



HAL
open science

Etude des relations entre les mutations EGFR/KRAS et les altérations de la voie p53/p14arf et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique, le complexe neurotensine et son récepteur1, dans les cancers bronchiques non à petites cellules

Mohamad Younes

► **To cite this version:**

Mohamad Younes. Etude des relations entre les mutations EGFR/KRAS et les altérations de la voie p53/p14arf et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique, le complexe neurotensine et son récepteur1, dans les cancers bronchiques non à petites cellules. Cancer. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66552 . tel-00839459

HAL Id: tel-00839459

<https://theses.hal.science/tel-00839459>

Submitted on 28 Jun 2013

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

YOUNES Mohamad

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Etude des relations entre les mutations EGFR/KRAS et les altérations de la voie p53/p14^{arf} et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique, le complexe neurotensine et son récepteur1, dans les cancers bronchiques non à petites cellules.

Thèse dirigée par Dr FORGEZ Patricia

Soutenue le 26/09/2012

Devant le jury composé de :

Pr Marie WISLEZ	Président
Pr Frédérique PENAULT-LLORCA	Rapporteur
Dr Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN	Rapporteur
Pr Sandrine FAIVRE	Examineur
Dr Patricia FORGEZ	Directeur de thèse
Pr Tabassome SIMON	Directeur de thèse

Etude des relations entre les mutations EGFR/KRAS et les altérations de la voie p53/p14^{arf} et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique, le complexe neurotensine et son récepteur1, dans les cancers bronchiques non à petites cellules.

Mohamad YOUNES. Unité INSERM U893, Centre de Recherche Saint-Antoine. Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris 12

Résumé

Le cancer bronchique est la première cause de mortalité mondiale. Son pronostic est très sévère. Les traitements restent très limités en terme de bénéfice à long terme. L'analyse des modifications génétiques et cellulaires de la cellule tumorale devrait améliorer nos connaissances sur la biologie de ce cancer et ouvrir de nouvelles voies pour le développement de stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons étudié le statut des mutations de TP53 et l'expression de p14^{arf} dans l'adénocarcinome bronchique muté pour EGFR ou KRAS ainsi que l'impact du système Neurotensine (NTS/NTSR1) sur la progression tumorale et la survie du cancer bronchique non à petites cellules.

Dans une série de 96 patients, l'analyse génomique a montré que les mutations de TP53, KRAS et EGFR ont été détectées dans respectivement 45.2%, 15.8% et 34.4% des cas. En parallèle, La diminution de l'expression de p14^{arf} a été observée dans 57.1% des cas. Le déficit de la voie p53/p14^{arf}, défini par la présence soit d'une mutation TP53 ou une diminution de l'expression p14^{arf} ou tous les deux, a été observé dans 83,3% des tumeurs mutées pour EGFR et dans 76,9% des tumeurs mutées pour KRAS. Nos résultats ont montré que les altérations de la voie p53/p14^{arf} sont des événements communs chez les patients opérés d'adénocarcinomes bronchiques et porteurs des mutations EGFR/KRAS, mais pas systématiques.

L'expression du NTSR1 a été recherchée par immunohistochimie dans plusieurs séries de patients présentant un adénocarcinome bronchique. L'expression de NTSR1 a été retrouvée dans 60.4% des patients de stades I ; 47% de stade II et 50% de stade III. Cette expression a été trouvée dans 51% des carcinomes épidermoïdes et 42% des carcinomes à grandes cellules. A l'analyse univariée et multivariée, l'expression du NTSR1 était associée significativement à un mauvais pronostic en terme de survie globale (p = 0,0081 pour stade I,

p = 0.0087 pour stade II-III). Par contre, le statut d'expression de NTSR1 n'était pas associé avec une différence significative en terme de survie globale pour le carcinome épidermoïde ou le carcinome à grandes cellules.

L'étude de l'implication de NTS dans l'agressivité du cancer bronchique a été réalisée *in vitro* et dans des tumeurs expérimentales en utilisant des lignées cellulaires très agressives exprimant le complexe NTS/NTSR1 ou de sous populations dont l'expression de la NTS ou du NTSR1 a été abolie par l'approche des ARN interférents. Le complexe NTS/NTSR1 augmente l'agressivité du cancer avec une coopérativité positive entre les cellules exprimant le complexe NTS/NTSR1 et celles qui expriment seulement le NTSR1 en augmentant de façon importante l'expression HER2 et HER3 et en induisant la transactivation des récepteurs EGFR, HER2 et HER3 par la libération des ligands HB-EGF et Neuréguline 1. L'ensemble de mes travaux soutient l'hypothèse selon laquelle le complexe NTS/NTSR1 contribue activement à l'agressivité et à la progression tumorale bronchique

Mots clés : cancer bronchique non-à petites cellules, EGFR, P53, neurotensine ; récepteur de la neurotensine; progression tumorale ; pronostic ; marqueur.

Study of the relationship between EGFR/KRAS mutations and p53/p14^{arf} alterations and characterization of novel therapeutic target, the neurotensin and its receptor1 complex, in non-small cell lung cancer

Mohamad YOUNES. Unité INSERM U893, Centre de Recherche Saint-Antoine. Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris 12, France

Summary

The lung cancer is the first cause of death worldwide. Its prognosis is severe. Treatments are limited in terms of long-term benefit. The analysis of cellular and genetic changes of tumor cells should enhance our understanding of the biology of this cancer and open new ways for the development of therapeutic strategies. In this context, we have studied, in the lung adenocarcinomas bearing EGFR or KRAS mutations, TP53/p14^{arf} status, and in the non-small cell lung cancer the contribution of Neurotensin system (NTS/NTSR1) on the tumoral progression and survival.

In a series of 96 patients, the genomic analysis has shown that TP53, KRAS and EGFR mutations were detected in 45.2 %, 15.8 % and 34.4 % of the cases respectively. In parallel, the p14^{arf} decrease expression was observed in 57.1 % of the cases. The deficit of the p53/p14^{arf} connection, defined by the presence of a TP53 mutations or p14^{arf} decrease expression or both, was observed in 83.3 % of EGFR mutated tumors and in 76,9 % of KRAS mutated tumors. Our results showed that the inactivation of the p53/p14^{arf} connection pathway is common but not systematic in EGFR or KRAS mutated lung adenocarcinomas.

The NTSR1 expression was studied by immunohistochemistry in several series of patients with lung adenocarcinoma. NTSR1 expression was found in 60.4 % of patients with stage I, 47% with stage II and 50% with stage III. This expression was found in 51 % of squamous cell carcinomas and 42 % of large cell carcinomas. In univariate and multivariate analysis, the NTSR1 expression were significantly associated with poor prognosis in terms of overall survival (p = 0.0081 for stage I, p = 0.0087 for stage II-III). On the other hand, the NTSR1 expression status was not associated with a significant difference in term of overall survival for squamous cell carcinoma or large cell carcinoma.

The study of the NTS involvement in the lung cancer aggressiveness was conducted in vitro and in experimental tumors using aggressive cell lines expressing the complex NTS/NTSR1 or subpopulations whose NTS or NTSR1 expression was abolished by the approach of RNA interference.

The NTS/NTSR1 complex increases the aggressiveness of the cancer with positive cooperativity between cells expressing the complex NTS/NTSR1 and those that express only the NTSR1, increasing significantly HER2 and HER3 expression and inducing the EGFR, HER2 and HER3 transactivation by the release of HB-EGF and neuregulin 1 ligands. This work supports the hypothesis that complex NTS/NTSR1 actively contributes to the aggressiveness and bronchial tumor progression.

Keywords: non-small cell lung cancer, EGFR, P53, neurotensin, Neurotensin receptor1, tumor progression, prognosis, marker

Remerciements

Toutes mes reconnaissances et mes remerciements à ma directrice de thèse, le Dr Patricia FORGEZ, qui m'a accueilli au sein de son équipe et qui m'a encadré au long de ce travail. Sa disponibilité à la discussion, son aide, et ses conseils précieux m'ont permis d'achever ce travail.

Je tiens à remercier mon ancien directeur de thèse le Pr Patrice JAILLON et ma directrice de thèse le Pr Tabassome SIMON pour leurs accueils, pour leurs gentillesse et leurs soutiens au long de cette thèse.

Je remercie le Pr Marie WISLEZ d'avoir accepté d'être le président du jury

Tous mes remerciements à Mme le Dr Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN et le Pr Frédérique PENAULT-LLORCA qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse

Je tiens à remercier le Pr Sandrine FAIVRE d'avoir accepté d'être examinateur de la thèse

Je remercie le Pr Marco ALIFANO avec lequel je partage une partie importante de ce travail. Je le remercie pour son aide et sa disponibilité remarquable.

Je remercie aussi le Pr Diane DAMOTTE qui a supervisé la sélection et la lecture des lames avec une grande disponibilité et gentillesse.

J'adresse un remerciement particulier au Pr Christos CHOUID, pour son aide, sa gentillesse et son soutien tout au long des années de thèse.

Je remercie le Dr Alexis CORTOT avec lequel je partage le premier travail.

Une grande merci à,

Le Pr Anne Gompel pour sa discussion avec moi et ses précieux conseils,

Menad AHMED-ZAID avec lequel j'ai travaillé pendant deux ans et j'ai partagé une partie de ce travail,

Le Pr Pierre HAINAUT qui m'a accueilli dans son laboratoire au (CIRC) et pour son soutien et son encouragement,

Mme Ghislaine MARTEL pour son précieux soutien et aide,

Les collègues de mon laboratoire : Zherui Wu, Sandra DUPOUY, Myriam GAMBERONI, Laudine DESREUMAUX, et DOAN VAN Kien, pour l'ambiance de travail, leurs conseils et leurs encouragements,

Madame Anne MARIE FAUSSAT pour son aide à réaliser les manip FACS,

Monsieur le Docteur Christian Gespach, avec lequel j'ai eu le plaisir de discuter souvent de l'avancement des travaux, en recevant des précieux conseils,

Madame Nadege MEUNIER BRUNEL pour la relecture du manuscrit,

Mes dernières pensées iront vers ma famille, et surtout mes parents et ma femme, qui m'auront permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui.

LISTE DES ABREVIATIONS

<u>ADAMS</u>	<i>Disintegrin and Metalloprotease -</i>
<u>ADNc</u>	<i>Acide desoxyribonucléique complémentaire</i>
<u>ANGII</u>	<i>Angiotensine II</i>
<u>AP-1</u>	<i>Activator protein 1.</i>
<u>APC</u>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<u>ARN</u>	<i>Acide ribonucléique</i>
<u>ATM</u>	<i>Ataxia teleangectasia mutated</i>
<u>ATP</u>	<i>Adénosine TriPhosphate</i>
<u>BAI-1</u>	<i>Brain-specific Angiogenesis Inhibitor</i>
<u>Bcl-2</u>	<i>B cell lymphoma/leukemia 2.</i>
<u>BAD</u>	<i>Bcl associated death protein</i>
<u>BAX</u>	<i>Bcl associated X protein</i>
<u>CBNPC</u>	<i>Cancer Bronchique Non à Petites Cellules</i>
<u>BPDE</u>	<i>Benzo à Pyrène Diol Epoxyde</i>
<u>BRCA1</u>	<i>Breast cancer type 1</i>
<u>BTC</u>	<i>Betacelluline</i>
<u>CPC</u>	<i>Cancer à petites cellules</i>
<u>CDK</u>	<i>Cyclin dependent kinase</i>
<u>CDKN2A</u>	<i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A</i>
<u>CIRC</u>	<i>Centre International de Recherche sur le Cancer</i>
<u>CIS</u>	<i>Cancer In Situ</i>
<u>CPS-1</u>	<i>Cancer Prevention Study-1</i>
<u>CPS-II</u>	<i>Cancer Prevention Study-II</i>
<u>CRE</u>	<i>cAMP response element.</i>
<u>DAG</u>	<i>Diacylglycérol.</i>
<u>DNAPK</u>	<i>DNA phosphokinase</i>
<u>E6AP</u>	<i>E6 Associated Protein</i>
<u>EGF</u>	<i>Epidermal growth factor.</i>
<u>EGFR</u>	<i>Epidermal growth factor- receptor.</i>
<u>ERE</u>	<i>Estrogen Responsive Element</i>
<u>ER</u>	<i>Eléments de Réponse</i>
<u>ERCC</u>	<i>Excision Repair Cross Complementing</i>
<u>ERK</u>	<i>Extracellular signal-regulated kinase.</i>
<u>FAK</u>	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
<u>GFO</u>	<i>Gain des Fonctions Oncogéniques</i>
<u>GDP</u>	<i>Guanine DiPhosphate</i>
<u>GPI</u>	<i>Ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol.</i>
<u>GRE</u>	<i>Glucocorticoid response element.</i>
<u>GPCR</u>	<i>G Protein Coupled Receptor</i>
<u>GSK-3β</u>	<i>Glycogène Synthase Kinase 3β</i>
<u>GTP</u>	<i>Guanine TriPhosphate</i>

<u>HB-EGF</u>	<i>Heparin-bindin epidermal growth facteur</i>
<u>HER2</u>	<i>Human epithelial growth facto receptor2.</i>
<u>HPA</u>	<i>Hydrocarbure Polycycliques Aromatiques</i>
<u>HAT</u>	<i>Histone Acétyl-Transférase</i>
<u>IGF</u>	<i>Insuline growth factor</i>
<u>IHC</u>	<i>Immunohistochimie</i>
<u>IL</u>	<i>Interleukin</i>
<u>IP3</u>	<i>Inositol-1, 4, 5-triphosphate.</i>
<u>ITK</u>	<i>Inhibiteur Tyrosine Kinase</i>
<u>IPASS</u>	<i>Iressa Pan-Asia Study</i>
<u>INVS</u>	<i>Institut de veille sanitaire</i>
<u>JNK</u>	<i>c-Jun N-terminal kinase.</i>
<u>kb</u>	<i>Kilobases.</i>
<u>KR</u>	<i>Doublets dibasiques Lys-Arg</i>
<u>KRAS</u>	<i>Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
<u>LPA</u>	<i>Lysophosphatique</i>
<u>LRP-DIT</u>	<i>Lipoprotein Receptor-related Protein-Deleted In Tumors</i>
<u>MAPK</u>	<i>Mitogen-activated protein kinase.</i>
<u>MDM2</u>	<i>Double minute 2 protein, mouse</i>
<u>MMP</u>	<i>Metallo-proteinase</i>
<u>MSP</u>	<i>Maladie Sans Progression</i>
<u>NGF</u>	<i>Nerve growth factor.</i>
<u>NN</u>	<i>Neuromédine N.</i>
<u>NOs</u>	<i>Nitric oxide synthase</i>
<u>NRG</u>	<i>Neuroguline</i>
<u>NTS</u>	<i>Neurotensine.</i>
<u>NTSR1</u>	<i>Récepteur de la neurotensine de sous-type 1.</i>
<u>NTSR2</u>	<i>Récepteur de la neurotensine de sous-type 2.</i>
<u>NTSR3</u>	<i>Récepteur de la neurotensine de sous-type 3.</i>
<u>OMS</u>	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
<u>PC</u>	<i>Prohormones convertases.</i>
<u>PDGF</u>	<i>Plateleet derived growth factor</i>
<u>PAL2</u>	<i>Phospholipase A2</i>
<u>PI3K</u>	<i>Phosphoinositide-3-kinase.</i>
<u>PIP2</u>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate</i>
<u>PKC</u>	<i>Protéine kinaseC.</i>
<u>PLC</u>	<i>Phospholipase C.</i>
<u>PTP</u>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<u>Rac1</u>	<i>Protéines Tyrosine Phosphatases</i>
<u>RAP</u>	<i>Receptor associated protein.</i>
<u>RB</u>	<i>retinoblastoma</i>
<u>RCPG</u>	<i>Récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques.</i>
<u>ROS</u>	<i>Reactive Oxygen Species</i>

<u>RTK</u>	<i>Receptor tyrosin kinase</i>
<u>SAP</u>	<i>Sphingolipid activator protein</i>
<u>SNC</u>	<i>Système nerveux central.</i>
<u>SOS</u>	<i>Son of Sevenless</i>
<u>TCF/Lef</u>	<i>T Cell Factor</i>
<u>TGF</u>	<i>Transforming growth factor</i>
<u>STATS</u>	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
<u>TM</u>	<i>Tranmembranaire</i>
<u>TNM</u>	<i>Tumor Nodes Metastasis</i>
<u>TRAIL-R2</u>	<i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Receptor2</i>
<u>uPA</u>	<i>Urokinase-type plasminogen activator.</i>
<u>uPAR</u>	<i>Urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
<u>VEGF</u>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<u>Vps10p</u>	<i>Vacuolar protein-sorting 10 protein.</i>

Table des matières

AVANT-PROPOS	15
I - INTRODUCTION	17
1 Epidémiologie du cancer bronchique.....	17
2 Facteurs de risque de cancer bronchique	19
2.1 Tabagisme actif	19
2.2 Tabagisme passif.....	22
2.3 Exposition professionnelle aux carcinogènes	22
2.4 Pollution atmosphérique	24
2.5 Susceptibilité individuelle.....	25
2.6 Maladie pulmonaire sous-jacents.....	26
3 Histopathologie du cancer bronchique	26
3.1 Les quatre principaux types histologiques de CBNPC.....	28
3.1.1 Cancer bronchique épidermoïde	28
3.1.2 Adénocarcinome bronchique.....	28
3.1.3 Carcinome à petites cellules.....	31
3.1.4 Carcinome à grandes cellules	31
4 Classification du cancer bronchique.....	32
5 Orientation thérapeutique Actuelle.....	34
6 Biologie du cancer bronchique.....	35
6.1 Anomalies chromosomiques	35
6.2 Carcinogénèse bronchique	39
7 TP53.....	41
7.1 Gène et structure de TP53.....	41
7.2 Régulation de P53	42
7.3 Mécanisme d'activation de p53.....	43
7.3.1 Etapes d'activation de p53 - cas de lésion de l'ADN.....	44
7.4 Fonctions et conséquence d'activation de P53	46
7.4.1 Cycle cellulaire.....	47
7.4.2 Apoptose	48
7.4.3 Inhibition de l'angiogénèse	48
7.5 P53 et cancer bronchique.....	48
7.5.1 Mécanisme d'inactivation de P53	50
7.5.1.1 Mutations p53.....	50
7.5.1.1.1 Type de mutations.....	50
7.5.1.1.2 Statut tabagique et mutations p53	52
7.5.1.1.3 Conséquence des mutations de p53	54
7.5.1.2 Surexpression de mdm2.....	57
7.5.1.3 Perte de l'expression de p14	57
8 Famille des récepteurs ErbB/HER à activité tyrosine kinase	58
8.1 Famille HERs	58
8.2 Structure d'HERs	58
8.3 Ligands d'HERs	59
8.4 Mécanisme d'activation et voies de signalisation	60
8.4.1 Mécanisme d'activation.....	60
8.4.2 Voies de signalisations activées par les HERs.....	61
8.4.2.1 Ras/MAPK.....	62
8.4.2.2 Kinase Src.....	63
8.4.2.3 Voie JAKs et STATs.....	63
8.4.2.4 Voie PI3K	63
8.4.2.5 Voie Phospholipase C	64

8.5	<i>Régulation de la famille HERs</i>	64
8.5.1	<i>Régulation négative par l'internalisation et l'endocytose</i>	64
8.5.2	<i>Déphosphorylation</i>	67
8.5.3	<i>Régulation positive</i>	67
8.6	<i>Famille HERs et cancer</i>	67
8.6.1	<i>Mécanisme contribuant à l'activation constitutive d'HERs</i>	71
8.6.1.1	<i>Mutations HERs</i>	71
8.6.1.1.1	<i>Types de mutations</i>	71
8.6.1.1.2	<i>Caractéristiques cliniques des mutations EGFR</i>	72
8.6.1.1.3	<i>Rôle oncogénique des mutations EGFR</i>	73
8.6.1.1.4	<i>Implication clinique des mutations EGFR</i>	73
8.6.1.1.5	<i>HER2</i>	76
8.6.1.1.6	<i>HER3 et HER4</i>	76
8.6.1.2	<i>Surexpression de récepteurs ou leurs ligands</i>	77
8.6.1.3	<i>Transactivation d'EGFR par les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG)</i>	78
8.6.1.4	<i>Synergie entre voie Wnt/Fz et HER</i>	78
8.6.1.5	<i>Mutations Ras</i>	79
8.6.1.5.1	<i>Caractéristiques des mutations Ras</i>	79
8.6.1.5.2	<i>Implications cliniques des mutations KRAS</i>	80
8.7	<i>Rôle spécifique HER2/HER3 - dimère le plus active</i>	80
8.7.1	<i>Evasion de l'endocytose</i>	80
8.7.2	<i>Couplage aux voies de signalisation puissantes</i>	81
8.7.3	<i>HER2/HER3 fonctionnent ensemble pour promouvoir la transformation</i>	82
9	<i>Système neurotensinergique</i>	84
9.1	<i>Neurotensine</i>	84
9.1.1	<i>NTS : synthèse, stockage, libération et dégradation</i>	85
9.1.1.1	<i>Synthèse</i>	85
9.1.1.2	<i>Stockage et libération et taux plasmatique de NTS</i>	87
9.1.1.3	<i>Dégradation</i>	87
9.1.2	<i>Gène de la NTS et régulation génique</i>	88
9.1.3	<i>Localisation</i>	89
9.2	<i>Récepteurs de la neurotensine</i>	90
9.2.1	<i>Récepteur de haute affinité NTSR1</i>	90
9.2.1.1	<i>Structure fonctionnelle</i>	90
9.2.1.2	<i>Localisation</i>	91
9.2.1.2.1	<i>En périphérie</i>	91
9.2.1.2.2	<i>Dans le SNC</i>	91
9.2.2	<i>Récepteur NTSR2</i>	92
9.2.3	<i>Récepteur NTSR3</i>	93
9.3	<i>Rôles physiologique de NTS</i>	94
9.3.1	<i>Effets centraux</i>	94
9.3.2	<i>Effets périphériques</i>	94
9.3.2.1	<i>Dans le tractus gastro-intestinal</i>	94
9.3.2.2	<i>Système cardio-vasculaire</i>	95
9.3.2.3	<i>Effet immunomodulateur et de réparation tissulaire</i>	95
9.4	<i>Système neurotensinergique et cancer</i>	96
9.4.1	<i>Dérégulation du système neurotensinergique dans les tissus tumoraux</i>	96
9.4.1.1	<i>Dérégulation de NTS</i>	96
9.4.1.2	<i>Dérégulation de NTSR1</i>	97
9.4.1.3	<i>Régulation de NTSR1 par son ligand</i>	98
9.4.2	<i>Signalisations oncogéniques associées à l'activation de NTSR1</i>	99

9.4.2.1	Voie PKC/ERK	100
9.4.2.2	RhoGTPases, et non-récepteur kinase FAK et Src	101
9.4.2.3	Transactivation EGFR	101
9.4.2.4	Rôles oncogéniques de la NTS	102
9.4.2.4.1	Rôle prolifératif de NTS	102
9.4.2.4.2	Rôle dans les processus migratoire et l'invasif	103
9.4.2.4.3	Rôle néoangiogénique	105
9.4.2.4.4	Rôle pronostique de NTSR1	106
II – RATIONEL DE L'ETUDE		107
III - RESULTATS		110
1	Partie I : Altération de la voie p53 dans le CBNPC porteurs d'une mutation d'EGFR ou KRAS... ..	110
1.1	Introduction	110
1.2	Méthode	111
1.2.1	Population	111
1.2.2	Mutation	111
1.2.3	Expression de P14 ^{arf}	111
1.3	Résultats	112
1.3.1	Détection des mutations d'EGFR, KRAS et P53	112
1.3.2	Expression p14 ^{arf}	112
1.3.3	Association entre les mutations d'EGFR, KRAS, et les altérations de TP53/p14 ^{arf}	113
1.4	Discussion	114
1.4.1	Association des altérations de la voie p14 ^{arf} /p53 et mutations d'EGFR/KRAS.....	114
1.4.2	Impact des altérations de la voie p53 sur la réponse aux ITK dans les cancers bronchiques porteurs de mutation d'EGFR	116
1.4.3	Mutations EGFR/KRAS, TP53 : caractéristiques	119
1.5	Conclusion.....	119
Article I		120
2	Partie II : Nouveau marqueur pronostique dans la prise en charge des patients opérés de CBNPC : le NTSR1.....	135
2.1	Implication du couple NTS-NTSR1 dans le pronostic des adénocarcinomes pulmonaires non à petites cellules de stade I.....	135
Article II		137
2.2	Implication du couple NTS-NTSR1 dans le pronostic de CBNPC stades II-III	149
2.2.1	Méthodes	149
2.2.1.1	Pathologie humaine : population étudiée.....	149
2.2.1.2	Immunohistochimie	150
2.2.1.3	Analyse statique.....	150
2.2.2	Résultats	153
2.2.2.1	Expression de NTSR1 dans le stade II d'adénocarcinome : impact sur le pronostic....	153
2.2.2.2	Expression de NTSR1 dans les stades III et II-III : impact sur le pronostic	154
2.2.2.3	Expression de NTSR1 dans les carcinomes épidermoïdes et à grandes cellules : impacte sur la survie.	156
2.2.3	Discussion générale de deux travaux	158
2.2.3.1	Rôle pronostique de NTSR1 dans le CBNPC	159
2.2.3.2	Dérégulation de l'expression de NTSR1 et de NTS dans le cancer bronchique	162
2.2.3.3	Rôle dans l'invasion tumorale ?.....	164
2.2.4	Conclusion et perspectives	164
Article III		166
3	Partie III ; Implication du système neurotensinergique dans la progression tumorale	183
3.1	Résultats	183

3.1.1	<i>Modèles cellulaires du cancer bronchique</i>	183
3.1.2	<i>Tumeurs expérimentales, rôle du complexe NTS-NTSRI favorisant la progression tumorale.</i>	186
3.1.2.1	<i>Coopération cellulaire induisant l'amplification de la croissance tumorale</i>	186
3.1.2.2	<i>Implication du NTS-NTSRI dans la promotion de la croissance tumorale</i>	187
3.1.2.3	<i>Régulation auto-paracrine ou endocrine de la NTS favorise la croissance tumorale ..</i>	189
3.1.3	<i>Implication du système neurotensinergique dans la prolifération cellulaire-mécanismes associés, étude in vitro,</i>	191
3.1.3.1	<i>Promotion de la prolifération cellulaire induite par le complexe NTS-NTSRI</i>	191
3.1.3.2	<i>Propriétés prolifératives et anti-apoptotiques du couple NTS-NTSRI</i>	193
3.1.3.3	<i>Voies de signalisation impliquées en aval du NTSRI</i>	194
3.1.4	<i>Interrelation entre les systèmes HERs et NTSRI</i>	195
3.1.4.1	<i>Implication de la famille d'HERs dans l'effet prolifératif du complexe NTS-NTSRI ...</i>	195
3.1.4.2	<i>Modification de l'expression basale des HERs induite par la stimulation du système neurotensinergique.</i>	197
3.1.4.3	<i>Mécanisme potentiel impliqué dans la surexpression des récepteurs d'HERs</i>	200
3.1.4.4	<i>Transactivation des récepteurs HERs par l'intermédiaire du complexe NTS-NTSRI ..</i>	201
3.1.4.5	<i>Ligands impliqués dans la transactivation de la famille HERs</i>	202
3.2	<i>Discussion</i>	205
3.2.1	<i>Impact de NTS-NTSRI sur la croissance tumorale, signalisations associées</i>	206
3.2.1.1	<i>NTS facteur favorisant la croissance tumorale</i>	206
3.2.1.2	<i>Impact de la concentration de NTS sur l'effet prolifératif du système neurotensinergique</i>	207
3.2.1.3	<i>Croissance cellulaire ; signalisations associées</i>	208
3.2.2	<i>Interrelation entre l'expression NTSRI et la famille HERs</i>	209
3.2.2.1	<i>Surexpression d'HERs induite par NTS-NTSRI</i>	209
3.2.2.2	<i>HER2/HER3 : Dimère prédominant-rôle dans l'agressivité tumorale</i>	210
3.2.2.3	<i>Transactivation de la famille d'HERs induit par NTS-NTSRI</i>	211
3.3	<i>Conclusion</i>	213
3.4	<i>Méthodes</i>	214
3.4.1	<i>Xénogreffes tumorales</i>	214
3.4.2	<i>Culture cellulaire</i>	214
3.4.3	<i>Test de prolifération cellulaire.</i>	214
3.4.4	<i>Extraction d'ARN</i>	216
3.4.5	<i>RT-PCR et PCR quantitative.</i>	216
3.4.6	<i>Cytométrie en flux.</i>	217
3.4.7	<i>Western Blot</i>	217
3.4.8	<i>Radioimmunoassay (RIA)</i>	218
3.4.9	<i>Transfection</i>	218
3.4.10	<i>Immunocytochimie</i>	218
3.4.11	<i>ELISA</i>	219
	IV- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	220
	V- ANNEXE	223
	VI- REFERENCES	232

AVANT-PROPOS

Problématique

Le cancer bronchique constitue un problème majeur de la santé publique de par sa fréquence et sa mortalité élevée. En France, son taux d'incidence occupe le quatrième rang avec 30 600 cas par an. C'est la première cause de mortalité par cancer avec 26 600 décès par an. L'épidémie mondiale de tabagisme au cours des dernières décennies a considérablement augmenté au fil des années l'incidence de cette maladie. Plus récemment, les changements dans les caractéristiques de cigarettes ont entraîné des lésions distales plus fréquentes, souvent de type histologique adénocarcinomeux.

Malgré les progrès dans la prise en charge médicale et chirurgicale, la survie à long terme reste médiocre avec des chiffres globaux entre 10 et 20 % à 5 ans. Le stade de la maladie reste l'élément principal qui définit le pronostic et l'orientation thérapeutique. Les modalités thérapeutiques mises en œuvre pour améliorer la survie ont montré leurs limites. Ainsi, la chirurgie, traitement le plus efficace, qui s'adresse aux formes les moins évoluées, a montré ses limites, même si elle s'accompagne d'un traitement néoadjuvant ou adjuvant. La radiothérapie en association avec la chimiothérapie a une efficacité limitée, même si elle améliore un peu la survie des patients porteurs d'une tumeur localisée. La chimiothérapie des formes avancées améliore modestement le pronostic. L'efficacité thérapeutique, en termes de survie, est hétérogène, même pour les stades les plus précoces, par exemple : 30 à 40 % des patients opérés de stade I décèdent pendant les 5 premières années en raison de la récurrence de leur maladie. En d'autres termes, les résultats de survie de la prise en charge actuelle, qui basent essentiellement sur le stade de la maladie, ne sont pas toujours satisfaisants (+++). Cela souligne la nécessité de rechercher de nouveaux marqueurs pronostiques capables de

déterminer les patients à haut risque de récurrence ainsi que des facteurs impliqués dans la croissance et la progression tumorale, et par-delà adapter à l'échelle individuelle le traitement et le suivi.

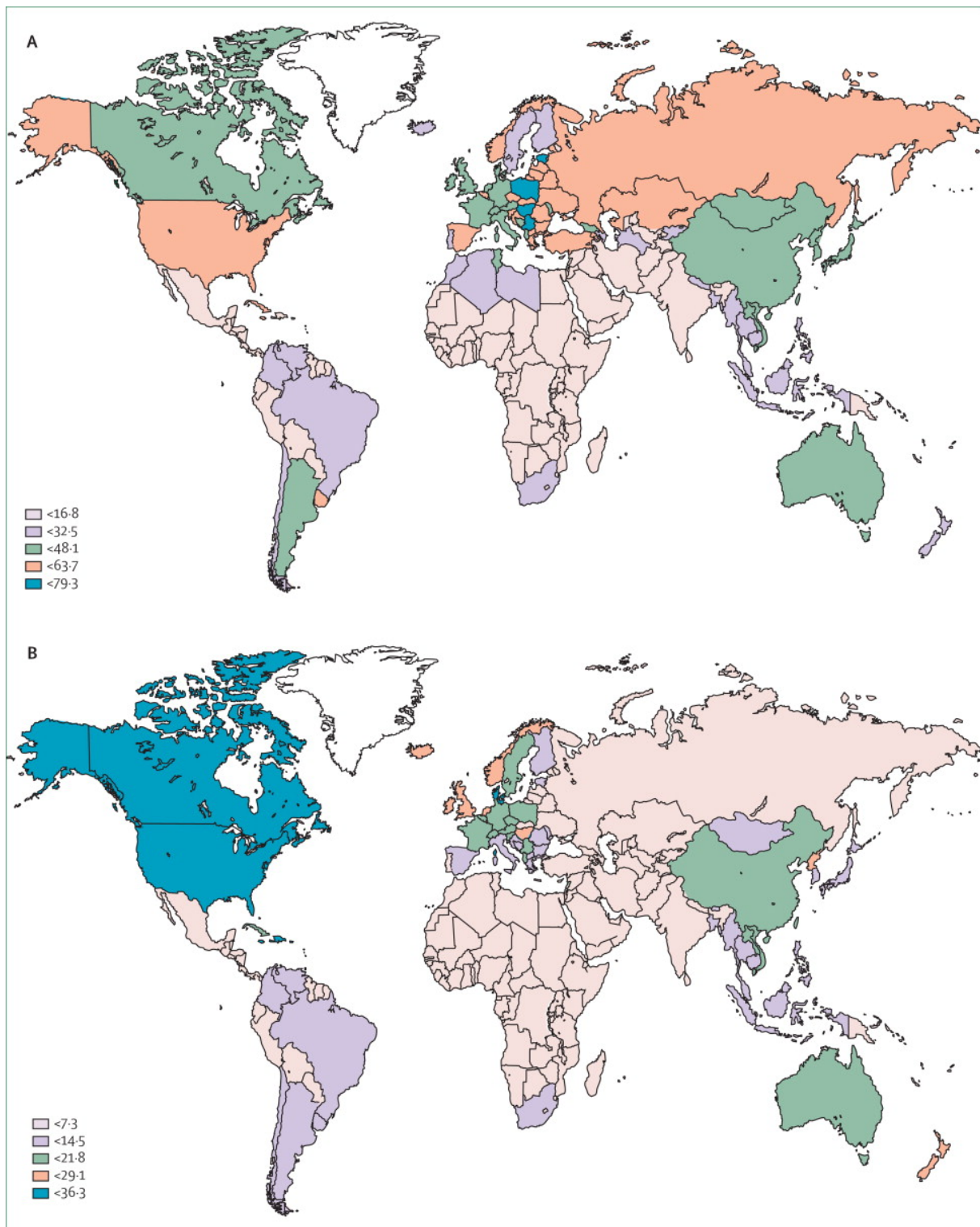
Dans ce contexte, j'ai étudié les relations entre les altérations de voie p53/p14^{arf} et les mutations EGFR/KRAS en tant que facteurs qui pourraient avoir un rôle dans la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase (partie I), d'une part, et d'autre part, j'ai exploré et caractérisé le rôle éventuel du système de neurotensine comme facteur pronostique de survie, mais également impliqué dans la progression du cancer bronchique (parties II et III).

I - INTRODUCTION

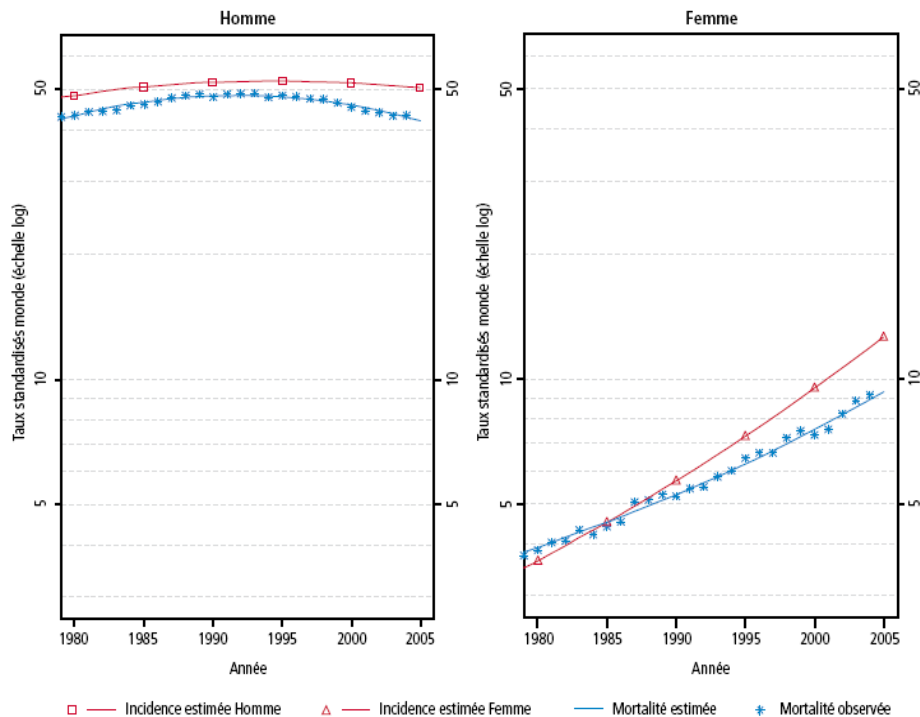
1 EPIDEMIOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE

Le cancer bronchique représente un enjeu majeur de la santé publique mondiale, il s'agit du premier cancer par incidence et mortalité (figure 1). En France, avec 30600 nouveaux cas estimés en 2009 ((Institut National de Veille Sanitaire (INVS 2009)), le cancer du poumon se situe au 4^{ème} rang. Il représente 9,6 % de l'ensemble des cancers incidents, et se situe, par sa fréquence, au 2^e rang chez l'homme derrière le cancer de la prostate et au 3^e rang chez la femme, derrière le cancer du sein et les cancers colorectaux. Les taux d'incidence standardisés sont de 50,5 chez l'homme et de 12,6 chez la femme. Cependant, avec 26 600 décès par an, ce cancer se situe au 1^{er} rang des décès par cancer : il représente 18,3 % de l'ensemble des décès par cancer. (<http://www.invs.sante.fr/publications/2009/>).

Chez l'homme, l'augmentation de l'incidence observée jusqu'à la fin des années 1990 s'est inversée en 2000 avec une décroissance moyenne annuelle de 0,5 % du taux d'incidence qui passe de 51,9 à 50,5 entre 2000 et 2005. Une diminution parallèle de -1.7 a également été observée pour la mortalité. La diminution de l'incidence est expliquée par la baisse de la consommation tabagique. Chez la femme, l'incidence du cancer pulmonaire observée continue à augmenter avec un taux moyen de +5,1 % pour la période étudiée de 1980 à 2005 et une augmentation plus importante sur la dernière période (+5,8 % par an entre 2000 et 2005) (figure 2). Le taux d'incidence passe ainsi de 3,6 en 1980 à 12,6 en 2005. Cette augmentation s'observe aussi pour la mortalité. L'incidence du cancer pulmonaire reste plus élevée chez les hommes, mais l'écart entre les hommes et les femmes diminue.



(Figure 1) Incidence de cancer bronchique au niveau mondial chez les hommes (A) et chez les femmes (B) (Brennan, Hainaut et al. 2011)



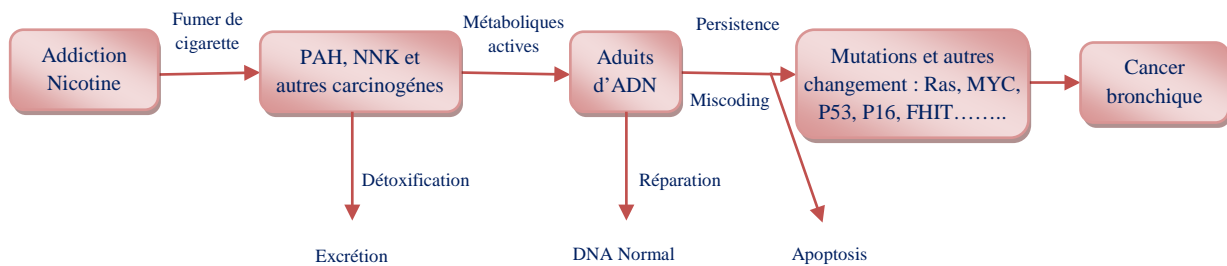
(Figure 2) Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer bronchique, en France, chez les hommes et les femmes

2 FACTEURS DE RISQUE DE CANCER BRONCHIQUE

2.1 Tabagisme actif

Un seul agent étiologique (la fumée de cigarette) est de loin la cause principale du cancer bronchique étant responsable de 90 % des cas. Le risque de développer un cancer bronchique chez les fumeurs est 20 fois supérieur, à celui des non-fumeurs. Ce risque, chez les fumeurs, augmente avec la durée de consommation du tabac, ainsi que le nombre de cigarettes fumées par jour (Doll and Peto 1978). Doll et Peto ont proposé un modèle quantitatif pour évaluer le risque du cancer bronchique sur la base des données d'étude de médecins britanniques (Doll and Peto 1978). Ce modèle a montré un effet plus important de la durée de consommation que de la quantité. Ainsi, le triplement du nombre de cigarettes fumées par jour triple le risque tandis que le triplement de la durée de consommation multiplie le risque par 100. Ces dimensions quantitatives de risque de cancer bronchique ont une importance concernant l'augmentation de fumer parmi les jeunes. L'exposition précoce de l'arbre bronchique aux composants cancérigènes de la fumée de tabac va augmenter le risque de survenue d'un cancer bronchique. Par conséquent, la précocité de début de tabagisme renforce l'effet de durée d'exposition.

La fumée de cigarette est un mélange de près de 4000 éléments dont une soixantaine ont été reconnus cancérigènes pour l'homme (Hecht 2002). Les carcinogènes les plus puissants sont les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA) (comme le benzo-a-pyrène), les N-nitrosamines et les amines aromatiques. La nicotine est le médiateur de la dépendance au tabagisme, mais elle n'est pas carcinogène. C'est l'association des produits carcinogènes renfermée dans la fumée à la nicotine qui rend son inhalation dangereuse (figure 3).



(Figure 3). Cancer bronchique lié au tabac. Schéma liant le cancer de poumon à la dépendance à la nicotine par l'intermédiaire des carcinogènes de tabac et leur induction de multiples mutations dans des gènes critiques (Alberg, Ford et al. 2007).

A partir des années 50, la composition des cigarettes a été changée avec la production des cigarettes avec filtres puis l'ajout des trous aux filtres pour diluer la fumée avec l'air extérieur. Ce changement marqué par la diminution théorique de nicotine et de goudron (résidu noir présent dans la fumée et composé de centaines de substances chimiques dont certaines considérées cancérigènes) inhalés entraîne que le fumeur qui a besoin de sa dose de nicotine inhale plus souvent et plus profondément la fumée de cigarette.

L'effet de ce changement sur le risque de cancer bronchique a été évalué dans plusieurs études ; dans l'étude de CPS-I (Cancer Prevention Study-I) (Hammond, Garfinkel et al. 1976), le risque de décès de cancer du poumon chez les fumeurs a été évalué en divisant les fumeurs en trois catégories par rapport à la typologie de cigarettes fumées (faible quantité de goudron [inférieure à 17.6 mg/cigarette] ; quantité intermédiaire [supérieure à 17.6 mg/cigarette et inférieure à 25.8 mg/cigarette] ; haute quantité [supérieure à 25.8 mg/cigarette]). Il a été observé que les risques standardisés de mortalité pour cancer pulmonaire chez les fumeurs de cigarettes à quantité faible et intermédiaire de goudron étaient approximativement de 80 % par rapport aux fumeurs de cigarettes à quantité haute de goudron. Cependant, ce

résultat n'a pas été trouvé dans l'étude CPS-II (Harris, Thun et al. 2004). Dans cette étude, un risque relatif égal à 1 de décéder d'un cancer bronchique est attribué par convention aux fumeurs de cigarettes (rendement en goudrons de 15 à 21 mg par cigarette). Les fumeurs de cigarettes ultralégères (rendement maximum de 7 mg de goudrons par cigarette) ont un risque relatif égal à 1.17 (IC 95 % : 0.95-1.45) alors que les fumeurs de cigarettes légères (un rendement en goudrons de 8 à 14 mg par cigarette) ont un risque relatif de décéder d'un cancer bronchique égal à 1.02. (IC 95 % : 0.90-1.16). Par ailleurs, il a été observé que le taux de cancer bronchique était plus élevé chez les patients participants à l'étude CPS-II que ceux qui ont participé à l'étude CPS-I, même si ces derniers ont consommé des cigarettes très chargées. De même, dans l'étude des médecins britanniques (Doll, Peto et al. 1994), les risques de décès par cancer bronchique ont été évalués pendant une première et une deuxième période de 20 ans avec un suivi de 40 ans. La mortalité de cancer du poumon a augmenté parmi les fumeurs de la deuxième période (de 1971 à 1991), bien que le rendement en nicotine et en goudrons aient considérablement diminué dans les cigarettes pendant cette période. Pendant la période de suivi, le taux de mortalité de cancer du poumon annuel parmi les fumeurs était 264 et 314 pour 100 000 personnes pendant la première et la seconde période respectivement. De ce fait, la diminution du rendement en nicotine et en goudron n'a aucun effet sur le risque de cancer bronchique.

En fait, le changement de la façon de fumer (inhalation profonde et fréquente), engendré par la diminution de nicotine et de goudron dans la fumée, a modifié l'exposition des voies aériennes aux carcinogènes de tabac. D'une part, les carcinogènes qui s'arrêtaient dans la trachée et les bronches souches sont entraînés plus loin dans les voies aériennes distales et d'autre part, cette modification était associée au changement proportionnel des constituants de la fumée, marqué par une diminution de HPA qui est expérimentalement responsable de cancer épidermoïde, et par une augmentation des nitrosamines qui sont mis en cause chez l'animale dans le développement d'adénocarcinome (Hecht 2002). Ces changements ont été considérés comme un des facteurs amenant à l'augmentation de l'incidence des adénocarcinomes bronchiques

Par ailleurs, le sevrage tabagique est bénéfique à tout âge. Il augmente l'espérance de vie et il diminue le risque de cancer en comparaison avec les fumeurs (Doll, Peto et al. 1994). Ainsi, plus la durée de sevrage est longue, plus le risque de cancer bronchique diminue (Mulcahy

1990). Toutefois, même pour des périodes de sevrage de 40 ans, le risque de cancer du poumon chez les ex-fumeurs reste élevé par rapport aux non-fumeurs (Mulcahy 1990). En plus, l'intérêt d'arrêter de fumer dépend aussi de la durée de tabagisme. En fait, pour une durée donnée de sevrage, la diminution du risque du cancer bronchique augmente si la durée de tabagisme diminue (Mulcahy 1990).

2.2 Tabagisme passif

Le tabagisme passif est l'inhalation par les non-fumeurs, de la fumée dégagée par un fumeur. Les premières études examinant l'apparition éventuelle des cancers bronchiques primitifs chez les fumeurs passifs ont été réalisées en 1981 puis les études se sont poursuivies. Dans ce contexte, Trichopoulos et al, ont montré un risque augmenté de cancer pulmonaire chez les femmes non-fumeuses mariées à des hommes fumeurs, par rapport aux femmes non-fumeuses mariées à des hommes non-fumeurs (Trichopoulos, Kalandidi et al. 1981). Hackshaw et al. ont conclu à une augmentation de 26 % du risque de cancer bronchique pour un non-fumeur exposé à la fumée de tabac environnemental (Hackshaw, Law et al. 1997). De même, Boffetta a aussi montré une augmentation de risque de 17 % chez les hommes non-fumeurs exposés à la fumée de fumeurs dans le lieu de travail (Boffetta 2002). En 2002, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a reconnu le rôle carcinogène de tabagisme passif pour le poumon (2004). Il est aujourd'hui estimé que le tabagisme passif est responsable d'approximativement 3000 morts pour cancer du poumon chaque année aux Etats-Unis (Environmental Protection Agency, 1992) et 1200 en Europe dont un peu plus d'une centaine en France (Tredaniel, Boffetta et al. 1997).

2.3 Exposition professionnelle aux carcinogène

A côté du tabagisme, mais souvent associés à lui, d'autres facteurs, essentiellement les expositions professionnelles à des composés carcinogènes, augmentent le risque de cancer bronchique (Steenland, Loomis et al. 1996). Plusieurs études de cas-témoins ont montré que les expositions professionnelles aux facteurs carcinogènes sont responsables de 9 à 15 % de cancer de poumon. En Europe, il a été estimé que le risque de cancer de poumon dû à l'exposition à des facteurs professionnels est de 13%. En France, selon l'INVS, entre 2731 et 6051 nouveaux cas de cancers bronchiques sont imputables à l'exposition professionnelle

provoquant entre 2433 et 5427 décès par an. (http://www.invs.sante.fr/pmb/invs/%28id%29/PMB_6053).

L'exposition au Benzo à pyrène qu'on trouve chez les travailleurs exposés au goudron ou à la combustion de coke augment le risque de cancer bronchique (Lloyd 1971). Les expositions professionnelles aux certains métaux comme l'arsenic, le chrome, et le nickel, sont aussi considérés comme cause de cancer de poumon.

Le rôle carcinogène de cristaux de silice est controversé. Une méta-analyse (Smith, Lopipero et al. 1995) a montré que les patients porteurs des silicozes ont deux fois plus de risque d'avoir un cancer bronchique par rapport aux témoins. Cependant, l'effet du tabagisme n'a pas été pris en compte pour beaucoup d'étude de cette méta-analyse. En 1997, le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) a effectivement classé les cristaux de silice comme un carcinogène pour l'homme (1997).

L'amiante est le premier des carcinogènes professionnelles. Son implication dans l'émergence des cancers bronchiques a été reconnue dès 1950. Doll et al ont observé que les ouvriers manipulant les textiles ont un risque 10 fois plus que la population générale de déclarer un cancer bronchique (Doll 1955). En France, l'INVS a estimé que plus de 12% de cancer de poumon des hommes de plus de 55 ans et environ 7 % de ceux de 35 à 55 ans peuvent être attribués à l'amiante. L'amiante et le tabac sont des facteurs indépendants de cancer pulmonaire, mais lorsqu'ils sont associés, ils agissent de façon synergique avec une augmentation du risque qui semble multiplicative (Nelson and Kelsey 2002). Le fait que l'amiante agisse directement comme carcinogène ou à travers des mécanismes indirects comme l'induction d'une inflammation chronique reste à déterminer; le tabagisme pourrait augmenter les effets des fibres d'amiante en favorisant leur rétention au niveau de l'appareil respiratoire (Churg and Stevens 1995).

Une incidence élevée de cancer bronchique a été trouvée chez les mineurs d'uranium depuis longtemps. L'exposition au radon a été considérée comme classiquement, de type professionnel malgré l'existence d'une pollution environnementale non négligeable, étant donné que des quantités relativement importantes de radon sont présentes dans beaucoup de matériaux de construction d'origine volcanique (en particulier les sols et certains types de briques). Le tabagisme et le radon agissent de façon synergique et augmentent le risque de

cancer pulmonaire d'une manière additive. Une revue des études cas-témoins (Field 2001) effectuée aux Etats-Unis a conclu que l'exposition résidentielle au radon est la deuxième cause de cancer bronchique. Il est estimé que 15 000 à 20 000 décès annuels par cancer bronchique sont dus à l'exposition au radon (Alberg and Samet 2003). Des radiations à plus faible transfert linéaire d'énergie (rayon X et gamma) ont été également considérées comme facteurs de risque du cancer pulmonaire. Il a été montré que les patients qui ont été traités par radiothérapie pour la tuberculose ont un risque plus élevé de développer secondairement un cancer bronchique (Davis, Boice et al. 1989).

2.4 *Pollution atmosphérique*

Pendant une journée type, un adulte inhale, en moyen, 15 000 l d'air par jour. En conséquence, les agents carcinogènes présents dans l'air, même à de faibles concentrations, pourraient être un facteur de risque. Les carcinogènes présents dans l'atmosphère sont principalement les HPA générés majoritairement de la combustion de fuels fossiles utilisés pour le chauffage et les transports, les métaux tels que le nickel, l'arsenic, et le chrome, la fumée toxique dégagée par les usines, le radon, et les produits de combustion de tabac.

Le risque de la pollution atmosphérique a été évalué dans plusieurs études cas-témoins et cohortes. Speizer et al, ont montré que la pollution atmosphérique n'était pas un facteur de risque pour les cancers bronchiques. Cependant, les méthodes de mesure de la pollution étaient approximatives (Speizer 1983). Deux études prospectives (Dockery, Pope et al. 1993; Pope, Thun et al. 1995) ont révélé que la pollution est faiblement associée au cancer bronchique. Dans la première (Dockery, Pope et al. 1993), après ajustement sur les facteurs de confusion, tels que l'âge, le tabagisme et le statut socio-économique, les personnes résidant aux endroits exposées à haute concentration de molécules ont un risque de 1.4 de décéder de cancer de poumon en comparaison avec ceux résidant aux endroits moins pollués. De même, dans la deuxième étude (Pope, Thun et al. 1995), il a été observé une augmentation de risque de cancer bronchique (RR 1.4 ; 95% CI, 1.1 à 1.7) chez les personnes résidentes dans des lieux pollués par le sulfate en comparaison à celles résidentes dans des lieux moins pollués. Dans une autre étude (Pope, Burnett et al. 2002), une augmentation de 14% de risque de cancer de poumon a été observée pour chaque augmentation de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dans la concentration des particules dans l'air environnemental. Doll et Peto ont estimé que 1 à 2 %

des cancers bronchiques peuvent être attribués à la pollution atmosphérique (Doll and Peto 1981).

2.5 *Susceptibilité individuelle*

La susceptibilité génétique au cancer bronchique a longtemps été postulée. Les facteurs environnementaux, même la fumée de cigarette, provoquent le cancer bronchique chez une minorité de personnes exposées, ce qui suggère que la sensibilité est déterminée de manière inhérente. Des études épidémiologiques de types cas-témoins et cohortes ont montré que l'histoire familiale augmente le risque de cancer bronchique (Matakidou, Eisen et al. 2005), la plupart de ces études ont bien contrôlé pour la consommation tabagique. Une étude épidémiologique, menée par Schwartz, a montré une association entre le risque de cancer bronchique chez les proches de premier degré et l'histoire familiale (Schwartz, Yang et al. 1996). Cette association était plus forte lorsque le diagnostic a été fait entre les âges de 40 à 59 ans par rapport aux personnes plus âgées, ce qui suggère que les facteurs génétiques sont plus importants quand le cancer survient à un âge précoce. Les études biologiques ont montré que les variabilités individuelles touchant les deux étapes de détoxification de carcinogènes de tabac, pourraient être responsables de cette prédisposition au cancer bronchique. Le métabolisme des carcinogènes de tabac, en particulier l'HPA, conduit dans une première étape à la formation des métabolites intermédiaires hautement réactifs et capables de se lier à l'ADN, et être un élément hautement mutagène (Garte, Zocchetti et al. 1997). Plusieurs enzymes de cette étape ont été étudiés, en particulier CYP1A1. Il a été suggéré que deux polymorphismes de cette enzyme, le polymorphisme Msp1 (Vineis, Veglia et al. 2003) et le polymorphisme dans l'exon 7 (Le Marchand, Guo et al. 2003) sont associés à un risque accru de cancer bronchique. La deuxième étape détoxifie les intermédiaires hautement toxiques en formant des métabolites moins réactifs et plus faciles à éliminer. L'une des enzymes de cette étape est le glutathion S transférase. Le génotype nul de cette enzyme est associé avec un risque augmenté de cancer bronchique dans une méta-analyse réalisée par Benhamou (Benhamou, Lee et al. 2002).

2.6 Maladie pulmonaire sous-jacents

Plusieurs maladies respiratoires ont été associées à un risque plus élevé de cancer bronchique. La plus fréquente est la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Cependant, le tabagisme est la cause principale de la BPCO et du cancer pulmonaire, ce qui rend difficile les analyses statistiques visant à analyser la contribution relative du tabac et de la maladie sous-jacente (BPCO) dans le déterminisme du cancer pulmonaire. Les maladies fibrosantes et les cicatrices pulmonaires exposent le malade aussi à un risque accru de cancer pulmonaire. Il existe aussi une association entre la présence de silicose et le cancer bronchique. Plusieurs études ont trouvé une association inverse entre l'asthme et le cancer bronchique (Gabriel, Dudley et al. 1972; Alderson 1974; Markowe, Bulpitt et al. 1987). Cependant, une méta-analyse (Santillan, Camargo et al. 2003) bien contrôlée pour le tabagisme a révélé une association entre l'asthme et le cancer pulmonaire. Les mécanismes proposés : le dysfonctionnement mucciliaire entraînant l'accumulation d'agents toxiques tels que les carcinogènes de tabac, l'inflammation chronique, la lésion de l'ADN par les radicaux libres comme résultat d'un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants (Santillan, Camargo et al. 2003).

3 HISTOPATHOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 1999 définit (Travis et al, 1999), sur la base de la morphologie observée en microscopie optique, 9 catégories de carcinomes broncho-pulmonaires avec 4 types histologiques principaux : les carcinomes à petites cellules (CPC) et les trois types de carcinomes non à petites cellules (CBNPC) : les épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes indifférenciés à grandes cellules.

Les 5 restant regroupent les carcinomes adénosquameux, les carcinomes avec des éléments sarcomatoïdes, les tumeurs carcinoïdes, les tumeurs de type glande salivaire et les carcinomes non classifiés (tableau 1).

Tableau 1 : Classification histologique des tumeurs pulmonaires (1999 WHO/IASLC).

Tumeurs épithéliales

1.1. Bénignes

1.1.1. Papillomes

1.1.1.1. Papillome épidermoïde exophytique inversé

1.1.1.2. Papillome glandulaire

1.1.1.3. Papillome mixte épidermoïde et glandulaire

1.1.2. Adénomes

1.1.2.1. Adénome alvéolaire

1.1.2.2. Adénome papillaire

1.1.2.3. Adénome des glandes salivaires

Adénome des glandes muqueuses

Adénome pléomorphe

1.1.2.4. Cystadénome mucineux

1.1.2.5. Autre

1.2. Lésions préinvasives

1.2.1. Dysplasie/Carcinome in situ

1.2.2. Hyperplasie atypique adénomateuse

1.2.3. Hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique

1.3. Tumeurs malignes

1.3.1. Carcinome épidermoïde

Variantes

1.3.1.1. Papillaire

1.3.1.2. A cellules claires

1.3.1.3. A petites cellules

1.3.1.4. Basaloïde

1.3.2. Carcinome à petites cellules

Variante

1.3.2.1. Carcinome à petites cellules composite

1.3.3. Adénocarcinome (voir tableau 2)

1.3.3.1. Acineux

1.3.3.2. Papillaire

1.3.3.3. Bronchioloalvéolaire

1.3.3.3.1. Non mucineux (Clara/pneumocyte type II)

1.3.3.3.2. Mucineux

1.3.3.3.3. Mixte mucineux/non mucineux ou intermédiaire

1.3.3.4. Adénocarcinome solide à sécrétion mucineuse

1.3.3.5. Mixtes

1.3.3.6. Variantes

1.3.3.6.1. Adénocarcinome bien différencié de type foetal

1.3.3.6.2. Mucineux colloïde

1.3.3.6.3. Cystadénocarcinome mucineux

1.3.3.6.4. A cellules en bague à chaton

1.3.3.6.5. A cellules claires

1.3.4. Carcinome à grande cellule

Variantes

1.3.4.1. Carcinome neuroendocrine à grandes cellules

1.3.4.1.1. Carcinome neuroendocrine à grandes cellules composite

1.3.4.2. Carcinome basaloïde

1.3.4.3. Carcinome de type lympho-épithélial

1.3.4.4. Carcinome à cellules claires

Tumeurs épithéliales

1.3.4.5. Carcinome à grandes cellules de phénotype rhabdoïde

- 1.3.5. Carcinome adénosquameux
 - 1.3.6. Carcinomes pléomorphes, sarcomatoïdes ou avec éléments sarcomateux
 - 1.3.6.1. Carcinome à cellules fusiformes et/ou géantes
 - 1.3.6.1.1. Carcinome pléomorphe
 - 1.3.6.1.2. Carcinome à cellules fusiformes
 - 1.3.6.1.3. Carcinome à cellules géantes
 - 1.3.6.2. Carcinosarcome
 - 1.3.6.3. Blastome (blastome pulmonaire)
 - 1.3.6.4. Autre
 - 1.3.7. Tumeur carcinoïde
 - 1.3.7.1. Carcinoïde typique
 - 1.3.7.2. Carcinoïde atypique
 - 1.3.8. Carcinome de type glandes salivaires
 - 1.3.8.1. Carcinome muco-épidermoïde
 - 1.3.8.2. Carcinome adénoïde kystique
 - 1.3.8.3. Autre
 - 1.3.9. Carcinomes inclassables
-

3.1 Les quatre principaux types histologiques de CBNPC

3.1.1 *Cancer bronchique épidermoïde*

Il se localise préférentiellement dans une bronche souche, lobaire ou segmentaire, et se présente souvent sous la forme d'une tumeur végétante (en chou-fleur) obstruant plus ou moins la lumière bronchique. Il se caractérise par l'existence de ponts intercellulaires, de kératinisation, et de « perles » cornées. La classification OMS de 1999 individualise quatre sous-types ou variantes : papillaire, à cellules claires, à petites cellules et basaloïde. (Travis et al, 1999). Dans la classification OMS de 1999, un guide précis a été donné pour la sous-classification des lésions bronchiques préinvasives de type épidermoïde : dysplasie légère, modérée, sévère, carcinome *in situ*

3.1.2 *Adénocarcinome bronchique*

L'adénocarcinome est désormais le sous-type prédominant dans de nombreux pays (Charloux, Quoi et al. 1997). L'adénocarcinome se localise en périphérie du poumon dans les régions sous-pleurales. Il est habituellement bien limité bien qu'il puisse exister des aspects spiculés et irréguliers. Il est divisé en 4 sous-groupes histologiques: acineux, papillaire, bronchiolo-alvéolaire, et solide. Les difficultés de sous classification des adénocarcinomes relèvent essentiellement du fait que la plupart des adénocarcinomes sont histologiquement hétérogènes avec seulement un minimum de cas correspondant à un type histologique pur (acineux, papillaire, bronchioloalvéolaire ou solide). La plupart des

adénocarcinomes pulmonaires associent plusieurs sous-types histologiques et sont classés comme des adénocarcinomes de sous-type mixte (Brambilla 2002) (Travis et al, 1999, Brambilla, 2002).

Avec la classification OMS de 1999, la définition des carcinomes bronchioloalvéolaires est devenue très restrictive et réservée à une prolifération des cellules malignes mucineuses ou non mucineuses (pneumomonocytaires ou de Clara) reposant sur des parois alvéolaires non ou peu transformées, sans modification de la vascularisation alvéolaire ni de son réseau élastique, réalisant une architecture « lépidique » (du grec *lepidos* signifiant « écailles ») (Brambilla 2002) (Travis et al, 1999). L'invasion de cellules manifestement malignes dans une cicatrice centrale ou des parois alvéolaires, une invasion vasculaire ou pleurale, ou des métastases ganglionnaires conduisent au diagnostic d'adénocarcinome de type mixte à prédominance bronchioloalvéolaire (Travis et al, 1999).

Néanmoins, en raison des progrès remarquables au cours de ces dernières années dans la compréhension de l'adénocarcinome bronchique, en particulier, en ce qui concerne le domaine thérapeutique, la biologie moléculaire et la radiologie, il y a un besoin pressant d'une nouvelle classification, basée non seulement sur les critères histologiques seuls, mais plutôt sur une plateforme intégrée et pluridisciplinaire incluant des critères cliniques, moléculaires, et radiologiques. La nouvelle recommandation concernant la classification histopathologique des adénocarcinomes est résumée dans le tableau 2 (Travis, Brambilla et al. 2011). Il est important de noter que le terme « adénocarcinome bronchiolo-alvéolaire » a été supprimé et remplacé par « adénocarcinome à composante lépidique » et on précise entre parenthèse « anciennement bronchiolo-alvéolaire ». Les différents types d'adénocarcinome bronchiques où le terme Bronchiolo-alvéolaire était utilisé sont résumés dans le tableau 3

Tableau 2: Classification of Lung Adenocarcinoma in Resection Specimens (IASLC/ATS/ERS) (Travis, Brambilla et al. 2011)

Preinvasive lesions

- Atypical adenomatous hyperplasia
- Adenocarcinoma in situ (≤ 3 cm formerly BAC)
 - Nonmucinous
 - Mucinous
 - Mixed mucinous/nonmucinous

Minimally invasive adenocarcinoma (≤ 3 cm lepidic predominant tumor with ≤ 5 mm invasion)

- Nonmucinous
- Mucinous
- Mixed mucinous/nonmucinous

Invasive adenocarcinoma

- Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with ≤ 5 mm invasion)
- Acinar predominant
- Papillary predominant
- Micropapillary predominant
- Solid predominant with mucin production

Variants of invasive adenocarcinoma

- Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
 - Colloid
 - Fetal (low and high grade)
 - Enteric

BAC, bronchioloalveolar carcinoma; IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer; ATS, American Thoracic Society; ERS, European Respiratory Society.

Tableau 3: Categories of New Adenocarcinoma Classification Where Former BAC Concept was Used (Travis, Brambilla et al. 2011)

-
1. Adenocarcinoma in situ (AIS), which can be nonmucinous and rarely mucinous
 2. Minimally invasive adenocarcinoma (MIA), which can be nonmucinous and rarely mucinous
 3. Lepidic predominant adenocarcinoma (nonmucinous)
 4. Adenocarcinoma, predominantly invasive with some nonmucinous lepidic component (includes some resected tumors, formerly classified as mixed subtype, and some clinically advanced adenocarcinomas formerly classified as nonmucinous BAC)
 5. Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
-

BAC, bronchioloalveolar carcinoma.

3.1.3 Carcinome à petites cellules

Le carcinome à petites cellules se localise généralement près des voies aériennes proximales. Il se différencie des autres formes de cancer bronchique primitif par son temps de doublement rapide, son pouvoir métastatique, sa forte sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Avec le carcinome épidermoïde, le cancer bronchique à petites cellules est la forme la plus directement liée au tabagisme (90% des patients porteurs de cancer bronchique à petites cellules sont fumeurs) (Travis et al, 1999).

Dans la classification OMS de 1999, les caractéristiques histopathologiques du carcinome à petites cellules sont très strictes : prolifération de cellules de petite taille (inférieure ou égale à 3 lymphocytes adjacents en diamètre), avec des caractères cytomorphologiques et nucléaires uniques : cytoplasme très restreint, rapport nucléo-cytoplasmique entre 8 et 9 sur 10, limite cytoplasmique mal définie, chromatine nucléaire fine, granulaire « poivre et sel », nucléole quasiment absent, fréquente déformation réciproque des noyaux (« nuclear molding »), index mitotique situé entre 20 et 100 mitoses pour 2 mm².

En immuno-histochimie un marquage positif pour de nombreux peptides et hormones (ACTH, somatostatine, β HCG, prolactine, bombésine, Neuron Specific Enolase, chromogranine A, synaptophysine) est observé (Travis et al, 1999).

3.1.4 Carcinome à grandes cellules

Le carcinome bronchique à grandes cellules est essentiellement un diagnostic d'exclusion et s'applique aux tumeurs qui n'ont pas l'aspect d'un cancer bronchique à petites cellules et qui n'ont ni différenciation épidermoïde ni différenciation glandulaire. La proportion de cancers à grandes cellules varie donc largement selon les centres, en rapport au degré de sophistication des colorations et des techniques anatomo-pathologiques et aussi à la quantité de tissu disponible pour le diagnostic. Il s'agit en général de tumeurs périphériques volumineuses. Histologiquement, les tumeurs consistent en des nappes de cellules contenant un cytoplasme éosinophile abondant. Les carcinomes à grandes cellules incluent actuellement cinq variantes (Brambilla 2002), (Travis et al, 1999), les deux principales variantes, toutes deux de très mauvais pronostic, sont le carcinome neuroendocrine à grandes cellules et le carcinome basaloïde.

Le classement de cancer bronchique définit par un système international de classification (International Staging System ISS) qui suit le même principe de la classification TNM mise au point par le Pr Denoix en 1946. Utilisé depuis 1974 et modifié en 1997, ce système décrit les tumeurs selon leur taille et leur extension locale (T), ganglionnaire (N) et métastatique dans d'autres organes (M) (tableau 4). Il est applicable à tous les cancers bronchiques quelle que soit leur nature histologique. Différentes catégories sont définies, sur la base d'avis d'experts, pour les trois paramètres (T, N, M); l'association des différentes catégories pour chaque paramètre détermine le stade (tableau 5). Pour chaque patient, on distingue entre la stadisation dérivée des résultats des examens cliniques, d'imagerie, et endoscopiques (staging clinique) et celle dérivée des résultats des études anatomopathologiques sur les pièces opératoires ou d'autopsie (staging pathologique) (Mountain, Carr et al. 1974)

Ce classement permet de standardiser la description des situations pathologiques, d'en refléter le pronostic, d'en orienter le traitement et de faciliter la recherche clinique et la comparaison des résultats.

Tableau 4 : Classification TNM des Tumeurs bronchiques de 1997

T - Tumeur primitive

TX : tumeur ne peut être évaluée ou est démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie.

T0 : pas d'évidence de tumeur primitive.

Tis : carcinome in situ.

T1 : Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans signe d'envahissement plus proximal que la bronche lobaire (c.-à-d. pas dans la bronche souche).

T2 : Tumeur ayant l'une des caractéristiques de taille ou d'extension suivantes • plus de 3 cm dans son plus grand diamètre • atteinte de la bronche souche, à 2 cm ou plus de distance de la carène • envahissement de la plèvre viscérale • associée à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive qui s'étend à la région hilare mais pas à l'ensemble du poumon.

T3 : Tumeur quelle que soit sa taille avec extension directe soit à la paroi thoracique (y compris les tumeurs de l'apex), au diaphragme, à la plèvre médiastinale ou au feuillet pariétal du péricarde; ou tumeur de la bronche souche située à moins de 2 cm de la carène* sans l'envahir; ou associée à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive intéressant l'ensemble du poumon

T4 : Tumeur quelle que soit sa taille envahissant soit le médiastin, le cœur, les gros vaisseaux, la trachée, l'œsophage, le corps vertébral, la carène; nodule(s) satellite(s) séparé(s) dans le même lobe; tumeur associée à un épanchement pleural malin.

N - Ganglions lymphatiques régionaux

NX : les ganglions ne peuvent pas être évalués.

N0 : pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale.

N1 : métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct.

N2 : métastase dans les ganglions médiastinaux ipsilatéraux et/ou sous-carinaux.

N3 : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux contralatéraux, hilaires contralatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou contralatéraux.

M - Métastase à distance

MX : les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées.

M0 : absence de métastase à distance.

M1 : Métastases à distance, y compris nodule(s) dans un autre lobe (homo- ou contralatéral)

Tableau 5 : Regroupement par stade

0	Tis	N0	TisN0M0
IA	T1	N0	T1N0M0
IB	T2	N0	T2N0M0
IIA	T1	N1	T1N1M0
IIB	T2 T3	N1 N0	T2N1M0
			T3N0M0
IIIA	T1 T2 T3	N1N2	T1N2M0
			T2N2M0
			T3N1M0
			T3N2M0
IIIB	T1 T2 T3 T4	N0 N1 N2 N3	T1 à T4 N3 M0
IV	T1 T2 T3 T4	N0 N1 N2 N3	T4 N0 à N3 M1

5 ORIENTATION THÉRAPEUTIQUE ACTUELLE

La prise en charge thérapeutique du patient avec cancer pulmonaire fait, en règle générale, l'objet d'une concertation multidisciplinaire entre pneumo-oncologue, chirurgien thoracique, et radiothérapeute. Le principal facteur pronostique au moment de la prise en charge initiale demeure à l'heure actuelle le stade et, par conséquent, l'éligibilité à un traitement chirurgical, seul ou associé à un traitement adjuvant ou néoadjuvant par chimiothérapie et/ou radiothérapie.

Le traitement de référence de stade I est la chirurgie. Pour le stade II, la prise en charge thérapeutique repose sur la chirurgie suivie par chimiothérapie adjuvant. La chimiothérapie néoadjuvant néanmoins peut être une alternative à la chimiothérapie adjuvant. En cas d'atteinte pT3N0 pariétale avec une résection incomplète, une radiothérapie est recommandée. Le stade III représente cependant un groupe hétérogène de tumeurs, la chirurgie sera réalisée chaque fois que possible, elle fait partie d'un traitement multimodal, intégrant différent combinaison de chimiothérapie et radiothérapie. La prise en charge de stade IV repose sur le traitement systémique. La stratégie thérapeutique est orientée selon la présence des mutations EGFR. D'autres critères interviennent dans la décision thérapeutique : l'histologie de la tumeur, le score de performance du patient et ses comorbidités. Les patients

porteurs des mutations activatrices d'EGFR reçoivent en première ou deuxième ligne un inhibiteur de la tyrosine kinase. En cas de tumeurs sans mutations EGFR, le traitement se base sur une bithérapie associant une molécule de troisième génération à cisplatine.

<http://www.e-cancer.fr/soins/recommandations/cancers-bronchopulmonaires-et-pleuraux>

Les résultats de ces traitements sont hétérogènes et très variables. La chirurgie, traitement le plus efficace, ne s'adresse, au moment de diagnostic, qu'à moins de la moitié des patients en raison d'une maladie avancée ou de comorbidités qui contre-indiquent l'opération (Patterson et al, 2008). D'autre part, même après des opérations carcinologiquement radicales, les résultats en terme de survie à long terme ne sont pas complètement satisfaisants, et en général dépendants du stade pathologique de la maladie (Patterson et al, 2008). La survie à cinq ans, après traitement chirurgical d'un cancer du poumon, est comprise entre 40 et 45%, tous stades confondus (Mountain, 1997 ; Goldstraw et al, 2007). Les résultats sont globalement satisfaisants pour les stades initiaux, tandis qu'en cas de maladie plus avancée (pour ce qui concerne le facteur « T » ou le facteur « N »), les résultats sont plus mitigés (Mountain 1997; Goldstraw, Crowley et al. 2007).

6 BIOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE

6.1 Anomalies chromosomiques

Dès le début des années 1990, la présence des anomalies génétiques dans le cancer bronchique a été montrée. Certaines de ces anomalies ont été détectées précocement dans les lésions précancéreuses voir même dans les tissus morphologiquement normaux de sujets fumeurs (Mao, Lee et al. 1997). Il s'agit, dans la majorité des cas, de délétions chromosomiques (Chung, Sundaresan et al. 1995). La présence de telles anomalies a guidé la recherche des gènes impliqués dans la carcinogenèse bronchique. Ainsi, cette délétion chromosomique est responsable de l'inactivation des gènes récessifs, inactivés par délétion d'un allèle (perte d'hétérozygotie) et la perte de l'activité de l'allèle restant (par mutation, délétion et méthylation du promoteur entraînant un arrêt de la transcription de gène). Ces gènes récessifs sont des suppresseurs de tumeur, leur activité permet de freiner la prolifération cellulaire ou d'induire l'apoptose. Par conséquent, leur inactivation entraîne une dérégulation

de la prolifération. Les principales anomalies génétiques identifiées dans le CBNPC sont représentées dans le tableau 6.

A côté de la délétion chromosomique, des mutations génétiques sont détectées fréquemment dans le cancer bronchique. Il s'agit de modifications de la séquence de l'ADN qui peuvent entraîner une perturbation ou une modification de l'activité d'un gène ou de son produit protéinique. Elles comprennent le réarrangement génétique, la délétion, l'insertion, et le changement d'une base unique. Bien que ces mutations soient souvent associées à la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur, comme TP53, CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A codant pour p16), TRAIL-R2 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor2), LRP-DIT (lipoprotein receptor-related protein-deleted in tumors) (Lee, Shin et al. 1999; Liu, Musco et al. 2000; Sanchez-Cespedes, Decker et al. 2001), certaines sont activatrices menant à une activité oncogénique comme c'est le cas pour les mutations KRAS et EGFR dans l'adénocarcinome bronchique (voir détail ; paragraphe 8.6.1.1, page 71) (Noda, Matsuzoe et al. 2001). Récemment, la translocation entre le gène ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) en 2p23 et le gène EML4 (Echinoderm Microtubule associated protein Like-4) en 2p21 (Soda, Choi et al. 2007) a été identifié en tant facteur oncogénique. Cette altération résulte en fait d'une inversion au niveau du bras court du chromosome 2 et d'une fusion de la région codant pour la tyrosine kinase (TK) ALK avec différents portions N-terminales plus ou moins tronquées du gène EML4. Ces réarrangements sont responsables d'une activité tyrosine kinase permanente via une dimérisation du domaine TK, indépendante de toute fixation à un ligand ; cette activation constante est responsable de la prolifération des cellules tumorales, de changements dans leur cytosquelette, de leur migration et de leur survie (Horn and Pao 2009). Un ciblage de cette altération est maintenant possible

(Tableau 6) Principales anomalies moléculaires observées dans les carcinomes non à petites cellules

N°	Histologie	Gènes
LOH 3p	80% CBC 50% CBNPC	FHIT : 3p14,2 FOXP1 : 3p14,1 RASSF1 : 3p21,3 <i>RARβ: 3p24,2 ?</i> TGFβR11 : 3p22 ? WNT7:3p25 ? βcaténine : 3p21,3 ? Sema3F:3p21,3 ?
Amplicon 3q26-3ter	45% CBNPC	<i>p63AIS</i>
LOH4p	53% CBNPC 36% CBC	SLIT24p15,2
LOH5q	30% CBNPC	APC/MCC 5q21-22 Séma4D5q21-22 ?
LOH8p	40% CBNPC	<i>8p21-22:</i> DR5/TRAIL-R2 dans 11% des CBNPC
LOH9p	50% CBNPC	9p21(INK4a:p16,p19) 9p34,1 (DAP kinase)
LOH10q	10-15% CBPC et carcinome épidermoïde	<i>PTEN 10q23?</i> <i>10q22-q26?</i>
LOH11p	50% CBNPC	11p15,5 <i>ribonucléotide</i> <i>réductase?p57?</i> IGF2? TSG101? 11p11,2:KAI-1 ?
Amplicon 11q13	21% CBNPC	CCND1 (cyclineD1)
LOH 13q	80% CBPC 44% CBNPC	Rb:13q14 ING1b13q33-34?
Amplicon 14q13	37% adénocarcinome	HNF3α14q13
LOH 17p	60% CBPC 50% CBNPC	p53:17p13
Amplicon 17q	5-20% CBNPC	<i>Erb2:17q,11,2-12</i>
LOH22q	35%-55% CBNPC 45%-65% CBPC	<i>MYO18B:22q12,1</i> <i>TIMP3 22q12,3</i>

En gras : gènes dont l'implication dans le cancer bronchique est établie par des séries importantes de groupes différents, avec des données convergentes. Gènes candidats à un rôle dans la carcinogenèse bronchique, non formellement établi (en italique) voir peu vraisemblable (données contradictoires ou insuffisantes, en noir avec point d'interrogation)

Plus rarement, des gains des propriétés oncogéniques ont été observés dans les CBNPC. Ce phénomène implique des mécanismes génétiques ou épigénétiques, tels les gains des matériels génétiques avec des amplifications de segments chromosomiques (amplification), au niveau desquels siègent des gènes dominants proto-oncogéniques, le plus souvent codant pour des récepteurs de facteurs de croissance comme EGFR et HER2, ou des régulateurs du cycle cellulaire, comme la cycline D1, et HNF3 α /FOXA1, ou de l'apoptose comme p63AIS. (Lonardo, Rusch et al. 1999; Hibi, Trink et al. 2000; Lin, Miller et al. 2002; Hirsch, Varella-Garcia et al. 2003; Pellegrini, Falleni et al. 2003).

Ces altérations sont responsables de l'acquisition par la cellule bronchique de nouvelles compétences qui vont en faire une cellule tumorale (*Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011*) (tableau 7):

- l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance qui permet aux cellules de rester en état de prolifération active. Ces facteurs de croissance stimulent les cellules tumorales par l'intermédiaire de récepteurs membranaire qui génèrent eux-mêmes des cascades multiples et parallèles de messagers intracellulaires, via des molécules de traduction du signal
- l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs provenant du milieu extracellulaire (cytokines) via des récepteurs membranaires
- la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée
- l'acquisition d'un potentiel répliatif par division illimitée des chromosomes
- la capacité à induire un réseau de néovaisseaux permettant un apport d'oxygène et de nutriments aux cellules tumorales
- l'acquisition d'un phénotype (mobile) et invasif qui donne à la cellule tumorale la capacité de s'échapper de son tissu d'origine ; c'est le pouvoir métastatique.

Tableau 7 : Altérations génétiques responsables de l'acquisition par les cellules bronchiques des propriétés cancéreuses, d'après (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011)

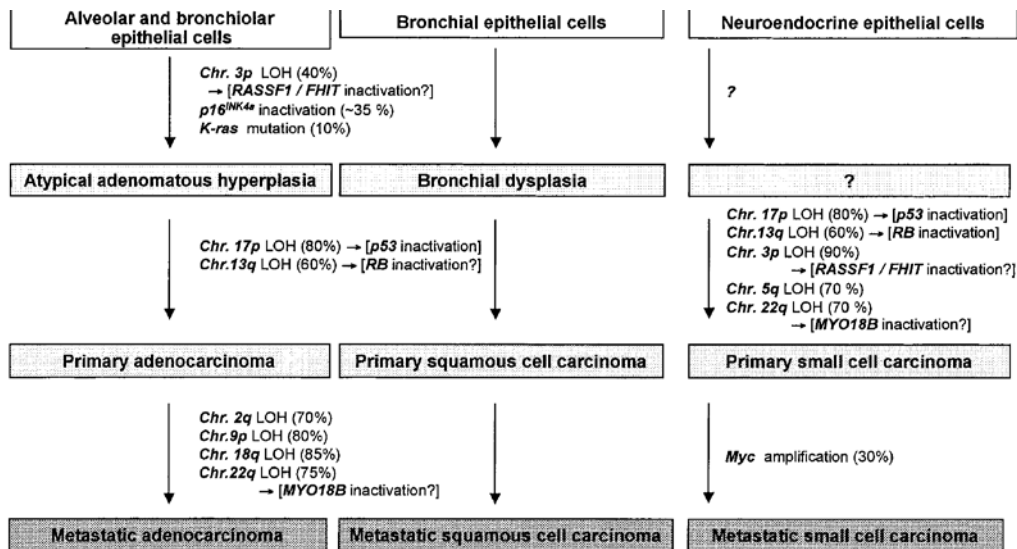
Propriétés acquises de cellule cancéreuse	altérations génétiques associées
Indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance	↑EGFR, ↑HER2, ↑IGF, mutations activatrice Ras, Raf, PI3K Perte PTEN
Echappement aux suppresseurs de croissance	Perte Rb, inactivation p53, altération voie TGF-β. Perte de l'expression LKB1, NF2 inactivation P16
Echappement à l'apoptose	Inactivation p53, p16, p14, ↓ RASSF1, DAPK ↑ Bcl2, ↓Bax, ↓Bim, ↓Puma ↑Igf1/2 Inactivation Beclin-1
Potentiel réplificatif illimité	↑Télomérase
Angiogenèse	↑VEGF, FGF HGF, EGF, MMPs ↓Thrombospondine ↓PAI-1, BAI-1, KAI-1, maspine ↓Angiotensine, endostatine, TPS-1 mutations Ras, p53, ↑Myc
Phénotype invasif et métastatique	↑MMP2 et 9, uPA Mutation Ras ↑Snail, Slug, Zeb1/2 ↓E-cadherin, ↑N-CAM, ↑GFs ↓HLA classe I, PAI-1 ↑α3β1, αvβ3

6.2 Carcinogène bronchique

La vie de la cellule épithéliale bronchique normale nécessite l'expression équilibrée de gènes (prolifératifs) contrôlant la division ou la différenciation cellulaire (proto-oncogènes), et de gènes (antiprolifératifs), freinant le cycle cellulaire ou induisant l'apoptose (la mort cellulaire programmée). Le cancer bronchique découle de la transformation de cette cellule bronchique normale par la rupture de cet équilibre physiologique sous l'effet des carcinogènes, en particulier, de la fumée de tabac. Cette transformation est la résultante d'un long processus multi-étape qui peut prendre plusieurs années.

L'analyse histologique des prélèvements autopsiques des patients décédés d'un cancer bronchique, ou des pièces opératoires de cancers bronchiques, a montré l'existence d'un véritable continuum lésionnel au niveau de l'épithélium bronchique allant de métaplasie malpighienne au carcinome invasif en passant par des stades de dysplasie légère, modérée et sévère puis carcinome in situ (Chung, Sundaresan et al. 1995). Parallèlement, l'analyse moléculaire a montré qu'une accumulation des altérations génétiques accompagne

l'augmentation du potentielle prolifératif et invasif de lésions précancéreuses et détermine la transition d'une étape à l'autre ayant un potentiel prolifératif et invasif plus important (Chung, Sundaresan et al. 1995; Mao, Lee et al. 1997). Ce modèle de carcinogenèse par étapes est résumé, pour les principaux types histologiques, en figure 4 avec schématisations des altérations génétiques associées à chaque étape.



(Figure 4) Altérations moléculaires associées à la carcinogenèse pulmonaire, selon le modèle multi-étapes. (Yokota, Nishioka et al. 2003)

De nombreuses altérations génétiques ont été décrites dans le cancer bronchique, en particulier ce qui concerne la voie suppresseur de la tumeur p53 et la voie oncogénique EGFR/KRAS. Récemment, le système neurotensinergique a été porté dans le cancer bronchique en tant facteur prédictif de survie mais également pour son rôle potentiel dans la progression tumorale.

Le gène TP53, découvert en 1979, était le premier gène suppresseur de la tumeur identifiée (Linzer and Levine 1979; Melero, Stitt et al. 1979). A l'origine, TP53 était considéré comme un oncogène, mais les données génétiques et fonctionnelles obtenues 10 ans après sa découverte ont prouvé qu'en réalité c'est un suppresseur de tumeur.

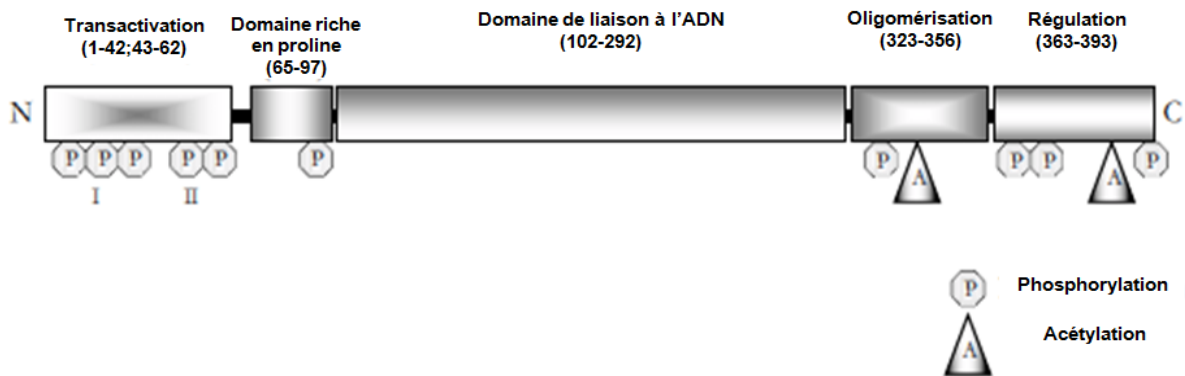
Le TP53 appartient à une famille de gènes hautement conservée qui contient au moins deux autres membres TP63 et TP73 (Marin and Kaelin 2000). Cependant, TP53 se différencie, de ces derniers, par son rôle unique dans la suppression tumorale. Les souris déficientes pour p53 se développent normalement, mais elles montrent une prédisposition très élevée à la formation de cancers multiples et précoces (Donehower, Harvey et al. 1992). Par contre, les souris déficientes en TP73 ou TP63 sont des modèles complexes avec des défauts dans le processus de développement et des dysfonctionnements physiologiques. Cependant, ce déficit n'augmente pas l'incidence des cancers chez ces souris (Mills, Zheng et al. 1999; Yang, Walker et al. 2000)

7.1 Gène et structure de TP53

Le gène humain TP53 est localisé au niveau de la région chromosomique 17p13.1. Il est composé de 11 exons dont le premier non codant et ils codent pour une phosphoprotéine nucléaire de 53 kd. Cette protéine de 393 acides aminés est composée de cinq domaines structuraux et fonctionnels : un domaine N-terminal de transactivation qui active les facteurs de transcription, un domaine de régulation riche en proline, important pour l'activité apoptotique, un domaine de liaison à l'ADN, un domaine d'oligomérisation et un domaine C-terminal impliqué dans la régulation de la liaison de p53 à l'ADN (Bouchet, de Fromentel et al. 2006) (figure 5). Au plan structural, le domaine de liaison à l'ADN est composé d'une armature de feuillets β qui supporte un ensemble de boucles et d'hélices flexibles en contact direct avec l'ADN. Ces boucles sont maintenues en place par la liaison d'un atome de Zinc.

p53 contient de nombreux sites de phosphorylation, cibles de kinases impliquées dans des voies de signalisation qui contrôlent la prolifération cellulaire (CKI, CKII, Chk2, ATM, ATR,

PRKC, JNK, MAPK) et des sites d'acétylation par des coactivateurs du type histone acétyltransférase (HAT), tels p300-CBP ou pCAF



(Figure 5) Structure de la protéine p53. La protéine p53 est composée de cinq domaines fonctionnels : le domaine de transactivation (I et II, acides aminés 1-62), une région régulatrice riche en proline (acides aminés 65-97), un domaine de liaison à l'ADN (acides aminés 102-292), un domaine d'oligomérisation (acides aminés 323-356) et un domaine C-terminal de régulation (acides aminés 363-393). p53 subit des modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations (hexagones) et des acétylations (triangles), au niveau des régions N et C-terminale (Bouchet, de Fromental et al. 2006)

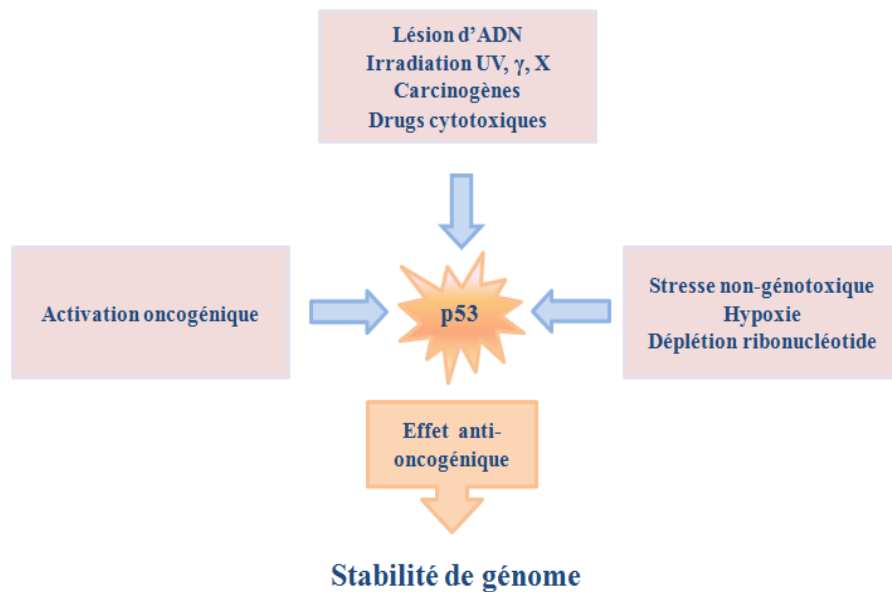
7.2 Régulation de P53

La p53 est exprimée de façon quasi constante et dans presque tous les tissus. Elle est cependant peu abondante en raison de sa dégradation rapide dans le protéasome. La stabilisation et l'accumulation de p53 en réponse à des lésions génotoxique qui va permettre la mise en jeu de ses fonctions qui maintiennent la stabilité génomique. En l'absence de signaux inducteurs, p53 est constitutivement instable et inactive. Le régulateur négatif principal de la stabilité et de la fonction de p53 est la protéine, mouse double-minute 2 (mdm2), une ubiquitine ligase E3 spécifique pour p53, qui intervient dans la dégradation de p53 via la voie ubiquitine-protéasome 26S (Haupt, Maya et al. 1997; Kubbutat, Jones et al. 1997). La régulation des protéines p53 et mdm2 est reliée par une boucle d'autorégulatrice, dans laquelle l'activation de p53 stimule la transcription de mdm2, tandis que mdm2 inhibe à son tour, la fonction p53 (Wu, Bayle et al. 1993). Un autre régulateur clé de p53 est la protéine mdm4, également connu sous le nom mdmx (Marine and Jochemsen 2005). Malgré la similarité de sa structure à mdm2, mdm4 ne peut pas ubiquitiner et inhiber p53 par interaction directe (Shvarts, Steegenga et al. 1996). Mdm4 se lie alors à mdm2 et forme un

hétérodimère ayant une capacité accrue à ubiquitiner p53 (Linares, Hengstermann et al. 2003). D'une part mdm2 se fixe sur la partie N-terminale de p53 bloquant ainsi son activité transcriptionnelle, et d'autre part, mdm2 ubiquitine p53 sur multiples résidus lysines tout au long de son extrémité C-terminale et induit son exportation nucléaire et par la suite sa dégradation dans le protéasome (Haupt, Maya et al. 1997; Kubbutat, Jones et al. 1997).

7.3 Mécanisme d'activation de p53

Après sa traduction, la p53 n'est probablement pas active en tant que facteur de transcription car elle ne peut pas se lier à ses ER (éléments de réponse) dans l'ADN. Cependant, suite à des modifications post-traductionnelles (phosphorylation des résidus sérine et thréonine au niveau du domaine amino-terminal, l'acétylation des résidus lysine au niveau du domaine carboxy-terminal et la stabilisation de la protéine) entraînant un changement de conformation, la p53 devient active et capable de se lier à ses RE (Jayaraman and Prives 1999; Prives and Manley 2001). De grandes variétés de signaux de stress cellulaire semblent capables de l'activer. Ces signaux, impliqués dans la plupart de types de cancers, sont classés en trois catégories (Figure 6) : la première concerne les lésions de l'ADN provoquées par exemple, par les UV, les rayons X ou gamma, les agents alkylants, les mycotoxines, les inhibiteurs de topoisomérase..., la deuxième résulte de l'activation constitutive des voies impliquées dans la croissance cellulaire. Cette activation est un requièment commun presque à toutes les lésions cancéreuses primaires. La troisième est provoquée par l'hypoxie, c'est un phénomène souvent présent dans les différentes étapes de développement du cancer solide. Ainsi, pendant l'initiation et la progression tumorale, les différents processus de transformation cancéreuse vont converger sur l'activation de p53 par ces trois mécanismes qui agissent séparément ou en combinaison. L'activation de p53 se caractérise par trois étapes quel que soit le facteur la déclenchant.



(Figure 6) Signalisation activant p53. Les trois classes majeures activant p53 sont montrées. P53 activée exerce son rôle anti-oncogénique qui maintient la stabilité de génome (Guimaraes and Hainaut 2002)

7.3.1 Etapes d'activation de p53 - cas de lésion de l'ADN

L'activation déclenchée par des lésions de l'ADN commence par la stabilisation de p53 (première étape). Plusieurs kinases, qui sont capables de phosphoryler p53 sur multiples sites dans le domaine N-terminal (impliqué dans l'interaction avec mdm2), peuvent dissocier l'interaction avec mdm-2 et entraîner la stabilisation et l'accumulation de la protéine. Les protéines kinases impliquées sont celles ayant des domaines phosphatidyl-inositol-3 kinase (ATM, ATR, DNAPK) et les kinases régulatrices du cycle cellulaire telles que Chk2. Elles sont activées suite aux lésions de l'ADN induites par exposition aux carcinogènes environnementaux ou par mécanismes endogènes comme les erreurs de polymérase ou les défauts de processus de réparation de l'ADN.

Dans la deuxième étape, la région N-terminale de p53 interagit avec des molécules à activité histone-acétyl-transférase de la famille CBP/p300, qui acétylent des résidus lysine localisés dans la partie extrême C-terminal (14; 21). Cette acétylation permet de déplier de la protéine p53 qui adoptait un état inactif, une conformation où le domaine C-terminal prévient la formation d'un complexe stable entre la portion centrale de p53 et l'ADN spécifique. Ce changement de conformation est complété et stabilisé par d'autres modifications post-

traductionnelles (phosphorylation, interactions avec des protéines hétérologues) (Hupp and Lane 1994).

A la troisième étape, la p53 se lie à l'ADN. La liaison de p53 à l'ADN se fait, sous forme d'un tétramère, sur une séquence spécifique de l'ADN (Bargonetti, Friedman et al. 1991) contenant certaines bases déterminées dont des guanines. La séquence consensus comporte 2 motifs palindromiques : **5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3'** séparés par 0 à 13 pb (el-Deiry, Kern et al. 1992).

Cas de stimulation mitogénique exagérée

Dans ce cas, l'activation de p53 est au moins, partiellement, indépendante de toutes lésions acquises de l'ADN et elle implique la protéine p14^{arf}. Cette dernière est un produit alternatif du locus INK4a, qui code aussi pour l'inhibiteur de kinases cycline-dépendantes p16 (Kamijo, Weber et al. 1998). Pendant les processus cancéreux, la dérégulation des voies telles que la voie Ras/Rb/E2F ou celle de beta-catenin/c-My pourrait conduire à l'activation de p14^{arf} (Lowe 1999). Cette dernière interagit et séquestre mdm2 dans le nucléole (Zhang, Xiong et al. 1998) permettant ainsi à p53 de s'accumuler pour bloquer la division cellulaire ou induire l'apoptose afin de contrecarrer cette prolifération incontrôlée.

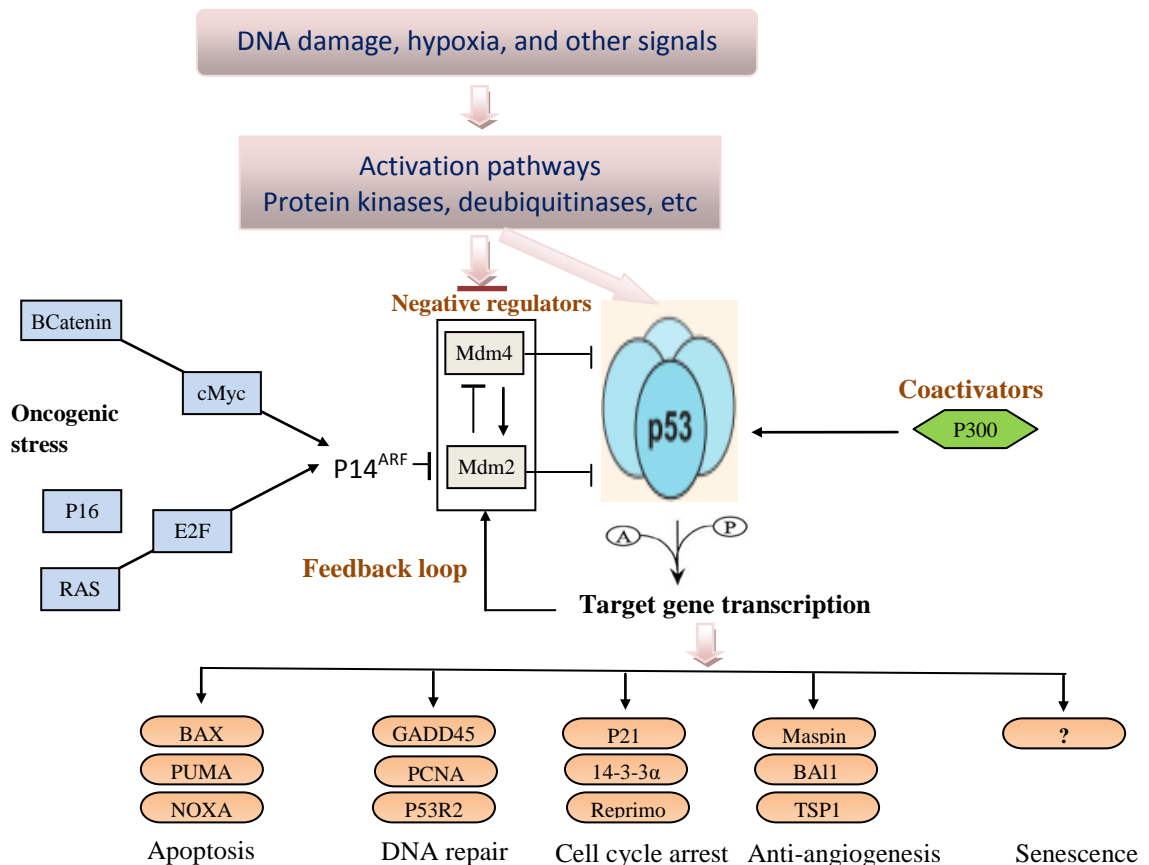
Cas d'hypoxie

L'activation induite par les signaux non-génotoxique est moins bien comprise. Il existe des données montrant que l'hypoxie peut entraîner à long terme une induction de p53 par un mécanisme tout à fait différent de celui du dommage de l'ADN et qui n'implique pas mdm2 (Pluquet and Hainaut 2001). Mais, la nature exacte de ce mécanisme n'est pas connue. Cependant, il a été montré que l'Amifosine, un médicament radioprotecteur, pourrait activer p53 par un mécanisme dépendant de Jun-N-terminal Kinase 2 (JNK2). Cette kinase se lie à p53 dans une forme inactive et elle agit comme une ubiquitine ligase et dirige p53 vers le protéasome où elle sera dégradée. L'activation de cette kinase conduit à la dissociation du complexe p53/JNK2, à la phosphorylation de p53 dans le domaine de transactivation et sa stabilisation (Fuchs, Adler et al. 1998). Donc, cette voie peut être impliquée dans l'activation de p53 en réponse à une grande variété de signaux, y compris certains signaux qui endommagent l'ADN (JNK est activée en réponse aux UV), mais aussi des signaux non

dommageables pour l'ADN (tels que le stress antioxydant et, peut-être, l'hypoxie) (Buschmann, Potapova et al. 2001).

7.4 Fonctions et conséquence d'activation de P53

L'activation de p53 se produit en tant que mécanisme de protection et de défense contre la transformation néoplasique. Après son activation, p53 enclenche une réponse cellulaire prenant deux voies, une voie dépendante et une voie indépendante de la transcription. La première comprend sa fixation spécifique sur des régions régulatrices des gènes qui contrôlent le cycle cellulaire et/ou l'apoptose (Vogelstein, Lane et al. 2000; Zilfou and Lowe 2009). Dans la deuxième, elle interagit spécifiquement avec diverses protéines qui contrôlent la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. P53 est donc une protéine multifonctionnelle dont les effets biologiques viennent via l'activation simultanée de plusieurs voies de signalisations complémentaires permettant à la p53 d'assumer sa fonction comme gardien du génome. Elle est capable, par conséquent d'induire l'arrêt de cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, l'inhibition de l'angiogenèse, et la sénescence cellulaire (figure 7).



(Figure 7) Schématisation des voies d'activation de p53. Les différents cas de stress cellulaire (lésion de l'ADN, oncogénique ou non) convergent sur l'activation de p53. Ensuite, p53 activée régule la transcription d'une variété de gènes cibles déterminant la réponse cellulaire. En absence de signaux d'activation, une boucle de rétroaction négative p53-mdm2 en collaboration avec l'action d'autres E3 ubiquitine ligases maintient les niveaux de p53 cellulaires constitutivement faible. D'après (Guimaraes and Hainaut 2002; Joerger and Fersht 2008)

7.4.1 Cycle cellulaire

Le principal gène stimulé par p53 est p21^{WAF1/CIP1}. Le produit de ce gène contribue à bloquer le cycle cellulaire (en phase G1). Il s'agit d'un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines qui inhibent la phosphorylation de Rb (protéine nucléaire qui, en état-hypo-phosphorylée, séquestre des facteurs de transcription E2F), en inhibant les complexes CDK4/6-cycline D, CDK2-cycline E, CDK2-cycline A et CDC2-Cycline B, qui sont responsables de la progression de cycle cellulaire (el-Deiry, Tokino et al. 1993; Harper, Adami et al. 1993). De même, p53 stimule aussi l'expression de GADD45, qui bloque la machinerie de réplication de l'ADN et stimule l'excision/réparation de l'ADN (Kastan, Zhan et al. 1992).

L'arrêt du cycle cellulaire a pour effet de permettre la réparation de l'ADN. Dans ce contexte, p53 stimule l'expression d'une ribonucléotide réductase qui participe à la biosynthèse d'ADN (Yamaguchi, Matsuda et al. 2001). En plus, p53 interagit avec certains produits de gènes de réparation de l'ADN comme les hélicases ERCC2/XPD et ERCC3/XPB, elle modulerait leur activité d'excision/réparation des nucléotides (Lozano and Elledge 2000).

7.4.2 *Apoptose*

En réponse à certains stimuli (stress génotoxique majeur), p53 est capable d'induire l'apoptose en activant des protéines Bcl2-like, des "death receptors" et leurs partenaires ou en induisant l'expression du récepteur membranaire PERP. P53 contribue à la production des ROS (Reactive Oxygen Species) via l'expression de PIG3 (une NADH quinone oxydoréductase), de PIG6 (une proline-réductase mitochondriale), et de PIG12 (une glutathion-S-transférase) (Polyak, Xia et al. 1997). ROS peut entraîner l'apoptose soit par le largage de cytochrome C par la mitochondrie, soit par l'activation des cascades de caspases indépendamment des mitochondries. De plus, p53 semble capable d'inhiber l'activité anti-apoptotique de Bclx, favorisant ainsi le largage de cytochrome C et l'apoptose (Mihara, Erster et al. 2003).

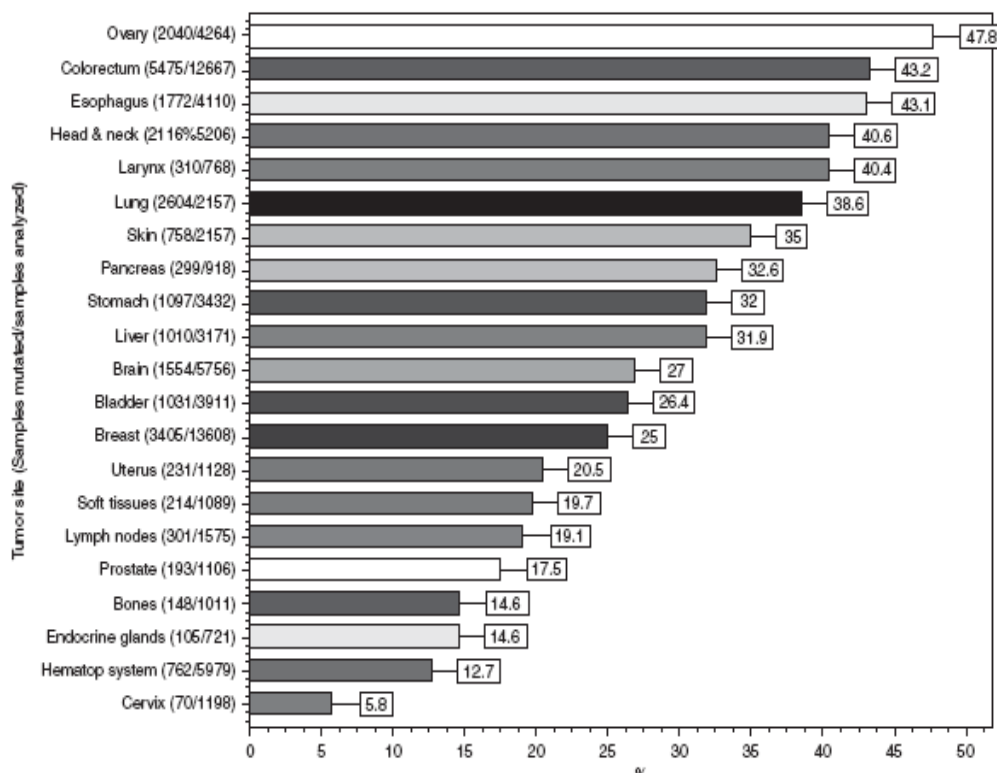
7.4.3 *Inhibition de l'angiogénèse*

La capacité anti-angiogénique de p53 se fait par la stimulation de l'expression d'inhibiteurs physiologique de l'angiogénèse, la thrombospondine et le BAI-1 (Brain-specific Angiogenesis Inhibitor), la glycoprotéine transmembranaire KAI-1/CD82 et des inhibiteurs des sérines-protéases (Freemantle and Dmitrovsky 2002). Parallèlement, p53 réprime l'expression des activateurs de plasminogène dont l'activation entraîne un switch angiogénique

7.5 *P53 et cancer bronchique*

L'inactivation de la voie p53 est fortement corrélée avec la tumorigénèse. En effet, la réponse de p53 au stress cellulaire est perdue dans presque tous les cancers. L'inactivation fonctionnelle du gène p53 est l'événement le plus commun dans les tumeurs malignes humaines et présente dans au moins 50% de tous les cancers (figure 8) (<http://www.iarc.fr>). L'inactivation mutationnelle de p53 est le mécanisme le plus fréquent et survient dans un

grand nombre de cancers sporadiques avec un taux de 38 à 50 % dans les cancers de l'ovaire, de l'œsophage, du côlon, la tête et du cou, du larynx et du poumon et avec un taux de 5% dans les leucémies primaires, le sarcome, le cancer des testicules, le mélanome malin, et le cancer du col. Dans les cancers avec p53 normale, la fonction de p53 est souvent inactivée par des mécanismes alternatifs comme dans le cas du cancer du col de l'utérus dans lequel p53 est dégradé par VPH-E6 (Virus du Papillome Humain) (Tommasino, Accardi et al. 2003) ou le sarcome qui surexprime mdm2 ou même dans le cancer bronchique par la surexpression de mdm2 ou la perte de l'expression de p14^{arf} (Mori, Ito et al. 2004).



(Figure 8) Prévalence de mutations TP53 dans les cancers sporadiques. Base de données de CIRC TP53 ((R13, novembre 2008 (Olivier, Hollstein et al. 2010))

Dans le cancer bronchique, la TP53 est inactivée dans 40 à 60 % des cas, souvent par mutation d'un allèle et la délétion de l'autre allèle. Cette inactivation est précoce au cours de carcinogenèse bronchique puisqu'elle est détectée dès le stade de métaplasie malpighienne (lésion précurseur des carcinomes épidermoïdes) ou d'hyperplasie adénomateuse atypique (lésion précurseur des adénocarcinomes)

Le rôle de ces mutations dans le cancer bronchique a fait l'objet de nombreux articles. Ainsi, une méta-analyse reprenant 77 articles de la littérature (Tammemagi, McLaughlin et al. 1999) a montré que ces mutations sont présentes dans 42 % des patients ayant CBNPC, elles sont associées significativement avec un stade localement avancé, avec extension ganglionnaire et un caractère mal différencié. Une autre méta-analyse incluant 43 articles a trouvé que la p53 aberrante était un facteur de mauvais pronostic de survie avec le type histologique adénocarcinome (Mitsudomi, Hamajima et al. 2000). Dans une autre étude (Graziano, Gu et al.), l'expression de p53 étudiée par Immunohistochimie (IHC) dans 250 échantillons obtenus de 344 patients a montré que la présence de p53 est un facteur de mauvais pronostic en terme de survie globale et de survie sans progression. Dans une autre publication (Tsao, Aviel-Ronen et al. 2007), l'expression de p53 a été évaluée chez 253 patients opérés de cancer bronchique. La p53 était surexprimée dans 52% (132 patients) et cette surexpression est associée à une survie globale inférieure à celle des patients négatifs pour p53. En revanche, le bénéfice de la chimiothérapie adjuvant en terme de survie était meilleur chez les patients surexprimant p53. Ces résultats indiquent que la surexpression de la protéine TP53 pourrait être un marqueur de mauvais pronostic et un marqueur prédictif de bénéfice de la chimiothérapie adjuvante chez les patients opérés de CBNPC.

7.5.1 Mécanisme d'inactivation de P53

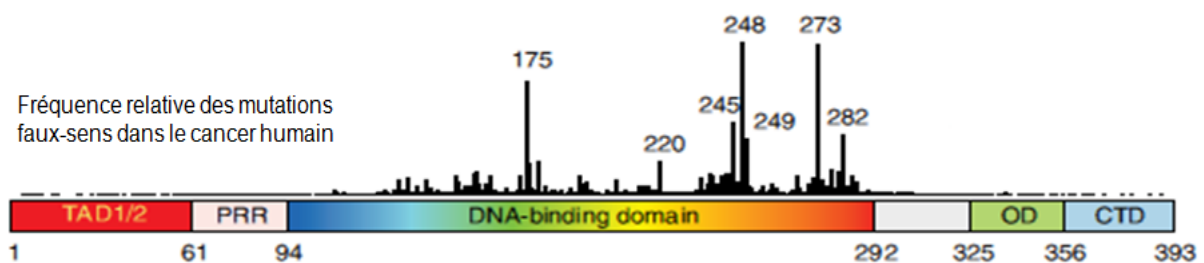
L'inactivation de p53 au cours de processus de transformation oncogénique peut se produire par plusieurs mécanismes :

7.5.1.1 Mutations p53

7.5.1.1.1 Type de mutations

Contrairement aux autres gènes suppresseurs de la tumeur tels que RB, APC, et BRCA1 qui sont inactivés par délétion ou mutation non sens entraînant l'anomalie de synthèse ou la perte de l'expression de gène, les altérations de TP53 sont de type faux sens (changement d'un nucléotide par un autre) dans 80% des cas (Soussi 2005). Les autres altérations de TP53 comprennent des délétions ou des insertions (9%), des mutations non sens (remplacement d'un codon spécifiant un acide aminé par un codon-stop) (7%) et des mutations silencieuses (mutations qui ne modifient pas la séquence d'une protéine) (5%) (Olivier, Eeles et al. 2002). Selon les databases R15 (CIRC), 27580 mutations somatiques et 597 mutations germinales ont été déterminées dans les TP53 dans différents types de cancers.

Ces mutations sont distribuées dans tous les exons codants avec une forte prédominance dans les exons 4 à 9 (exons codant le domaine de liaison à l'ADN) (figure 9). Parmi toutes les mutations de TP53 rapportées, 74% sont des mutations faux-sens, atteignant le domaine de liaison à l'ADN. Dans ce domaine, tous les résidus constituent des cibles potentielles des mutations. Cependant, certains codons sont plus fréquemment mutés que d'autres, ils représentent environ 30% de toutes les mutations observées. Les codons "hotspot" sont 175, 245, 248, 249, 273, et 282 (Petitjean, Mathe et al. 2007). Quatre de ces codons correspondent à des résidus arginine (175, 248, 273 et 282) impliqués dans l'interaction protéine-ADN. En plus, des mutations inactivant p53 peuvent aussi survenir sur de nombreux autres sites, incluant, en particulier, ceux impliqués dans la liaison au Zinc (codons 176, 179, 238, 242, qui représentent ensemble environ 5% de toutes les mutations)



(Figure 9) Fréquence de distribution de différentes mutations faux sens au long de p53 (Joerger and Fersht 2010).

Deux explications sont proposées pour expliquer pourquoi certains résidus sont plus fréquemment mutés que des autres :

La première est la mutagenèse ciblée : cinq de ces points chauds de mutations surviennent sur des cytosines localisées dans des sites répétés de dinucléotide (CpG). Les mutations de type transition se produisent sur ces sites (CpG) avec une fréquence 10 fois supérieure à celles sur les autres nucléotides. Dans le génome humain, ces sites sont souvent méthylés en position 5' par un mécanisme postrépliatif réservé aux dinucléotides CpG et catalysé par l'ADN méthyltransférases. Le résidu 5' méthylcytosine est moins stable que la cytosine et subit une désamination spontanée en thymine à un taux cinq fois supérieur à celui de la base non méthylée conduisant ainsi à ces mutations (Rideout, Coetzee et al. 1990). Parmi les 22 CpG siégeant dans le domaine de liaison de p53 à l'ADN, les trois points chauds de mutations (175, 248, 273) représentent 60 % de mutations CpG. En effet, les résidus codés par ces codons jouent un rôle important dans la liaison de p53 à l'ADN et leurs substitutions

induisent une diminution de l'affinité de p53 à l'ADN et par conséquent, une perte de son activité suppresseur de tumeur. Par ailleurs, plusieurs autres codons sont des sites connus pour le dommage de l'ADN par carcinogènes hexogènes tels que les carcinogènes de tabac (157, 158, 245, 248, 273) (Hainaut and Pfeifer 2001).

La deuxième est la sélection fonctionnelle : la plupart des codons fréquemment mutés sont essentiels pour la liaison à l'ADN. Il a été proposé, que le degré exact de perturbation de la fonction p53 sauvage dépend de la position de la mutation dans la protéine. Ainsi, certaines positions sont essentielles pour la fonction de p53 et leurs modifications permettraient l'émergence des cellules portant d'autres altérations génétiques importantes pour le développement tumoral.

7.5.1.1.2 *Statut tabagique et mutations p53*

L'implication de tabagisme dans 90% des cas de cancer bronchique d'une part et la fréquence très élevée des mutations de p53 dans le cancer bronchique d'autre part, font de TP53 une cible fréquente des mutations liées au tabagisme. Les données disponibles indiquent que ces mutations sont plus fréquentes dans le cancer du poumon des fumeurs que dans le cancer du poumon chez les personnes n'ayant jamais fumé. Globalement, les patients atteints de cancer bronchique associé au tabac ont une fréquence plus élevée de mutations TP53 (26 à 71%) que les patients non-fumeurs (8 à 47%)(Subramanian and Govindan 2008).

Par ailleurs, les types de mutations sont différents entre les fumeurs et les non-fumeurs (Hainaut, Olivier et al. 2001; Hainaut and Pfeifer 2001; Vahakangas, Bennett et al. 2001). Les mutations du cancer bronchique associé au tabac sont caractérisées par une fréquence élevée de mutations de type transversion (substitution d'une purine (G ou A) pour pyrimidine (C ou T)) dans le gène de p53. Par contre, le cancer bronchique d'une population de non-fumeurs se distingue par une proportion élevée de mutation de type transition (substitution d'une purine pour purine ou pyrimidine pour pyrimidine). Ainsi, dans le cancer bronchique, les mutations de TP53 étaient de type transversion G → T dans 43% des cas, alors que chez les non-fumeurs ce taux était de 13% (Ding, Getz et al. 2008). Dans une autre étude, les mutations de TP53 chez les femmes non-fumeuses ayant des adénocarcinomes étaient de type transition dans 83% des cas alors que chez les femmes fumeuses, les mutations étaient de type transversion dans 60% (Kondo, Tsuzuki et al. 1996). Une autre analyse examinant des échantillons de cancer bronchique de 440 patients fumeurs et de 156 non-fumeurs a confirmé

ces résultats (Toyooka, Tsuda et al. 2003). Trente pour cent des patients fumeurs avaient des mutations G → T comparativement à 15% de ceux non-fumeurs. De même, les mutations de transition G→A se trouvaient chez 29% des fumeurs et 44% des non-fumeurs. Ces résultats étaient concordants avec les résultats d'analyse précédente publiés par CIRC en 2001. Incluant plus de 14051 cas, cette analyse a conclu que les spectres de mutations de p53 est différents entre les fumeurs et les non fumeurs (mutations de type transversion G → T sont 30 versus 10% ; $p < 0.0001$) (Hainaut and Pfeifer 2001). Cependant, dans la même analyse, la différence de mutations TP53 entre les fumeurs et les non-fumeurs existent seulement chez les femmes. La proportion de mutations de transversion G → T parmi les fumeuses et les non-fumeuses était (36% vs 13%), alors que chez les hommes était (27% vs 31%). En outre, la ration de mutations G → T/G → A chez les femmes fumeuses était de 1,5 et qui n'ont jamais fumé était 0,23, alors qu'il n'y avait pas de différence dans les ratios entre les hommes fumeurs et non fumeurs.

La survenue de ces mutations G → T est probablement induite par les carcinogènes de tabac, en particulier le métabolite principal du benzo-a-pyrène, le benzo à pyrène diol époxyde (BPDE) qui est l'un des plus puissants cancérrogènes présents en grande quantité dans la fumée de cigarette. La présence d'adduits de BPDE sur le gène p53 dans les cellules épithéliales bronchiques coïncide avec les points chauds de mutations G → T sur les codons 157, 248, 273 dans les cancers bronchiques liés au tabac.(Denissenko, Pao et al. 1996; Smith, Denissenko et al. 2000). La base mécanique de la survenue de ces points chauds induits par BPDE se lierait à la méthylation de la cytosine dans le gène TP53 (Denissenko, Chen et al. 1997). La distribution d'adduits-BPDE dans l'ADN diffère considérablement entre l'ADN CpG méthylés et l'ADN CpG non méthylé. Les guanines flanquées par 5-méthylcytosines sont les positions de préférence pour la formation des adduits. Par conséquent, les dinucléotides CpG, qui sont méthylés dans le gène humain TP53 dans tous les tissus humains examinés, représentent une cible privilégiée pour les cancérrogènes chimiques exogènes. En plus, il a été possible de reproduire les mêmes mutations sur le gène p53 que celles retrouvées chez les fumeurs, en traitant des cellules bronchiques normales par benzo-à-pyrène (Denissenko, Pao et al. 1996). Ces résultats indiquent clairement un effet mutagène direct de certains composants majeurs du tabac dans les cancers du poumon des fumeurs.

7.5.1.1.3 *Conséquence des mutations de p53*

a)- Stabilisation de p53 mutant

L'une des conséquences de mutation de p53 est sa stabilisation et l'augmentation de son taux dans les cellules. (Rotter, 1983). La raison est que la plupart des mutants p53 sont effectivement en dehors de la boucle de régulation négative par mdm2. Le mécanisme proposé met en cause la perte de capacité de p53 de transactiver le promoteur mdm2 et l'inhibition de p53 sauvage par p53 mutée, selon un effet dominant négatif de p53 mutée (Midgley and Lane 1997).

b)- Perte de l'activité transcriptionnelle

La conséquence fonctionnelle principale des mutations de TP53 est la perte de la liaison spécifique à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de la protéine. En conséquence, l'absence de p53 fonctionnelle permet aux cellules comportant des dommages de leur ADN de se diviser, transmettant ainsi, les mutations de l'ADN aux cellules filles. Au fil des divisions, ces mutations vont s'accumuler, conférant aux cellules mutées un avantage sélectif de prolifération, ce qui concourt à l'acquisition du phénotype cancéreux complet.

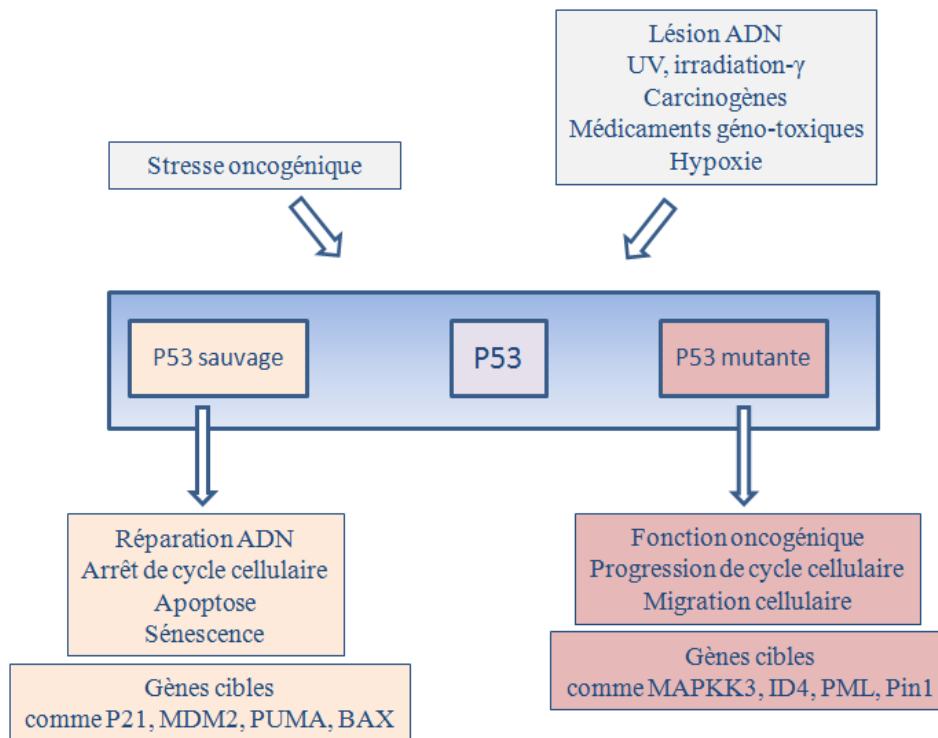
c) – Effet dominant négatif

Outre la simple perte de fonction, de nombreuses formes mutées de p53 peuvent conduire à l'expression de protéines présentant des activités dominantes négatives capables d'inhiber la suppression exercée par la protéine sauvage (Forrester, Lupold et al. 1995). Cet effet dominant négatif provient du fait que la protéine p53 se lie à l'ADN sous forme de tétramère (Weinberg, Freund et al. 2004). Les protéines p53 sauvages et les mutants forment des hétéro-oligomères. Ce dernier montre un déficit de sa liaison à l'ADN et une faible activité transcriptionnelle (Milner and Medcalf 1991; Srivastava, Wang et al. 1993). Ainsi, la p53 mutée peut inhiber l'activité transcriptionnelle de p53 sauvage et par conséquent ses fonctions suppresseurs de tumeur. Il a été proposé que cette inhibition survienne seulement avec une forte ration de p53 mutante à p53 sauvage. Dans des cellules normales, le type sauvage p53 est synthétisé dans le cytoplasme comme dimères et transporté au noyau, où ils se réunissent en tétramères fonctionnels sur des sites de liaison p53 à l'ADN. Dans des cellules hétérozygotes, les niveaux faibles d'expression de la protéine mutante ne bloquent pas la formation de tétramère de p53 sauvage. Cependant, lorsque les protéines sauvage et

mutante s'accumulent, elles forment des tétramères inactifs diminuant ainsi la transcription des gènes cibles, (Chan, Siu et al. 2004). Par ailleurs, il a été montré que les mutants de p53 sont capables de s'associer aux autres membres de la famille p53 (p63 et p73) renforçant ainsi son effet dominant négatif par l'inhibition ou la diminution de l'activité transcriptionnelle de ces protéines (Marin, Jost et al. 2000; Gaiddon, Lokshin et al. 2001).

d) – Effet oncogénique

La protéine p53 mutante s'accumule souvent dans le noyau des cellules cancéreuses *in situ* et métastatique (figure 10), ce qui suggère un effet oncogénique, outre la perte de fonction suppresseur de tumeur. Expérimentalement, il a été démontré que plusieurs mutations de p53 (points chauds) coopèrent avec des oncogènes pour la transformation cellulaire (Hinds, Finlay et al. 1990) définissant ainsi la notion de gain des fonctions oncogéniques (GFO) pour ces mutants. Cependant, peu de p53 mutantes ont été étudiés pour les activités de GFO et il n'y a pas de consensus sur la définition moléculaire de ces activités (Petitjean et al. 2007b). Dans ce contexte, des souris « knocking » avec des mutants R175H et R273H (Lang, Iwakuma et al. 2004; Olive, Tuveson et al. 2004) ont montré une augmentation de la distribution de différents cancers et des métastases par rapport aux souris « knock-out » p53, fournissant des preuves *in vivo* de GOF. Divers mécanismes moléculaires ont été proposés comme base de GFO, tels que l'interférence avec la voie de réparation de l'ADN-ATM (Song, Hollstein et al. 2007), l'activation de gènes normalement inactivés ou réprimés par p53 sauvage, l'interférence avec d'autres facteurs de transcription (Oren and Rotter 2010). L'origine de cette propriété oncogénique a été étudiée par Lassus et al. Ils ont trouvé que de très faibles niveaux de p53 (inactive) sauvage protègent les cellules contre l'apoptose de manière indépendante de l'arrêt de cycle cellulaire (Lassus, Ferlin et al. 1996; Lassus, Bertrand et al. 1999), ce qui contrecarre le rôle physiologique de p53 activée (stabilisée et accumulée). Il est possible que p53 mutante oncogène conserve les fonctions de p53 inactive. Cependant, aucune étude systématique n'a été réalisée afin de déterminer les mutants ayant des propriétés GOF. Ainsi, il n'existe jusqu'à présent aucune preuve concluante que GOF contribue à la sélection des mutants de p53 dans les cancers humains.



(Figure 10) Résumé synthétique du rôle p53 sauvage ou mutante. P53 mutante exerce une activité oncogénique (dit gain de fonction oncogénique) qui peut participer aux différents stades de la progression tumorale.

e) - Combinaison d'effets; dominant négatif et oncogénique

La combinaison des effets dominants négatifs et oncogéniques forme les effets oncogènes de mutants p53. Le rôle de cette combinaison a été étudié dans l'angiogénèse. Dans ces études, il n'y avait pas de séparation entre le gain de fonction oncogénique et l'effet dominant négatif, car les essais ont été réalisés dans des cellules exprimant p53 sauvage. Il a été montré que la protéine p53 mutante a diminué l'expression de thrombospondine-1 (inhibiteur de l'angiogénèse) (Grant, Kyshtoobayeva et al. 1998), a augmenté l'expression basale du facteur de croissance des fibroblastes (bFGF) (Ueba, Nosaka et al. 1994), et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Kieser, Weich et al. 1994). Ce qui est contraire au rôle physiologique de p53 sauvage qui est impliquée dans l'inhibition de l'angiogénèse en général et du VEGF en particulier (Mukhopadhyay, Tsiokas et al. 1995). L'effet dominant négatif de p53 mutant explique alors en partie cette augmentation.

7.5.1.2 *Surexpression de mdm2*

L'un des mécanismes d'inactivation de p53 est la surexpression de son régulateur négatif mdm2. La surexpression du gène mdm2, *in vitro*, induit le potentiel tumorigénique des cellules primaires des fibroblastes d'embryon de rat et l'emporte sur l'activité suppresseur de tumeur de p53 (Finlay 1993). Le gène mdm2 est fréquemment amplifié ou surexprimé dans l'absence de mutations du gène p53 dans la plupart des types de sarcomes, mais aussi dans les leucémies / les lymphomes, le mélanome, et le glioblastome. Le premier rapport examinant la dérégulation de mdm2 dans les tumeurs humaines en tant que mécanisme alternatif de blocage de l'activité antiproliférative de p53 a trouvé une amplification génique de mdm2 dans plus d'un tiers de 71 sarcomes incluant ceux des os et des tissus mous (Oliner, Kinzler et al. 1992; Leach, Tokino et al. 1993). La surexpression de mdm2 était également associée à la tumorigénèse dans certains types de mélanome cutané n'ayant pas de mutations de p53. Parmi 172 cas représentant de différents degrés de transformation des mélanocytes (des naevus dysplasiques, des mélanomes *in situ*, invasifs, et métastatiques), la surexpression mdm2 est corrélée avec la progression maligne (6% de 16 naevi dysplasiques, 27% des 11 mélanomes *in situ*, et 56% de 145 mélanomes invasifs et métastatiques (Polsky, Bastian et al. 2001). Dans le cancer bronchique, mdm2 a été trouvé surexprimé dans 31% des 192 cas de tous les types histologiques. Par ailleurs, une relation inverse entre la perte de p14^{arf} et la surexpression de mdm2 était présente, renforçant l'idée que p14^{arf} et mdm2 agissent dans une voie commune de régularisation de p53 (Eymin, Gazzeri et al. 2002).

7.5.1.3 *Perte de l'expression de p14^{arf}*

La p14^{arf} est inactivée principalement par délétion homozygote du locus INK4a (plus rarement par méthylation de son promoteur), dans 25% de CBNPC (Gazzeri, Della Valle et al. 1998). Du fait, la perte de l'expression de p14^{arf} libère mdm2 entraînant ainsi une augmentation de dégradation de p53 par la voie mdm2-protéasome. Les expériences *in vitro* et *in vivo* ont donné des preuves solides qui place p14^{arf} comme un régulateur positif en amont de p53 : (a) l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire par p14^{arf} en phase G1 exige la présence p53, (b) p14^{arf} supprime fortement la transformation oncogénique induite par Myc et ras et cette suppression nécessite une fonction intacte de p53 (Pomerantz, Schreiber-Agus et al. 1998). L'analyse de p16INK4a, p14^{arf}, et p53 dans 38 échantillons de CBNPC (19 adénocarcinomes et 19 carcinomes épidermoïdes) a montré que p16INK4a a été inactivé dans 58% des tumeurs par des délétions homozygotes, hyperméthylation du promoteur, et la

mutation ponctuelle dans l'exon 2 (Sanchez-Cespedes, Reed et al. 1999). Quatorze tumeurs avaient simultanément l'inactivation de p16INK4a et p14^{arf}, le plus souvent en raison des délétions homozygotes comprenant les locus Ink4a/Arf (Sanchez-Cespedes, Reed et al. 1999). L'analyse de p14^{arf} par IHC, dans 116 patients atteint de CBNPC a montré que l'expression de p14^{arf} était faible ou perdue chez 57% des patients (Mounawar, et 2007). Enfin, la capacité de mdm2 de cibler p53 vers la dégradation a été inhibé par p14^{arf} (Sherr 2006)

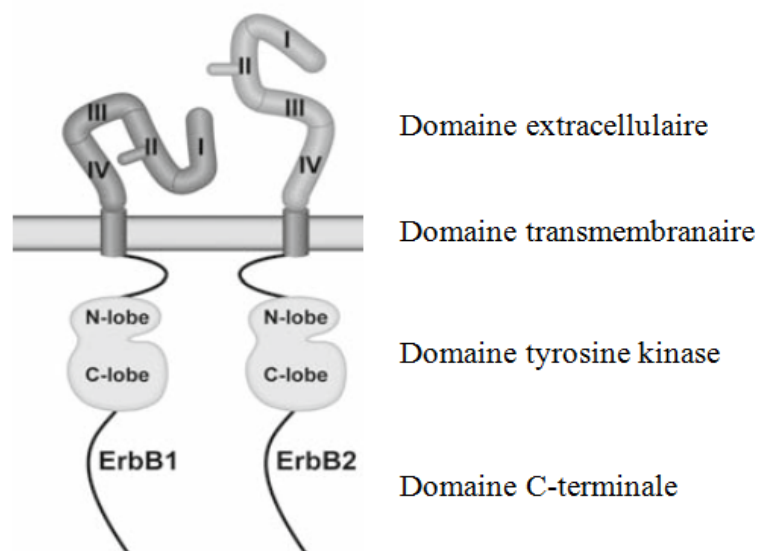
8 FAMILLE DES RÉCEPTEURS ERB/HER À ACTIVITÉ TYROSINE KINASE

8.1 Famille HERs

L'un des mécanismes fondamentaux par lequel les cellules dans l'organisme multicellulaire communiquent entre elles est la liaison des ligands polypeptides aux récepteurs possédant des activités catalytiques à tyrosine kinase. Ces récepteurs à tyrosine kinase (RTK) forment une importante famille de récepteurs transmembranaires présentant une activité tyrosine kinase intracytoplasmique. Plus d'une vingtaine de familles ont été identifiées, ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire ou la différenciation. L'un des membres importants de cette famille sont les récepteurs aux facteurs de croissance qui comprennent 4 types de récepteurs, *human epidermal growth factor receptor 1* (HER1/EGFR/ErbB-1), ErbB-2/HER-2/neu, ErbB-3/HER-3 et ErbB-4/HER 4.

8.2 Structure d'HERs

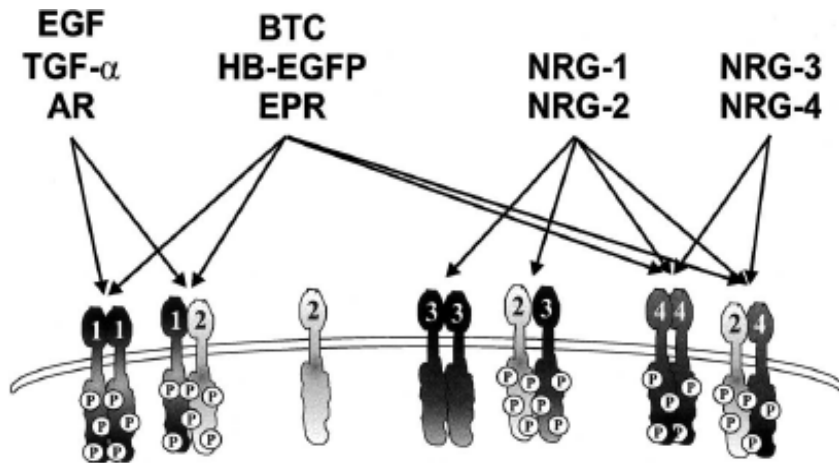
Les HERs sont des glycoprotéines transmembranaires. Ils possèdent une structure à chaîne simple, de taille variable, composée de trois régions majeures : une région extracellulaire constituée du domaine extracellulaire et impliquée dans la reconnaissance du ligand et de la formation du dimère; un domaine transmembranaire hydrophobe favorisant l'ancrage à la membrane; et une région intracellulaire. Cette dernière qui porte l'activité catalytique est formé de deux lobes : l'un, petit du côté N-terminal et l'autre, plus grand, du côté C-terminale. Les deux lobes sont séparés par un sillon où l'ATP se fixe. On décrit aussi, dans la région intracellulaire, un domaine C-terminale riche en sites de phosphorylation, très importante pour la transduction du signal (figure 11)



(Figure 11) : Schéma représentant les récepteurs d'EGFR et d'HER2 : ces récepteurs composés de domaine extracellulaire (riche en leucine (I et III) et en cystéine (II et IV)), domaine transmembranaire et domaine intracellulaire (Burgess, Cho et al. 2003)

8.3 Ligands d'HERs

Dans des conditions physiologiques normales, l'activation des récepteurs HERs est contrôlée par l'expression temporelle et spatiale de leurs ligands (membres de la famille de facteurs de croissance EGF) (Peles and Yarden 1993; Riese and Stern 1998). Ce sont des peptides produits comme précurseurs transmembranaires. La partie extracellulaire (ectodomaine) est clivée par protéolyse entraînant ainsi la libération de facteurs de croissance soluble (Massague and Pandiella 1993). Selon leurs spécificités de liaison aux HERs, ces ligands sont divisés en trois groupes. Le premier comprend les ligands EGF, amphiréguline et TGF- α , qui se lient spécifiquement à l'EGFR (Olayioye, Neve et al. 2000; Hynes and Lane 2005). Le deuxième qui contient Betacelluline, l'Hb-EGF ou (HB-EGF), et l'épiréguline se lient à EGFR et à HER4 (Olayioye, Neve et al. 2000). Le troisième groupe est composé de 4 types de neurégulines (NRG) qui se lient à HER3 et 4 (NRG-1 et NRG-2) ou seulement HER4 (NRG-3 et NRG-4). Cependant, aucun ligand n'a pas encore identifié pour HER2 (figure 12), ce qui exige sa dimérisation avec un autre récepteur activé de la famille HERs pour initier la signalisation.

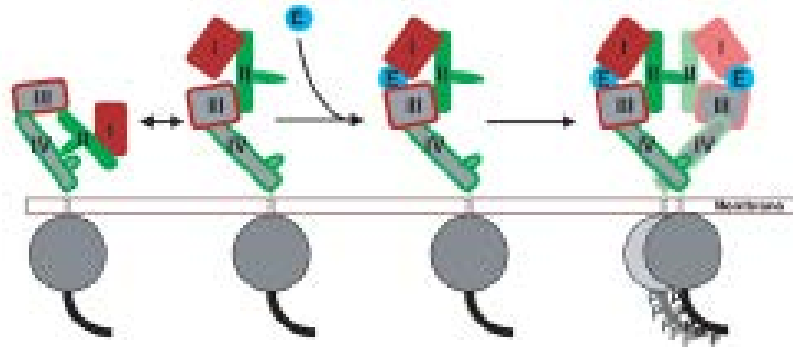


(Figure 12) Spécificité de liaison des ligands EGF-like aux récepteurs HERs: Les ligands sont divisés dans plusieurs catégories selon leurs capacités de liaisons aux HERs. HER2 n'a pas de ligand et besoin de partenaire pour l'acquisition d'un potentiel de signalisation. HER3 ne possède pas d'activité de tyrosine kinase. L'hétérodimère HER2/HER3 induit par NRG est le plus fort en terme de capacité mitogénique (Holbro, Civenni et al. 2003).

8.4 Mécanisme d'activation et voies de signalisation

8.4.1 Mécanisme d'activation

A l'état normal inactif, les récepteurs se trouvent en forme monomère. Pour être activés, les récepteurs doivent former des dimères ; ceux-ci peuvent être de deux sortes, homodimères (monomères de même nature comme HER1/HER1) ou hétérodimères (avec d'autres monomères tels que HER3/HER2). La dimérisation des récepteurs se forme sous l'action des ligands et entraîne le rapprochement des domaines cytoplasmiques tyrosines kinase des deux récepteurs, induisant alors la transphosphorylation des résidus tyrosines par l'intermédiaire de l'adénosine triphosphate (ATP) (figure 13). Ces résidus permettront le recrutement de différentes molécules de signalisation qui vont conduire à la propagation du signal de croissance aux différents processus biologique (figure 13).

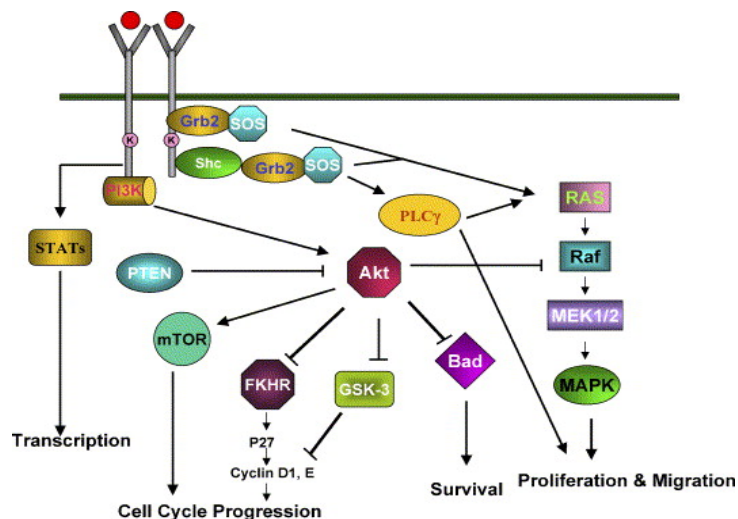


(Figure 13) Modèle de dimérisation induite par les ligands EGF-like

La liaison du ligand à un sous domaine I ou III de domaine extracellulaire d'EGFR déclenche un changement conformationnel dans ce domaine permettant la libération du bras de dimérisation de sa forme fixe intramoléculaire et permettant d'adopter la conformation étendue permettant ainsi la dimérisation. Une autre possibilité considère qu'EGFR a une structure dynamique comprenant un large éventail de différentes conformations, et que l'EGF se lie au récepteur ayant une configuration, avec le bras de domaine de dimérisation II exposé (Ferguson 2004).

8.4.2 Voies de signalisations activées par les HERs

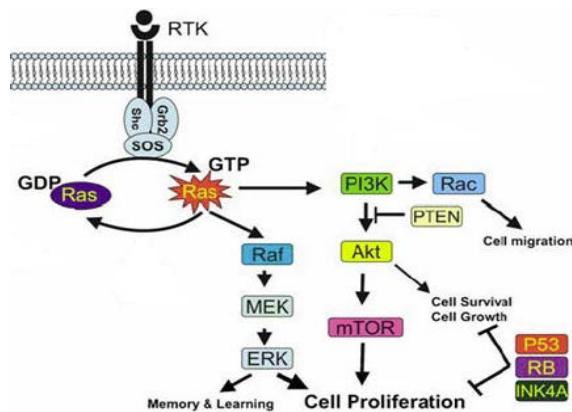
Plusieurs voies de signalisation impliquées dans la transformation oncogénique ont été décrites en aval d'HER. Les voies principales sont schématisées dans la figure 14



(Figure 14) : Schématisation des voies de signalisation activées en aval d'HERs. L'activation des récepteurs HERs déclenche des cascades de signalisation qui dépend au type cellulaire et aux facteurs de croissance impliqués. L'activation de ces récepteurs conduit à la transactivation de l'une des voies majeure PI3K/Akt, MAPK, PLC, STAT. Chacune de ces molécules va initier un cascade de signalisation aboutissant à la régularisation des gènes impliqués dans la transcription et la progression du cycle cellulaire (Singh and Harris 2005)

8.4.2.1 Ras/MAPK

Ras est une petite protéine G de 21 kDa, localisée à la surface interne de la membrane plasmique et activée en aval des RTK. Sa famille comprend trois membres K-ras, H-ras et N-ras. Cette protéine agit en tant que transducteur des signaux intracellulaires (Vetter and Wittinghofer 2001) et sa forme active interagit avec une grande variété de protéines effectrices en aval. Le lien entre la protéine Ras et le récepteur tyrosine kinase est assuré par des protéines adaptatrices, elles-mêmes complexées au facteur d'échange SOS (Son of Sevenless). Ainsi recruté à la membrane plasmique, ce facteur d'échange peut alors interagir avec la protéine Ras, et catalyser le départ de la guanine diphosphate (GDP) liée à la forme inactive de Ras. Cette dernière fixe alors de la guanine triphosphate, ce qui induit un changement conformationnel. Ras-GTP peut alors interagir avec une demi-douzaine de protéines effectrices qui induisent autant de signalisations intracellulaires parallèles (Vojtek and Der 1998). Le retour de Ras à la conformation inactive se fait par l'hydrolyse du GTP en GDP (figure 15). Le principal effecteur de Ras est la kinase Raf, qui, une fois activé, va déclencher une cascade de phosphorylation (cascade des MAPK), aboutissant à la mise en jeu, dans le noyau de la cellule, de facteurs de transcription (c-jun, c-fos) (Kyriakis and Avruch 2001). Ces derniers vont activer la transcription de gènes prolifératifs, ou de gènes impliqués dans la motilité cellulaire et l'angiogénèse. Une autre voie de signalisation en aval de Ras implique la PI3K qui active, à son tour, AKT, impliqué dans l'apoptose (Luo, Manning et al. 2003)



(Figure 15) : Voie Ras, mécanisme d'activation-inactivation de protéine Ras et les principales protéines effectrices en aval (Raf et PI3K). (Le and Parada 2007)

8.4.2.2 *Kinase Src*

La protéine Src contrôle la prolifération, la croissance, la migration, la survie ainsi que l'angiogenèse (Parsons and Parsons 2004). Elle est impliquée dans la transduction des signaux générés par les récepteurs aux facteurs de croissance tels qu'EGFR. L'interaction de Src avec les résidus phosphotyrosilés du récepteur membranaire via son domaine SH2 permet son activation et par conséquent, la propagation du signal de croissance (Thomas and Brugge 1997) via l'activation d'autres protéines telles que Ras, PI3K ou STAT (Olayioye 2001).

8.4.2.3 *Voie JAKs et STATs*

Les STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) sont des protéines impliquées dans différents processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Ihle, Nosaka et al. 1997). Sept membres de la famille STAT ont été identifiés. Les protéines STATs 1, 3, 5a et 5b sont activées en réponse aux cytokines, mais également à divers facteurs de croissance tels que l'EGF, le PDGF, IGF-1. Les protéines STATs 2, 4 et 6 sont stimulées par l'interféron- α ou par différentes interleukines. Les protéines STATs sont des facteurs de transcription inactifs, qui sont activés après stimulation du récepteur spécifique de la famille de kinases JAK (*Janus Kinase*). Son activation entraîne sa dimérisation puis sa translocation au noyau, induisant la transcription des différents gènes impliqués dans le processus tumoral (Silva 2004). La sérine/thréonine kinase Src joue un rôle dans l'activation des STATs dépendant des HERs.

8.4.2.4 *Voie PI3K*

Cette voie régule différents processus cellulaires tels que la prolifération, la croissance, et l'apoptose (Cantley 2002). La protéine PI3k est constituée de deux sous-unités : régulatrice (p85) et catalytique (p110). L'interaction de PI3K avec les récepteurs HERs se fait par la sous-unité p85. Les signalisations en aval de PI3K sont transmises principalement par Akt. Ce dernier est impliqué dans des effets biologiques, tels que la survie et la prolifération. Son rôle dans la survie passe via la phosphorylation en particulier (Bad, Caspase-9, m-Tor) (Pommery and Henichart 2005). Par contre, son effet prolifératif fait intervenir la protéine Raf-1 et par conséquent la stimulation de la voie Ras/Raf/MAPK.

8.4.2.5 *La voie Phospholipase C*

Les PLCs sont classées en plusieurs groupes (β , γ , δ , ϵ). La PLC γ est régulée par RTK. Son activation conduit à l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en 1,2-diacylglycérol (DAG) et inositol (1,4,5)-triphosphate (IP3). L'IP3 permet la libération de calcium du réticulum endoplasmique. L'augmentation de calcium intracellulaire permet la modulation de nombreuses enzymes et protéines comme l'AMPc phosphodiesterase, la NO Synthase ou la CaM kinase (*Ca²⁺/calmoduline dependent kinase*). Le DAG est capable d'activer la protéine kinase C (PKC). Ce dernier, une fois activé, participe à de nombreux processus biologiques tels que la prolifération en activant la voie Ras/Raf/MAPK (Marais, Light et al. 1998)

8.5 Régulation de la famille HERs

Différents mécanismes tels que l'endocytose ou encore la déphosphorylation contribuent à la régulation négative d'HERs (downregulation). En plus, des phosphorylations inhibitrices ou activatrices réalisées par des kinases (telles que la PKC) peuvent également intervenir et jouer un rôle dans la modulation du récepteur :

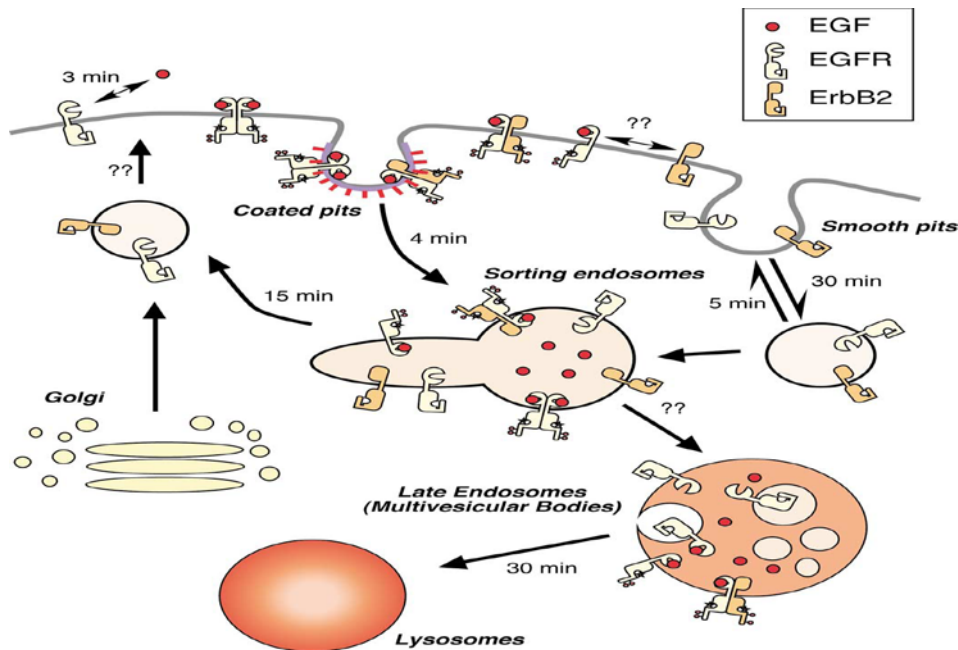
8.5.1 *Régulation négative par l'internalisation et l'endocytose*

Aux conditions de croissance cellulaires stationnaires, la plus grande partie des récepteurs HERs sont localisés au niveau de la membrane cellulaire où ils sont constitutivement internalisés (Resat, Ewald et al. 2003). Cependant, après l'internalisation, les récepteurs HERs inactifs sont principalement recyclés à la surface cellulaire (Wiley 2003). Le faible taux d'internalisation des HERs et leurs recyclages rapides conduisent à localisation prédominante d'HERs au niveau membranaire. Par ailleurs, la demi-vie de récepteur est très variable selon leur niveau d'expression. Ainsi, *in vitro*, dans les cellules exprimant faiblement ou modérément les EGFR (< 200000/cellule), les récepteurs sont recyclés avec une demi-vie (t1/2) de 6 à 10 heures, tandis que dans des cellules surexprimant EGFR, comme les cellules de carcinome épidermoïde humain (A-431), sa demi-vie pourrait atteindre 24 heures ou plus (Beguinot, Lyall et al. 1984; Stoscheck and Carpenter 1984). Le taux recyclé d'HER2 exprimé dans des cellules NR6 était semblable à celui d'EGFR non stimulé (Sorkin, Di Fiore et al. 1993). La demi-vie d'HER3 dans les cellules MCF-7 est de 2,4h (Cao, Wu et al. 2007) alors qu'HER4 exprimé dans les cellules COS a une demi-vie de 5 à 7h (Sundvall, Korhonen et al.

2008). Il semble que la corrélation entre le recyclage de la famille HERs non stimulé et leurs niveaux d'expression sont réciproques, vraisemblablement en raison de la saturabilité des voies d'internalisation et de dégradation.

La voie de l'internalisation dépend de l'expression de ligands et/ou de récepteurs (Wiley 1988; Jiang and Sorkin 2003). Dans des conditions physiologiques (concentration faible des ligands et expression modérée d'EGFR), les EGFR sont principalement internalisés par voie rapide dépendante de la clathrine. Cependant, dans les conditions de surexpression de récepteur et/ou de forte concentration des ligands, la voie de clathrine sera saturée, et la plupart des complexes (ligand-récepteur) sont internalisés avec une cinétique lente indépendante de la clathrine et similaire à celle des récepteurs inactifs.

Après l'endocytose, les vésicules contenant les complexes ligands-récepteur seront fusionnées avec l'endosome précoce. Les endosomes précoces sont fortement dynamiques et ont la tendance soit à recycler rapidement les récepteurs à la surface cellulaire, soit à fusionner avec les autres menant à la formation des endosomes intermédiaires (Gruenberg and Maxfield 1995; Maxfield and McGraw 2004). Le pH dans les endosomes précoces et intermédiaires est de 6.0 à 6.5 et avec ces pH les complexes (ligand-récepteur) ne dissocient pas (Sorkin, Teslenko et al. 1988). La maturation des endosomes par la fusion des endosomes précoces et le changement morphologique avec les compositions chimiques conduit à la formation des endosomes tardifs. Ensuite, la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes qui portent des enzymes protéolytiques mène à la protéolyse rapide des composants intra-liminaux contenant EGFR (Miller, Beardmore et al. 1986) (figure 16).



(Figure 16) Internalisation des récepteurs HERs : EGFR activé et l'hétérodimère EGFR-HER2 sont internalisés par une voie (coated pits), mais d'autres membres de la famille HERs (inactives) sont susceptibles d'être internalisé par une voie (smooth pits). Le temps nécessaire pour l'hétérodimérisation et la formation de (multivesicular bodies) est inconnu. L'internalisation d'HER3 et 4 est similaire à celle d'HER2 (Wiley 2003)

HER2

Dans des cellules surexprimant HER2, ces récepteurs sont principalement localisés au niveau de la membrane cellulaire, indiquant ainsi que la surexpression d'HER2 ne mène pas à l'accélération de son endocytose (Wang, Zhang et al. 1999). En plus, l'hétérodimérisation d'HER2 avec EGFR peut influencer sur le trafic endocytique pour les deux récepteurs. Le traitement des cellules exprimant faiblement HER2 par EGF aboutit en régulation négative d'HER2 (down-regulation) (Kornilova, Taverna et al. 1992). En revanche, l'activation d'EGFR, dans des cellules surexprimant HER2, n'affecte pas l'expression membranaire d'HER2 ni sa dégradation (Wang, Zhang et al. 1999; Haslekas, Breen et al. 2005). De plus, la surexpression d'HER2 avait un effet dominant-négatif sur la régulation négative d'EGFR stimulé (Wang, Zhang et al. 1999). Il a été montré, dans certains cas, qu'HER2 peut empêcher l'internalisation d'EGFR par l'endocytose dépendant de la clathrine (Haslekas, Breen et al. 2005; Offterdinger and Bastiaens 2008) et dans d'autres cas, il n'avait pas d'influence sur l'internalisation d'EGFR. Par contre, la surexpression d'HER2 oriente EGFR de la voie de dégradation vers celle de recyclage (Worthylake, Opresko et al. 1999). Le mécanisme par lequel HER2 agit pour entraver l'internalisation d'HER1 n'est pas clair. Cependant, il est

possible que l'internalisation d'HER2 ainsi que l'hétérodimère HER1-HER2 soient limitée par les mécanismes de rétention membranaire. Il a été suggéré que le domaine régulateur (carboxyl-terminal) d'HER2 contient les signaux moléculaires responsables de la rétention d'HER2 dans la membrane plasmique où il manque des signaux nécessaires qui renforcent l'internalisation rapide (Sorkin, Di Fiore et al. 1993; Wang, Zhang et al. 1999).

HER3

L'activation d'HER3 conduit à son internalisation ainsi qu'à sa régulation négative. Toutefois, cette internalisation est plus lente que celle d'EGFR (Baulida, Kraus et al. 1996). De plus, HER3 est inefficacement trié vers la voie de dégradation, apparemment en raison du manque, dans le domaine c-terminal, de motif de ciblage vers les lysosomes (Waterman, Sabanai et al. 1998; Waterman, Alroy et al. 1999). En plus, il a aussi été suggéré que les neurégulines n'orientent pas efficacement HER3 à la dégradation en raison de la dissociation de complexes (ligand-récepteur) dans les endosomes (Waterman, Alroy et al. 1999).

8.5.2 Déphosphorylation

Les protéines tyrosine phosphatases (PTP) assurent la déphosphorylation des résidus tyrosine et permettent de réguler et d'équilibrer les réactions de phosphorylation. Dans ce contexte, les PTP pourraient réguler les voies de signalisation engendrées par les facteurs de croissance, les cytokines ou les hormones. Parmi ces PTP, la plus connue est Shp1 qui interagit au niveau de la pTyr1173 de l'EGFR et atténue la signalisation émergente par ce récepteur (Keilhack, Tenev et al. 1998).

8.5.3 Régulation positive

Certains stimuli non physiologiques tels que le stress oxydatif ou mécanique, les rayons U.V. ou l'irradiation γ sont capable d'activer EGFR par phosphorylation. Ces stimulations seront à l'origine de l'inhibition de phosphatases responsables de l'équilibre entre la forme active et inactive du récepteur

8.6 Famille HERs et cancer

La famille HERs et leurs ligands sont impliqués dans plus de 70% de tous les cancers (tableau 8 et 9). Leur activité augmentée est l'un des événements biologiques importants au

cours de développement tumoral. Cette activité accrue est due à un certain nombre d'événements moléculaires, qui peuvent conduire à l'activation persistante de l'activité kinase du récepteur. La plus commune est la surexpression des récepteurs seuls et/ou associée à la surexpression de leurs ligands comme TGF α , EGF, amphiréguline et Hb-EGF conduisant à une stimulation autocrine-paracrine persistante. Un autre mécanisme responsable de l'activation constitutive est la mutation activatrice dans le domaine tyrosine kinase ou celle entraînant la délétion des exons 2-7 d'EGFR, ce qui conduit à un récepteur actif persistante en l'absence de ligands (Huang, Nagane et al. 1997; Wikstrand, Reist et al. 1998). Ainsi, cette suractivité intervient dans des phénomènes biologiques responsables du développement et de la progression tumorale telles la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse, l'adhérence et l'invasion.

Tableau 8 : Type d'altérations d'HERs et leur pronostique potentiel dans les différents cancers humains (Monnier, Milano et al. 2004)

Récepteur	Type de dérégulation	Types de cancer
HER1	Surexpression Mutation conduisant à une activité constitutive	Tête et cou, vessie, prostate, rein, poumon non à petites cellules, ovaires, pancréas et glioblastome
HER2	Surexpression Co-expression avec HER1 améliore la capacité à prédire l'agressivité des cancers du sein	Sein, ovaires
HER3	Co-expression avec HER2 améliore la capacité à prédire l'agressivité des cancers du sein et ORL Expression réduite produisant un phénotype différencié	Sein, ORL, côlon, estomac, prostate, autres carcinomes
HER4	Rôle antiprolifératif Co-exprimé avec HER2 a une valeur pronostique Valeur pronostique positive si exprimé seul	Sein, prostate, médulloblastome

Table 9 : Fréquence de surexpression des HERs dans les principaux cancers humains (Monnier, Milano et al. 2004)

Type tumoral	Pourcentage de tumeurs surexprimant			
	EGFR	HER2	HER3	HER4
Tumeurs tête et cou	80-100%	33-76%	faible	
Bronchique	45-90%	20-30%	21-71%	49-60%
Adénocarcinome	30-50%	17-82%	28-47%	
Pancréas				
Côlon-rectum	28-77%	51%		
Œsophage	43-89%	10%		
Estomac	33-74%	25%	faible	
Col utérin	90%			
(malpighien)				
Sein	14-91%	25-30%	20-70%	7-13%
Ovaire	35-48%	4-30%		
Prostate	65%	35-56%		
Vessie	31-48%	17-71%		
Carcinome rénal	50-90%			
Gliomes	40-63%			

HER1

Il est surexprimé à la surface des cellules tumorales de nombreux cancers, tels que le cancer de la prostate, de la tête et le cou, du CBNPC, du rein et du sein. Il faut toutefois noter que, pour un organe donné, ses pourcentages d'expression peuvent grandement varier (tableau 9). Cette très grande variabilité pour un organe donné est due à la variabilité dans les sous-types histologiques ainsi qu'aux différents stades de progression de la maladie. Ce récepteur représente un médiateur principal de l'activité tumorale en induisant la prolifération, le blocage de l'apoptose et l'effet angiogénique.

HER2

La surexpression de HER2 était décrite dans les cancers du côlon, du sein, de l'endomètre, de l'œsophage ou du pancréas. Dans le cancer du sein, sa surexpression est un signe de mauvais pronostic, elle est due à une amplification génique dans 15 à 30% des cas de cancers invasifs du sein, et corrélée avec la taille, le grade de la tumeur et la baisse du nombre de récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Slamon, Clark et al. 1987). Mécanistiquement, la surexpression d'HER2 biaise la formation normale d'hétérodimères en élargissant le nombre de dimères formés et leur efficacité d'action puisque les hétérodimères avec HER2 sont

formés préférentiellement (Graus-Porta, Beerli et al. 1997) et induisent un signal plus fort (Alroy and Yarden 1997). La signalisation induite par HER2 est multiple, elle facilite le processus d'invasion (Spencer, Graus-Porta et al. 2000). Contrairement aux autres récepteurs EGF, la surexpression d'HER2 peuvent causer la transformation maligne, en absence des ligands. Cette observation suggère que HER2 a un haut niveau d'activité constitutive (indépendante du ligand) et l'expression d'HER2 au-dessus d'un seuil spécifique peut stimuler la croissance tumorale (Yarden and Sliwkowski 2001).

HER3

L'activité tyrosine kinase de ce récepteur est abolie en raison de la substitution dans le site catalytique d'un résidu asparagine en acide aspartique. Ce qui nécessite sa dimérisation avec d'autres membres de la famille HERs pour activer ses voies de signalisation (Jacobs, Gown et al. 1999). Ce récepteur possède de multiples sites de fixation pour la sous-unité p85 de la PI3 kinase, ce qui lui confère un rôle crucial dans la transduction du signal lors de la formation d'hétérodimères (Guy, Platko et al. 1994). HER3 est la plupart du temps surexprimé en association avec HER2 dans les cancers du sein invasifs et une corrélation entre l'expression de l'hétérodimère HER2-HER3 et la progression du cancer en cancer invasif a été montrée (deFazio, Chiew et al. 2000). Il est surexprimé dans d'autres cancers tels que le cancer de colon, de la prostate et de l'estomac.

HER4

Ce récepteur a un rôle plus complexe : une expression réduite a été corrélée avec phénotype de cancer différencié, tandis que sa surexpression dans les neuroblastomes n'a apparemment pas de signification clinicopathologique précise (Klapper, Kirschbaum et al. 2000). Il est exprimé dans environ 12 % des carcinomes mammaires (Witton, Reeves et al. 2003) où il apparaît comme un marqueur de bon pronostic. Il est rarement exprimé avec les autres membres de la famille HER.

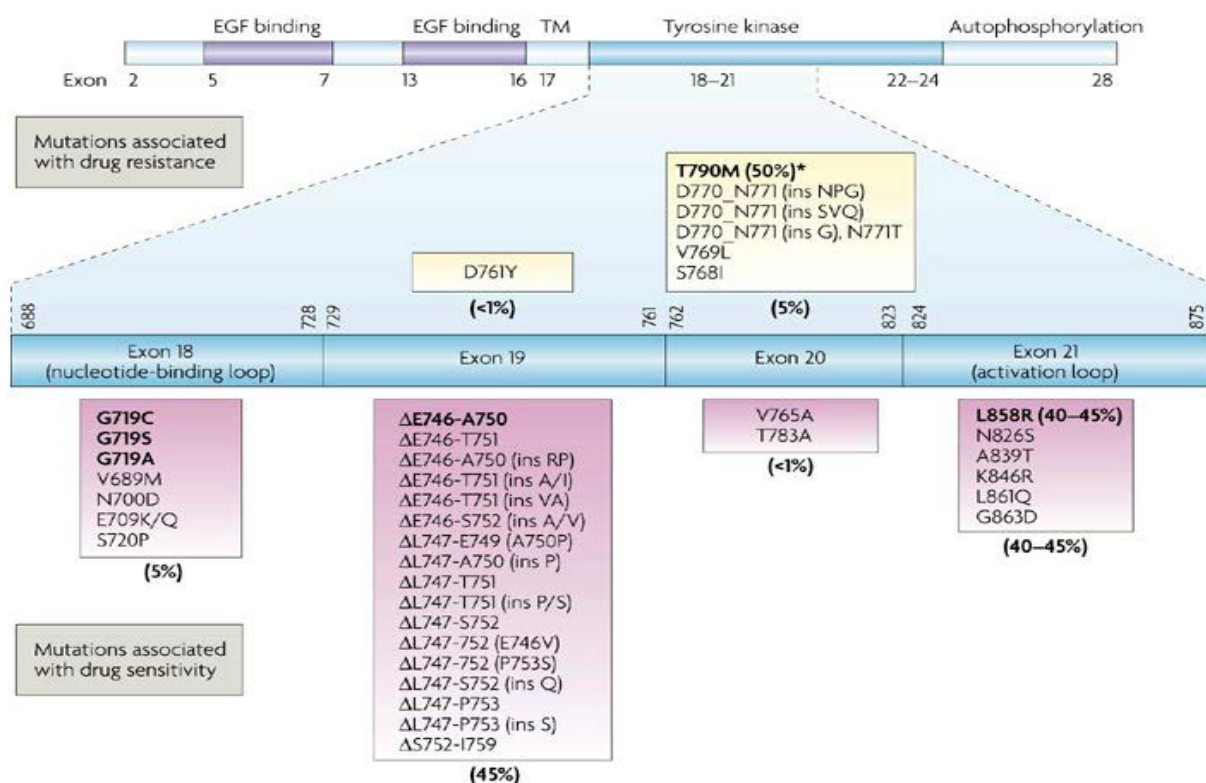
8.6.1 Mécanisme contribuant à l'activation constitutive d'HERs

8.6.1.1 Mutations HERs

8.6.1.1.1 Types de mutations

Les mutations d'EGFR comprennent 3 types très différents (délétion, insertions et mutations ponctuelles faux sens), elles ciblent les structures autour du sillon de fixation d'ATP. Quarante-cinq pour cent de ces mutations se représentent soit par délétion de quatre acides aminés (LREA) juste en aval d'un résidu lysine (745) dans l'exon 19 (45% de toutes les mutations), soit par mutations ponctuelles faux-sens essentiellement, une substitution d'une base unique L858R dans l'exon 21 (40-45 % de toutes les mutations). Le reste, ce sont des mutations ponctuelles occasionnelles qui peuvent se produire sur plusieurs autres sites en particulier, G719X (X indique : A, C, ou S) dans l'exon 18 (5 % de toutes les mutations) ou un petit nombre d'insertions/duplications dans l'exon 20 (vers 5% de toutes les mutations) (figure 17). Par ailleurs, les mutations en dehors des exons codant pour le domaine kinase sont rares dans les cancers du poumon, mais les mutations EGFRvIII (délétion exon 2-7) fréquemment présentes dans les gliomes ont été trouvées dans certains CBNPC, en particulier, les cancers épidermoïdes (Ji, Zhao et al. 2006).

Les travaux concernant les mutations EGFR ont montré qu'il s'agit de mutations somatiques. Toutefois, une famille avec des mutations germinales dans EGFR a été identifiée (Bell, Gore et al. 2005). Dans cette famille, six membres sur trois générations ont des cancers du poumon, dont trois avec le sous-type carcinome bronchiolo-alvéolaire. Les mutations EGFR (T790M) ont été isolées de la tumeur et des échantillons de sang périphérique chez deux patients pour lesquels des échantillons étaient disponibles.



(Figure 17) : Mutations d'EGFR et leurs fréquences. Structure de récepteur d'EGFR montrant la distribution des exons dans les domaines extracellulaire (EGF binding), transmembranaire (TM), et intracellulaire. Les exons (18-21) dans le domaine tyrosine kinase (partie en bleu) où les mutations EGFR se localisent se représentent en bleu. La fréquence et le détail de mutations d'EGFR qui sont associé avec sensibilité à l'erlotinib ou gefitinib se représentent par cases en rose ou avec résistance à ces médicaments par case en jaune (Sharma, Bell et al. 2007)

8.6.1.1.2 Caractéristiques cliniques des mutations EGFR

Une analyse examinant les mutations EGFR (exon 18-21) dans les tumeurs de plus de 3000 patients atteints de cancer du poumon de différentes institutions et lieux géographiques, de différents types histologiques, a été réalisée. Cette analyse a inclus aussi des tissus d'autres cancers. Les données montrent que les mutations d'EGFR se trouvent en particulier, dans une proportion de CBNPC. La présence de ces mutations ont été décrite également dans les cancers de la tête et du cou, du cholangiocarcinome, et des cancers du côlon, des ovaires, de l'œsophage et du pancréas (Riely, Politi et al. 2006). Dans le cancer bronchique, ces mutations étaient plus fréquentes chez les patients n'ayant jamais fumé, chez les femmes, chez les personnes d'origines asiatiques, et chez les patients atteints d'un adénocarcinome (Rosell, Moran et al. 2009). Au niveau européen, des données présentes dans le dossier de dépôt de demande d'AMM à l'EMA pour le gefitinib montrent que la fréquence des mutations est de

40 % chez les non-fumeurs et seulement de 7 % chez les fumeurs. De même, elles sont de 17 % chez les femmes et seulement de 6 % chez les hommes. Elles varient enfin selon le type histologique de la tumeur : elles sont de 16 % chez les patients atteints d'un adénocarcinome, mais seulement de 3 % des patients avec une autre forme histologique.

8.6.1.1.3 *Rôle oncogénique des mutations EGFR*

Il a été trouvé que les mutations dans le domaine tyrosine kinase d'EGFR peuvent favoriser les transformations oncogéniques (Politi, Zakowski et al. 2006). Ainsi, en utilisant des lignées cellulaires de CBNPC ayant des mutations ou des lignes cellulaires transfectées (fibroblastes de souris, cellules épithéliales bronchiques humaines, cellules épithéliales mammaires de souris), plusieurs chercheurs ont montré que la délétion dans l'exon 19 et les mutations L858R entraînent une activation de récepteur indépendamment du ligand et une durée d'activation prolongée après stimulation par ligand (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Amann, Kalyankrishna et al. 2005). En plus, des travaux réalisés *in vitro* ont montré que des mutations sélectionnées dans l'EGFR (G719S dans l'exon 18, délétion dans l'exon 19, L858R dans l'exon 21, et l'insertion dans l'exon 20) peuvent transformer à la fois les fibroblastes et les cellules épithéliales du poumon (Greulich, Chen et al. 2005; Carey, Garton et al. 2006). Des analyses biochimiques des lignées cellulaires de CBNPC et transfectées indiquent que, dans des lignées cellulaires portant des mutations dans l'EGFR, les facteurs STAT3 et 5 ainsi qu'AKT sont préférentiellement activés, alors que ERK demeure inchangée, suggérant alors une activation sélective des voies apoptotiques sans altération des voies de prolifération (Sordella, Bell et al. 2004; Amann, Kalyankrishna et al. 2005; Alvarez, Greulich et al. 2006)

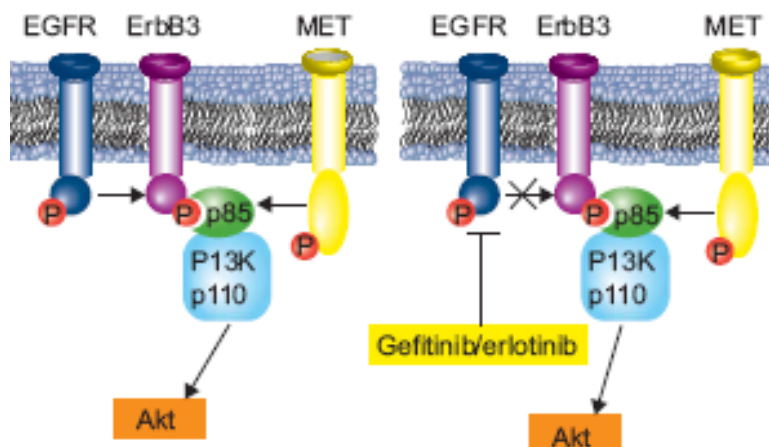
8.6.1.1.4 *Implication clinique des mutations EGFR*

L'implication des mutations EGFR dans la réponse aux ITK (inhibiteurs de tyrosine kinase) a été démontrée dans de nombreuses études. Les études initiales étaient rétrospectives fondées sur données des patients traités par Gefitinib ou Erlotinib avant que le statut des mutations EGFR soit connu. En général, ces études montrent un taux de réponse d'environ 75% pour les patients dont les tumeurs présentent des mutations par rapport au taux de réponse de moins de 10% pour ceux de type EGFR sauvage (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004; Pao, Miller et al. 2004; Cappuzzo, Hirsch et al. 2005; Tsao, Sakurada et al. 2005)

Ces résultats ont été confirmés dans cinq études prospectives réalisées dans l'objectif de déterminer les taux de réponse aux ITK dans des patients caucasiens et asiatiques, dont les tumeurs porteuses des mutations EGFR (Riely, Politi et al. 2006). En total, 74 des 95 patients (78%) dont les tumeurs avaient soit des délétions dans l'exon 19, soit des mutations L858R ont répondu aux ITK. Ces études ont confirmé que le statut des mutations EGFR est un facteur prédictif de la réponse aux ITK. Par ailleurs, plusieurs séries rétrospectives ont noté que la survie des patients traités par Gefitinib ou Erlotinib était plus longue dans les patients ayant des mutations EGFR que dans ceux sans ces mutations. Certains ont trouvé que cette survie prolongée peut néanmoins se produire même en l'absence de traitement par ITK dans des patients traités chirurgicalement (Haneda, Sasaki et al. 2006), tandis que d'autres n'ont trouvé aucune différence dans la survie globale, en l'absence de ITK, entre les patients ayant des mutations EGFR et ceux avec EGFR sauvage (Shigematsu, Lin et al. 2005). Paz-Ares *et al.* ont effectué une méta-analyse sur des données publiées concernant les patients dont les tumeurs portent des mutations activatrices de l'EGFR, traités par Erlotinib, Gefitinib ou chimiothérapie standard (Paz-Ares, Soulieres et al. 2010). Cette étude montre que les patients traités, en première ligne et plus, par Erlotinib ou Gefitinib ont une durée médiane de survie sans progression significativement plus longue (13,2 mois pour l'Erlotinib et 9,8 mois pour le Gefitinib) que les patients traités par chimiothérapie standard (5,9 mois). L'étude IPASS (Iressa Pan-Asia Study) a comparé le Gefitinib en première ligne versus carboplatine/paclitaxel (Mok, Wu et al. 2009). Les patients inclus étaient non-fumeurs ou ex-fumeurs et atteints d'adénocarcinomes bronchiques. Dans les 437 patients évaluables, les mutations d'EGFR ont été trouvées chez 59,7%. Les patients traités par Gefitinib avaient une maladie sans progression (MSP) supérieure à ceux traités par chimiothérapie. L'analyse en sous-groupes a démontré aussi que les patients ayant des mutations EGFR avaient une MSP supérieure avec le Gefitinib à la chimiothérapie. Enfin, une équipe espagnole a recherché, de manière prospective, les mutations activatrices de l'EGFR chez 2105 patients atteints du cancer bronchiques du poumon non à petites cellules (Rosell, Moran et al. 2009). Des mutations ont été mises en évidence chez 350 patients, soit un taux de mutation de 16,6 %. L'Erlotinib a été administré à 217 patients EGFR muté (dont 113 en première ligne et 104 en seconde ligne). Le taux de réponse a été de 70,2 %, dont 12,2 % de réponses complètes. La durée moyenne de survie sans progression était de 14 mois et la durée moyenne de survie 27 mois. Les patients présentant une mutation activatrice de l'EGFR dans leur tumeur ont un bénéfice accru au traitement par ITK-EGFR en termes de taux de réponse, de durée de survie

sans progression et de survie globale par rapport à ceux dont la tumeur présente la forme sauvage de l'EGFR.

L'explication proposée pour cette sensibilité aux ITK est que ces mutations entraînent des changements de configuration provoquant ainsi un repositionnement des résidus critiques autour de sillon de fixation d'ATP et la stabilisation de l'interaction d'ATP et ITK augmentant l'activité des récepteurs d'une part et d'autre part, en les rendant sensibles à ces drogues. Cependant, malgré une réponse primaire aux ITK, les patients avec mutations EGFR atteignent rarement une réponse complète. La présence de la tumeur et la poursuite du traitement avec le Gefitinib ou Erlotinib fournissent une pression sélective pour le développement des cellules tumorales ayant une résistance acquise au Gefitinib ou à l'Erlotinib. Les mécanismes de cette résistance acquise commencent à être élucidés. Des études ont montré que des mutations supplémentaires dans EGFR sont trouvées dans les échantillons ayant une résistance acquise (Kobayashi, Boggon et al. 2005; Pao, Miller et al. 2005). La lésion majeure identifiée à ce jour est une mutation T790M dans l'EGFR qui a été rapportée chez environ la moitié des tumeurs de patients après progression de la maladie (Kobayashi, Boggon et al. 2005; Pao, Miller et al. 2005; Kosaka, Yatabe et al. 2006). Cette substitution T790M dans EGFR pourrait bloquer la liaison de l'Erlotinib et du Gefitinib au sillon de fixation d'ATP (Jackman, Holmes et al. 2006). En plus, d'autres mutations associées à la résistance aux ITK ont été déterminées dans l'exon 19 et 20 (D761Y dans l'exon 19, insertion dans l'exon 20 (D770_N771insNPG) (Kwak, Sordella et al. 2005; Balak, Gong et al. 2006). Le second mécanisme majeur de la résistance acquise aux ITK est l'amplification observée des récepteurs MET chez vers 20% des patients de CBNPC et ayant développé cette résistance (Engelman, Zejnullahu et al. 2007). L'amplification de MET peut entraîner la stimulation de signalisation de phosphoinositide-3-kinase *via* HER3, indépendamment de l'EGFR (figure 18). L'amplification de MET se produit indépendamment de la mutation T790M, bien que les deux peuvent se produire simultanément chez le même patient (Bean, Brennan et al. 2007). D'autres mécanismes peuvent aussi expliquer la résistance aux ITK telles la mutation KRAS (Linardou, Dahabreh et al. 2008) et la perte de l'expression PTEN (régulateur négatif de PI3K) (Mellinghoff, Cloughesy et al. 2007).



(Figure 18) Amplification MET active la signalisation de phosphoinositide 3-kinase (PI3K) via HER3/ErbB3, indépendamment de l'EGFR. En présence d'ITK qui bloque l'activité kinase d'EGFR, l'activation d'HER3 peut être maintenue via les récepteurs MET, ce qui conduit à la résistance aux ITK (Cadranel, Zalczman et al. 2010).

8.6.1.1.5 HER2

Les mutations et l'amplification d'HER2 ont été identifiées chez des patients présentant un adénocarcinome du poumon. La fréquence de ces mutations est inférieure à 5%, et la fréquence de l'amplification est de 5 à 10%. Les mutations du domaine kinase HER2 (insertions dans l'exon 20) sont corrélées avec le sexe féminin, le statut de non-fumeurs, et l'origine asiatique des patients atteints d'adénocarcinomes bronchiques (Shigematsu, Takahashi et al. 2005). L'amplification du gène HER2 est sensible aux inhibiteurs de la tyrosine kinase d'EGFR (Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005). Toutefois, les mutations HER2 sont associées avec la résistance à ces inhibiteurs, mais elles sont sensibles aux thérapies ciblées HER2 (Wang, Narasanna et al. 2006).

8.6.1.1.6 HER3 et HER4

Les mutations HER3 dans le domaine tyrosine kinase n'ont pas été détectés chez des patients atteints de CBNPC (Jeong, Soung et al. 2006). Les mutations dans le domaine kinase d'HER4 kinase ont été trouvées dans 2 à 3% des patients asiatiques atteints de cette maladie, avec une éventuelle association avec le sexe masculin et le tabagisme (Soung, Lee et al. 2006)

8.6.1.2 Surexpression de récepteurs ou leurs ligands

Quarante trois à quatre-vingt-quatre pour cent de CBNPC surexpriment l'EGFR. Selon le type histologique, la surexpression de ce récepteur a été décrite dans 84% de carcinome épidermoïde, 65% d'adénocarcinome et 68% de carcinome à grandes cellules. (Hirsch, Scagliotti et al. 2003). Cette augmentation de l'expression a été décrite même dans les lésions bronchiques pré-invasives en particulier, les dysplasies et CIS où son expression anormale a été trouvée dans 18 de 29 cas (62%) (Rusch, Klimstra et al. 1995) Beaucoup de ces tumeurs secrètent aussi les ligands du récepteur tels l'EGF ou le TGF α , ce qui réalise donc une boucle de stimulation autocrine ou paracrine, les rendant autosuffisantes vis-à-vis de l'EGF ou du TGF α . La stimulation de ce récepteur entraîne un signal constitutif de prolifération cellulaire. Le mécanisme le plus fréquent en cause dans cette expression importante est l'amplification du gène d'EGFR en plusieurs copies, voire une multiplication du chromosome 7 portant le gène de l'EGFR.

Le rôle pronostique de l'expression d'EGFR a été prospectivement étudié par IHC dans un groupe de 130 patients opérés de CBNPC. Trente-sept pour cent de ces patients surexprimaient le récepteur. La survie à 2 et 5 ans était significativement moins dans les patients surexprimant ce récepteur que chez les autres (43% vs 70% et 31% vs 46%, $p > 0.01$). Dans une autre étude, l'expression d'EGFR a été étudiée par IHC dans des échantillons de tissus obtenus de 183 patients opérés de CBNPC. Dans ce travail, l'expression d'EGFR n'était pas associée à un mauvais pronostic. Cependant, les patients ayant des tumeurs surexprimant l'EGFR avaient une tendance à une survie plus courte que les patients porteurs des tumeurs expriment légèrement ce récepteur (Hirsch, Varella-Garcia et al. 2003). Une autre étude a analysé l'expression d'EGFR par IHC sur 290 échantillons de CBNPC a trouvé que la coloration positive pour EGFR était un facteur de risque de mauvais pronostic (Ohsaki, Tanno et al. 2000). Les données d'une méta-analyse publiée par Meert et al (Meert, Martin et al. 2002), portant sur 2185 patients dans onze études, ne retrouvent pas de corrélation entre la surexpression d'EGFR et le pronostic. Cependant, Tateishi et al ont montré qu'une expression élevée des ligands TGF α et EGF dans les CBNPC était associée à une survie à 5 ans plus faible que lorsque leur niveau d'expression est faible (Tateishi, Ishida et al. 1990), ce qui suggère au moins une boucle de régulation autocrine donc un ciblage potentiellement intéressant.

8.6.1.3 Transactivation d'EGFR par les récepteurs couplés aux protéines-G (RCPG)

Le traitement des cellules par des agonistes des RCPG tels que la thrombine, la bombésine, et l'acide lysophosphatique (LPA), transactive EGFR (Zwick, Hackel et al. 1999). Le mécanisme évoqué implique la stimulation rapide des métalloprotéases, suivi par le clivage du précurseur du ligand d'EGFR, l'Hb-EGF, qui ensuite, se lie et l'activent (Prenzel, Zwick et al. 1999; Gschwind, Zwick et al. 2001). Plusieurs études montrent que la transactivation d'EGFR est impliquée dans plusieurs effets induits par les agonistes des RCPG. Ainsi, la prolifération et la migration induite par LPA dans des lignées cellulaires de cancer épidermoïde nécessitent l'activité d'EGFR ainsi que des métalloprotéinases (Gschwind, Prenzel et al. 2002). La migration induite par la thrombine dans des cellules musculaires lisses dépend de l'activité d'EGFR stimulée par Hb-EGF (Kalmes, Vesti et al. 2000) et la prolifération des fibroblastes induite par bombésine est abrogée par inhibiteurs EGFR (Santiskulvong, Sinnott-Smith et al. 2001). En plus, la prolifération des cellules musculaires vasculaires lisses, induite par ANGII (Angiotensine II), nécessite l'activation d'EGFR (Voisin, Foisy et al. 2002).

8.6.1.4 Synergie entre voie Wnt/Fz et HER

Les récepteurs Wnt sont des membres de la famille Fz (récepteurs de sept domaines transmembranaires). La liaison de Wnt à son récepteur initie une cascade de signalisation qui empêche le glyco-gène synthase kinase 3β (GSK- 3β) de phosphoryler β -caténine, ce qui conduit à sa stabilisation et sa translocation nucléaire où elle active les facteurs TCF/Lef (famille de facteurs de transcriptions) (van Noort and Clevers 2002). L'activation constitutive de cette voie est impliquée dans certains cancers (Polakis 2000). La coopération entre les récepteurs HERs et l'effecteur de Wnt, β -caténine, a été observée *in vitro*. L'activation des récepteurs HERs a conduit à la phosphorylation de résidu tyrosine de β -caténine stimulant ainsi la migration (Muller, Choidas et al. 1999) et la formation des métastases (Shibata, Ochiai et al. 1996). Une étude (Civenni, Holbro et al. 2003) a montré que le traitement des cellules épithéliales mammaires par Wnt-1 ou Wnt-5a a activé EGFR et la voie MAPK. L'effet était rapide et peut être bloqué par un anticorps monoclonal anti-EGFR qui interfère avec la liaison du ligand, ou par des inhibiteurs de métalloprotéinases. Ces résultats suggèrent que d'une manière similaire à celle décrite pour les agonistes de RCPG, la liaison de Wnt à Fz transactive EGFR en augmentant la disponibilité d'un ligand HERs. En plus, la transactivation

d'EGFR par Wnt a été responsable de l'activation des MAPK et l'augmentation des niveaux de la cycline D1.

8.6.1.5 *Mutations Ras*

8.6.1.5.1 *Caractéristiques des mutations Ras*

Le gène ras a été depuis longtemps connu comme proto-oncogènes muté dans divers types de cancers humains. La grande majorité des mutations ras affectent les résidus d'acides aminés G12, G13, et, plus rarement, Q61. Ces mutations ont pour effet de bloquer Ras dans sa conformation active, liée au GTP, en empêchant l'hydrolyse de GTP. Il en découle une activation constitutive, non régulée, des cascades de signalisation en aval des récepteurs membranaires aux facteurs de croissance, sans que ces récepteurs aient besoin d'être stimulés, ce qui rend les cellules indépendantes de la présence de facteurs de croissance en milieu extracellulaire (Bos 1989).

KRAS est l'un des oncogènes les plus fréquemment activé, avec 20% de toutes les tumeurs humaines hébergeant une mutation activatrice. Les mutations activatrices sont répandues dans les carcinomes canaux du pancréas (73%), l'adénocarcinome colorectal (35%), les carcinomes pulmonaires (17%), et de l'endomètre et l'adénocarcinome ovarien (16%) (Laurent-Puig, Lievre et al. 2009). Dans le carcinome pulmonaire, le taux de mutation dépend à la fois de sous-type histologique (0% dans le carcinome à petites cellules, 5% dans le carcinome épidermoïde, et 22% dans les adénocarcinomes) et les habitudes tabagiques (0-7% en n'ayant jamais fumé à 30-43% en fumeurs (Subramanian and Govindan 2008). Les gènes Nras et Hras sont moins fréquemment mutés (8% et 3,5%, respectivement) et le type de cancers muté est différent du gène de cancer ayant KRAS muté cancers (peau et cancer de la thyroïde)

Par ailleurs, les types de mutations dans le gène KRAS sont différents entre les divers types de cancer. Ainsi, elles sont souvent de type de transitions dans les cancers colorectaux, alors que, dans le cancer bronchique, elles sont majoritairement des transversions G → T siégeant sur le codon 12. La fréquence élevée de mutation KRAS sur un seul codon (12) dans les tumeurs de poumon a été étudiée par Feng et ses collègues. Ils ont montré que les codons 12 et 14 du gène KRAS sont des points chauds pour la formation d'adduits d'ADN induit par les carcinogènes de fumer du tabac (benzo- α -pyrène diol époxyde) (BPDE), avec peu ou pas de formation d'adduits au niveau des codons 13 et 61, respectivement. Les adduits-

carcinogènes sur l'ADN formées au niveau du codon 14 sont toutefois réparés plus efficacement que ceux qui sont formés au niveau du codon 12 (Feng, Hu et al. 2002).

8.6.1.5.2 *Implications cliniques des mutations KRAS*

Les mutations KRAS étaient associées à la résistance aux ITK. Le mécanisme proposé est que les mutations dans les codons 12, 13 et 61 conduisent à l'activation constitutive de la protéine Ras, ce qui permet aux cellules tumorales de se développer indépendamment de la signalisation de l'EGFR et, par conséquent, de les rendre résistants aux TKI (Riely and Ladanyi 2008; Zhu, da Cunha Santos et al. 2008). L'analyse de 206 tumeurs de l'étude BR.21 a montré que 15% avaient des mutations dans les codons 12 ou 13 du gène KRAS. Dans cette étude, les patients avec les formes mutées de KRAS n'ont retiré aucun bénéfice, en terme de survie, de la thérapie par Erlotinib, tandis que ce bénéfice a été observé chez les patients ayant une forme sauvage KRAS (HR 0,69, p = 0,03) (Zhu, da Cunha Santos et al. 2008). Dans l'étude TRIBUTE, 55 des 264 patients (21%) avaient des mutations KRAS. Les patients avec mutations KRAS et traités par Erlotinib présentaient une survie globale plus courte que ceux traités par chimiothérapie seulement (Eberhard, Johnson et al. 2005).

Comme les mutations EGFR et KRAS sont mutuellement exclusives, la possibilité de définir ces deux biomarqueurs comme prédicteurs de la réponse et de la résistance aux TKI, est généralement acceptée par de nombreux médecins.

8.7 *Rôle spécifique HER2/HER3 - dimère le plus active*

Le récepteur HER3, discuté ci-dessus, présente une faible activité kinase et un faible signal alors que HER2 ne peut pas être stimulé par un ligand connu. Néanmoins, HER2 peut améliorer et prolonger la signalisation de nombreux ligands EGF-like (Karunakaran, Tzahar et al. 1996). En plus, HER2 constitue le partenaire préféré de dimérisation pour les récepteurs HERs, mais le partenaire préféré d'HER2 est HER3. L'activité remarquable de signalisation de dimères HER2/HER3 est caractérisée par les éléments décrits ci-dessous

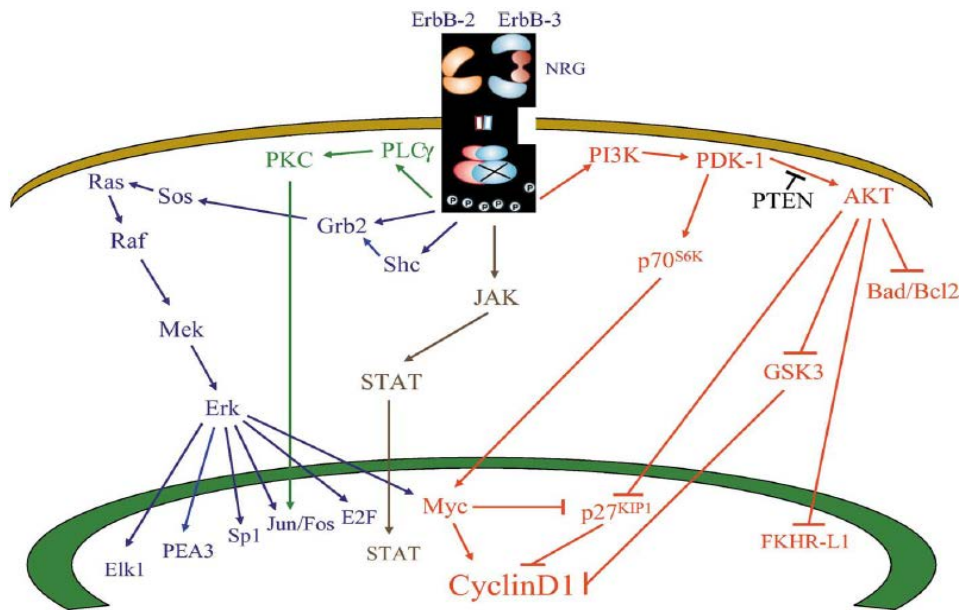
8.7.1 *Evasion de l'endocytose*

La principale voie menant à l'inactivation de signaux émanant par les récepteurs activés est le processus d'endocytose qui trie ces récepteurs vers les lysosomes où ils seront

dégradés (Waterman and Yarden 2001). Dans le cas d'EGFR, ce processus est régulé par ubiquitine ligase E3, appelé c-Cbl, qui se lie à une phosphotyrosine spécifiques d'EGFR, améliorant ainsi l'ubiquitination du récepteur et ultérieurement le processus de l'endocytose et la dégradation (Levkowitz, Waterman et al. 1998). En revanche, l'endocytose induit par les ligands pour les autres HERs est plus lente (Baulida, Kraus et al. 1996), probablement parce que ces récepteurs sont faiblement couplée à c-Cbl (Levkowitz, Klapper et al. 1996). Par conséquent, les ligands HER3 subissent une dégradation relativement lente (Baulida and Carpenter 1997), tandis que HER3 lui-même échappe à la régulation négative et sera recyclé à la membrane plasmique (Waterman, Sabanai et al. 1998). L'endocytose défectueuse et l'amélioration du recyclage caractérisent non seulement les dimères HER2/HER3, mais également d'autres hétérodimères contenant HER2

8.7.2 *Couplage aux voies de signalisation puissantes*

La dimérisation HER2-HER3 est suivie par transphosphorylation de plusieurs résidus phosphotyrosine situés sur l'extrémité carboxy-terminale de chaque récepteur. Un site unique d'HER2 (Y1253) impliqué dans l'activation de la voie MAPK, est suffisant pour la transformation cellulaire (Ben-Levy, Paterson et al. 1994). En plus, plusieurs sites d'HER3 sont en mesure de recruter PI3K (Prigent and Gullick 1994), activant ainsi la voie Akt. Ce dimère est alors extrêmement mitogène parce qu'il active fortement PI3K, évite c-Cbl et l'endocytose, et transmet des signaux prolongés par la voie MAPK (figure 19).



(Figure 19) Les voies majeures de signalisations induites par l'hétérodimère HER2-HER3. La formation d'hétérodimère HER2-HER3 suite à la liaison du ligand conduit à l'activation de plusieurs voies majeures de signalisation. Cette activation aboutit à la transformation via la dérégulation des processus impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. L'activation d'Erk via Ras/Raf conduit à la prolifération cellulaire via de nombreuses cibles nucléaires incluant Elk1, PEA3, Sp1, AP1 et c-Muc (facteur de transcription et de régulation de la progression du cycle cellulaire). D'autres voies comme PI3K, dont l'activation favorise la survie cellulaire via l'inhibition des protéines proapoptotique (Bad, GSK3) et du facteur de transcription (FKHR-L1). En plus, la voie PLC γ et JAK-STAT dont l'activation favorise la prolifération cellulaire. De même, plusieurs voies en aval HER2-HER3 entraînent l'activation cyclin D1 impliqué dans la progression du cycle cellulaire (Citri, Skaria et al. 2003)

8.7.3 HER2/HER3 fonctionnent ensemble pour promouvoir la transformation

Comme indiqué précédemment, HER2 exige sa dimérisation avec un autre récepteur activé de la famille HERs pour initier la signalisation. Cependant, la surexpression d'HER2 dans certains cancers a conduit à étudier si la signalisation provenant d'HER2 seule est suffisante pour conduire la transformation, ou si les autres membres de la famille HERs sont nécessaires dans ces processus de transformation. Ainsi, le ciblage d'HER2 surexprimé dans les cellules cancéreuses a un effet antiprolifératif, qui est accompagné par une forte baisse de l'activité de signalisation PI-3K/AKT (Neve, Sutterluty et al. 2000; Munster, Marchion et al. 2002). Cependant, bien qu'HER2 est capable de déclencher l'activation de MAPK via le recrutement Shc et Grb2, il ne peut pas néanmoins recruter la sous-unité p85 de PI3K (Olayioye, Neve et al. 2000). Ainsi, pour activer cette voie, soit HER2 s'hétérodimérise avec

un autre récepteur HERs contenant un site de liaison p85, soit l'active indirectement, par exemple via la voie Ras (Rodriguez-Viciana, Warne et al. 1994). HER3 contient six sites de coupage à la sous-unité p85 de PI-3K et il se lie efficacement à cette voie (Prigent and Gullick 1994). Par ailleurs, l'inactivation de HER2 entraîne une perte de la phosphorylation HER3 (Neve, Sutterluty et al. 2000; Basso, Solit et al. 2002). Ces observations suggèrent que le rôle HER3 dans les cellules cancéreuses pourrait être d'agir comme un partenaire d'HER2 surexprimé en promouvant l'activation de la PI-3K. Pour explorer cette question, le blocage de la transcription HER3 endogène, dans des cellules tumorales surexprimant HER2 a montré que ces cellules ont une diminution de la signalisation PI-3K/AKT, une réduction des niveaux de cyclines de type D, et une augmentation de la phase G1 du cycle cellulaire. Ainsi, ces résultats suggèrent que les hétérodimères HER2/HER3 fonctionnent comme une unité oncogénique conduisant à la prolifération des cellules cancéreuses du sein. La suggestion que l'hétérodimère HER2/HER3 pourrait avoir un rôle *in vivo* vient de résultats de modèle de tumeur mammaire transgénique induite par l'expression de HER2 activé. Dans ces tumeurs, il a été observé que l'expression d'HER3 a été augmentée et, surtout, sa forme phosphorylée (Siegel, Ryan et al. 1999). Le rôle du dimère HER2/HER3 dans des tumeurs humaines primaires reste à étudier. Il est, toutefois, indiqué que la coexpression d'HER2 et HER3 a été observée dans les cancers humains, dont ceux du sein (Lemoine, Barnes et al. 1992; Naidu, Yadav et al. 1998), et que dans de nombreux cancer du sein surexprimant HER2, la phosphorylation HER3 est augmenté (Alimandi, Romano et al. 1995).

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent une large famille de protéines transmembranaires qui déclenchent des cascades de signalisation intracellulaire suite aux différents stimuli extracellulaires, comme la lumière, les molécules odorantes, les hormones, les neuropeptides et les neurotransmetteurs. Les neuropeptides et les hormones polypeptides, sont composés de plus de 100 membres, constituent une grande classe des ligands endogènes pour les RCPG. Ce système peptidergique est impliqué dans différentes fonctions biologiques au niveau digestif, cérébral, cardiovasculaire, immun, et reproductif.

Récemment, certains neuropeptides, dont la neurotensine fait partie, sont exprimés anormalement durant les processus de transformation et de progression néoplasique. Ce qui ouvre de nouveaux champs d'exploration dans la recherche de la compréhension des mécanismes de la carcinogenèse et permet d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

9.1 *Neurotensine*

La neurotensine (NTS) fait partie de la grande famille des peptides présents et biologiquement actifs en périphérie et dans le système nerveux central. Ce peptide de treize acides aminés (1674Da) a été découvert en 1973 par Carraway et Leeman pendant la purification de la substance P à partir d'extrait d'hypothalamus bovin. Il a ensuite été mis en évidence en périphérique dans des extraits intestinaux bovins (Kitabgi, Carraway et al. 1976) puis humains (Hammer, Leeman et al. 1980). Sa séquence chez l'homme présente l'enchaînement des résidus aminés suivant



L'extrémité amino terminale de NTS est protégée de l'activité aminopeptidase par un résidu pyroglutamate. La partie carboxy-terminale 8-13 possède l'essentiel des propriétés pharmacologiques du peptide (Kitabgi et al 1985) et se retrouve très conservée chez la plupart des vertébrés (Rostene and Alexander 1997) (table 10)

Tableau 10 : Structure primaire de la NTS chez les différentes espèces de vertébrés étudiés

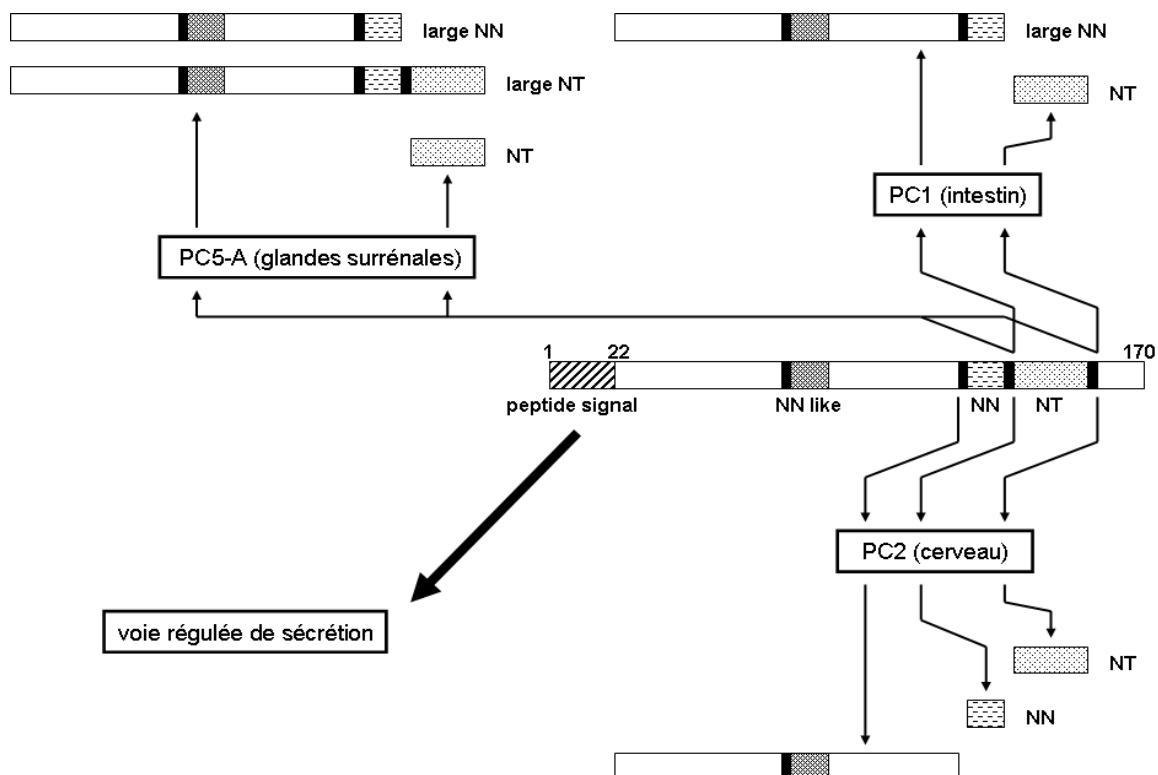
Espèces	Séquence												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Homme, boeuf, chien, rat	pGlu	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Pro	Arg	Arg	Pro	Tyr	Ile	Leu
Cochon d'Inde	pGlu	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Ser	Arg	Arg	Pro	Tyr	Ile	Leu
Opossum	pGlu	Leu	His	Val	Asn	Lys	Ala	Arg	Arg	Val	Tyr	Ile	Leu
Poulet, alligator, python	pGlu	Leu	His	Val	Asn	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Tyr	Ile	Leu
Grenouille	pGlu	Ala	His	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg	Arg	Pro	Tyr	Ile	Leu

9.1.1 NTS : synthèse, stockage, libération et dégradation

9.1.1.1 Synthèse

La NTS est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif de 170 acides aminés chez les chiens et de 120 acides aminés chez l'homme (Bean, Dagerlind et al. 1992). La région carboxy-terminale, composée de la NTS et d'un hexapeptide apparenté, la neuromédine N (NN) (Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH), également très conservée dans toutes les espèces étudiées. Une séquence-signal de 22 acides aminés a été caractérisée, dans la partie N-terminal du précurseur. Cette séquence permet la translocation des peptides nouvellement synthétisés dans la voie régulée de sécrétion. La maturation du précurseur conduit à la libération de la NTS et de la NN. Ces deux peptides sont encadrés et séparés par trois doublets dibasiques KR (Lys-Arg). Ceux-ci constituent les sites de reconnaissance et de clivage par des prohormones convertases (PC). Le processus de maturation endoprotéolytique est tissu spécifique. La maturation de type intestinal est liée à la prohormone convertase 1 (PC1) et la maturation de type cérébral due à la prohormone convertase 2 (PC2) (Rovere, Barbero et al. 1996). Ainsi, dans l'intestin, le précurseur est préférentiellement clivé au niveau des deux séquences dibasiques les plus extrêmes de l'extrémité carboxy-terminale, générant une quantité comparable de NTS et d'une forme longue de NN, biologiquement active (Carraway and Mitra 1990). Dans le cerveau, le précurseur est clivé au niveau des trois séquences

dibasiques les plus extrêmes de l'extrémité carboxy-terminale, produisant la NTS et la NN en quantité similaire ainsi qu'un fragment long du peptide contenant la séquence homologue de la NN (de Nadai, Rovere et al. 1994). Dans les glandes surrénales, l'implication d'une troisième PC (PC5-A) a été suggérée aboutissant à la production de NTS et des deux fragments longs la NTS et la NN (Barbero, Rovere et al. 1998). Ces trois types de prohormones convertases sont localisés dans la voie régulée de sécrétion et plus particulièrement au niveau des granules sécrétoires (figure 20).



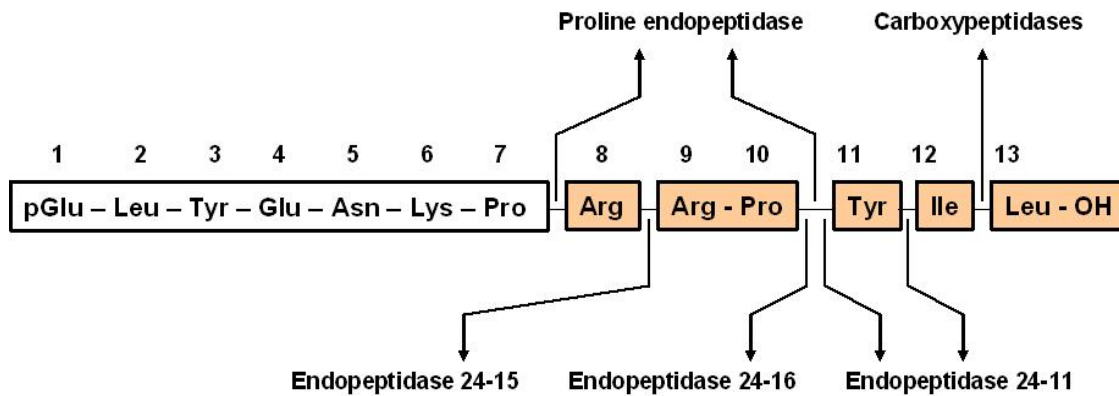
(Figure 20) Représentation schématique du précurseur NTS/NN, des sites potentiels de clivage enzymatique par les prohormones convertases PC1, PC2 et PC5-A et des produits de maturation respectifs. On distingue trois types de maturation : cérébral, due à PC2, produisant une quantité similaire de NTS et NN et une faible proportion de large NN, la maturation de type intestinal, liée à PC1, générant une quantité comparable de NTS et d'une forme longue de NN alors que la NN et la forme large NTS sont minoritaires, la maturation dans les glandes surrénales, impliquant PC5-A aboutissant à la production de NTS et des deux fragments longs de (Dobner, Barber et al. 1987; Carraway and Mitra 1990)

9.1.1.2 *Stockage et libération et taux plasmatique de NTS.*

Après sa synthèse, le peptide est stocké dans les granules denses de sécrétion, spécifiques de la voie régulée. Sa libération est induite par des signaux physiques et/ou chimiques. Ainsi chez l'homme, l'ingestion massive d'acides gras se traduit après 15 à 60 minutes par une augmentation rapide et importante du taux plasmatique de 50 à 273 % en phase postprandiale (Theodorsson-Norheim and Rosell 1983). Ce taux plasmatique peut demeurer élevé pendant au moins 10 heures (Gullo, Pezzilli et al. 1998). Un apport excessif de matières grasses (> 100g) au cours d'un repas unique augmente le taux de NTS plasmatique à plus de 20 fmol/mL, alors que des repas normaux (13-76 g de matières grasses) n'induit qu'un effet modéré sur le taux circulant de NTS avec une augmentation de 1,5 à 5,5 fmol/mL (Ferris, George et al. 1991). Ensuite, la NTS libérée dans la circulation intestinale est métabolisée par le foie (Brook, Shulkes et al. 1987) limitant son action au niveau régional concernant l'intestin grêle, le pancréas, le foie et la circulation associée. Le peptide est ensuite éliminé principalement par le système rénal (Shulkes, Bijaphala et al. 1984). Les taux circulants normaux chez l'homme, comprenant le peptide natif ainsi que les fragments de dégradation, sont compris entre 2 et 10 fmol/mL. La demi-vie de NTS est estimée chez l'homme à environ 4 minutes (Blackburn, Fletcher et al. 1980).

9.1.1.3 *Dégradation*

La NTS est soumise à une inactivation protéolytique qui met fin très rapidement à la transmission du message (Checler, Emson et al. 1984; Checler, Vincent et al. 1985; Checler, Amar et al. 1986). Protégée des activités aminopeptidasiques par le groupement pyroGlutamate, la NTS n'est soumise qu'à l'attaque d'endopeptidases et de carboxypeptidases. Celles qui n'interviennent au niveau du segment 8-13, qui porte l'essentiel de l'activité biologique de la NTS, sont donc inactivantes (Davis and Konings 1993) (Figure). Ainsi, le clivage de la NTS conduit à la formation des fragments amino-terminos considérés comme pour la plupart inactifs (NT (1-8), (1-10), (1-11), (1-7), (1-12)) (figure 21). Toutefois, une étude, *in vivo*, a suggéré que les fragments NT (1-8) et NT (1-11) pourraient avoir certaines fonctions biologiques attribuées au fragment NTS actif (Nustede, Kohler et al. 1989).



(Figure 21) : peptidases impliquées dans les coupures primaire de la neurotensine (Checler, Emson et al. 1984; Checler, Vincent et al. 1985; Checler, Mazella et al. 1986). Ces coupures interviennent toutes dans le segment 8-13 qui porte l'activité pharmacologique de la neurotensine

9.1.2 Gène de la NTS et régulation génique

Le gène humain de la NTS se localise au niveau chromosomal 12q21 (Marondel, Renault et al. 1996). Il comprend quatre exons et trois introns (Kislauskis, Bullock et al. 1988). L'exon 1 contient la séquence codant pour le peptide signal (AA 1-22). L'exon 4 code pour la NTS et NN. La région promotrice du gène de la NTS présente une TATA box située 29 pb en amont du site d'initiation de la transcription, des séquences régulatrices de type AP-1 (*Activator Protein 1*), CRE (*cAMP Response Element*), GRE (*Glucocorticoïde Response Element*), ainsi qu'un site imparfait CRE/AP-1 (motif TGACATCA) (Kislauskis and Dobner 1990; Evers, Wang et al. 1995). L'ensemble de ces éléments de réponse coopère afin d'intégrer les différents stimuli environnementaux et aboutir à une réponse transcriptionnelle concertée.

Plusieurs facteurs jouant un rôle dans la régulation de la NTS ont été mis en évidence. L'influence des effecteurs de signalisation, en aval d'HERs, incluant le RAS et Src sur l'expression de NTS a été examinée. Ainsi, une activation de la transcription du gène codant pour la NTS a été décrite dans la lignée cellulaire humaine CaCo-2 (cancer du côlon) transfectée de manière stable par l'oncogène Ha-Ras (Evers, Zhou et al. 1995). Dans les cellules CaCo-2 parentales, la NTS est faiblement exprimée. La transfection de Ras sauvage quadruple l'activation de la transcription du gène de la NTS alors que la forme oncogénique l'augmente de dix-sept fois. L'activation de la transcription par Ha-Ras nécessite le site CRE/AP-1. En effet, une mutation de cet élément de réponse diminue de 80 % l'activation de la transcription par l'oncogène ras. Une activation de la transcription du gène codant pour la

NTS a également été mise en évidence dans la lignée Caco-2 sous l'effet de la kinase Src (Banker, Hellmich et al. 1997). De la même manière, cette activation semble dépendre d'une voie liée à Raf et convergeant sur l'élément AP-1/CRE du promoteur de la NTS.

De même, certaines hormones stéroïdiennes ont également une influence sur la transcription du gène NTS/NN. C'est le cas des œstrogènes qui, malgré l'absence de site classique ERE (*Estrogen Responsive Element*) sur le promoteur NTS/NN, régulent l'expression de la NTS dans certaines régions cérébrales de rates riches en récepteurs aux œstrogènes au cours du cycle menstruel (Alexander, Dobner et al. 1989; Alexander and Leeman 1994).

9.1.3 Localisation

Dans le SNC, la NTS est exclusivement présente dans les neurones (corps cellulaires et terminaisons nerveuses) (Reinecke 1985). Les régions les plus riches en NTS regroupent, en particulier, l'hypothalamus, la substance grise périaqueducale, ainsi que plusieurs régions du système limbique telles que le noyau accumbens, l'amygdale, le septum et l'hippocampe (Manberg, Youngblood et al. 1982).

En périphérie, la majorité du contenu de l'organisme en neurotensine se trouve dans les tissus périphériques (90%) (Carraway and Leeman 1976). Elle se distribue dans deux types cellulaires : nerveuses et endocrines. Dans certains organes, la NTS présente les deux types de localisation (Reinecke 1985). Ainsi, au niveau intestinal, on retrouve la NTS dans les cellules endocrines de type N de la muqueuse iléo-jéjunale (Helmstaedt, Muhlmann et al. 1977) mais également dans les neurones innervant les muscles lisses de la paroi intestinale (Schultzberg, Hokfelt et al. 1980). Cependant, sa répartition présente des taux variables le long de l'intestin avec une concentration élevée dans l'iléum, plus modérée dans le jéjunum et le duodénum et absent au niveau colonaire. La dualité de localisation intestinale se retrouve aussi dans la médullo-surrénale (cellules chromaffines et innervation) (Kondo 1985), dans le pancréas exocrine et encore au niveau du système cardio-vasculaire (Reinecke, Weihe et al. 1982; Reinecke 1985).

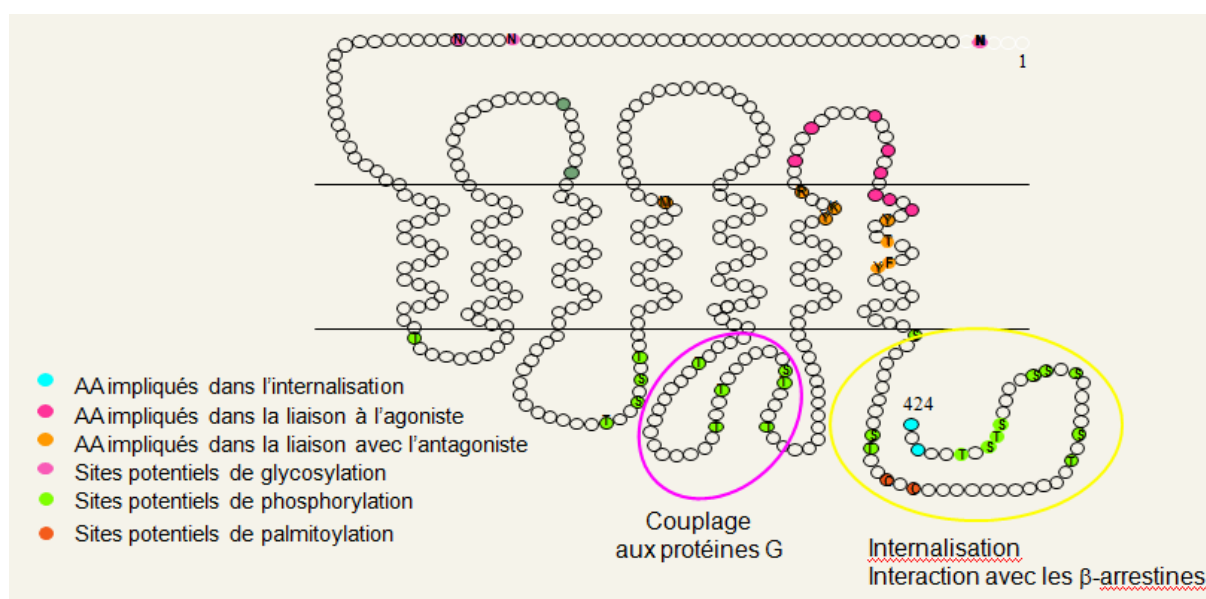
9.2 Récepteurs de la neurotensine

Les effets de NTS sont transmis aux cellules cibles par trois récepteurs. Deux récepteurs membranaires font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (Pelaprat 2006). Le premier est de haute affinité, NTSR1, et le deuxième de faible affinité, sensible à la lévocabastine (NTSR2). Le troisième correspond à une protéine à une seule hélice transmembranaire et appartient à la famille des protéines VPS10 (Vacular carboxy-Peptidase Sorting receptor-10). *

9.2.1 Récepteur de haute affinité NTSR1

9.2.1.1 Structure fonctionnelle

Les effets de NTS sont principalement transmis par l'intermédiaire de son récepteur de haute affinité, le NTSR1. Ce récepteur de 418 acides aminés présente sept domaines hydrophobes transmembranaires, trois boucles extracellulaires (e), trois boucles intracellulaires (i), une extrémité carboxy-terminale intracellulaire courte et une extrémité N-terminale extracellulaire relativement longue (Tanaka, Masu et al. 1990) (figure 22).



(Figure 22) Structure du récepteur humain NTSR1 de haute affinité pour la neurotensine déduite à partir de la séquence nucléotidique d'après (Le, Groshan et al. 1997).

Les séquences impliquées dans la liaison de ligand, la transduction du signal, et l'internalisation de récepteur ont été déterminées par les expériences de mutagenèse dirigée. Ainsi, il a été montré que la liaison de NTS au récepteur implique plusieurs acides aminés

(Arg327, Trp339, Phe 344 et Tyr 347) situés dans les premières et troisièmes boucles extracellulaires (e1 et e3) puisque leur mutation induit une diminution ou même une perte totale d'affinité pour la NTS (Pang, Cusack et al. 1996; Botto, Chabry et al. 1997; Labbe-Jullie, Barroso et al. 1998). Le site de reconnaissance du SR48692 (antagoniste spécifique de NTSR1) recouvre partiellement la séquence de liaison de la NTS, mais également dépendant d'autres acides aminés de e2 et e3 (Labbe-Jullie, Barroso et al. 1998). Ce chevauchement des deux sites de liaison permet de rendre compte des propriétés d'antagoniste du SR48692.

La fixation de la NTS à la surface extracellulaire du récepteur entraîne des changements conformationnels des domaines intracellulaires, ce qui leur permet d'interagir avec les protéines G impliquées dans la signalisation. Ces domaines intracellulaires ont été identifiés comme la boucle i3 qui interagit et active la voie de signalisation préférentielle Gq (Kitabgi 2002) et la partie proximale C-terminale qui peut aussi activer Gs, Gi/o (Bozou, Amar et al. 1986; Ishizuka, Townsend et al. 1993) et phospholipase A2 (PAL2) (Gailly, Najimi et al. 2000). Les deux domaines intracellulaires sont reliés à l'e3 via TM6 et TM7. Cela suggère que la liaison de la NTS à la boucle e3 pourrait conférer des changements conformationnels dans i3 et les domaines C-terminal suite à des mouvements de TM6 et TM7 adjacentes. Inversement, SR48692 peut empêcher ces mouvements en comblant TM6 et TM7.

9.2.1.2 Localisation

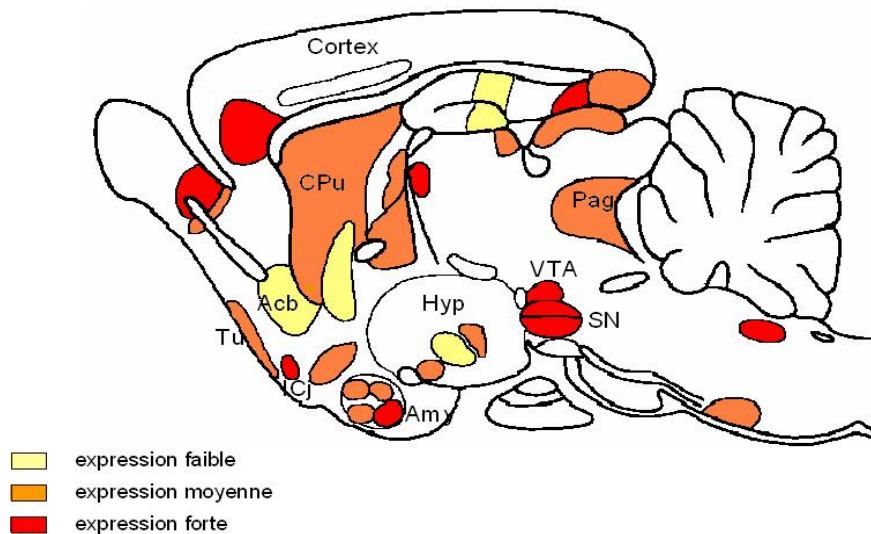
9.2.1.2.1 En périphérie,

Alors que l'essentiel du peptide est retrouvé dans le tube digestif particulièrement dans la partie distale du jéjunum, les récepteurs de la NTS n'y sont présents qu'à des concentrations relativement faibles, ils ont été caractérisés sur les fibres nerveuses et le muscle lisse (Kitabgi and Freychet 1978; Kitabgi, Hamon et al. 1979). D'autres sites ont été mis en évidence, ils comprennent les mastocytes, les cellules endothéliales (Schaeffer, Laplace et al. 1995), le foie au niveau des membranes plasmiques (Muraki, Nishi et al. 1987). Des sites de liaison pour la NTS ont été identifiés dans la glande surrénale de rat ainsi que dans l'utérus (Goedert, Mantyh et al. 1984; Pettibone and Totaro 1987).

9.2.1.2.2 Dans le SNC

Les NTSR1 sont localisés principalement dans la substance noire compacte, l'aire tegmentaire ventrale, dans les noyaux de l'amygdale, le striatum ainsi que dans les cortex cingulaire, entorhinal et olfactif (Sarrieau, Javoy-Agid et al. 1985) (figure 23). Dans le moelle

épinière, les récepteurs sont distribués de façon uniforme dans la substance grise (Faull, Villiger et al. 1989).



(Figure 23) Distribution du récepteur de haute affinité NTSR1 dans le système nerveux central.
(d'après Sarrieau et al., 1985)

9.2.2 Récepteur NTSR2

C'est une protéine de 410 acides aminés, il a une forte homologie avec le NTSR1 (64%) (Chalon, Vita et al. 1996). Le NTSR2 présente des propriétés de liaison faibles pour la NTS et cette liaison est antagonisée par la lévocabastine (Schotte, Leysen et al. 1986). Le SR48692 qui a une moins bonne affinité pour le NTSR2 que pour le NTSR1 peut cependant stimuler l'activité de ce récepteur.

Le NTSR2 a longtemps été considéré comme un accepteur de NTS plutôt que comme un récepteur déclenchant des messages neurotensinergiques, car aucune activité biologique ne lui était attribuée. L'expression du NTSR2 cloné a permis de mettre en évidence certaines réponses intracellulaires induites par l'activation de ce récepteur. Dans des lignes cellulaires humaines (CHO), la stimulation de ce récepteur par le SR48692 induit la mobilisation du calcium intracellulaire, la production d'IP3, la libération d'acide arachidonique et l'activation des MAP-kinases (Vita, Oury-Donat et al. 1998). En revanche, la NTS, la NN, et la lévocabastine n'induisent aucune réponse intracellulaire. Au contraire, ces effets ont été abolis par la NTS et la lévocabastine. Ces résultats suggèrent que le NTSR2 humain cloné pourrait être fonctionnellement couplé, mais activé par un ligand endogène inconnu et la NTS joue

alors un rôle agoniste inverse. Actuellement, les effets de NTS attribués au NTSR2 incluent les effets hypothermiants et analgésiants (Dubuc, Sarret et al. 1999).

9.2.3 Récepteur NTSR3

Il s'agit d'un récepteur à un seul domaine transmembranaire, localisé principalement dans le cytoplasme (90%) (Mazella, Chabry et al. 1988). Ce récepteur est identique avec la gp85/sortiline, une protéine réticulo-endothéliale localisée majoritairement dans le réseau transgolgien, où elle est impliquée dans l'adressage de multiples protéines aux différents compartiments vésiculaires (Mazella, Zsuzger et al. 1998). Ce récepteur n'est pas spécifique à la NTS, il peut lier d'autres ligands comme des proneurotrophines, la protéine RAP (Receptor associated protein) (Nielsen, Jacobsen et al. 1999), ou encore les protéines SAP (Sphingolipid Activator Protein) (Lefrançois, Zeng et al. 2003).

Etant donné de son affinité pour de nombreux ligands, le rôle exact de cette protéine n'est pas défini avec certitude. Dans le cadre du système neurotensinergique, une étude menée sur des cellules transfectées par NTSR3, mais dépourvues de NTSR1 a montré que la NTS induit une augmentation de la synthèse de l'ADN, ce qui indique la participation de NTSR3 aux effets de type de croissance décrit pour la NTS (Dal Farra, Sarret et al. 2001). Une autre étude a montré que ce récepteur intervient dans le phénomène de migration des cellules microgliales humaines après les avoir exposés à la NTS (Martin, Vincent et al. 2003). De même, une étude menée sur des cellules exprimant naturellement les récepteurs NTSR1 et NTSR3 (HT-29, adénocarcinome de côlon) (Martin, Navarro et al. 2002) a montré que NTSR3 pourrait modifier le profil d'activation de MAPK et la formation des inositol-phosphates en aval de NTSR1 en s'hétérodimérisation avec ce dernier.

Par ailleurs, en présence de NTS, le domaine extracellulaire de NTSR3 peut-être clivé et libéré dans le milieu extracellulaire via PKC ou via métalloprotéinases dépendant de Zinc. L'ectodomaine résultant de ce clivage séquestre la NTS libérée dans le milieu extracellulaire et inhibe les interactions du couple NTS-NTSR1. Ce processus de « *shedding* » a été observé dans des cellules normales (neurones), des cellules immortalisées (microglie) ainsi que des cellules tumorales (LoVo, CaCo-2, HT-29).

Globalement, dans le cadre du système neurotensinergique, le NTSR3 joue un rôle de modulateur de la signalisation neurotensinergique lorsqu'il est co-exprimé avec un autre récepteur de la NTS et un rôle de récepteur fonctionnel impliqué dans la migration lorsqu'il est exprimé seul.

9.3 *Rôles physiologique de NTS*

Le spectre des effets pharmacologiques de NTS est étendu et dépend du site d'administration et de la dose donnée. On peut distinguer de types d'effets : centraux et périphériques ;

9.3.1 *Effets centraux*

L'administration de NTS par voie intracérebroventriculaire ou intracisternale provoque chez la souris :

- 1- une diminution de l'activité locomotrice spontanée suite à la modulation de l'activité dopaminergique (van Wimersma Greidanus, van Praag et al. 1982),
- 2- une hypothermie par l'activation NTSR2 (Nemeroff, Osbahr et al. 1979),
- 3 - un effet antinociceptif résultant de l'interaction avec le système de peptide opiacés (Mazella and Vincent 2006),
- 4 - un effet anorexigène chez l'animal à jeun (Luttinger, King et al. 1982) (Luttinger et al 1982),
- 5 - une augmentation de la sécrétion de GH, de PRL et de LH (Maeda and Frohman 1978)

9.3.2 *Effets périphériques*

9.3.2.1 *Dans le tractus gastro-intestinal*

La NTS exerce un rôle physiologique dans l'amélioration de gestion de nutriments en particulier les acides gras. Ainsi, la NTS inhibe la sécrétion gastrique (Wood, Hoang et al. 1988) et elle diminue la pression œsophagienne (Horstmann, Nustede et al. 1999), la vidange gastrique et la motilité colique, en revanche elle amplifie la motilité duodénale et augmente la sécrétion exocrine pancréatique (Harada, Niiyama et al. 1986). Par ailleurs, l'injection de NTS dans le système porte induit une hyperglycémie par mobilisation de glycogène hépatique (Carraway, Demers et al. 1976) et une hypercholestérolémie (Peric-Golia, Gardner et al. 1979). Outre l'activité facilitatrice de la gestion lipidique, la NTS exerce un rôle

physiologique promouvant la prolifération tissulaire en particulier au niveau de l'intestin grêle.

9.3.2.2 *Système cardio-vasculaire,*

Les effets de neurotensine sur le système cardio-vasculaire sont complexes et variables selon les espèces étudiées, la dose administrée et le site d'injection. Ces effets peuvent être directe par l'action sur l'endothélium vasculaire ou indirecte via la dégranulation mastocytaire et libération locale d'histamine. La NTS peut ainsi entraîner une hypertension ou hypotension, une contraction ou dilatation des coronaires, une vasodilatation périphérique. En outre, la NTS peut augmenter la migration cellulaire endothéliale, avec un effet promoteur de l'angiogenèse, démontrée par des expériences d'induction de la neovascularisation de la cornée murine in vivo en présence d'agoniste.

9.3.2.3 *Effet immunomodulateur et de réparation tissulaire*

Le rôle immunitaire de NTS a été prouvé dans de nombreuses études. La stimulation du système neurotensinergique entraîne la dégranulation mastocytaire et influence également le comportement (adhérence, chemotaxis, phagocytose, prolifération et synthèse de IL-8) des neutrophiles, les macrophages alvéolaires et péritonéaux, les cellules microgliales et les lymphocytes T (Katsanos, Anagianaki et al. 2008). En plus, un rôle proinflammatoire a été décrit au cours de réponse inflammatoire à l'entérotoxine A et Clostridium Difficile (agent étiologique de la colite pseudomembraneuse) via la libération de l'IL-8 (Castagliuolo, Wang et al. 1999). Par contre, En pathologie intestinale chronique, la NTS influence positivement la prolifération cellulaire, dans la réparation des lésions, qui a été testée sur des modèles de colites ulcéreuses induites expérimentalement chez la souris (Brun, Mastrotto et al. 2005). Dans le SNC, un rôle a également été décrit dans la réparation en réponse à l'agression cérébrale. Il implique les récepteurs NTSR2 fortement exprimé à la surface des cellules gliales (Nouel, Sarret et al. 1999). En plus, la NTS favorise l'activation et la migration des cellules microgliales. Par ailleurs, un effet antiapoptotique sur des cultures neuronales a été mis en relation avec l'activité antagoniste de NTSR3 vers l'effet apoptotique induit par le pro-NGF, conforté par la notion que l'expression de NTSR3 est fortement diminuée au cours du vieillissement cérébral (Lu, Pan et al. 2004).

9.4 Système neurotensinergique et cancer

L'association épidémiologique entre l'incidence du cancer et l'apport élevé en matières grasses, dans le monde, suggère que NTS libérée comme une hormone au cours de la digestion des graisses pourrait jouer un rôle. Pichon et collaborateurs ont indiqué que les niveaux de NTS sanguins (mesurée par dosage immunologique) dans des patients à jeun atteints de cancer du pancréas étaient significativement plus élevés dans les stades IV de la maladie, ce qui suggère que la NTS pourrait avoir un impact sur l'évolution de la maladie (Pichon, Coquin et al. 1999). Cependant, d'autres ont constaté que les niveaux de NTS ont diminué avec la progression de cancer de la prostate et du pancréas, suggérant un rôle important de l'état nutritionnel et/ou des effets de la thérapie. Il est donc possible que NTS puisse contribuer en tant qu'hormone à l'augmentation du risque de cancer. Dans ce contexte, de nombreuses études ont fourni des arguments en faveur du rôle du couple NTS/NTSR1 en tant que facteur contribuant à la progression tumorale, mais aussi apportant une valeur pronostique en termes de survie.

9.4.1 *Dérégulation du système neurotensinergique dans les tissus tumoraux*

9.4.1.1 *Dérégulation de NTS*

La dérégulation de NTS a été observée dans de nombreux cancers tels des cancers pancréatiques (Gutniak *et al.*, 1980 ; Blackburn *et al.*, 1981 ; Feurle *et al.*, 1981 ; Bani-Sacchi *et al.*, 1986), des carcinomes médullaires de la thyroïde (Baca et Schmidt-Gayk, 1981 ; Zeytinoglu *et al.*, 1983), dans deux cas d'adénocarcinomes bronchiques (Wood *et al.*, 1983, Dammrich et al, 1988), dans des cancers intestinaux ou coliques (Yang *et al.*, 1983 ; Ulich *et al.*, 1983 ; Evers *et al.*, 1992a), dans des carcinomes hépatocellulaires fibrolamellaires (Ehrenfried *et al.*, 1994) ainsi que dans des carcinomes pulmonaires à petites cellules (Moody, Carney et al. 1985). Dans la majorité de ces études, le neuropeptide n'est pas exprimé dans les tissus sains correspondants.

Le mécanisme impliqué n'est pas encore bien élucidé. Cependant, des études ont montré que l'état de méthylation dans la région promotrice du gène de NTS peut expliquer une partie de cette dérégulation. Ainsi, la différence dans l'expression de gène NTS entre les deux lignes de cellules des hépatomes, Hep 3B et Hep G2 (Dong, Wang et al. 1998) résulte d'une divergence dans l'état de méthylation du promoteur. Le traitement avec l'agent de déméthylation tel 5-

azacytidine engendre une activation partielle du gène NTS dans la lignée cellulaire hépatique n'exprimant pas la NTS. En plus, la transfection d'un gène rapporteur de NTS sous contrôle du promoteur méthylé a entraîné une réduction spectaculaire de son activité transcriptionnelle. Ces observations ont été confirmées dans les lignes cancéreuses du côlon humain exprimant ou non le gène codant pour NTS (Dong, Wang et al. 2000).

Les profils de méthylation n'entraînent pas des modifications dans la structure de la chromatine ou dans l'accessibilité du gène, mais plutôt une inhibition de la fixation de facteurs de transcription dans la région promotrice (site AP-1). Par ailleurs, il a été montré, que l'activation de la voie Ras peut stimuler l'expression de NTS dans la ligne cellulaire intestinale Caco-2, ce qui suggère que cela pourrait fournir un mécanisme pour la production inappropriée de la NTS par les cellules cancéreuses ou des tissus associés (Evers, Zhou et al. 1995).

9.4.1.2 Dérégulation de NTSR1

La dérégulation du NTSR1 a été observée dans des tumeurs humaines du système nerveux central comme les méningiomes (Mailleux, Przedborski et al. 1990; Przedborski, Levivier et al. 1991), les astrocytomes (Camby, Salmon et al. 1996) et les médulloblastomes (Giangaspero, Burger et al. 1985). La présence du récepteur a également été observée dans de nombreuses lignées cancéreuses incluant des lignées de côlon (Maoret, Pospai et al. 1994), de prostate (Seethalakshmi, Mitra et al. 1997), de pancréas (Mendez, Souaze et al. 1997) et de poumon à petites cellules (Allen, Carney et al. 1988). Plus récemment, le NTSR1 a été détecté dans des lignées tumorales mammaires ainsi que dans des tumeurs du sein (Elek, Pinzon et al. 2000). Or, physiologiquement, le récepteur n'est pas ou seulement très faiblement exprimé dans les cellules épithéliales des tissus sains correspondants (Dupouy, Viardot-Foucault et al. 2009).

Le mécanisme impliqué dans cette dérégulation a été étudié dans le cadre de la carcinogenèse colorectale. Ces études proposent un rôle important de la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine. Ainsi, la perte ou la mutation de la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) entraîne une diminution de la dégradation de β -caténine. L'accumulation de ce dernier et ensuite sa translocalisation nucléaire indiquent qu'il est capable d'induire l'expression de gène NTSR1 via son association avec les facteurs de transcriptions Tcf/Lef (Souaze, Viardot-

Foucault et al. 2006). Le promoteur de NTSR1 peut être activé par le complexe β -caténine/Tcf car il contient un site consensus pour les facteurs de transcription Tcf (T cell factor). Dans ce contexte, une étude récente a montré que les agents provoquant l'accumulation de β -caténine tel les inhibiteurs de GSK-3 β (protéine kinase impliqué dans la phosphorylation de β -caténine et sa dégradation) sont capables d'induire l'expression de NTSR1 (Wang, Jackson et al. 2010). L'inhibition sélective de la GSK-3 β a significativement régulé à la hausse le niveau de la transcription de NTSR1, tandis que la surexpression de la GSK-3 β a diminué l'activité de promoteur NTSR1 de plus de 30% dans diverses cellules du cancer colorectal. En accord avec ce résultat, la stimulation de NTS a entraîné la suppression de la protéine GSK-3 β par voie dépendante de PKC (Wang, Zhou et al. 2006). Des résultats similaires ont montré le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans autres cancers comme ceux du poumon, de la prostate et du sein (Chesire, Ewing et al. 2002; Turashvili, Bouchal et al. 2006; Van Scoyk, Randall et al. 2008).

Ainsi, la production et la sécrétion de la NTS par les cellules tumorales ainsi que la présence aberrante de récepteurs NTSR1 fonctionnels suggèrent l'implication du système neurotensinergique dans les pathologies cancéreuses par le biais de régulations potentiellement autocrines ou paracrines

9.4.1.3 Régulation de NTSR1 par son ligand

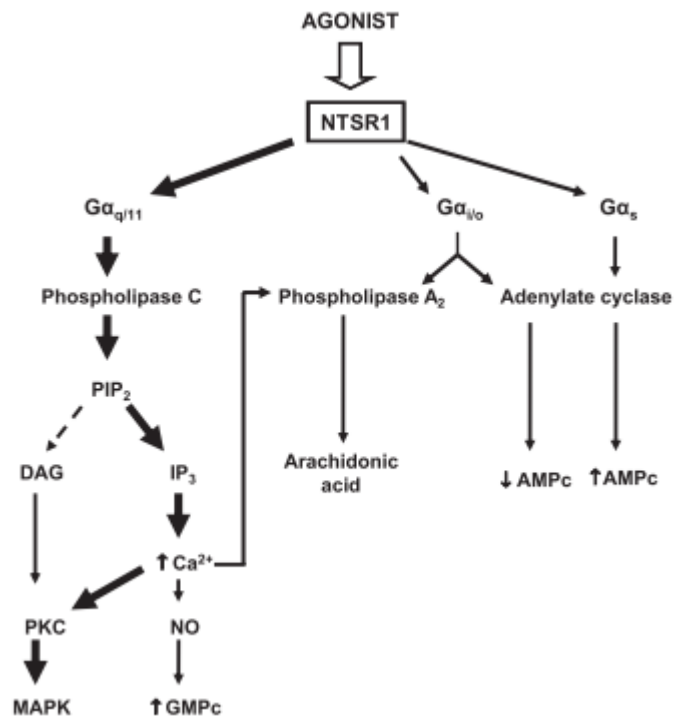
Dans les conditions physiologiques, l'activation du récepteur par son agoniste s'accompagne par une deuxième étape aussi importante : l'internalisation du complexe ligand-récepteur et sa dégradation dans les lysosomes par la voie dépendante de la clathrine (Souaze and Forgez 2006). La résensibilisation cellulaire se produit quelques heures après la fin de stimulation par l'agoniste suite à la synthèse de *novo* récepteur. Cependant, certaines études menées sur des modèles cellulaires comme CHO, CHP-212, N1E-115 et HT-29 ont démontré une modification de ce trafic en situation d'exposition prolongée à une dose saturante d'agoniste (Souaze, Rostene et al. 1997; Nguyen, Cahill et al. 2002; Toy-Miou-Leong, Cortes et al. 2004). Au lieu d'être dégradée dans le lysosome, NTSR1 s'accumule transitoirement avec NTS dans le compartiment de recyclage périnucléaire où il est ensuite recyclé dans la membrane cellulaire (Toy-Miou-Leong, Bachelet et al. 2004). Cependant, la capacité de liaison du ligand au NTSR1 libre à la membrane à long terme n'est que partiellement restaurée par rapport à la capacité initiale de liaison observée dans les cellules naïves (Souaze, Rostene

et al. 1997; Najimi, Souaze et al. 1998). L'utilisation du détergent digitonine a montré que cet écart résulte de stockage partiel de NTSR1 dans des vésicules sous membranaires qui sont immédiatement disponibles pour le recrutement membranaire suite à la nouvelle stimulation par l'agoniste. Donc, la stimulation chronique à la NTS induit une adaptation cellulaire en modifiant le processus de dégradation de NTSR1 qui sera plutôt recyclé à la membrane cellulaire. Ce phénomène engendre des cellules sensibles en permanence au signal neurotensinergique. La mise en place de ce mécanisme pourrait entraîner la dérégulation de nombreuses voies corrélées à l'expression de NTSR1 et impliquées dans les processus carcinogènes tels les MAPK et ses gènes cibles (Najimi, Robert et al. 2002; Somai, Gompel et al. 2002; Souaze, Dupouy et al. 2006). L'activation constitutive de ces voies de signalisation est responsable donc d'induire l'apparition ou l'amplification des effets oncogènes tels que ceux décrits ci-dessous.

9.4.2 *Signalisations oncogéniques associées à l'activation de NTSR1*

Les voies de signalisation impliquées dans les différents effets oncogéniques du complexe NTS-NTSR1 sont multiples et ont été étudiées dans différents types cellulaires d'origine tumorale tels que la lignée cellulaire NIE-115 du neuroblastome murin, la lignée HT-29 d'adénocarcinome du côlon humain. La stimulation de NTSR1 par son ligand (NTS) conduit à l'activation de PLC via son couplage préférentiel à la sous-unité Gαq/11 (Wang and Wu 1996; Najimi, Maloteaux et al. 2002). Cette activation de PLC a pour conséquence la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol à partir de phospholipides membranaires (PiP2). IP3 entraîne la mobilisation du calcium intracellulaire (Amar et al., 1986; Bozou et al., 1989b; Turner et al., 1990). L'élévation du calcium intracellulaire se traduit par une deuxième séquence d'événements comme l'activation de la PKC (Amar, Kitabgi et al. 1986; Snider, Forray et al. 1986; Turner, James-Kracke et al. 1990; Hermans, Maloteaux et al. 1992). La mobilisation de Ca²⁺ et l'activation de PKC constituent les effecteurs clés conférant au système neurotensinergique ses propriétés oncogéniques. Par ailleurs, le complexe NTS/NTSR1 peut coupler avec d'autres protéines G hétérotrimériques, comme Gai/0 et Gas. L'activation de Gai/0 a été principalement décrite dans les cellules neuronales, alors que celle de Gas a été observée dans la majorité des cellules transfectées avec le NTSR1, ce qui suggère que le couplage se produit lorsque NTSR1 est surexprimé dans ces cellules (Yamada, Watson et al. 1993; Gailly, Najimi et al. 2000).

Plusieurs voies de signalisation potentiellement impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, la migration et l'invasion sont décrites après la stimulation de NTSR1. Trois voies principales ont été mises en évidence (figure 24):



(Figure 24) Effecteurs majeurs activés suite à la stimulation de NTSR1 (Dupouy, Mourra et al. 2011).

9.4.2.1 Voie PKC/ERK

Ainsi, l'activation de PKC pourrait induire la Mitogène Activated Proteine Kinase (MAPK) via la stimulation directe de Raf-1 indépendamment de Ras (Guha, Lunn et al. 2003). La stimulation de cascade ERK pourrait se faire également par la transactivation d'EGFR/ras (Guha, Lunn et al. 2003). L'activation de MAPK via NTSR1 est principalement associée avec une croissance cellulaire incontrôlée, ce qui peut aggraver les taux de croissance des tumeurs (Kisfalvi, Hurd et al. 2010). L'activation de MAPK est associée également avec l'induction d'Early Growth Response gene-1 (Egr-1) aussi appelé Krox 24, et le facteur de transcription AP-1 (c-Fos). Les deux mécanismes ont été inhibés, en présence d'antagoniste du NTSR1 (Pointot-Chazel, Portier et al. 1996; Ehlers, Bonnor et al. 1998; Portier, Combes et al. 1998; Zhao, Zhan et al. 2007).

Par ailleurs, il a été montré que la NTS est capable d'induire une activation précoce et transitoire de PKD1 de façon dépendant de la voie PKC (Guha, Rey et al. 2002). Il s'agit

d'une protéine sérine/thréonine kinase activée en aval de PKC et impliquée dans la progression cancéreuse (LaValle, George et al. 2010). Ainsi, la PKD1 augmente la durée d'activation d'ERK1/2, la synthèse de l'ADN et par conséquent la prolifération cellulaire ce qui suggère que PKD1 peut agir comme un amplificateur de l'évolution cancéreuse (Kisfalvi, Hurd et al. 2010).

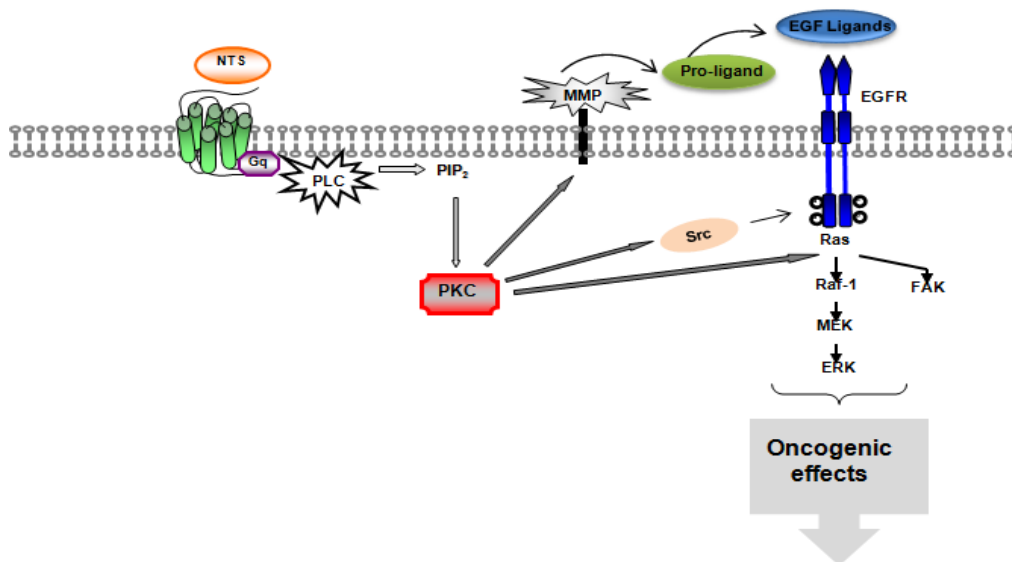
9.4.2.2 *RhoGTPases, et non-récepteur kinase FAK et Src*

La stimulation neurotensinergique peut moduler l'activité des petites RhoGTPases Rac1, Cdc42 et RhoA, qui sont en partie responsables de la dynamique du cytosquelette. Cette modulation a un effet sur les processus de migration cellulaire. Dans la lignée cellulaire U373 de glioblastome, la NTS a été associée à la stimulation de l'activité de protéines Rac1, RhoA et Cdc42 (Zhao, Kuhnt-Moore et al. 2003; Servotte, Camby et al. 2006). En plus, dans des cellules de cancer bronchique à petites cellules, il a été montré que la NTS peut stimuler l'activité de la Focal Adhesion Kinase (FAK) (Tallett, Chilvers et al. 1996). Il s'agit d'une protéine impliquée dans la régulation de la dynamique des protéines à l'interface cellule-matrice, mais également impliquée dans les phénomènes d'adhérence et de migration cellulaire (Leyton, Garcia-Marin et al. 2002). Dans la lignée cellulaire de cancer de la prostate, le complexe NTS/NTSR1 active d'autres tyrosines kinases intracellulaires, comme Src et Etk/Bmx (Lee, Guan et al. 2001). Etk/Bmx est activé par FAK, et éventuellement par Src, et les trois tyrosines kinases activées forment un complexe de signalisation potentiellement impliqué dans les effets trophiques alternatifs induits par la NTS consécutivement à la privation androgénique.

9.4.2.3 *Transactivation EGFR*

L'un des mécanismes importants impliqué dans les processus oncogéniques du système neurotensinergique est la transactivation et le renforcement de l'activité des récepteurs EGF. Cette transactivation se fait par deux mécanismes dont le plus favorable implique la libération des ligands EGFR-like (TGF- α , Hb-EGF ou amphiréguline) existants à la membrane plasmique sous forme pro-ligands (figure 25). Ces ligands sont libérés par un clivage protéolytique faisant intervenir des protéines de la famille des métalloprotéinases, et notamment les ADAMS (Disintegrin and Metalloprotease) et les MMP (Matrix Metalloprotenase) (Zhao, Zhan et al. 2004; Sanderson, Dempsey et al. 2006; Kataoka 2009). Une fois libérés, ces ligands vont se lier à EGFR et déclenchent ainsi les cascades de

signalisation en aval d'EGFR activé (Hassan, Dobner et al. 2004). Le second mécanisme d'activation d'EGFR met en cause la protéine Src. Ainsi, après son activation en aval du complexe NTS-NTSR1, Src peut phosphoryler EGFR sur le résidu Tyr845 (Amorino, Deeble et al. 2007). Cette voie conduit à l'activation de STAT5b, activateur de transcription des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie. En parallèle, une stimulation synergique de la NTS combinée à l'EGF a entraîné une prolongation de la durée de signalisation d'ERK et par la suite une augmentation de la synthèse de l'ADN (Kisfalvi, Guha et al. 2005). Ces résultats suggèrent une relation coopérative entre NTSR1 et le système EGFR, qui s'exerce soit par la mise en place d'une voie commune de signalisation en aval ou par une transactivation directe de l'EGFR.



(Figure 25) Schématisation de mécanisme de transactivation d'EGFR suite à la stimulation de NTSR1

9.4.2.4 Rôles oncogéniques de la NTS

9.4.2.4.1 Rôle prolifératif de NTS

Le rôle trophique de NTS a fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, il a été démontré que la NTS stimule la croissance des tissus normaux comme la muqueuse de l'intestin grêle, le côlon, le pancréas, l'estomac et le cortex des glandes surrénales (Evers 2006). Cet effet trophique a par ailleurs été démontré dans des lignées cellulaires cancéreuses diverses, telles que les cellules de cancer de la prostate sensibles aux androgènes LNCap (Sehgal et al 1994) ou hormono-indépendant PC3 (Seethalakshmi et al 2002), de pancréas MIA PaCa-2 (Ishizuka et al 1993), ou PANC-1 (Guha et al 2002), de cancer de poumon à petites cellules (Davis et al

1991). Ces effets de la NTS sont inhibés par l'antagoniste spécifique de NTSR1 (SR48692). De même, l'effet trophique de la NTS a été retrouvé *in vivo*. Ainsi, la NTS stimule la croissance des cellules de cancer de côlon SW480 et HCT116 xénotreffées chez des souris nues entraînant une augmentation du volume de la tumeur ainsi que de la synthèse de l'ADN (Maoret et al 1999). Cet effet de la NTS a été contrecarré par le SR48692. Plus récemment, ce résultat a été confirmé en utilisant l'ARN interférent, avec une forte diminution de la croissance tumorale lorsque l'expression NTSR1 a été abolie, dans des tumeurs expérimentales de sein (Souaze, Dupouy et al. 2006). Conformément à ces résultats, la NTS exogène a aussi augmenté significativement la taille, le poids, et la synthèse de l'ADN dans des cellules MC26 de cancer du côlon, et celles de cancer de pancréas MIA Paca-2, xénotreffées chez la souris nue (Yoshinaga, Evers et al. 1992; Iwase, Evers et al. 1997).

Un autre mécanisme contribuant au rôle trophique de la NTS est son effet anti-apoptotique. Cet effet a été décrit dans la lignée cellulaire MCF-7 d'adénocarcinome du sein (Somai, Gompel et al. 2002). Une exposition prolongée au JMV449 (agoniste spécifique de NTS), a protégé ces cellules (MCF-7) de la mort induite par la privation de sérum en réduisant le nombre des cellules apoptotiques de deux à trois fois. Ces effets ont été accompagnés par une augmentation concomitante de l'expression de la protéine Bcl-2 qui dépend de la stimulation de voie MAPK (Somai, Gompel et al. 2002)

9.4.2.4.2 *Rôle dans les processus migratoire et l'invasif.*

L'évolution métastatique d'un cancer reste la principale cause de décès du patient. Cette évolution nécessite l'acquisition par les cellules tumorales des capacités migratoires et invasives. Dans les cellules tumorales, il a été montré que NTS est capable de moduler la capacité migratoire des cellules adhérentes telles les cellules de glioblastome (Servotte, Camby et al. 2006), les cellules cancéreuses du côlon (Wang, Wang et al. 2006), celles d'adénocarcinome canalaire du pancréas (Mijatovic, Gailly et al. 2007), celles du carcinome squameux de la tête et du cou (Shimizu, Tsukada et al. 2008), et celles du cancer du sein (Souaze, Dupouy et al. 2006). La nature de l'effet neurotensinergique est étroitement liée à l'environnement de la matrice extracellulaire suggérant l'implication des intégrines dans ce phénomène, mais aussi des changements dans la signalisation de la dynamique du cytosquelette. Par exemple, la NTS réduit la vitesse de migration des cellules de glioblastome ensemencées sur une surface en plastique, mais il stimule la migration sur la laminine, une

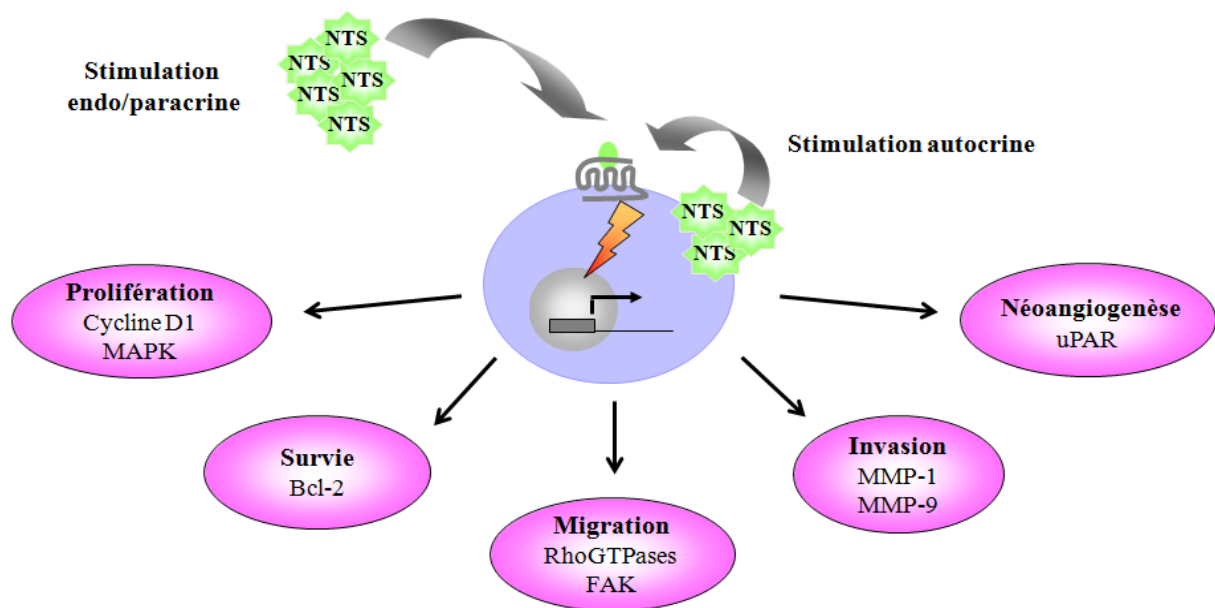
matrice proadhésive secrétée naturellement par les cellules de gliome (Servotte, Camby et al. 2006). Sur la vitronectine, NTS influence différenciellement le comportement migratoire des cellules du cancer du pancréas en fonction de leur mode de migration (Mijatovic, Gailly et al. 2007). Ainsi, elle diminue considérablement le niveau de migration des cellules en migration collective, mais elle l'augmente dans la migration des cellules individuellement.

Par ailleurs, il a été montré que la NTS induit et renforce le phénotype invasif dans les cellules tumorales. Lorsque les cellules LNCaP d'adénocarcinome de la prostate ont été exposées à NTS, on observe une augmentation de 75% de leur capacité d'invasion basale dans le Matrigel (Vias, Burt et al. 2007). De même, dans les cas de privation androgénique, les cellules de cancer de la prostate deviennent spontanément invasives. Ces propriétés d'invasion acquises ont été corrélées avec la sécrétion intrinsèque de NTS puisque l'effet a été aboli en présence d'antagoniste spécifique de la NTS. De plus, dans les cellules HNSCC (Head and neck squamous cell carcinomas) exprimant NTSR1, l'agoniste de la NTS a augmenté de trois à quatre fois le nombre des cellules invasives dans le Matrigel (Shimizu, Tsukada et al. 2008). L'analyse du transcriptome effectuée sur des cellules HNSCC exposées à l'agoniste de la NTS a confirmé l'activation de signatures génétiques métastatiques, avec la régulation des 10 gènes impliqués dans l'adhésion, la migration, l'invasion et les processus apoptotiques, dont MMP-1 et IL-8. De même, en utilisant le système Affimetrix Gene-Chip pour analyser l'expression de 12.600 gènes, de Lange et collaborateurs ont constaté que le gène de la NTS était l'un des 73 gènes surexprimés dans la ligne cellulaire d'origine pulmonaire, hautement métastatique H460-M par rapport aux cellules contrôles moins métastatiques (de Lange, Dimoudis et al. 2003).

La nature de l'implication de NTR1 dans les effets promigratoires et pro-invasifs reste à préciser. Le rôle de NTSR1 et de NTSR3 est décrit individuellement dans ce phénomène qui dépend des modèles cellulaires étudiés. Cependant, ils pourraient potentiellement coopérer pour produire cet effet. Les études dans ce domaine restent fragmentaires et des investigations supplémentaires permettraient une meilleure compréhension de ces effets, de leur impact sur la progression tumorale, et des mécanismes impliqués.

9.4.2.4.3 Rôle néoangiogénique

Une tumeur de 1 à 2 mm de diamètre peut recevoir tous les nutriments par simple diffusion, mais la croissance tumorale ultérieure dépend du développement d'une vascularisation par le processus d'angiogénèse. La NTS peut favoriser la formation de nouveaux vaisseaux via l'interaction avec le récepteur uPAR, impliqué dans les phénomènes de migration endothéliale. En effet, la NTS libérée dans la circulation péri tumorale est susceptible d'induire l'activité fibrinolytique de cellules endothéliales vasculaires humaines et bovines et de favoriser ainsi leur migration vers le site tumoral (Ushiro, Mizoguchi et al. 1997). Le mécanisme, peu connu à l'heure actuelle, résulte d'une interaction de la NTS avec le récepteur uPAR (*urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*). Cependant, ce dernier n'appartient pas à la famille des RCPG. Il possède trois domaines transmembranaires ainsi qu'une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol). L'interaction avec son ligand traditionnel, le uPA, induit l'activation du plasminogène en plasmine et la dégradation de la matrice extracellulaire. Les différents effets oncogéniques de NTS ont été résumés dans la figure 26.



(Figure 26) Schématisation représentant le rôle oncogénique de NTSRI. L'activation de NTSRI peut être de façon autocrine, paracrine et/ou endocrine. Cette activation déclenche une cascade de signalisation ciblant des cibles oncogéniques ou des protéines impliquées dans les différents processus cancéreux (prolifération, survie, invasion, migration, et néoangiogénèse)

9.4.2.4.4 *Rôle pronostique de NTRSI*

La valeur pronostique du couple NTS-NTSR1 dans le cancer a été étudiée dans un nombre limité d'études. Ainsi, dans des échantillons de carcinomes squameux de la tête et du cou, l'analyse de l'expression des gènes du génome entier a montré que la NTS se localise dans le groupe des gènes qui ont été up-régulés de plus de 3 fois, par rapport à la muqueuse normale. Les patients (n = 38) qui expriment fortement la NTS et la NTSR1 présentent une baisse du taux de survie sans progression par rapport aux patients ayant des niveaux d'expression plus faible de la NTS et du NTSR1 (Shimizu, Tsukada et al. 2008). Dans le cancer canalaire du sein, les patients avec une expression élevée de NTSR1 avaient un taux de survie de 66.2% contre 96.5 % pour ceux ayant une expression moindre. Dans le cancer du sein, le fort niveau d'expression du NTSR1 est corrélé avec un grade (SBR), la taille de la tumeur et le nombre de ganglions envahis (Dupouy, Viardot-Foucault et al. 2009). En revanche, le NTSR1 n'était pas un marqueur discriminant de survie, dans d'autres tumeurs, telles que le mésothéliome, probablement parce qu'il était exprimé dans 77% des échantillons de plèvre normale et dans 90% du mésothéliome pleural malin (Alifano, Loi et al. 2010). Néanmoins, l'expression de la NTS influence négativement le pronostic du mésothéliome pleural malin (Alifano, Loi et al.).

II – RATIONEL DE L'ETUDE

Le développement du cancer bronchique est un processus multi-étapes caractérisé par accumulation séquentielle des altérations génétiques ou épigénétique responsables de la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. De nombreuses altérations ont été décrites dans le CBNPC, en particulier, les altérations des voies de p53/p14^{arf} et EGFR/KRAS. D'autres facteurs régulateurs de la transformation cellulaire et des processus de carcinogénèse, tels que le complexe neurotensine NTS, et son récepteur de haute affinité, le NTSR1, pourraient également jouer un rôle dans la progression du CBNPC.

Les données exposées dans la première partie de l'introduction montrent que, les altérations dans les voies EGFR/Ras, P53/P14^{arf}, jouent un rôle crucial dans le développement du CBNPC. La protéine p53 en tant que facteur de transcription multi-cibles agissant sur de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, la réparation de l'ADN, la sénescence et la progression du cycle cellulaire, son inactivation représente ainsi l'élément clé de développement de nombreux cancers. La dérégulation de la voie EGFR/Ras par mutation ou surexpression est considérée comme un puissant promoteur oncogénique, impliqué dans la prolifération, la survie, l'invasion et l'angiogénèse. Cependant, la conjonction entre les mutations EGFR/KRAS et les altérations de la voie suppresseur de tumeur p53 est peu connue. Il est raisonnable de supposer que la réponse aux ITK peut dépendre, au moins en partie, sur la fonctionnalité des voies responsables de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de la sénescence, de même que les altérations dans la voie p53/p14^{arf} sont essentielles pour l'émergence des tumeurs porteuses des mutations EGFR.

Dans ce contexte, le premier projet de ma thèse a été d'examiner la corrélation entre les altérations de la voie p53/p14^{arf} et des mutations EGFR/Ras. Afin d'enrichir la population en mutations EGFR, nous avons sélectionné les patients selon des critères cliniques bien corrélés à la présence des mutations EGFR. On a donc sélectionné les patients opérés d'adénocarcinomes bronchiques, les femmes quel que soit leur statut tabagique et les hommes non fumeurs.

Les données de la littérature suggèrent que le système neurotensinergique peut être un véritable acteur du processus tumoral, agissant comme élément promoteur de la progression tumorale. Dérégulé dans des tumeurs de diverses origines, par des mécanismes qui ne sont pas

entièrement élucidés, le couple NTS-NTSR1 a démontré des propriétés pro-prolifératives et anti-apoptotiques mais également des propriétés pro-invasives et pro-angiogéniques *in vitro* et/ou *in vivo*. Il est par ailleurs capable de transactiver le récepteur EGFR et donc les voies oncogéniques en aval. En condition d'exposition prolongée à la NTS, la régulation de l'expression membranaire du NTSR1 induit une sensibilité permanente des cellules tumorales au signal neurotensinergique. Ce qui aboutit à la "up-régulation" de nombreuses voies de signalisation associées à l'activation du NTSR1 et impliquées dans la stimulation des processus de carcinogénèse, tels les MAPK et ses gènes cibles. Bien que de nombreuses données soient disponibles sur le rôle possible de la NTS et de ses récepteurs, et en particulier le NTSR1, dans les mécanismes pathogéniques de différents cancers. En revanche, les données sur les effets potentiels du système NTS-NTSR1 dans le CBNPC sont extrêmement limitées.

Dans ce contexte, j'ai étudié le profil d'expression et l'implication du complexe NTS-NTSR1 dans le CBNPC.

Tout d'abord, j'ai eu l'opportunité de participer à une étude menée par le Dr M. ALIFANO montrant que l'expression de NTSR1 pourrait être considérée comme facteur péjoratif de survie dans l'adénocarcinome bronchique de stade I. Ces résultats encourageants, nous ont conduits à élargir nos recherches en explorant la valeur pronostique de NTSR1 aux autres types histologiques (carcinome épidermoïde et carcinome à grandes cellules) ainsi qu'aux autres stades opérables de la maladie.

De plus, des expériences préliminaires réalisées dans l'équipe sur des tumeurs expérimentales suggéraient que le système NTS-NTSR1 participe activement dans la progression de CBNPC, par son action sur l'amplification de la croissance tumorale et l'émergence des métastases. En utilisant des modèles cellulaires d'origine de cancers bronchiques, exprimant ou non le couple NTS/NTSR1, j'ai cherché à caractériser les mécanismes induits par la NTS associés à l'agressivité tumorale.

Les objectifs de ce travail sont donc :

1 - Etudier les mutations d'EGFR1, de KRAS, de P53 et l'expression de P14^{arf} et la corrélation entre la voie p53/p14^{arf} et la voie EGFR/KRAS.

2 – Evaluer la valeur pronostique de NTSR1, en termes de survie à cinq ans, chez les patients opérés de CBNPC. Déterminer les caractéristiques cliniques potentiellement associées à l'expression de NTSR1 dans le CBNPC.

3 - Étudier l'impact sur la progression tumorale de l'activation du système NTS/NTSR1 dans un modèle de tumeurs expérimentales chez la souris immunodéprimée, en utilisant des lignées tumorales exprimant ou non les deux molécules et *in vitro* et étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet neurotensinergique.

Par ailleurs, j'ai eu l'opportunité au cours de ma thèse de participer à un projet visant à mettre en évidence le rôle de la CRP dans les patients opérés de CBNPC. Ce travail a abouti à une publication (annexe1).

III - RESULTATS

1 PARTIE I : ALTÉRATION DE LA VOIE P53 DANS LE CBNPC PORTEURS D'UNE MUTATION D'EGFR OU KRAS

1.1 Introduction

Dans l'adénocarcinome bronchique, les gènes d'EGFR et de KRAS sont les deux oncogènes les plus fréquemment mutés (Ding, Getz et al. 2008). L'association entre ces mutations et des altérations de la voie suppresseur de tumeur p53, dans la transformation tumorale, est peu connue. Cette association peut favoriser la transformation induite par mutations d'EGFR ou de KRAS. Ainsi, comme nous l'avons vu dans l'introduction, la sur-activation d'EGFR ou de KRAS peut stimuler l'expression de p14^{arf} via les facteurs de transcription E2F1. P14^{arf} permet de stabiliser et d'activer p53 en séquestrant son régulateur négatif, mdm2. Une fois activée, p53 exerce alors un rétrocontrôle négatif en bloquant la progression du cycle cellulaire induite par EGFR ou KRAS, ce qui suggère que l'émergence de tumeurs porteuses de mutation EGFR ou KRAS requerrait l'inactivation de la voie p53. Dans ce contexte, un travail réalisé par Mounawar et collaborateurs au sein de l'équipe "CIRC" (Centre International de Recherche sur le Cancer) a montré une association systématique entre les mutations d'EGFR et les altérations des voies p53/p14^{arf} (mutation de TP53 et/ou perte de l'expression de p14^{arf}) (Mounawar, Mukeria et al. 2007).

Bien que les mutations communes dans le domaine kinase de l'EGFR (exons 18-21) soient souvent associées à une réponse objective aux inhibiteurs de tyrosine kinase EGFR (ITK), les patients porteurs de ces mutations ne répondent pas toujours de la même façon aux ITK. Une partie des patients ne répondent pas, et pour certains la maladie progresse sous traitement. Il est raisonnable de supposer que la réponse aux ITK peut dépendre, au moins en partie, sur la fonctionnalité de la voie p53 responsable de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose ou de la sénescence. La détermination du statut de la voie p53 dans les tumeurs porteuses d'une mutation d'EGFR constitue alors la première étape pour étudier le rôle de cette voie dans la réponse aux ITK d'EGFR chez ces patients porteurs des mutations EGFR

Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude visant, d'une part, à étudier le statut de la voie p53/p14^{arf} dans les CBNPC porteurs de mutation d'EGFR ou KRAS et d'autre part, à

confirmer les résultats précédents publiés par Mounawar. Etant donné que les mutations EGFR sont considérées comme (hallmark) du cancer bronchique survenu chez des femmes non-fumeuses ayant un adénocarcinome, cette série a inclut une grande proportion de ces patientes.

1.2 *Méthode*

1.2.1 *Population*

Quatre-vingt-seize patients ayant subi une résection chirurgicale pour adénocarcinome pulmonaire, à l'Institut Gustave Roussy, Villejuif ou au centre hospitalier Lyon Sud, Lyon, France, entre 1995 et 2003, ont été inclus. Afin d'augmenter le nombre des cas susceptibles de porter des mutations d'EGFR, nous avons sélectionné des patients de sexe masculin n'ayant jamais fumé, (56,5%) et de sexe féminin quels que soit leur statut tabagique (73,9%). Les détails de la population étudiée sont présentés dans le tableau 1 de l'article 1. Les données cliniques et étiologiques ont été révisées à partir des dossiers cliniques. L'étude a été approuvée par le conseil institutionnel d'examen éthique de CIRC.

1.2.2 *Mutation*

Les mutations d'EGFR, de KRAS et de TP53 ont été détectées par la technique PCR suivie des séquençages des exons cibles (voir le paragraphe méthode dans l'article 1). Nous avons étudié les exons 18-21 pour EGFR, les exons 5-9 pour TP53, et l'exons 1 pour KRAS.

1.2.3 *Expression de P14^{arf}*

L'IHC a été utilisé pour détecter l'expression de p14^{arf}. Les résultats ont été calculés selon la méthode décrite par Gazzeri (Gazzeri, Della Valle et al. 1998). Le score d'expression de p14^{arf} (0-300) combine le pourcentage des cellules positives (0-100%) pour le marquage et l'intensité de marquage (1-3, échelle semi-quantitative). P14^{arf} a été considérée comme exprimée faiblement lorsque le score était inférieur ou égal à la médiane (médiane = 160).

1.3 Résultats

1.3.1 *Détection des mutations d'EGFR, KRAS et P53*

Le séquençage des exons 18-21 d'EGFR a montré que 31/90 patients (34,4%) présentent des mutations d'EGFR, dont 20 (64,5%) sont délétions dans l'exon 19, et 7 une substitution de leucine en arginine sur le site 858. Les mutations d'EGFR étaient observées plus fréquemment chez les non fumeurs que les fumeurs (52% vs 8,3% $p = 2e-5$), et tendent à être plus fréquentes chez les femmes que les hommes (39,1% vs 18,2%, $p = 0,11$). Les mutations de KRAS ont été détectées dans 15/95 (15,8%) des patients. Toutes les mutations, sauf une, sont survenues au niveau du codon 12. Contrairement aux mutations d'EGFR, les mutations de KRAS étaient observées plus souvent chez les fumeurs que les non fumeurs (30% vs 3,9%, $p = 8.5e-4$) et ont été plus fréquemment observées dans les tumeurs de stade I (21,3% au stade I vs 6,5% aux stades > I, $p = 0,08$).

Pour les mutations de TP53, 48 mutations ont été déterminées dans 42/93 échantillons (45,2%). Ces mutations se distribuent : 15 dans l'exon 5 (31,2%), 15 dans l'exon 8 (31,2%), 11 dans l'exon 7 (22,9%) et 7 dans l'exon 6 (14,6%). La fréquence de mutation TP53 était similaire entre les fumeurs et les non fumeurs (47,4% et 43,1%, respectivement), ainsi qu'entre les femmes et les hommes (42,4% vs 52,2%, $p = 0,471$). Cependant, la prévalence des mutations de type de transversions G > T était significativement plus élevée chez les fumeurs par rapport aux patients non fumeurs (61% et 9,1% respectivement, $p < 0,001$).

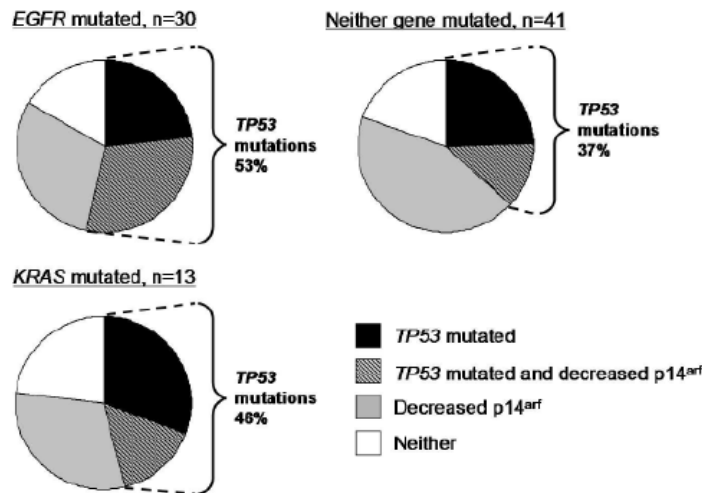
1.3.2 *Expression p14^{arf}*

L'analyse de l'expression de p14^{arf} par IHC a montré que 52/91 échantillons (57,1%) ont de niveau faible ou de perte de l'expression de p14^{arf} (≤ 160) et 39/91 échantillons (42,9%) ont une expression normale (> 160). La perte ou la diminution de l'expression de p14^{arf} était similaire entre les femmes et les hommes (59,4% et 54,2% respectivement), et elle n'était pas associée avec le statut tabagique (52,6% chez les fumeurs, et 62,0% chez les non-fumeurs, $p = 0,39$).

1.3.3 Association entre les mutations d'EGFR, KRAS, et les altérations de TP53/p14^{arf}

Les mutations d'EGFR et de KRAS étaient mutuellement exclusives. Parmi les 31 échantillons avec mutation d'EGFR, 16 présentaient de mutations de TP53 (51,6%), et 18 sur 30 (60%) étaient associés à une diminution de l'expression de p14^{arf}.

Les mutations de KRAS ont été associées aux mutations de TP53 dans 50% des cas (7/14, statut de TP53 n'était pas disponible pour un cas), et avec une expression normale de p14^{arf} dans 46,2% des cas (6/13, 2 cas non disponible). Les échantillons ayant ni de mutations KRAS, ni de mutations d'EGFR sont moins porteur de mutations de TP53 en comparaison aux échantillons porteurs des mutations EGFR ou KRAS (37,2% vs 52,3%, $p = 0,20$, NS). Les mutations de TP53 ont été associées à des mutations d'EGFR dans 16/40 échantillons (40,0%) et à des mutations de KRAS chez 7/41 échantillons (17,1%). Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les échantillons mutés et sauvages de TP53 par rapport au statut d'EGFR et de KRAS. En revanche, parmi les 40 tumeurs contenant une mutation TP53, 22 avaient une expression normale de p14^{arf} (55%), tandis que les tumeurs sauvages de TP53 ont été préférentiellement associée à une faible expression de la p14^{ARF} (67,3%, $p = 0,052$). Aucune association n'a été observée entre l'expression de p14^{arf} et le statut d'EGFR ou de KRAS. Les altérations de la voie p53/p14^{arf} (les mutations de TP53 ou la diminution de l'expression p14^{arf} ou les deux) ont été observée dans 73 des 89 échantillons (79,2%) pour lesquels les deux séries de données étaient disponibles, dont 22 échantillons (45,3%) présentait une mutation de TP53, 33 échantillons (45,2%) avec une faible expression de la p14^{arf}, et 18 échantillons (24,7%) avec les deux. Parmi les échantillons pour lesquels l'expression de p14^{arf}, et le statut de TP53 et d'EGFR (ou gène KRAS) étaient disponibles, 5 des 30 échantillons avec des mutations de l'EGFR (16,7%), et 3 des 13 échantillons avec des mutations de KRAS (23%) n'avaient ni de mutations de TP53, ni de faible expression des p14^{arf} (figure 27).



(Figure 27) Proportion des cas avec des mutations TP53, ou perte de l'expression de p14^{arf}, ou tous les deux, associée avec les mutations EGFR (n = 30), mutations KRAS (KRAS = 13), ou avec les cas n'ayant pas de mutations EGFR ou KRAS.

Globalement, ces résultats montrent une tendance à la présence des mutations de TP53 et/ou à la diminution de l'expression des p14^{arf} dans les tumeurs avec EGFR muté. Cependant, cette association n'a pas été trouvée systématiquement, avec quelques échantillons ayant de mutation d'EGFR avec TP53 sauvage et une expression normale de p14^{arf}.

1.4 Discussion

Nos résultats ont montré que la sélection des patients a favorisé l'enrichissement de la population par mutations EGFR. La connexion p53/p14^{arf} était altérée dans la majorité, mais pas dans tous les adénocarcinomes pulmonaires portant des mutations EGFR ou KRAS. Les mutations TP53 ne diffère entre les fumeurs et les non fumeurs qu'au niveau de leur type où les mutations de type transversion G>T sont plus fréquent chez les fumeurs

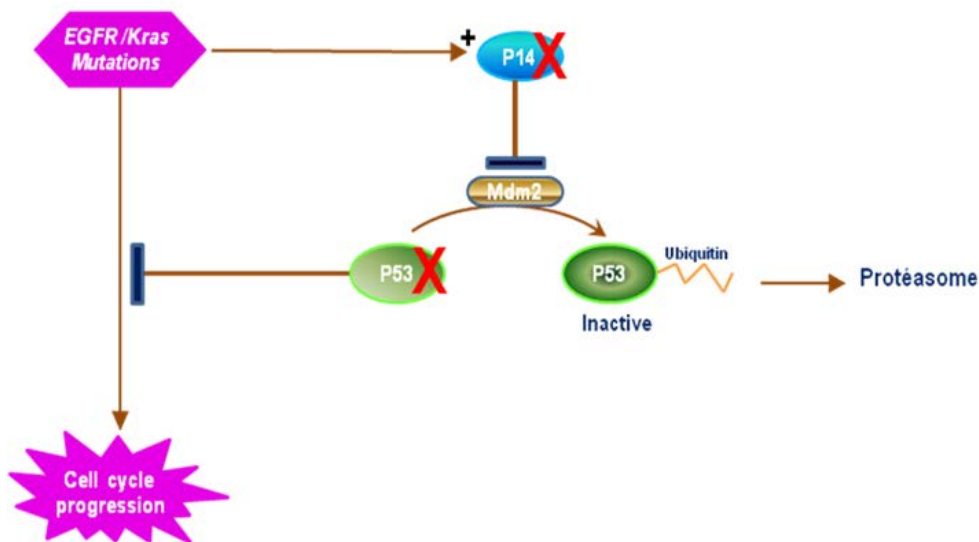
1.4.1 Association des altérations de la voie p14^{arf} /p53 et mutations d'EGFR/KRAS

Le résultat essentiel de ce travail est que la grande majorité des tumeurs porteuses de mutations pour EGFR ou KRAS présente une inactivation de la voie p53 par mutation de TP53 et/ou par perte de l'expression de p14^{arf}. Ce résultat suggère un rôle important de

l'inactivation de la voie p53 pour l'émergence des tumeurs porteuses des mutations d'EGFR ou de KRAS.

Dans les cas où nous n'avons pas trouvé des altérations dans la voie p53/p14^{arf}, plusieurs explications sont possibles : tout d'abord, nous avons séquencé les exons 5 à 9 sur TP53, qui contiennent environ 90% de toutes les mutations décrites dans le cancer du poumon (<http://www-p53.iarc.fr>). Par conséquent, il est possible qu'un petit nombre de cancers portent des mutations dans d'autres régions du gène. Deuxièmement, bien que la perte ou la diminution de l'expression p14^{arf} puisse résulter de divers mécanismes d'inactivation du gène ARF (hyperméthylation de promoteur, régulation transcriptionnelle), il est possible que certains mécanismes d'inactivation n'entraînent pas de diminution de son expression, par exemple par mutations faux-sens rare qui peut conduire à l'expression d'une protéine inactive (Polager et Ginsberg 2009). Troisièmement, la voie p53/p14^{arf} implique de nombreux facteurs qui n'ont pas été analysés ici, et que leur dérégulation pourrait contribuer aux altérations de cette voie comme le facteur de transcription E2F1 et mdm2. La prise en compte de toutes ces possibilités rend notre évaluation actuelle, de la prévalence des altérations de la connexion de p53/p14^{arf} dans les adénocarcinomes bronchiques porteurs des mutations EGFR ou KRAS, réservée. Des études supplémentaires seront donc nécessaires pour bien éclaircir ce phénomène

Nos résultats confortent néanmoins l'hypothèse selon laquelle les altérations de la voie p53 contribue au potentiel transformant des mutations d'EGFR (Sato, Vaughan et al. 2006; Mounawar, Mukeria et al. 2007). Ainsi, les mutations d'EGFR qui activent constitutivement le domaine tyrosine kinase intracellulaire de ce récepteur entraîne un signal constitutif de prolifération cellulaire et stimule la formation de néovaisseaux ainsi que la capacité métastatique des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg 2000). La levée de freinage de prolifération suite à l'inactivation de la voie suppresseur de la tumeur (p53), par ailleurs, confère aux cellules comportant des mutations EGFR un avantage sélectif de prolifération, ce qui concourt à l'acquisition d'un phénotype cancéreux complet (figure 28).



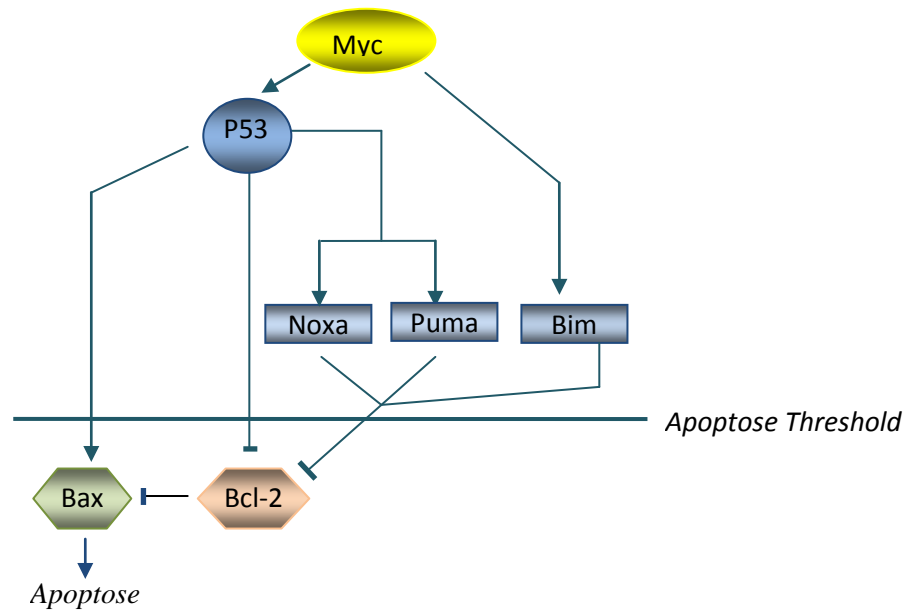
(Figure 28) Schématisation représentative de la relation entre les altérations de la voies p53/p14 et l'émergence des tumeurs induites par mutation EGFR

1.4.2 Impact des altérations de la voie p53 sur la réponse aux ITK dans les cancers bronchiques porteurs de mutation d'EGFR

L'émergence des thérapies ciblées visant à moduler spécifiquement des activités oncogéniques identifiées comme responsables de l'acquisition des propriétés cancéreuses, suscite de grands espoirs dans la prise en charge des patients atteints de CBNPC. La sensibilité du patient à ces médicaments dépend de manière critique de la suractivation de la cible pharmacologique du médicament. Toutefois, les séries cliniques montrent que la présence ou l'absence d'une telle modification n'est pas suffisante pour prédire à long terme des réponses à ces traitements. Par exemple, les patients avec des mutations activatrices de l'EGFR n'atteignent pas le même degré de réponse aux ITK d'EGFR. Dans l'étude IPASS, la première grande étude évaluant le gefitinib en première ligne contre les patients traités par chimiothérapie, les patients porteurs de mutations EGFR traités par gefitinib (n = 132) ont présenté des réponses complètes ou partielles, certains ont vu la maladie se stabiliser ou progresser dans 2,3%, 68,9%, 20,5% et 7.6 % des cas respectivement (Mok, Wu et al. 2009). Cette hétérogénéité dans la réponse aux ITK pourrait être due, au moins en partie, à l'altération dans la voie suppresseur de la tumeur (p53). Ainsi, la perte de la fonction de p53 a entraîné une diminution de la sensibilité à l'imatinib (inhibiteur de protéine kinase BCR-ABL) dans des modèles de leucémie myéloïde chronique (Wendel, de Stanchina et al. 2006). Dans une étude plus récente, la restauration de la fonction de p53 via le transfert de gène TP53 dans les cellules de cancer de prostate PC3 dépourvues de TP53 a rendu ces cellules

sensibles au cetuximab (anticorps monoclonale anti-EGFR (Bouali, Chretien et al. 2009). Dans une autre étude réalisée en utilisant les cellules A549 et NCI-H1299, la p53 fonctionnelle a augmenté la réponse apoptotique suite au traitement par gefitinib (Rho, Choi et al. 2007).

Ces données indiquent le rôle important de p53 dans la réponse aux certains traitements anticancéreux. Ceci peut être en relation avec le rôle apoptotique de p53. La p53 fait partie des voies apoptotiques responsables des signaux apoptotiques qui contrecarrent les signaux anti-apoptotiques de la protéine Bcl2. L'inactivation d'une seule de ces voies apoptotiques dans des cellules exprimant une activité oncogénique permettrait à la cellule d'acquérir d'un phénotype prolifératif excessif. C'est le cas par exemple, pour la surexpression de Myc, dans des modèles murins de lymphome B. Cette surexpression entraîne une activation des voies apoptotiques dépendantes des protéines de p53 ou de BIM (protéine apoptotique fait partie de la famille Bcl-2 qui comporte aussi bien des membres aux propriétés anti-apoptotiques que des membres aux propriétés apoptotiques). L'inactivation d'une seule de ces deux dernières suffit à engendrer le développement tumoral (Evan, Wyllie et al. 1992; Hermeking and Eick 1994; Schmitt, McCurrach et al. 1999; Egle, Harris et al. 2004) (figure 29). Un autre exemple s'observe également dans le lymphome humain Burkitt, où la dérégulation de deux protéine Bim et p53 existent, mais sont mutuellement exclusifs. Ainsi, les signaux dépendants et indépendants de p53 agissent en parallèle afin de promouvoir l'apoptose et de réprimer la tumorigenèse. La combinaison de ces signaux est nécessaire pour surmonter les effets anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'inactivation de l'une de ces voies apoptotiques peuvent cependant inhiber le déclenchement de l'apoptose permettant ainsi la prolifération excessive (Evan, Wyllie et al. 1992; Hermeking and Eick 1994; Schmitt, McCurrach et al. 1999; Egle, Harris et al. 2004; Hemann, Bric et al. 2005).



(Figure 29) Surmonter le seuil anti-apoptotique déterminé par les membres de la famille Bcl2. Les signaux apoptotiques dépendants de p53 incluant l'induction de Bax, de Puma et de Noxa et l'inhibition directe de Bcl2 synergise avec les signaux indépendants de p53 comme l'induction de Bim afin de contrecarrer la fonction anti-apoptotique de Bcl2. (Hemann and Lowe 2006)

Dans les CBNPC porteurs des mutations d'EGFR, il est possible que l'opposition de signal anti-apoptotique induite par EGFR suractivé (par mutation) nécessite l'intégrité de l'ensemble des voies pro-apoptotiques et l'inactivation de l'une de ces voies pourrait conduire ainsi à une prolifération cellulaire excessive. De même, la réponse optimale aux ITK peut aussi dépendre de l'intégrité de ces voies pro-apoptotiques dans ces tumeurs.

Ainsi, Le gefitinib, induit l'apoptose par mécanisme dépendant de la protéine pro-apoptotique BIM (Costa, Halmos et al. 2007; Cragg, Kuroda et al. 2007; Gong, Somwar et al. 2007). Bien que l'expression de BIM ne soit pas dépendant de p53, ce dernier peut cependant stimuler l'expression d'autre membre de la famille Bcl-2 tel PUMA. Récemment, il a été montré que PUMA, est également un acteur essentiel de l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules de cancer ORL (Sun, Ming et al. 2009). Donc, la réponse au gefitinib dépend sur des voies apoptotiques dépendantes et indépendantes de p53 qui contrecarrent les effets antiapoptotiques Bcl2. Il est possible que l'altération de l'une de ces voies provoque un signal apoptotique plus faible, se traduisant par une réponse limitée aux ITK.

1.4.3 Mutations EGFR/KRAS, TP53 : caractéristiques

Dans ce travail, nous avons sélectionnés les patients afin d'avoir une plus grande représentation des non fumeurs ou des femmes que dans la population générale des adénocarcinomes bronchiques. Comme prévu, la sélection des patients a permis d'enrichir la population en mutations d'EGFR. Ainsi, dans cette série, le taux de mutations de l'EGFR (34,4%) était plus élevé que dans les patients caucasiens non sélectionnés (Rosell, Moran et al. 2009). Par contre, le taux de mutations de KRAS (15,8%) est légèrement inférieur à celui de la série non sélectionnée, ce qui est compatible avec le fait que les mutations de KRAS sont rares chez les non fumeurs.

Les mutations de TP53 ont été détectées dans 42 des 93 cas (45,2%) sans différence dans leur fréquence entre les fumeurs et les non fumeurs, ce qui est concordant avec deux autres séries de la littérature (37.5% 142/376) (Jin, Kim et al. ; Kosaka, Yatabe et al. 2009). Cette concordance a aussi été retrouvée avec la différence significative entre les fumeurs et les non fumeurs dans les types de mutations où une fréquence très élevée de mutations de type de transversion se trouve chez les fumeurs (61% vs 9%, $p < 0,001$). Cela peut être expliqué par l'effet que ce type de mutation résulte des lésions de l'ADN par les carcinogènes du tabac tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Pfeifer, Denissenko et al. 2002). Cependant, il est intéressant de noter que chez les non fumeurs, le gène TP53 subi une pression mutagène très élevée comme chez les fumeurs, malgré l'absence des effets de carcinogènes du tabac. Cette observation corrobore l'hypothèse que la prévalence relativement élevée de mutations de TP53 chez les non fumeurs est due à une forte pression de sélection afin de désactiver son rôle en tant que sauvegarde contre le stress oncogénique.

1.5 Conclusion

Nos résultats ont montrés que les altérations de la voie p53/p14^{arf} sont des événements communs chez les patients opérés d'adénocarcinomes bronchiques et porteurs des mutations EGFR/KRAS, mais pas systématiques. Des études approfondies, *in vitro* et *in vivo*, explorant le rôle de ces altérations dans la réponse aux ITK sont nécessaires. La mise en évidence de ce rôle permettrait de mieux adapter le traitement selon le profil des patients.

Article I

Mutation of TP53 and alteration of P14^{arf} expression in EGFR and KRAS-mutated lung adenocarcinoma

Alexis B. Cortot (1,2,‡), Mohamad Younes (1,3,‡), Ghislaine Martel-Planche (1), Benoit Guibert (4), Sylvie Isaac (5), Pierre-Jean Souquet (2), Tabassome Simon (3), Frédéric Commo (6,7) Philippe Girard (8), Pierre Fouret (6,9), Elisabeth Brambilla (10), Pierre Hainaut (1), Jean-Charles Soria (6,7).

(1) International Agency for Research on Cancer, Lyon, France;

(2) Department of Thoracic Oncology, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, France;

(3) Clinical Research Unit and Department of Pharmacology, Saint-Antoine University of Medicine, University Pierre et Marie Curie Paris 6, Paris, France

(4) Department of Thoracic Surgery, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, France;

(5) Department of Pathology, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, France;

(6) Department of Translational Research, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France;

(7) INSERM Unit 981, University Paris-South, France

(8) Thorax Department, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France

(9) Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France;

(10) Institut Albert Bonniot, INSERM U823 and Department of Pathology, Hôpital Albert Michallon, Grenoble, France

‡ These authors contributed equally to this work

Manuscript correspondence: Pierre Hainaut, International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon France. Tel: +33 4 72 73 85 32; Fax: +33 4 72 73 83 22, email: hainaut@iarc.fr; Secretary: Mrs M. Wisez, Tel: +33 4 72 73 84 62, email: Wisez@iarc.fr

ABSTRACT (242 words)

Background. *EGFR* and *KRAS* are commonly and mutually exclusively mutated oncogenes in lung adenocarcinomas. Little is known about the association between these mutations and alterations in tumor suppressor pathways. The most frequently inactivated tumor suppressor is *TP53*. We have investigated *TP53* mutations and expression of p14^{arf}, a regulator of p53 activated by oncogenic signals, in *EGFR* and *KRAS*-mutated lung adenocarcinomas.

Patients and methods. Ninety-six patients were included and their clinicopathological characteristics were reviewed. DNA was extracted from paraffin-embedded resected tissues. Mutation in *TP53* (exons 5-9), *KRAS* (exon 1) and *EGFR* (exons 18-21) were identified by direct sequencing. p14^{arf} expression was semi-quantitatively assessed by immunohistochemistry.

Results. *TP53*, *KRAS* and *EGFR* mutations were detected in 42/93 (45.2%), 15/95 (15.8%) and 31/90 (34.4%) of the cases, respectively. Decreased expression of p14^{arf} was observed in 52/91 cases (57.1%). Sixteen of 88 cases (18.1%) had both *TP53* and *EGFR* mutations, 7 of 92 cases (7.6%) had both *TP53* and *KRAS* mutation, and none had *EGFR* and *KRAS* mutation. Deficiency of the p53/p14^{arf} connection (defined by the presence of either a *TP53* mutation or decreased p14^{arf} expression or both) was observed in 25 of 30 *EGFR* mutated (83.3%) and in 10 of 13 *KRAS* mutated (76.9%) tumors.

Conclusion. Inactivation of the p53/p14^{arf} connection pathway is common but not systematic in *EGFR* or *KRAS* mutated lung adenocarcinomas. Further studies are needed to evaluate the impact of this pathway on treatment outcomes such as response to small drug *EGFR* inhibitors.

INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer death for both men and women worldwide. Over the last decade, adenocarcinoma has become the most common histological subtype of lung cancer in many Western countries. Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) and *Kirsten* rat sarcoma 2 viral oncogene homolog (*KRAS*) are the two most frequently mutated oncogenes in lung adenocarcinoma (Ding, Getz et al. 2008). Common mutations in the kinase domain of *EGFR* (exons 18-21) are often associated with objective response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI), whereas *KRAS* mutations are usually associated with resistance to this treatment. Surprisingly, little is known about the association between these mutations and alterations in tumor suppressor pathways. Yet it seems reasonable to assume that response to TKI may depend, at least in part, on the functionality of pathways responsible for cell cycle arrest, apoptosis or senescence.

TP53 encodes a multi-target transcription factor, p53, which controls cellular processes often deregulated in cancer cells, such as apoptosis, DNA repair, senescence and cell cycle progression (Hollstein, Sidransky et al. 1991). The p14^{arf} protein is the alternate reading frame (ARF) product of the *CDKN2A* locus, which also encodes

the p16^{ink4a} cyclin kinase inhibitor. p14^{arf} binds and tethers to the nucleolus the Mdm2 protein (Murine double minute clone 2), the main effector of p53 degradation. Thus, by sequestering Mdm2, p14^{arf} promotes p53 stabilization and activation. The expression of p14^{arf} is under the transcriptional control of the S-phase transcription factor E2F1. Thus, activation of p53 through induction of p14^{arf} by E2F1 provides cells with a safeguard against untimely or excessive growth signals such as those generated by activated oncogenes (Lomazzi, Moroni et al. 2002).

The *TP53* gene is mutated in a large proportion of human tumors, irrespective of the organ site (Hollstein, Sidransky et al. 1991). In lung adenocarcinoma, it is the most frequently mutated tumor suppressor gene (Ding, Getz et al. 2008). The two products of *CDKN2A*, p16^{ink4a} and p14^{arf} are often down-regulated in lung cancers through mechanisms including promoter hypermethylation, loss of heterozygosity, point mutations and transcriptional repression (Sharpless 2005). In resected non-small cell lung cancers, decreased p14^{arf} expression has been detected in 19 out of 42 adenocarcinomas (44%) (Hsu, Wang et al. 2004). This mechanism might contribute to carcinogenesis by hampering p53 activation in cells containing activated

oncogenes. In a previous study, we have observed that *EGFR* mutation in lung adenocarcinoma was systematically associated with either *TP53* mutation, decreased p14^{arf} expression, or both (Mounawar, Mukeria et al. 2007). These results led us to suggest that functional deficiency in the p14^{arf}/p53 connection is mandatory to bypass a growth suppression safeguard mechanism in adenocarcinomas with activated *EGFR*.

In this study, we have analyzed *EGFR*, *KRAS*, *TP53* mutations and p14^{arf} expression in a series of lung adenocarcinoma recruited in two French referral centers. Since *EGFR* mutations are considered as a hallmark of lung cancers occurring in never-smokers, the case series was selected to contain a high proportion of female and never-smoker patients.

PATIENTS AND METHODS

Patients and tissues

Lung adenocarcinoma patients that underwent surgical resection were identified either at Institut Gustave Roussy, Villejuif or at Centre hospitalier Lyon Sud, Lyon, France, between 1995 and 2003. All patients had a diagnosis of adenocarcinoma confirmed by a single pathologist (E.B.). To enrich in cases likely to contain *EGFR* mutations, the series included a large proportion of lifelong never-smokers (56.5%) and of women (73.9%) (Table 1).

Patients' clinical records were retrospectively reviewed for clinical and etiological parameters, including smoking status as assessed by trained physicians at diagnosis. A patient was considered as "smoker" if reporting any history of active smoking. Thus the "smoker" category included ex-smokers as well as current smokers. Patients who denied any active smoking were considered as lifelong never-smokers. The study was approved by the institutional review boards of the International Agency for Research on Cancer. Tumor samples were chemo- or radio-naïve resection samples from formalin-fixed, paraffin-embedded pathology archives.

Mutation analysis

DNA was extracted using a previously described standard affinity column procedure from areas of fresh formalin fixed, paraffin-embedded tumor sections as selected by the pathologist and analyzed for *TP53* (exons 5 to 9 and flanking splice sites, containing over 90% of all lung cancer mutations indexed in the IARC *TP53* database, <http://www-p53.iarc.fr>), *KRAS* (codons 12 and 13) and *EGFR* mutations (exons 18 to 21) by sequencing of PCR products generated using primers and annealing conditions as described elsewhere (Anker, Lefort et al. 1997; Pao,

Miller et al. 2004; Le Calvez, Mukeria et al. 2005) (http://www-p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf). PCR products were treated with 2 μ L ExoSAP-IT (GE Healthcare, Piscataway, NJ) at 37°C for 15 min followed by inactivation at 80°C for 15 min and direct sequencing using Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing method on ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). All mutations were confirmed by sequencing of a second, independent PCR product of the same tumor DNA.

Immunohistochemistry

Deparaffinized tissue sections (4 μ m) were labelled with a specific antibody against p14^{arf} (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). All the slides were read by a single pathologist (E.B.). Results were calculated as expression scores as previously described (Gazzeri, Della Valle et al. 1998). Briefly, the expression score (0-300) combines the percentage of positive cells (0-100%) for the marker and the staining intensity (1-3 on an arbitrary, semi-quantitative scale). p14^{arf} was considered as lower expressed when the score was inferior or equal to the median.

Statistical analysis

For comparison of proportions between gene mutations, p14^{arf} expression and

clinicopathological characteristics, two-tailed Fisher's exact tests were used. A *p*-value <0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Patients characteristics

The baseline characteristics of the patients are described in Table 1. Ninety-six patients were included, including 68 women (73.9%) and 52 never-smokers (56.5%). Sixty-two patients (67.7%) had stage I disease at the time of diagnosis. Information was non-available for 4 of the 96 patients.

Detection of *EGFR*, *KRAS* and *TP53* mutations

Results of detection of *EGFR*, *KRAS* and *TP53* mutations are presented in Table 1. The detailed list of all mutations identified is given in Supplementary Table 1. *EGFR* mutational status could not be determined for 6 patients. Thirty one samples (34.4%) harbored *EGFR* mutation, including in frame deletions in exon 19 (20 cases; 64.5%) and arginine to leucine substitution at amino acid 858 (L858R) (7 cases; 22.6%).

EGFR mutations were more likely observed in never-smokers compared to smokers (52% and 8.3%, respectively, *p* = 2e-5), and tended to be more frequently

observed in women (39.1% vs. 18.2% for men, $p = 0.11$, non significant, NS).

KRAS mutations were detected in 15 of 95 samples (15.8%). All but one *KRAS* mutations occurred at codon 12. *KRAS* mutations were more likely to occur in smokers (30% vs. 3.9% in never smokers, $p = 8.5e-4$) and were more frequently observed in stage I tumors (21.3% vs. 6.5% in stage > I, $p = 0.08$).

Forty eight *TP53* mutations were detected in 42 samples (45.2%, status could not be determined for 3 patients). These mutations included 15 mutations in exon 5 (31.2%), 15 mutations in exon 8 (31.2%), 11 mutations in exon 7 (22.9%) and 7 mutations in exon 6 (14.6%).

Proportions of *TP53* mutation (all mutations included) were similar in smokers and never-smokers patient groups (47.4% and 43.1%, respectively), as well as in each gender group (42.4% in women, and 52.2% in men, $p = 0.471$). However, the prevalence of G>T transversions was significantly higher in smokers compared to never smoker patients (61% and 9.1%, respectively, $p < 0.001$). This excess of G to T transversions in smokers is compatible with the well-described pattern of tobacco-smoke induced mutations in lung cancers of smokers (Pfeifer, Denissenko et al. 2002). The codon distribution of *TP53*

mutations in smokers and non-smokers is shown in Figure 1.

p14^{arf} expression

The p14^{arf} expression scores could not be assessed for 5 patients. The median of p14^{arf} expression score (median = 160, range 0-300) was used to assign samples to two expression groups. Fifty two samples (57.1%) were classified as “decreased expression” of p14^{arf} (≤ 160) and 39 samples (42.9%) were classified as “normal expression” (>160).

Decreased p14^{arf} expression was equivalently observed among female and males (59.4% and 54.2%, respectively), and was not associated with the smoking status either (52.6% in smokers, and 62.0% in non smokers, $p = 0.39$) (Table 1).

Association between *EGFR*, *KRAS*, *TP53* mutations and p14^{arf} expression

In agreement with data from other series, *EGFR* and *KRAS* mutations were mutually exclusive. Among the 31 samples with *EGFR* mutation, 16 harbored *TP53* mutations (51.6%), and 18 of 30 (60%) were associated with a decreased expression of p14^{arf}. No statistically significant difference between *EGFR* mutated and *EGFR* wild type tumors was observed with respect to *TP53* status or p14^{arf} expression.

KRAS mutations were associated with *TP53* mutation in 7 of 14 (50.0%, *TP53* status was not available in a case), and with a normal expression of p14^{arf} in 6 of 13 (46.2%, 2 non available cases). Samples with neither *KRAS* nor *EGFR* mutation tended to be less likely to harbor a *TP53* mutation compared to samples with either *EGFR* or *KRAS* mutation (37.2% vs. 52.3%, $p = 0.20$, NS). However, none of these differences were statistically significant.

TP53 mutations were associated with *EGFR* mutations in 16/40 samples (40.0%) and with *KRAS* mutations in 7/41 samples (17.1%). No statistically significant difference between mutant and wild type *TP53* samples was observed regarding *EGFR* and *KRAS* status.

In contrast, among 40 tumors containing a *TP53* mutation, 22 had normal expression of p14^{arf} (55%), while wild type *TP53* samples were preferentially associated with low expression of p14^{arf} (67.3%, $p = 0.052$). No association was observed between p14^{arf} expression and *EGFR* or *KRAS* status.

Deficiency of the p53/p14^{arf} connection (i.e. *TP53* mutation or decreased p14^{arf} expression or both) was observed in 73 out of the 89 samples (79.2%) for which both data were available, including 22 samples (45.3%) with *TP53* mutation, 33 samples

(45.2%) with low expression of p14^{arf} and 18 samples (24.7%) with both.

Among the samples for which p14^{arf} expression, *TP53* and *EGFR* (or *KRAS*) status were available, 5 of 30 samples with *EGFR* mutations (16.7%), and 3 of 13 samples with *KRAS* mutations (23%) did not show either *TP53* mutation or low expression of p14^{arf}. Overall, these results show a trend for either mutation of *TP53* and/or decreased expression of p14^{arf} in tumors with mutant *EGFR*. However, this association was not systematically found, with 1/6 of samples with *EGFR* mutation showing both wild-type *TP53* and normal expression of p14^{arf}.

DISCUSSION

In this study, we show that the p53/p14^{arf} connection is altered in a majority, but not in all, lung adenocarcinomas carrying either *EGFR* or *KRAS* mutations. These alterations consist into *TP53* inactivation by mutation, p14^{arf} down-regulation, or both. However, in 5 cases of *EGFR* mutated tumors (16.7%) and in 3 cases of *KRAS* mutated tumors (23%), neither *TP53* mutation nor low expression of p14^{arf} could be detected. Overall, these observations are compatible with the hypothesis proposed by Mounawar et al. 2007 that the p53/p14^{arf} connection operates as a natural safeguard against

excessive growth signaling in lung cells which should be disrupted to allow adenocarcinoma cancer cells to maintain sustained proliferation (Mounawar, Mukeria et al. 2007). However, the fact that the p53/p14^{arf} connection does not appear to be altered in all *EGFR* or *KRAS* mutated tumors suggests that some tumors may escape this natural safeguard by yet unidentified, alternative mechanisms. In this respect, the analyses reported here may not capture the full extent of the mechanisms disrupting the p53/p14^{arf} connection. First, we have sequenced only exons 5-9 of *TP53*, which contain about 90% of all described lung cancer mutations (<http://www-p53.iarc.fr>). Therefore, it is possible that a small number of cancers with wild-type exons 5 to 9 harbor inactivating mutations in other regions of the gene. Second, although decreased expression of p14^{arf} may translate the effect of diverse mechanisms of inactivation of the *ARF* gene (promoter hypermethylation, transcriptional down-regulation), it is possible that some mechanisms of inactivation do not lead to apparent decrease in expression, such as for example rare missense mutations that may lead to expression of an inactive protein (Polager and Ginsberg 2009). Third, the p53/p14^{arf} connection involves many components which have not been

analyzed here. One is E2F1, a transcription factor often deregulated in cancers, which is itself under the control of the Rb (retinoblastoma) protein, another common target in carcinogenesis. Another one is Mdm2, which actually is the molecular link between p14^{arf} and p53 and which is sometimes amplified or otherwise deregulated in lung cancers (Mori, Ito et al. 2004). Putting all these possibilities together, our current assessment of the prevalence of disruption of the p53/p14^{arf} connection in lung adenocarcinoma with *EGFR* or *KRAS* mutations appears rather conservative. Further studies will be needed to uncover the full extent of this phenomenon.

Lung adenocarcinoma is a heterogeneous disease that includes sub-groups characterized by the presence of “driving” mutations in *EGFR*, *KRAS* or *BRAF*, or translocations such as *EML4-ALK*. In a recent DNA sequencing analysis of 623 genes in 188 lung adenocarcinomas, *KRAS* and *EGFR* were found to be the most frequently mutated oncogenes, with respectively 61 and 34 mutations detected (Ding, Getz et al. 2008). In the same study, *TP53* was the most frequently mutated tumor suppressor gene, with 66 mutations in 188 samples (Ding, Getz et al. 2008). Although *EGFR* and *KRAS* mutations appear to define two non-overlapping sub-

groups of cancers at the molecular level, these sub-groups are far from homogeneous in terms of clinical features and behavior. In particular, all patients with activating *EGFR* mutation do not achieve the same degree of response to EGFR-targeted therapy using TKI. In the IPASS study, the first large study evaluating first-line gefitinib against chemotherapy, *EGFR* mutated patients who were treated with gefitinib (n = 132) achieved complete response, partial response, stable disease and progressive disease in respectively 2.3%, 68.9%, 20.5% and 7.6% of the cases (Mok, Wu et al. 2009). This heterogeneity might be due, to a small extent, to the presence of TKI-resistance mutations. However, such mutations are generally detected at relapse from TKI treatment and their prevalence is very low in patients initially receiving first-line TKI (Kosaka, Yatabe et al. 2006). Thus, other molecular parameters modulating the long-term response of *EGFR* mutated remain to be identified.

Variations in the patterns of alteration of tumor suppressor genes may represent such modulators of the response to TKIs. Indeed, *EGFR* (as well as *KRAS*) are proximal effectors in cell proliferation signal transduction pathways, initiating signaling cascade that involve bypassing or temporarily disconnecting the mechanisms

responsible for the negative regulation of cell growth. In a comparable context of pharmacological targeting of an activated tyrosine kinase, loss of p53 function has been shown to decrease sensitivity to the BCR-ABL kinase inhibitor imatinib in models of chronic myelogenous leukemia (CML) (Wendel, de Stanchina et al. 2006). More recently, a study showed that restoration of functional p53 protein through gene transfer in the *TP53*-null prostate cancer cell line PC3 sensitized these cells to EGFR inhibition with the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab (Bouali, Chretien et al. 2009). In another study performed on *EGFR* wild-type lung cancer cell lines A549 and NCI-H1299, p53 was shown to enhance growth inhibition and apoptosis by the EGFR TKI gefitinib through up-regulation of Fas and restoration of caspase activation (Rho, Choi et al. 2007). Although EGFR-TKI have been shown to promote apoptosis in *EGFR* mutated cells through up-regulation of BIM, a p53-independent member of the BH3-only group (Costa, Halmos et al. 2007; Cragg, Kuroda et al. 2007; Gong, Somwar et al. 2007), a fully functional p53 pathway may fatefully contribute to the pro-apoptotic burden that stands in opposition to the prosurvival load, and enhance efficacy of EGFR-TKI (Hemann and Lowe 2006).

It should be emphasized that the series analyzed here cannot be taken as representative of the population of lung adenocarcinoma patients in France. As explained in the “Methods” section, patients were selected to include a larger representation of never-smokers and of women than in the general population of adenocarcinoma patients. Thus, as anticipated, the rate of *EGFR* mutations (34.4%) is higher in this series than in unselected Caucasian patient’s populations (Rosell, Moran et al. 2009) and the rate of *KRAS* mutations (15.8%) is slightly lower than in unselected series, in agreement with the fact that *KRAS* mutations are known to be rare in never smokers. *TP53* mutations were found in 42 out of 93 samples (45.2%), consistent with other series (Jin, Kim et al. 2009; Kosaka, Yatabe et al. 2009). Notably, the prevalence of *TP53* mutations was similar in smokers (47.4%) and never-smokers (43.1%). The significant difference between smokers and never-smokers resides not in the prevalence of *TP53* mutations but in their pattern, which showed a much higher prevalence of G>T transversions in smokers than in non-smokers (61% vs 9%, $p < 0.001$). This type of mutation has been shown to result from DNA damage by the tobacco carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons

(Pfeifer, Denissenko et al. 2002). It is interesting to note that in never-smokers, the *TP53* gene appears to sustain a mutagenic pressure which is as high as in smokers, despite the absence of the heavy burden of tobacco carcinogens. This observation supports the hypothesis that in never-smokers the relatively high prevalence of *TP53* mutations is due to strong selection pressure for inactivation of its role as safeguard against oncogenic stress.

The series of patients analyzed here was recruited between 1995 and 2003, before the systematic implementation of TKI as part of the therapeutic management. Therefore, it is not possible to determine whether the different patterns of molecular alterations reported here may provide predictive information on the extent of the patient’s response to TKI. Such a demonstration awaits larger studies, carried in the context of clinical trials where TKI are used as first-line treatment in comparison with conventional adjuvant therapy.

CONCLUSION

The emergence of molecular targeted agents aiming at specific activated oncogene represents the most spectacular advance to date in the treatment of metastatic lung cancer. The patient’s

sensitivity to such drugs is critically dependent upon the presence of activating alterations in the pharmacological target of the drug. However, clinical series show that presence or absence of such an alteration is not sufficient to predict long-term responses to small drug therapies. This observation calls for the development of rationales including additional biomarkers to better predict individual variations in patient's responses. In this study, we show that status of the p53/p14^{arf} connection, a safeguard pathway against oncogenic stress, differs among lung adenocarcinomas with *EGFR* mutation. Further molecular pathology and experimental studies are warranted to determine whether the status of the p53/p14^{arf} connection is an important predictor of TKI responses.

ACKNOWLEDGEMENTS

Work on lung cancer at IARC is supported by the PNES program of the French National Cancer Institute (INCa).

This project has been supported by a grant from the Comité National de lutte contre les Maladies Respiratoires (CNMR).

A.B.C. received grants from the Fondation de France and the Collège des Enseignants de Pneumologie (CEP).

REFERENCES

1. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455:1069-1075.
2. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49-53.
3. Lomazzi M, Moroni MC, Jensen MR, Frittoli E, Helin K. Suppression of the p53- or pRB-mediated G1 checkpoint is required for E2F-induced S-phase entry. *Nat Genet*. 2002;31:190-194.
4. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*. 2005;576:22-38.
5. Hsu HS, Wang YC, Tseng RC, et al. 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*. 2004;10:4734-4741.
6. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, et al. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res*. 2007;67:5667-5672.
7. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with

colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1997;112:1114-1120.

8. Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res*. 2005;65:5076-5083.

9. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. 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*. 2004;101:13306-13311.

10. Gazzeri S, Della Valle V, Chaussade L, Brambilla C, Larsen CJ, Brambilla E. The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1998;58:3926-3931.

11. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21:7435-7451.

12. Polager S, Ginsberg D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:738-748.

13. Mori S, Ito G, Usami N, et al. p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in

nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2004;100:1673-1682.

14. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:947-957.

15. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5764-5769.

16. Wendel HG, de Stanchina E, Cepero E, et al. Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7444-7449.

17. Bouali S, Chretien AS, Ramacci C, et al. P53 and PTEN expression contribute to the inhibition of EGFR downstream signaling pathway by cetuximab. *Cancer Gene Ther*. 2009;16:498-507.

18. Rho JK, Choi YJ, Ryoo BY, et al. p53 enhances gefitinib-induced growth inhibition and apoptosis by regulation of Fas in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2007;67:1163-1169.

19. Costa DB, Halmos B, Kumar A, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med*. 2007;4:1669-1679; discussion 1680.

- 20.** Cragg MS, Kuroda J, Puthalakath H, Huang DC, Strasser A. Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med.* 2007;4:1681-1689; discussion 1690.
- 21.** Gong Y, Somwar R, Politi K, et al. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med.* 2007;4:e294.
- 22.** Hemann MT, Lowe SW. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ.* 2006;13:1256-1259.
- 23.** Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:958-967.
- 24.** Kosaka T, Yatabe Y, Onozato R, Kuwano H, Mitsudomi T. Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2009;4:22-29.
- 25.** Jin G, Kim MJ, Jeon HS, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer.* 2009.

TABLES

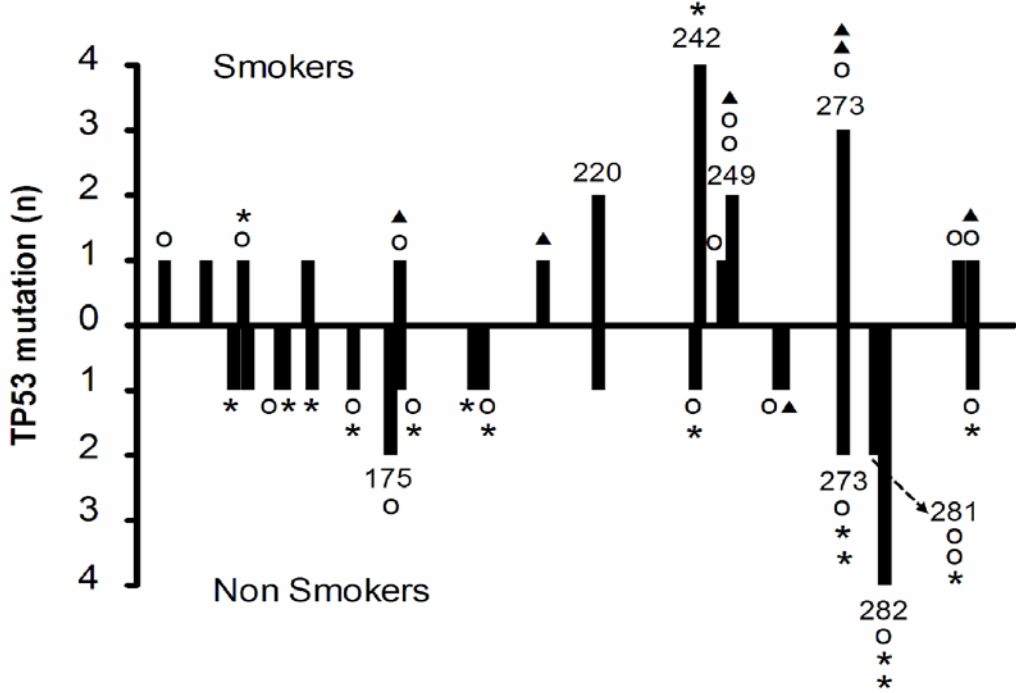
Table 1. Alterations of *EGFR*, *KRAS*, *TP53* genes and p14^{arf} expression in relation to clinicopathological features.

Total	All subjects n=96	EGFR mutation			KRAS mutation			TP53 mutation			p14 ^{arf} expression		
		with n=31	without n=59	OR[95% CI]	with n=15	without n=80	OR[95% CI]	with n=42	without n=51	OR[95% CI]	low n=52	normal n=39	OR[95% CI]
Age (Mean, years)	65.1	67.3	63.7		64.8	65		65.3	64.8		64.5	65.5	
Sex	n %												
Male	24 26.1	4	18		4	20		12	11		13	11	
Female	68 73.9	25	39	2.9[0.9-9.5]	10	57	0.9[0.2-3.1]	28	38	0.7[0.3-1.7]	38	26	1.2[0.5-3.2]
Smoking status													
Smoker	40 43.5	3	33		12	28		18	20		20	18	
Non smoker	52 56.5	26	24	11.9[3.2-44]	2	49	0.1[0.02-0.5]	22	29	0.8[0.4-2]	31	19	1.5[0.6-3.4]
Tumor stage													
I	62 66.7	20	38		13	48		26	34		32	26	
>I	31 33.3	9	20	0.8[0.3-2.2]	2	29	0.2[0.05-1.2]	15	15	1.3[0.5-3.1]	19	12	1.3[0.5-3.1]

Table 2. Association between alterations of *EGFR*, *KRAS*, *TP53* genes and p14^{arf} expression.

n (% per row)		EGFR			KRAS			TP53			p14 ^{arf} expr.		
		WT	Mut	OR[95%CI]	WT	Mut	OR[95%CI]	WT	Mut	OR[95%CI]	Normal	Low	OR[95%CI]
EGFR	WT	-	-	-	45(77.6)	13(22.4)	0	33(57.9)	24(42.1)		27(48.2)	29(51.8)	
	Mut	-	-	-	31(100)	0(0.0)		15(48.4)	16(51.6)	1.5[0.5,3.9]	12(40.0)	18(60.0)	1.4[0.5,3.8]
KRAS	WT	45(59.2)	31(40.8)		-	-	-	44(56.4)	34(43.6)		31(40.3)	46(59.7)	
	Mut	13(100)	0	0	-	-	-	7(50.0)	7(50.0)	1.3[0.4,4.8]	7(53.8)	6(46.2)	0.6[0.1,2.2]
TP53	WT	33(68.8)	15(31.2)		44(86.3)	7(13.7)		-	-	-	16(32.7)	33(67.3)	
	Mut	24(60.0)	16(40.0)	1.5[0.6,3.9]	34(82.9)	7(17.1)	1.3[0.4,4.8]	-	-	-	22(55.0)	18(45.0)	0.4[0.2,1]
p14 ^{arf} expr.	Normal	27(69.2)	12(30.8)		31(81.6)	7(18.4)		16(42.1)	22(57.9)		-	-	-
	Low	29(61.7)	18(38.3)	1.4[0.5,3.8]	46(88.5)	6(11.5)	0.6[0.1,2.2]	33(64.7)	18(35.3)	0.4[0.2,1]	-	-	-

Figure 1. Codon distribution of TP53 mutations and association with EGFR (star) and KRAS (triangle) mutations, and low p14^{arf} expression (circle) in adenocarcinomas from smokers and non-smokers.



La valeur pronostique du couple NTS-NTSR1 dans le CBNPC a été étudiée dans deux travaux indépendants : le premier est présenté dans le chapitre 2.1- article II et le deuxième chapitre 2.2-article III

2.1 Implication du couple NTS-NTSR1 dans le pronostic des adénocarcinomes pulmonaires non à petites cellules de stade I

Bien que les données suggérant l'implication de NTS dans divers cancers soient nombreuses, celles concernant le CBNPC sont très limitées. Une étude pilote descriptive explorant les profils d'expression du couple NTS/NTSR1 au sein d'une population homogène sélectionnée opérée de CBNPC était donc primordiale pour valider la possible dérégulation du système neurotensinergique dans le cancer bronchique et évaluer l'impact potentiel de cette dérégulation sur la survie des patients. Dans ce but, une première étude a été menée par l'équipe avec la collaboration du service de chirurgie thoracique de l'Hôtel Dieu et le Pr Alifano. Une population homogène a été sélectionnée afin de limiter l'impact d'autres paramètres sur le pronostic des patients. La population était composée de patients opérés d'un adénocarcinome stade I (Ia, Ib) et traités seulement par lobectomie et curage ganglionnaire (sans traitement néoadjuvant ni adjuvant). Nous avons choisi d'étudier l'adénocarcinome bronchique pour la prévalence prédominante de ce sous-type histologique dans le CBNPC.

Une analyse, par immunohistochimie, du statut d'expression de la NTS et du récepteur NTSR1, sur une série multicentrique de 139 patients opérés dans un but curatif d'un adénocarcinome bronchique de stade I, a montré que la NTS et le NTSR1 ou les deux s'expriment respectivement dans 60.4%, 59.7 % et 38.8% des cas. Par contre dans les pièces de contrôles de parenchyme pulmonaire issues de pneumothorax idiopathiques, aucune expression de la NTS ou du NTSR1 n'a été mise en évidence. L'analyse univariée et multivariée a montré que l'âge supérieur à 65 ans et l'expression de NTSR1 était associé à un mauvais pronostic de survie globale et de maladie sans progression. Par contre, l'expression de la NTS n'a aucun impact sur la survie globale. Ces résultats ont été validés par l'analyse du transcriptome d'une deuxième série de 74 patients opérés d'un adénocarcinome ou d'un carcinome à grandes cellules. Parmi les 47 000 transcrits analysés, le récepteur

NTSR1 était parmi les 50 premiers gènes associés à une dégradation de la survie sans récurrence des patients.

Parallèlement, le rôle du couple NTS-NTSR1 sur la croissance tumorale a été étudié dans deux modèles cellulaires du cancer bronchique présentant une régulation constitutive à la NTS : la lignée LNM-R dérivée de la lignée hautement agressive LNM-35 et les A549. Dans la lignée A549, l'extinction de l'expression du récepteur NTSR1 dans les cellules A549 par des ARN interférents réduit de 40 % la taille des tumeurs générées par l'injection de ces cellules chez les souris. De même, la déplétion de la NTS ou du récepteur NTSR1 dans les cellules LNM-35 entraîne une diminution de 35 % et de 60 % respectivement du volume tumoral. Le mélange à pourcentage égale de ces deux clones conduit à des tumeurs du volume similaire à la lignée parentale suggérant que la signalisation neurotensinergique autocrine ou paracrine stimule la croissance tumorale. De même, dans les clones silencieux pour la NTS ou le NTSR1, le taux de métastases ganglionnaires massives était de 9 % et 24 % respectivement comparé à 66 % pour la lignée LNM-R.

Donc, Le système de la NTS – NTSR1 peut être un candidat pour une utilisation future comme marqueur pronostique pour identifier les patients de mauvais pronostic à l'intérieur du stade I. En plus, Le NTSR1 peut jouer ainsi un rôle aggravant sur la croissance tumorale.

Article II

Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer

Imaging, Diagnosis, Prognosis

Neurotensin Receptor 1 Determines the Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer

Marco Alifano¹, Frédérique Souazé³, Sandra Dupouy², Sophie Camilleri-Broët⁴, Mohamad Younes², Sadi-Menad Ahmed-Zaid², Takashi Takahashi⁵, Alessandra Cancellieri⁶, Stefania Damiani⁷, Maurizio Boaron⁷, Philippe Broët⁴, Lance D. Miller⁸, Christian Gespach², Jean François Regnard¹, and Patricia Forgez²

Abstract

Purpose: This study aimed to investigate the role of the neurotensin/neurotensin receptor 1 (NTSR1) complex in non-small cell lung cancer (NSCLC) progression.

Experimental Design: The expression of neurotensin and NTSR1 was studied by transcriptome analysis and immunohistochemistry in two series of 74 and 139 consecutive patients with pathologic stage I NSCLC adenocarcinoma. The findings were correlated with clinic-pathologic features. Experimental tumors were generated from the malignant human lung carcinoma cell line A459, and a subclone of LNM35, LNM-R. The role of the neurotensin signaling system on tumor growth and metastasis was investigated by small hairpin RNA-mediated silencing of NTSR1 and neurotensin.

Results: Transcriptome analysis carried out in a series of 74 patients showed that the positive regulation of *NTSR1* put it within the top 50 genes related with relapse-free survival. Immunohistochemistry revealed neurotensin- and NTSR1-positive staining in 60.4% and 59.7% of lung adenocarcinomas, respectively. At univariate analysis, NTSR1 expression was strongly associated with worse 5-year overall survival rate ($P = 0.0081$) and relapse-free survival ($P = 0.0024$). Multivariate analysis showed that patients over 65 years of age ($P = 0.0018$) and NTSR1 expression ($P = 0.0034$) were independent negative prognostic factors. Experimental tumor xenografts generated by neurotensin- and NTSR1-silenced human lung cancer cells revealed that neurotensin enhanced primary tumor growth and production of massive nodal metastasis via autocrine and paracrine regulation loops.

Conclusion: NTSR1 expression was identified as a potential new prognostic biomarker for surgically resected stage I lung adenocarcinomas, as NTSR1 activation was shown to participate in lung cancer progression. *Clin Cancer Res*; 16(17); 4401–10. ©2010 AACR.

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in the United States and remains the most common malignancy in the world (1–3). Two main histologic categories are recognized: small cell lung cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC). NSCLC is usually further divided into three main histologic types: large cell lung carcinoma,

squamous cell carcinoma, and adenocarcinoma. This last represents nowadays the most frequent histologic type in western countries. NSCLC is believed to arise from a multistep process, with each step associated with genetic and epigenetic alterations, and correlated with tumor aggressiveness. The factors used to define the stage of the disease, to choose the optimal management, and to predict outcome are the size of the primary tumor, the invasion of locoregional nodes, and the presence of distant metastases (4). Nevertheless, a vast disparity in patient outcome is seen within the same stage. Globally, patients with operable lung cancers (stage I-IIIa) have an overall 5-year survival rate of around 40%. The survival rate among those with stage I disease is only 60% to 70%; in a quarter of these patients relapse is local, whereas for the others the disease shows metastatic spread (4–6). The current challenge today is to identify factors that would predict tumor relapse despite curative treatment. In a series of stage IB lung adenocarcinomas, we carried out a tandem DNA copy number and gene expression profile using high-resolution microarrays to establish a robust predictor of clinical outcome

Authors' Affiliations: ¹Service de chirurgie thoracique, Hôtel-Dieu, and ²INSERM-UPMC U 938, Paris, France; ³EA-4273 Biometadys, Faculté de Médecine, Nantes, France; ⁴JE2492, Université Paris-Sud, Villejuif, France; ⁵Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya, Japan; ⁶Pathology Department and ⁷Thoracic Surgery Department, Maggiore-Bellaria Hospital, Bologna, Italy; and ⁸Wake Forest University School of Medicine, Medical Center, North Carolina

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

M. Alifano, F. Souazé, and S. Dupouy contributed equally to this work.

Corresponding Author: Patricia Forgez, INSERM, Pav Raoul Kourilsky, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Fbg Saint-Antoine, Paris, 75012 France. Phone: 33-1-49-28-46-74; Fax: 33-1-49-28-46-38; E-mail: patricia.forgez@inserm.fr.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0659

©2010 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Non-small cell lung cancer is a heterogeneous condition with significant variability in prognosis and in the individual response to treatments. Therefore, identification of patients with high risk of relapse after surgery will enable tailored management in terms of adjuvant treatments and stricter follow-up. We report that the neurotensin/neurotensin receptor 1 (NTSR1) complex is specifically expressed in lung adenocarcinoma. NTSR1 expression was identified as an independent predictive marker of unfavorable outcome in stage I lung adenocarcinoma treated by surgery alone. Experimental data suggest that the neurotensin/NTSR1 complex is an enhancer of lung tumor progression. The neurotensin system is therefore suitable for the development of new therapeutic targets, new applications of already available treatments, and the development of a new diagnostic biomarker ensuing better predictive parameters.

at the early stages of NSCLC (7). Among the first 50 genes upregulated and associated with disease-free survival was the neurotensin receptor 1 (NTSR1).

Neurotensin and its cognate receptor (NTSR1) are neuropeptide-receptor complexes frequently deregulated during the neoplastic process. Neurotensin is a 13-amino-acid peptide previously recognized for its distribution along the gastrointestinal tract (8). Typical physiologic functions associated with neurotensin include the stimulation of pancreatic and biliary secretions, inhibition of small bowel and gastric motility, and facilitation of fatty acids translocation (9, 10). The peripheral functions of neurotensin are mediated through its interaction with NTSR1, a high affinity receptor coupled to a Gq/G11 protein. When neurotensin binds to NTSR1, phosphatidylinositols are hydrolyzed leading to Ca²⁺ mobilization and PKC activation.

NTSR1 activation leads to cell proliferation, survival, mobility, and invasiveness in specific cancer cell types via signal transduction through PKC, extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, RhoGTPases, NF- κ B, or focal adhesion kinase activation. (11–13). The disruption of the neurotensinergic pathway through a specific antagonist, in experimental tumors from colon, breast, and small cell lung cancer cells, caused a strong reduction in tumor growth (14–16). We had previously shown the presence of a chronic self-activation loop between neurotensin and NTSR1, as one mechanism responsible for the constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase mitogenic signaling pathways along with sustained target gene activation (17–20). More recently, NTSR1 expression level was associated with poor prognosis in patients with ductal breast cancer, and similar results have

been found in head and neck squamous cell carcinomas (21, 22).

In this study, we examined the expression of both neurotensin and NTSR1 in two series of consecutive patients undergoing pulmonary lobectomy and nodal dissection for pathologic stage I lung adenocarcinoma by transcriptome analysis and immunohistochemistry, respectively. The expression of NTSR1 was clearly shown to negatively affect the outcome. Experimental tumors were also developed to study the role of the neurotensin system on tumor growth. With this model, we show the aggravating role of the neurotensinergic system in tumor progression.

Materials and Methods

Study from a genome-wide gene expression

We report the results obtained for NTSR1 from a previous large-scale gene expression analysis carried out on 74 homogeneous cases of stage pT₂N₀ lung adenocarcinomas/large cell carcinomas treated by surgery (7). In this study RNA samples were hybridized to the Human U133 Plus 2.0 oligonucleotide arrays (Affymetrix), and 37,771 probes met the quality control criteria and were considered for the analysis (GEO Series accession number GSE10445). We selected transcripts having a high likelihood of being associated with relapse-free survival (RFS) by considering the false discovery rate error as described in Broet et al. (7).

Patients and tissue specimens for neurotensin and NTSR1 immunohistochemistry

Expression of NTSR1 and neurotensin was done in a multicenter study. The clinical files of 139 patients (Table 1) treated by lobectomy and full nodal dissection for pathologic stage I (pT₁N₀, n = 51; pT₂N₀, n = 88) primary lung adenocarcinomas were retrospectively reviewed. They were operated on in three teaching hospitals in Paris, France and Bologna, Italy between January 2001 and March 2003. All patients had macroscopically and microscopically complete resections. None of the patients had preoperative or postoperative chemotherapy or radiotherapy. For all cases histologic slides of primary tumors were obtained by paraffin wax embedded tissues. Standard H&E staining was used to ensure the tumoral character of the specimen, and adjacent sections were obtained for immunohistochemistry. For 23 of 71 patients operated on at the Hôtel-Dieu Hospital, frozen samples of resected tumors were used to detect RNA for neurotensin and NTSR1, after verification of the tumoral character of the samples by frozen sections. As normal tissue, we assessed the lung parenchyma of 26 patients with idiopathic pneumothorax treated by apical resection.

Ethics

The study was carried out according to the Declaration of Helsinki principles and in agreement with the French and Italian laws on biomedical research. The following studies were conducted on tissues obtained from surgical specimens between 2001 and 2003. The experiments reported here were carried out under the current ethical

regulations as defined by the Huriet-Sérusclat Act of December 20, 1988. Under this act, institutional review board approval was not required. Accordingly, patients or next of kin (in case of deceased patients) were specifically asked for verbal informed consent only.

Statistical analysis

Overall survival rates were estimated using the Kaplan-Meier method, and survival curves were compared using the Log-rank test. RFS time was calculated from the date of the patients' surgery until disease-related death, disease recurrence (either local or distant), or last follow-up examination. All available variables potentially influencing survival, namely, age, sex, smoking habit (current and former versus never smoker), presence of vascular or lymphatic or vascular emboli, pT category, and NTSR1 expression, were considered for a multivariate analysis using the Cox proportional hazards model.

For the transcriptome analysis, the prognostic impact of NTSR1 gene expression changes on RFS was evaluated by calculating the score test statistic derived from the semi-parametric Cox proportional hazards model. The analyses were done with the SPlus software package.

Immunohistochemistry

Immunostaining of neurotensin and NTSR1 was carried out on 4- μ m-thick deparaffinized sections, using the avidin-biotin-peroxidase complex method. Slides were incubated with 10% normal rabbit serum at room temperature for 30 minutes. Neurotensin immunoreactivity was conducted using rabbit antibody directed against neurotensin (1:500; NA1230, Biomol GmbH) for 2 hours. NTSR1 immunoreactivity was detected using a goat polyclonal antibody directed against the human carboxy terminus of the receptor (1:100; C-20, Santa Cruz Biotechnology). All slides were rinsed three times with TBS; sections were incubated with biotinylated secondary antibody (1:200; Vector laboratories, Inc). The antigen-antibody complex was revealed with avidin-biotin-peroxidase complex, according to the manufacturer's instructions for the Vectastain ABC Kit (Vector laboratories, Inc.). Staining was done with diamino-benzidine tetrahydrochlorid. All slides were counterstained with hematoxylin. All specimens were scored by an anatomopathologist (SCB).

Culture procedures

The human lung adenocarcinoma cell lines LNM35 and A459 were grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen

Table 1. Clinical characteristics of the multicenter series of patients whose tumors were studied by immunohistochemistry for neurotensin and NTSR1 expression

Lung adenocarcinomas, <i>n</i> = 139	
Age (years)	64.0 \pm 10.7
Women	34/139 (24.5%)
Tobacco history	
Current smoker	71
Former smoker (stop >2 months)	49
Never smoker	19
pT ₁ disease	51/139 (36.7%)
pT ₂ disease	88/139 (63.3%)
Tumor size (cm), mean \pm SD	3.1 \pm 1.94
N ₀	139/139
Intratumoral or peritumoral neoplastic vascular emboli	34/139 (24.5%)
Intratumoral or peritumoral neoplastic lymphatic emboli	21/139 (15.1%)
NTSR1-positive tumors, <i>n</i> (% of patients)	83/139 (59.7%)
Neurotensin-positive tumors, <i>n</i> (% of patients)	84/139 (60.4%)
NTSR1- and neurotensin-positive tumors, <i>n</i> (% of patients)	54/139 (38.8%)
Lost at follow-up	1/139 (0.7%)
Follow-up in months, mean \pm SD	44.2 \pm 20.9
Deaths during follow-up, <i>n</i> (% of patients)	49/139 (31%)
Perioperative therapies	
Radiotherapy	0/139
Chemotherapy	0/139
Idiopathic pneumothorax, <i>n</i> = 26	
NTSR1-positive lung parenchyma	0/26
Neurotensin-positive lung parenchyma	0/26
NTSR1- and neurotensin-positive lung parenchyma	0/26

SARL) supplemented with 10% FCS and 2 mmol/L glutamine (23). The LNM35 cell line was subcloned by limiting dilution; clones containing exclusively rounded cells were named LNM-R.

NTSR1 and neurotensin siRNA construction and transfection. Small hairpin RNAs for human NTSR1 (AAGAAGTTCAT-CAGCGCCATC) and neurotensin (5'-GCAATGTTGACAA-TATACC-3') were prepared using psilencer 3.1-H1 according to the manufacturer's instruction. LNM-R and A549 cells were transfected using the Lipofectamine reagent (20).

Experimental tumors

Xenografts were initiated in nude mice by s.c. injection of 10^6 cells of LNM-R and derivative cell clones, or 10^7 cells of A549 and A549 NTSR1-silenced clones. For tumors generated from a cell mixture, 10^6 cells from each clone were plated together 72 hours prior to injection. Four to six series were done; each series included 5 to 8 mice. The tumor volume was calculated with the ellipsoid formula.

RNA extraction and reverse transcriptase-PCR. The protocols for total RNA extraction, reverse-transcription reaction, and PCR are documented in detail in Souazé et al. (24). Reverse-transcription reaction was done on 2 µg of total RNA using a specific NTSR1 primer (5'-GCTGACGTAGAAGAG-3') or 50 pmol of oligo dT and oligo dN. The PCR amplification was done on a 1:5 v/v of the reverse-transcription reaction using 25 pmol of each primer 5'-CGTGGAGCTGTACAACCTCA-3' and 5'-CAGCCAGCAGACCACAAAGG-3' for NTSR1, and 5'-CAGCTCCTGGAGTCTGTGCT-3' and 5'-GTTGAAAAGCCCTGCTGTGACAGA-3' for neurotensin, 5'-TCAAATGAGATTGTGAAAA-3 and AS 5-AG-ATCATCTCTGCCTGAGTAT-3' for cyclooxygenase-2, 5'-CGGAGTCAACGGATTGCTCG-3' and 5'-TTCACCACATGGAGAAGGCT-3' for GAPDH, and 1 unit of Taq polymerase.

Neurotensin RIA

One million cells were grown in 60 mm² Petri dishes. After 24 hours media were removed and serum-free media were added to the cells for 24, 48, or 72 hours. Media were collected; centrifuged 5 minutes at 2,000 g, and 5,000 UIK/mL of trasytol was added to the supernatant. RIA was done on 1 mL of lyophilized media according to the procedure developed in Scarceriaux et al. (25).

Results

Genome-wide gene expression study in a population of patients with lung adenocarcinoma/large cell carcinomas

In an attempt to identify a clinical outcome predictor for patients with NSCLC, patterns of genomic alteration and gene expression profiles were analyzed and integrated concerning 74 homogeneous cases of stage Ib pT₂N₀ lung adenocarcinomas/large cell carcinomas (7). In this study, NTSR1 (probe set: 207360_s_at) was the 48th among the 58 selected probes related with RFS. NTSR1 was positively regulated. To correlate the NTSR1 transcription level and

the RFS over time, a log rank test using the third quartile as the cutoff point was applied to determine high-risk subgroups (Fig. 1). High gene expression for NTSR1 was associated with an increased risk of relapse ($P = 0.0005$).

Protein expression of neurotensin and NTSR1, and its impact on the survival of patients with primary lung adenocarcinoma

A neurotensin and NTSR1 expression study was done on a multicenter series of 139 consecutive patients undergoing pulmonary lobectomy and nodal dissection for pathologic stage I lung adenocarcinomas. The patient clinical characteristics are shown in Table 1. NTSR1 staining of cancer cells from patients with primary lung adenocarcinoma was granular, restricted to the cytoplasm, and rarely localized at the cell surface (Fig. 2A, left). Neurotensin labeling was often very intense and always detected throughout the cytosol (Fig. 2A, right). Expression of neurotensin, NTSR1, or both was found in 60.4%, 59.7%, and 38.8% of the cases, respectively. Similar results were found when neurotensin and NTSR1 transcripts were studied (23 patients): 65% of patients expressed neurotensin (Fig. 2B, red dots), 69% expressed NTSR1 (Fig. 2B, green dots), and 43% expressed both markers. No expression of either neurotensin or NTSR1 was observed in the lung parenchyma of 26 patients with idiopathic pneumothorax treated by apical resection (Fig. 2A), suggesting that normal lung tissue does not express neurotensin or NTSR1.

The impact of neurotensin/NTSR1 expression on outcome was assessed on 138 of 139 patients, with a patient lost at follow-up. The overall 5-year survival was 63.5% [95% confidence interval (95% CI), 54.4-71.7%]. With respect to those clinical and pathologic parameters influencing

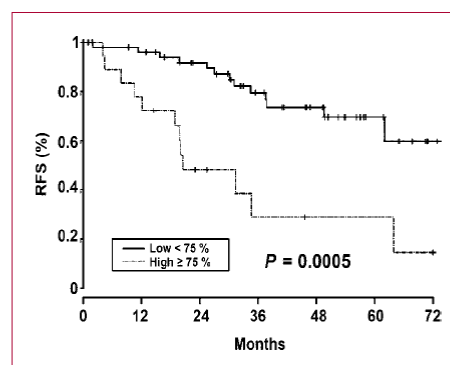
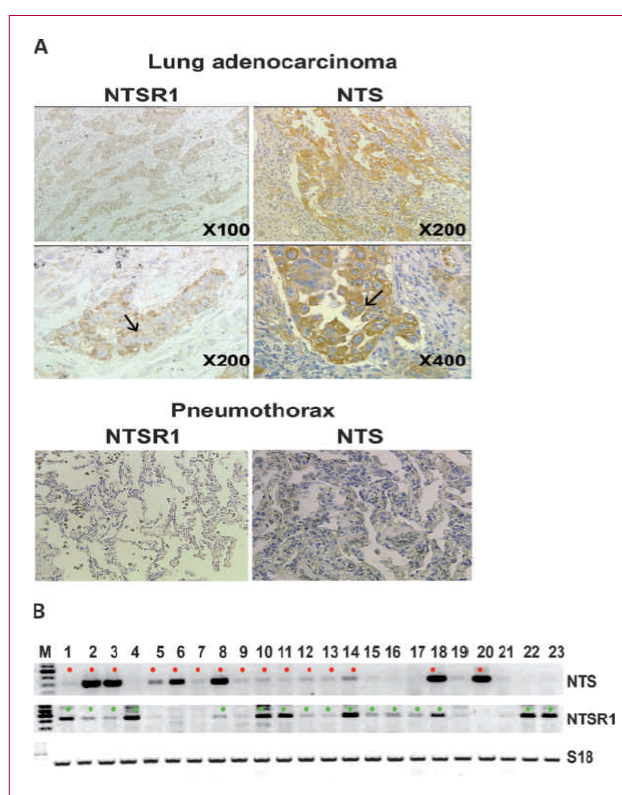


Fig. 1. Relapse-free survival of a study resulting from transcriptome analysis. Large-scale gene expression analysis done on 74 homogeneous cases of stage pT₂N₀ lung adenocarcinomas/large cell carcinomas treated by surgery. Depicted according to the procedure described by Broet et al. (7), the transcriptomic signature of selected positive scores indicates that overexpression increases relapse risk. Shown is the Kaplan-Meier plot according to NTSR1 mRNA levels over (broken line) or below (solid line) the 75th percentile.

Fig. 2. Neurotensin (NTS) and NTSR1 expression in patients with primary lung adenocarcinomas. A, example of immunohistochemistry for NTSR1 (left) and NTS (right). Top, positive labeling of patients with primary lung adenocarcinomas; bottom, negative labeling of idiopathic pneumothorax at $\times 200$ magnification. B, NTS and NTSR1 transcript analysis on RNA from 23 patients with primary lung adenocarcinomas stage I. M, 100 bp ladder. Patients with red dot or green dot were considered as positive for NTS or NTSR1, respectively.



patient outcome, no difference was observed in survival rates using univariate analysis according to sex, pT parameter, presence of vascular or lymphatic tumoral emboli, or smoking habit (current and former versus never). Five-year survival rates were 72.0% and 57.7% in patients with T₁N₀ and T₂N₀ tumors, respectively ($P = 0.13$). Patients of age 65 years or older had a lower 5-year survival ($P = 0.0028$) as compared with younger patients, at 49.3% (95% CI, 36.2-62.4%) versus 75.9% (95% CI, 64.2-84.7%), respectively. NTSR1 expression, scored as positive (positive staining involving $\geq 10\%$ of tumor cells) or negative (positive staining of $< 10\%$ of tumor cells) was associated with a significantly worse 5-year overall survival [54.6% (95% CI, 42.82-65.86%) versus 76.1% (95% CI, 62.4-85.9%); $P = 0.0081$; Fig. 3A]. The degree of NTSR1 expression also significantly influenced outcome ($P = 0.015$), as patients with none (positive staining of $< 10\%$ of tumor cells), medium (positive staining of $\geq 10\%$ and $< 50\%$ of tumor cells), and strong (positive staining involving $\geq 50\%$ of tumor cells) NTSR1 expression showed 5-year overall survival rates of

76.1% (95% CI, 62.2-86.0%), 56.4% (95% CI, 43.8-68.1%), and 40.5% (95% CI, 15.3-72%), respectively (Fig. 3B). Two independent predictors of worse overall survival were found using multivariate analysis: age ≥ 65 years ($P = 0.0018$) and expression of NTSR1 ($P = 0.0034$).

NTSR1 expression was also associated with a significantly worse 5-year RFS, at 56.5% (95% CI, 45.5-66.8%) versus 79.3% (95% CI, 65.6-88.5%) in patients with tumors expressing or not expressing NTSR1, respectively ($P = 0.0024$; Fig. 3C). The degree of NTSR1 expression also significantly ($P = 0.0076$) influenced outcome, as patients with none, medium, and strong NTSR1 expression showed 5-year RFS of 79.3% (95% CI, 65.6-88.5%), 57.3% (95% CI, 45.6-68.3%), and 50.0% (95% CI, 23.6-76.3%), respectively (Fig. 3D). Two independent predictors of worse RFS were found using multivariate analysis: expression of NTSR1 ($P = 0.00066$) and age ≥ 65 years ($P = 0.00142$). In contrast, neurotensin expression in human tumor did influence neither overall survival nor RFS (Supplementary Fig. S1).

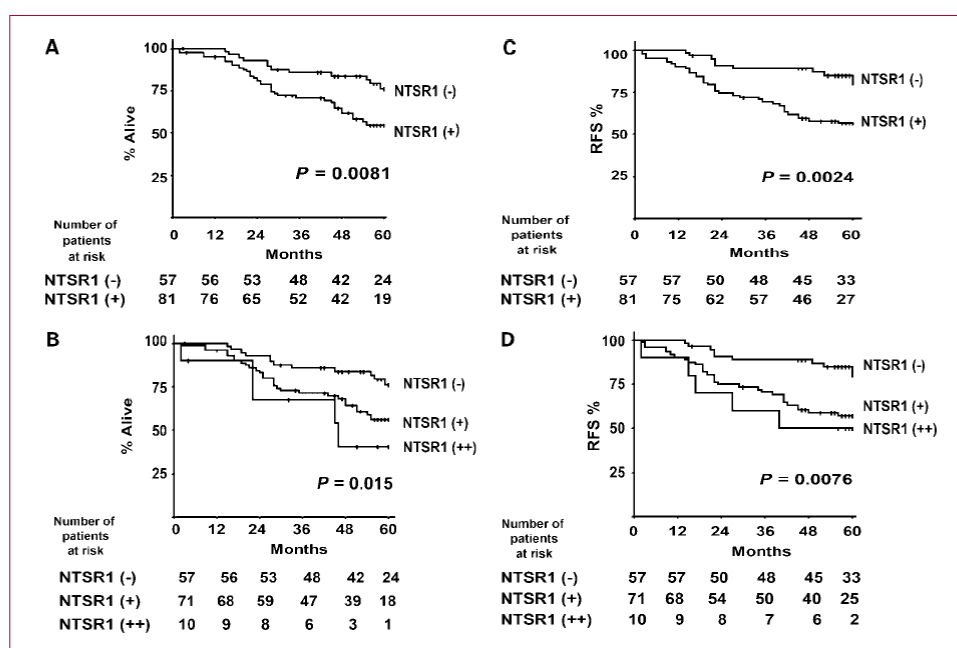


Fig. 3. Overall survival and RFS of patients with stage I adenocarcinoma ($n = 138$) according to NTSR1 expression. A and C, qualitative assessment by immunohistochemistry of NTSR1 expression: (+), positive; (-), negative. B and D, semiquantitative immunohistochemistry: (++), strong expression; (+), medium expression; (-), no expression. The number of patients at risk for each time period is shown below each curve.

Influence of the neurotensin/NTSR1 signaling system on the tumorigenic potential of human lung cancer cells

To evaluate the role of the neurotensin/NTSR1 complex in tumor growth and progression, we used mice xenografted with cancer cells expressing or not expressing the neurotensin/NTSR1 system. We first established xenografts from the adenocarcinoma cell line A549. As shown in Fig. 4A (inset), this cell line expressed both neurotensin and NTSR1. The silencing of NTSR1 induced a 40% reduction in the growth of tumor xenografts in nude mice compared with wild-type cells (Fig. 4A).

Additional evidence of the impact of the neurotensin system on tumor growth derived from LNM-R, a subpopulation of the highly metastatic lung carcinoma cell line LNM35 (23). LNM-R cells express neurotensin and NTSR1 as shown by transcript analysis (Fig. 4B, inset). Experimental lung tumors were generated using LNM-R cells and the silenced derivative clones R-SI NTS and R-SI NTSR1. In the done R-SI NTS, the transcript encoding neurotensin was completely depleted (Fig. 4B, inset). This result was confirmed by the absence of neurotensin estimated by RIA on the corresponding culture media. In contrast, the

culture medium of LNM-R cells contained 76.4 ± 10.3 , 153.2 ± 25.3 , and 624.3 ± 81.8 fmol/mL of neurotensin corresponding to 14, 48, and 72 hours of culture, respectively. In the done R-SI NTSR1, the transcript for NTSR1 was depleted, whereas neurotensin transcript levels remained similar to those of LNM-R cells. An example is shown in the inset of Fig. 4B. The level of neurotensin released in the culture media was lower than for LNM-R cells at 22.25 ± 2.4 , 53.4 ± 2.7 , and 140.2 ± 9 fmol/mL corresponding to 14, 48, and 72 hours of culture, respectively.

Using these models, we examined the effect of neurotensin and NTSR1 depletion on the growth of LNM-R xenografts and their neurotensin- and NTSR1-silenced counterparts. Depletion of neurotensin and NTSR1 was accompanied respectively by 35% and 60% decrease of the tumor volume compared with the LNM-R tumor xenografts at day 28 (Fig. 4B). To show the participation of neurotensin in tumor growth enhancement, a mixture of the two silenced clones was seeded at equal density (50/50) and cultured for 3 days, prior to injection into mice. The final tumor volume and weight were similar to those of the parental LNM-R tumor xenografts. Together these results strengthen the tumorigenic consequence of neurotensin

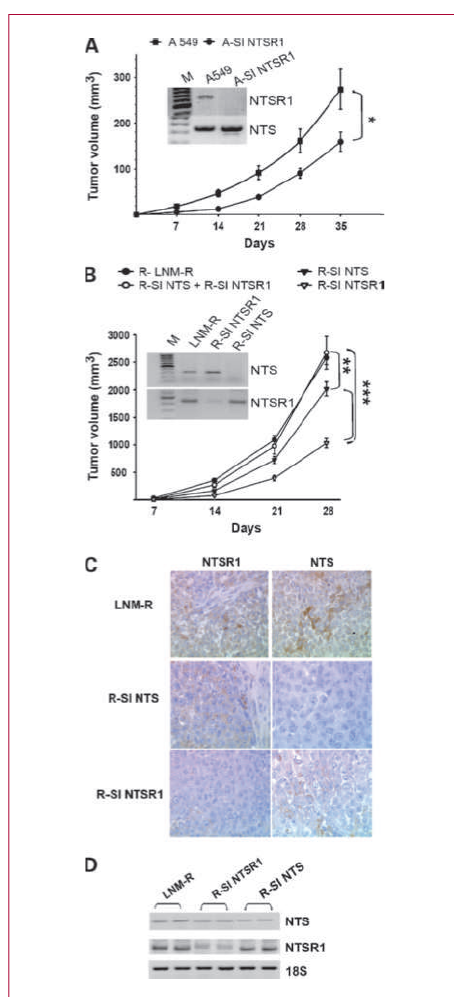


Fig. 4. Tumor growth generated by the human lung adenocarcinoma cell lines. A, A549 cells, or its NTSR1-silenced clone A-SI NTSR1 were injected into 15 mice for each cell line. Inset, NTS and NTSR1 transcript analysis on A549 cells, and A-SI NTSR1 RNA. *, significant differences at $P < 0.05$, using unpaired t test. B, LNM-R, R-SI NTS, R-SI NTSR1, or a 50/50 mixture of R-SI NTS and R-SI NTSR1 cells were injected into 36, 21, 21, and 19 mice, respectively. The ellipsoid formula was used to calculate the volume. Inset, NTS and NTSR1 transcripts analysis on total RNA from LNM-R, R-SI NTSR1, and R-SI NTS. C, typical immunohistochemistry for NTSR1 (left) or NTS (right) for tumors generated from R-SI NTS (top) or R-SI NTSR1 cells (bottom). D, NTS and NTSR1 transcript analysis on tumors from LNM-R, R-SI NTSR1, and R-SI NTS cells. Analysis was done at day 28. Examples of two different tumors are shown. ***, significant differences at $P < 0.001$; **, at $P < 0.01$ using ANOVA and Student-Neuman-Keuls test.

autocrine or paracrine regulation (Fig. 4B). A similar pattern was observed in tumor weight with 4 ± 0.2 , 2.8 ± 0.18 , 1.54 ± 0.17 , and 3.4 ± 0.16 g for LNM-R, R-SI NTS, R-SI NTSR1, and the 50/50 R-SI NTS/R-SI NTSR1 cellular mixture, respectively. Neurotensin and NTSR1 immunohistochemistry and transcript analysis on tumor xenografts shows that neurotensin and NTSR1 silencing constructs were still efficient at 28 days postinjection (Fig. 4C and D).

Influence of the neurotensin/NTSR1 complex on nodal metastasis

The ipsilateral and contralateral regional lymph nodes from mice bearing either LNM-R or the silenced clones for neurotensin and NTSR1 were dissected. The weight of the lymph nodes was 2.5 times smaller when the tumor was not expressing neurotensin or NTSR1 (Fig. 5A). Metastases were scored by an anatomopathologist as negative, micro (metastases < 1 mm), and massive (Fig. 5B). After 28 days, mice bearing tumor R-SI NTS and R-SI NTSR1 xenografts had a smaller percentage of massively invaded lymph nodes (9% and 24%, respectively), as compared with 66% for the LNM-R xenografts ($P < 0.0001$ and $P = 0.0047$, respectively, Fisher's exact test; Fig. 5C). The respective distribution of negative, micro, and massive lymph node metastasis is detailed under the graph in Fig. 5C. The negative and the micro metastasis were combined to form a single set because it covers the global effect of neurotensin/NTSR1 on metastatic process.

Discussion

In this study we found that NTSR1 and neurotensin were not detected in normal pulmonary tissue, but were strongly and frequently expressed in stage I lung adenocarcinomas. Similar results have been seen in colon and breast tissues where NTSR1 is absent in normal epithelial cells but overexpressed in tumors (20, 26). As previously described, one of the possible molecular mechanisms responsible for NTSR1 upregulation is the *Wnt/APC* signaling pathway activation, because of a functional Tcf element within the NTSR1 promoter. In normal human breast epithelial cells, the activation of the *NTSR1* gene was observed by agents causing β -catenin cytosolic accumulation (15). A set of TCF4 regulated genes was recently shown to be associated with metastasis-free survival in patients with lung adenocarcinoma (27). In this study, the transcription factors HOXB9 and LEF1 were identified as mediators of chemotactic invasion. Accordingly, a hyperactive *Wnt/TCF* pathway activity in lung adenocarcinomas is associated with a high rate of relapse at distant sites. As part of *Wnt/Tcf* activated genes, *NTSR1* should participate in disease progression and correlation with the worst prognosis.

The availability of useful prognostic factors in NSCLC is made difficult because of the extreme heterogeneity in patient populations in terms of histologic typing, disease staging, type of surgical treatment, and the association with neoadjuvant or adjuvant therapy. For these reasons, we focused our study on patients with stage I primary lung

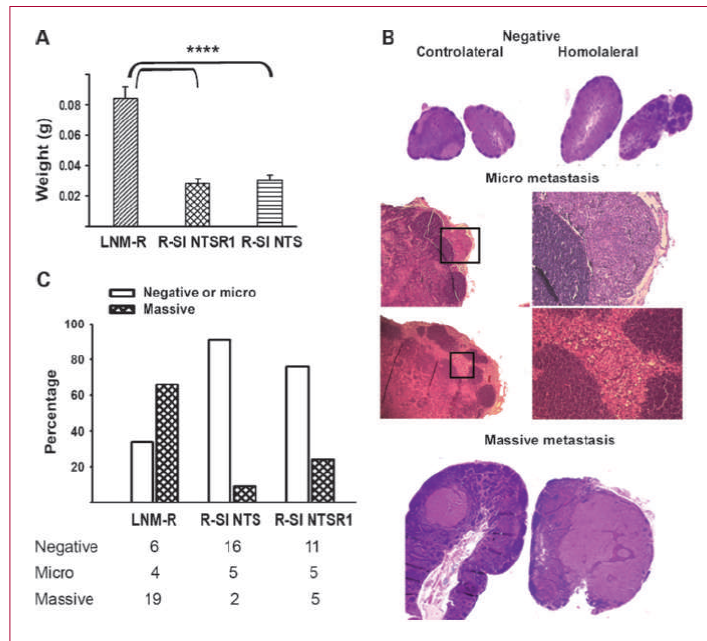


Fig. 5. Lymph node metastasis generated by lung cancer cell lines LNM-R and their subclonal counterparts silenced for NTS and NTSR1. **A**, ipsilateral lymph node weight at 28 days from mice xenografted with LNM-R, R-SI NTSR1, and R-SI NTS cells. ***, significant differences at $P < 0.001$ using ANOVA and Student-Neuman-Keuls test. **B**, standard H&E staining done on paraffin section of lymph node embedded tissue. Example is shown for negative (top); micro metastasis, less than 1 mm (middle); and massive metastasis (bottom) of homolateral lymph node. **C**, for each group, the percentage of ipsilateral lymph nodes with no and micro metastasis or with massive metastasis, from mice xenografted with LNM-R, R-SI NTSR1, and R-SI NTS cells, at 29, 21, and 23 mice, respectively.

adenocarcinoma, treated by surgery only (pulmonary lobectomy and full nodal dissection). This ensured the reliability of the staging and the absence of interfering treatments.

In our clinical series from 138 homogeneous patients with stage I disease, NTSR1 expression was correlated with poor outcome. This result was confirmed by multivariate analysis which showed that among the available clinical and pathologic factors, only the expression of NTSR1 and patient age were independent predictors of worse prognosis. These findings in human lung cancer suggest that NTSR1 is a potential marker and/or a pejorative mediator of lung cancer progression associated with poor prognosis.

In contrast, no correlation was found between neurotensin expression and patient survival. Neurotensin expression in the lung tumor is certainly part of the neoplastic process but is not a discriminative factor of disease progression. The molecular mechanism inducing neurotensin expression in lung neoplasm remains unclear. As it was shown that neurotensin expression can be upregulated by inflammatory process and mediates proinflammatory cytokine release, such as interleukin-6 and interleukin-8 (28, 29), we propose that neurotensin expression is induced and implicated in the pathogenesis of lung cancer due to chronic inflammation and neoplasia in the respiratory epithelium generated by tobacco carcinogens and

metabolites. The evaluation of neurotensin expression in premalignant lesions will settle this hypothesis.

To delineate the biological significance of the neurotensin/NTSR1 system in the progression of human lung tumors, we studied the performance of the neurotensin/NTSR1 complex on tumor growth and progression. Removing neurotensin sensitivity and NTSR1 signaling resulted in a strong reduction of lung cancer cell proliferation and tumor growth in the two experimental models. The silencing of neurotensin was less efficient than NTSR1 silencing in negating the growth of the LNM-R xenografts, suggesting that circulating neurotensin in mice may counteract the depletion of neurotensin induced by RNA interference in cancer cells. Substantiating this argument, we noted that when R-SI NTSR1 cells were injected s.c. into the right flank and R-SI NTS cells in the left flank of the mice, the latter tumor reach the size and weight of the tumors initiated by the corresponding LNM-R parental cells; in contrast, R-SI NTSR1 tumors remained at the same smaller size that was observed in mice bearing only R-SI NTSR1 xenografts (unpublished data). It is likely that neurotensin systemic regulation is implicated in the growth of the tumor xenografts.

Our data support the position that LNM-R cancer cells are driven by an autocrine neurotensin-NTSR1 loop to incur invasive tumor growth and metastasis. LNM-R is a subpopulation of LNM-35 cells selected for their metastatic

properties (23). Within the time period of the experiments, 70% of mice bearing LNM-R xenografts exhibited massive lymph node metastasis. The invalidation of the neurotensin/NTSR1 system in LNM-R cells was associated with less aggressive primary tumor xenografts, and it restricted the metastatic process. Once the cells acquire metastatic potential, the presence of neurotensin in the tumor microenvironment potentiates the emergence of metastasis. When replaced in the context of stage I patients with adenocarcinoma, most of these patients are treated only with surgery as adjuvant treatment, which has not been shown to improve the global outcome (30). In these patients, local and distant tumor recurrence should arise either from active or dormant cancer cells that have spread, both kinds being undetectable with the current diagnostic methods (31). Our experimental model predicts that the autocrine or paracrine loop involved in NTSR1 activation in those patients would enhance tumor progression and recurrence.

Patients within the initial stages of NSCLC are best managed by surgery, with no consensus existing regarding postoperative follow-up measures (32). The identification of patients with poor prognosis, within a determined stage, would be of major importance for the management of patients with NSCLC (33), as the follow-up procedures could be individually tailored. Furthermore, patients with poor prognosis, within a determined stage, could be identified as more suitable candidates for postoperative treatments. Adjuvant chemotherapy has been shown to improve the prognosis of patients with stage II-IIIa resected NSCLC, whereas no benefit has been observed in patients with stage Ia, and the results remain controver-

sial in stage Ib (30). Thus, in patients with stage Ib, the identification of a good prognosis marker would represent an important element permitting the avoidance of adjuvant chemotherapy.

Our data indicate that the neurotensin/NTSR1 system is a good prognostic marker useful to identify, within stage I disease patients, those with a bad prognosis. Furthermore, the role of neurotensin in the growth of experimental tumors would represent a basis for the development of specifically targeted drugs, to be used together with currently available treatments.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Dr. Ferec for microsatellite analysis of the LNM35 and its subclones and Dr. Neil Insdorf for his helpful discussions and editing.

Grant Support

INSERM and Grants from ARC: 3543, and 3905, "Ligue contre le Cancer" 07/75-85, GEFLUC, and MERLION (5-07-06). S. Dupouy was supported by the "Ligue contre le cancer," M. Younes was supported by Damas University, and S.M. Ahmed Zaid was supported by PHYWE Systeme GmbH und Co. KG.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 03/17/2010; revised 06/16/2010; accepted 06/27/2010; published online 09/01/2010.

References

- Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2007;132:29-55S.
- Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1407-27.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
- Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706-14.
- Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 1997;111:1718-23.
- Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111:1710-7.
- Broet P, Camilleri-Broet S, Zhang S, et al. Prediction of clinical outcome in multiple lung cancer cohorts by integrative genomics: implications for chemotherapy selection. *Cancer Res* 2009;69:1055-62.
- Reinecke M. Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog Histochem Cytochem* 1985;16:1-172.
- Baca I, Feurle GE, Schwab A, Mittmann U, Knauf W, Lehnert T. Effect of neurotensin on exocrine pancreatic secretion in dogs. *Digestion* 1982;23:174-83.
- Andersson S, Rosell S, Hjelmquist U, Chang D, Folkers K. Inhibition of gastric and intestinal motor activity in dogs by (Gln4) neurotensin. *Acta Physiol Scand* 1977;100:231-5.
- Zhao D, Pothoulakis C. Rho GTPases as therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7:583-92.
- Leyton J, Garcia-Marin L, Jensen RT, Moody TW. Neurotensin causes tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2002;442:179-86.
- Ehlers RA, Zhang Y, Hellmich MR, Evers BM. Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:704-8.
- Moody TW, Chiles J, Casibang M, Moody E, Chan D, Davis TP. SR48692 is a neurotensin receptor antagonist which inhibits the growth of small cell lung cancer cells. *Peptides* 2001;22:109-15.
- Souaze F, Viardot-Foucault V, Roulet N, et al. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/β-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 2006;27:708-16.
- Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, Gully D, Laburthe M. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 1999;80:448-54.
- Toy-Miou-Leong M, Cortes CL, Beaudet A, Rostene W, Forgez P. Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2004;279:12636-46.

18. Najimi M, Souza F, Mendez M, et al. Activation of receptor gene transcription is required to maintain cell sensitization after agonist exposure. Study on neurotensin receptor. *J Biol Chem* 1998;273:21634–41.
19. Somai S, Gompel A, Rostene W, Forgez P. Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:482–8.
20. Souza F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, et al. Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Res* 2006;66:6243–9.
21. Shimizu S, Tsukada J, Sugimoto T, et al. Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway. *Int J Cancer* 2008;123:1816–23.
22. Dupouy S, Viardot-Foucault V, Alifano M, et al. The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression. *PLoS ONE* 2009;4:e4223.
23. Kozaki K, Miyaishi O, Tsukamoto T, et al. Establishment and characterization of a human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 with consistent lymphogenous metastasis via both subcutaneous and orthotopic propagation. *Cancer Res* 2000;60:2535–40.
24. Souza F, Rostene W, Forgez P. Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1997;272:10087–94.
25. Scarceriaux V, Pelaprat D, Forgez P, Lhiaubet AM, Rostene W. Effects of dexamethasone and forskolin on neurotensin production in rat hypothalamic cultures. *Endocrinology* 1995;136:2554–60.
26. Maoret JJ, Pospai D, Rouyer-Fessard C, et al. Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:465–71.
27. Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, et al. WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell* 2009;138:51–62.
28. Koon HW, Kim YS, Xu H, et al. Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8766–71.
29. Zhao D, Zhan Y, Zeng H, Koon HW, Moyer MP, Pothoulakis C. Neurotensin stimulates interleukin-8 expression through modulation of I κ B α phosphorylation and p65 transcriptional activity: involvement of protein kinase C α . *Mol Pharmacol* 2005;67:2025–31.
30. Wakelee HA, Schiller JH, Gandara DR. Current status of adjuvant chemotherapy for stage IB non-small-cell lung cancer: implications for the New Intergroup Trial. *Clin Lung Cancer* 2006;8:18–21.
31. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1194–210.
32. Rubins J, Unger M, Colice GL. Follow-up and surveillance of the lung cancer patient following curative intent therapy: ACCP evidence-based clinical practice guideline. *Chest* 2007;132:355–67S.
33. Lu Y, Lemon W, Liu PY, et al. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med* 2006;3:e467.

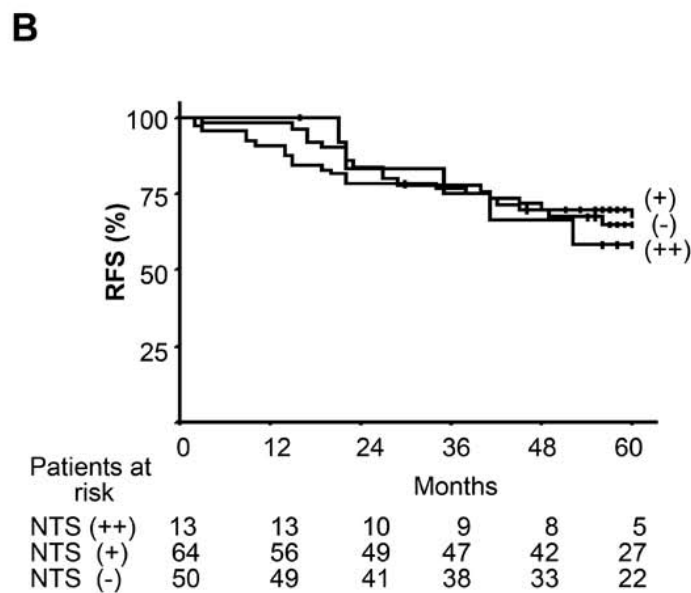
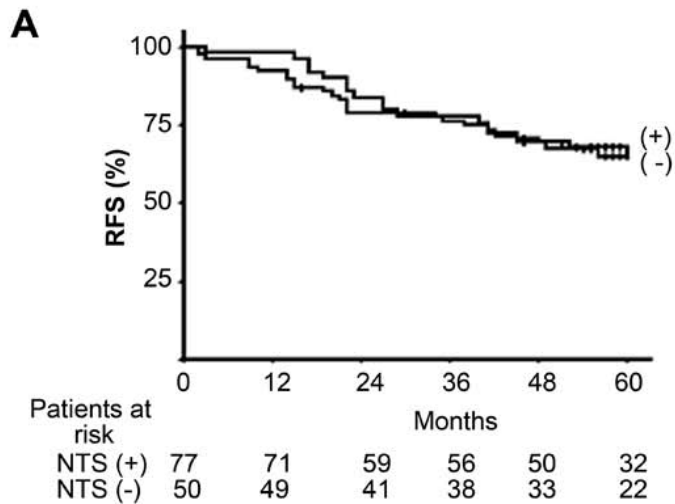


Figure 1 Sup. Relapse free survival (RFS) of patients with stages I adenocarcinoma (n=138) according to NTS expression.

A) Qualitative assessment by immunohistochemistry of NTSR1 expression:
 (+) = positive; (-) = negative.

B) Semi-quantitative immunohistochemistry :
 (++) = strong expression; (+) = medium expression; (-) = no expression.

2.2 Implication du couple NTS-NTSR1 dans le pronostic de CBNPC stades II-III

Les résultats favorables obtenus lors de la première étude (résultat 2.1) montrant que le NTSR1 est un facteur péjoratif de survie, m'ont conduit à poursuivre le travail et explorer le caractère pronostique du NTSR1 chez les patients ayant été opérés d'adénocarcinome bronchique dans un but curatif pour des stades plus avancés. Nous avons restreint le choix des patients à ceux de stades avancés et ayant profité d'une résection complète de leur tumeur, représentant le traitement de référence pour la majorité des patients en stades II et III avant et/ou après la chimiothérapie. Ce choix a permis d'avoir une population non sélectionnée représentative de la population cible (opérés de stade II et III d'adénocarcinome bronchique).

En parallèle, j'ai étudié l'impact de NTSR1 sur la survie dans les deux autres principaux types histologiques de cancer bronchique (carcinome épidermoïde et carcinome à grandes cellules). Afin d'étudier une population représentative, j'ai inclus tous les patients opérés consécutivement de carcinome épidermoïde ou à grandes cellules, quelle que soit la modalité thérapeutique associée à la chirurgie. Le choix a donc été limité aux patients en stade I-III.

2.2.1 *Méthodes*

2.2.1.1 *Pathologie humaine : population étudiée*

Nous avons étudié deux populations : la première population a inclus les patients opérés consécutivement des adénocarcinomes bronchiques stade II-III, dans le service de chirurgie thoracique, à l'hôpital Hôtel-Dieu, Paris, France entre juin 2001 et décembre 2005. Pour deuxième population, nous avons sélectionné les patients opérés de carcinome épidermoïde ou carcinome à grandes cellules au même hôpital entre juin 2001 et décembre 2002. Tous les patients ont eu une résection pulmonaire majeure (lobectomie ou pneumonectomie et la dissection ganglionnaire) dans un but curatif. Les données cliniques ont été obtenues à partir des dossiers cliniques des patients, ces données sont résumées dans les tableaux 11 et 12). Les données de survie ont été obtenues par correspondance avec les services d'états civils ou les médecins traitants ou par entretien téléphonique direct avec les familles pour les patients décédés. Les données recueillies sont la survie, l'âge, le sexe, le statut tabagique, l'indication de résection pulmonaire, le traitement possible préopératoire

(chimiothérapie/radiothérapie), les données pathologiques incluant le type histologique, pTNM, et la présence des embolies tumorales lymphatiques et/ou vasculaires.

2.2.1.2 Immunohistochimie

La détection de l'expression de NTS et NTSR1 a été faite par l'immunohistochimie. Une étape de prétraitement par la chaleur avec tampon citrate PH6 a été effectuée avant d'incuber avec l'anticorps primaire. L'immunohistochimie a été réalisée à l'aide d'anticorps anti-NTSR1 (dilution 1/100) de chèvre (C-20, SC-7596). Les lames ont été ensuite incubées avec un anticorps secondaire (anti-chèvre pour NTSR1), marqué à la Biotine. Le complexe antigène-anticorps a été révélé avec des molécules de streptavidine couplées à la peroxydase HRP (horseradish peroxydase) (kit Dakocytomation™LSAB2 system HRP, ou Vectastain ABC kit Vector laboratories). Le DAB (3, 3-diaminobenzidine, DAB Substrate Chromogen System, DakoCytomation™), substrat de la HRP, a été incubé quelques minutes sur les coupes. Une contre-coloration des noyaux cellulaires au bleu Hemalun a ensuite été pratiquée. La lecture des résultats a été effectuée par un anatomopathologiste à l'insu de l'identité du malade.

2.2.1.3 Analyse statique

Le taux de survie globale, à l'exclusion de mortalité postopératoire, a été calculé par la méthode de Kaplan-Meier, et les courbes de survie ont été comparées en utilisant le test du log-rank. Les Variables montrant potentiellement une influence sur la survie à l'analyse univariée avec une valeur $p < 0,05$ (stade de la maladie, expression de NTSR1), ont été considérés pour une analyse multivariée utilisant le modèle de Cox. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide des logiciels SEM (Silex Development, Mirefleurs, France).

Tableau 11 : Caractéristiques des patients opérés d'un adénocarcinome bronchique stades II et III

	Stade II n (%) n° = 74	Stade III n (%) n° = 133	Stade II - III n (%) n° = 207
Age moyen-SD	59,52	59,51 (11,57)	59,5 (11,47)
Sexe			
Homme	51 (69)	88 (66)	139 (67)
Femme	23 (31)	45 (34)	67 (33)
Statut tabagique			
Ex-fumeurs (arrêt > 2 mois)	33 (45)	54 (41)	87 (42)
Fumeurs	26 (35)	35 (26)	61 (29)
Non-fumeurs	5 (7)	28 (21)	33 (16)
Inconnu	10 (13)	16 (12)	26 (13)
Type de résection			
Lobectomie/bilobectomie	67 (91)	109 (82)	175 (85)
Pneumonectomie	7 (9)	24 (18)	31 (15)
Stage	74 (36)	133 (64)	207
Type histologique			
Adénocarcinome (ADNK)	74	132	206
Bronchioloalvéolaire	-	1	1
Emboli vasculaire intra ou peritumoral	35 (47)	69 (52)	104 (50)
Emboli lymphatique intra ou péritumorale	27 (36)	68 (51)	95 (46)
Chémiothérapie préopératoire	19 (25)	77/130 (59)	96/203 (34)
Radiothérapie préopérative	6 (8)	3/116 (3)	9/180 (5%)
Décès Postopérative	2 (2.7)	5 (3.7)	7 (3.4)
Suivi, mois-moyen-SD		33	40
Perte de vue	2 (2.7)	1	3 (1.4)
Décès pendant le suivi, n (% de patients)	38/70 (54)	86/127 (68)	124/197 (63)
Score de NTSR1			
0	39 (53)	66 (49)	105 (51)
1	19 (26)	42 (32)	61 (29)
2	16 (21)	25 (19)	41 (20)
Expression de NTSR			
positive	35 (47)	67 (51)	102 (49)
négative	39 (53)	66 (49)	105 (51)

Score 0 : nombre de cellules marquées $\leq 10\%$, score 2 : nombre des cellules marquées $> 50\%$ et intensité de marquage intense, score 1 : cas intermédiaire (marquage de faible intensité quelque soit le nombre des cellules marquées ou marquage intense mais le nombre des cellules marquées $< 50\%$).
Expression positive : nombre des cellules marquées $\geq 10\%$, expression négative : nombre des cellules marquées $< 10\%$.

Tableau 12 : Caractéristiques des patients opérés de carcinome épidermoïde ou carcinome à grandes cellules

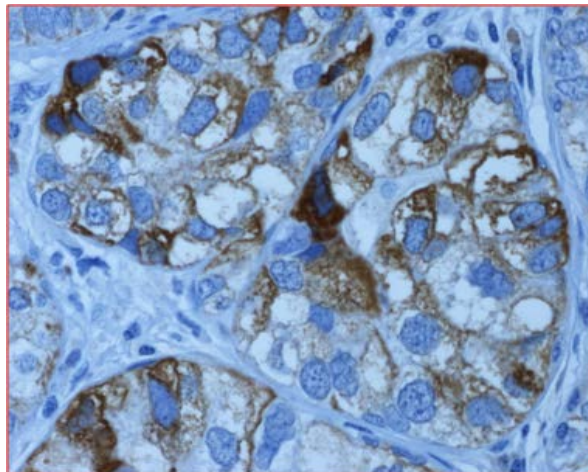
	N n (%)
Age moyen-SD	64,41 (10,09)
Sexe	
Homme	134 (92%)
Femme	12 (8%)
Statut tabagique	
Ex-fumeurs (arrêt > 2 mois)	95 (65)
Fumeurs	49 (33)
Non-fumeurs	1 (1)
Inconnu	1 (1)
Type de résection	
Lobectomie/bilobectomie	99/146 (68%)
Pneumonectomie	47/146 (32%)
Stage	
I	54 (37%)
II	41 (28%)
III	51 (35%)
Type histologique	
Carcinome épidermoïde	107
Carcinome à grandes cellules	36
Mixte	6
Embolie vasculaire intra ou péri tumoral	66/146 (45%)
Embolie lymphatique intra ou péri tumorale	38/146 (26%)
Chimiothérapie préopératoire	33/143 (23%)
Radiothérapie préopératoire	6/143 (4%)
Décès Postopératoire	18/146 (12%)
Suivi, mois-moyen-SD	57
Perte de vue	20
Décès pendant le suivi, n (% de patients)	79/126 (63%)
Score de NTSR1	
0	74 (51%)
1	63 (43%)
2	9 (6%)
Expression de NTSR	
positive	70 (49%)
négative	73 (51%)

*Score 0 : nombre de cellules marquées $\leq 10\%$, score 2 : nombre des cellules marquées $> 50\%$ et intensité de marquage intense, score 1 : cas intermédiaire (marquage de faible intensité quelque soit le nombre des cellules marquées ou marquage intense mais le nombre des cellules marquées $< 50\%$).
Expression positive : nombre des cellules marquées $\geq 10\%$, expression négative : nombre des cellules marquées $< 10\%$.*

2.2.2 Résultats

2.2.2.1 Expression de NTSR1 dans le stade II d'adénocarcinome : impact sur le pronostic

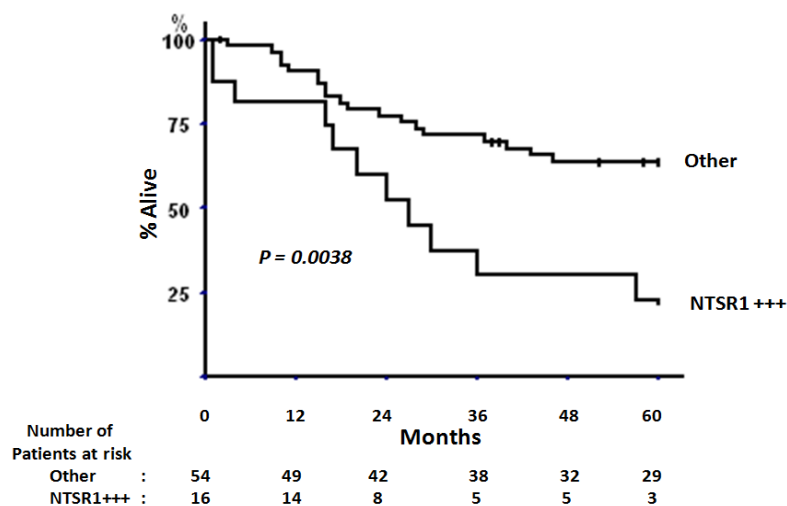
Pour les stades II, l'expression de NTSR1 a été évaluée chez 74 patients, les caractéristiques de cette population sont résumées dans le tableau 11. Cette population inclut 51 hommes et 23 femmes, la majorité (69%) était des fumeurs. L'expression positive de NTSR1 (nombre des cellules marquées > 10%) a été identifiée dans 35 patients (47%) sans être détectée dans les tissus normaux adjacents de la zone tumorale. L'expression de NTSR1 dans les cellules cancéreuses était hétérogène, granulaire, intracellulaire, et rarement localisée à la membrane plasmique (figure 30). En outre, l'expression de NTSR1 n'a pas été détectée dans la composante bronchiolo-alvéolaire de l'adénocarcinome mixte. Par contre, la partie invasive de ce dernier, exprime du NTSR1 dans 66% des cas (4/6).



(Figure 30) Exemple de marquage de NTSR1 par IHC dans le type histologique adénocarcinome.

L'expression de NTSR1 n'était pas corrélée avec le sexe, l'âge, le statut tabagique, ni avec la présence d'embolies vasculaires ou lymphatiques. De plus, l'expression de NTSR1 (positive vs négative) n'avait aucun impact sur la survie. Cependant, lorsqu'on a évalué l'impact de l'expression de NTSR1 sur la survie selon une analyse semi-quantitative (score 0, 1, 2) tenant compte à la fois de l'intensité de marquage et du nombre des cellules marquées, une corrélation a été trouvée. D'après cette évaluation semi-quantitative, 39 patients (53%) étaient considérés comme 0 (nombre de cellules marquées \leq 10%), et 16 patients (22 %) étaient considérés comme 1 (nombre de cellules marquées > 10% et \leq 20%), et 19 patients (26%) étaient considérés comme 2 (nombre de cellules marquées > 20%).

comme 2 (nombre des cellules marquées > 50% et intensité de marquage intense), et 19 patients (25%) comme 1 (cas intermédiaire : marquage de faible intensité quelque soit le nombre des cellules marquées ou marquage intense mais le nombre des cellules marquées < 50%). L'impact de NTSR1 sur la survie a été analysé pour 70 patients. Deux patients ont été exclus en raison de décès postopératoire. Pour deux autres patients les données de survie n'étaient pas disponibles. La durée moyenne de suivi était de 40 mois et le nombre de décès survenus était de 38/70 (54%). Le score 2 de NTSR 1 était associé à un mauvais pronostic à 5 ans par rapport au score 0 et 1 (22.6% [IC 95%: 8.07% - 49.2%] versus 63,6% [IC 95% 49.94% - 75.31] respectivement, $p = 0,0038$) (figure 31). En revanche, aucune différence en terme de survie n'a été observée entre les patients avec score 1 de NTSR1 et ceux avec un score 0.



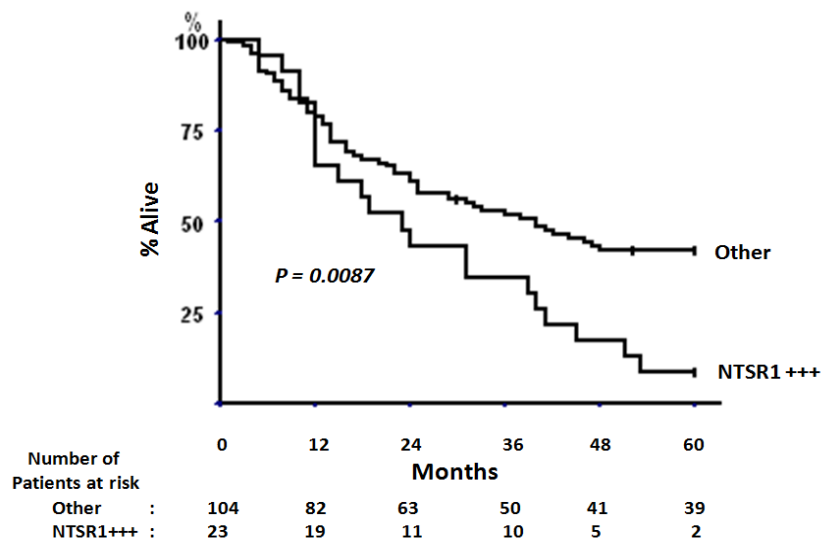
(Figure 31) Survie globale des patients opérés d'adénocarcinome bronchique stade II ($n = 70$) selon l'expression de NTSR1. Evaluation semi-quantitative par l'IHC de l'expression de NTSR1 : NTSR1+++ : expression fortement positive (nombre des cellules marquées > 50% et l'intensité de marquage forte= score 2), Other : le reste des patients (score 0 ou 1 de NTSR1). Le nombre des patients à risque pour chaque période est indiqué sous chaque courbe.

2.2.2.2 Expression de NTSR1 dans les stades III et II-III : impact sur le pronostic

Cent-trente trois patients opérés d'adénocarcinome bronchique stade III ont été inclus. Cette population inclut 88 hommes et 45 femmes et le pourcentage de fumeur était de 77%. Les caractéristiques sont développées dans le tableau 11. Soixante sept patients avaient un marquage positif pour NTSR1 (51%) et les caractéristiques de ce marquage étaient identiques à celles du stade II. En plus, comme nous l'avons vu dans le stade II, l'expression de NTSR1 dans le stade III n'a pas été détectée dans les carcinomes bronchiolo-alvéolaire ni même dans

la composante bronchiolo-alvéolaire de l'adénocarcinome mixte. Par contre, la partie invasive de ce dernier, exprime du NTSR1 dans 40% (6/15) des cas.

Selon l'évaluation semi-quantitative décrite ci-dessus, les scores 0, 1, et 2 ont été détectés dans respectivement 66 (49%), 42 (32%), et 25 (19%) des patients. L'analyse de l'impact de NTSR1 sur la survie a été réalisée chez 127 patients. Cinq patients ont été exclus en raison d'un décès post-opératoire. Pour un patient les données de survie n'étaient pas disponibles. La durée moyenne de suivi était de 33.6 mois. Quarante six patients sont décédés sur la période étudiée de 5 ans (68%). Le taux de survie à 5 ans était moins favorable avec le score 2 qu'avec le score 0-1 (8.7% [IC 95% 2.42% -26.8%] vs 42.4% [IC 95% 33.08% - 52.21] ($p = 0,0087$) (figure 32)

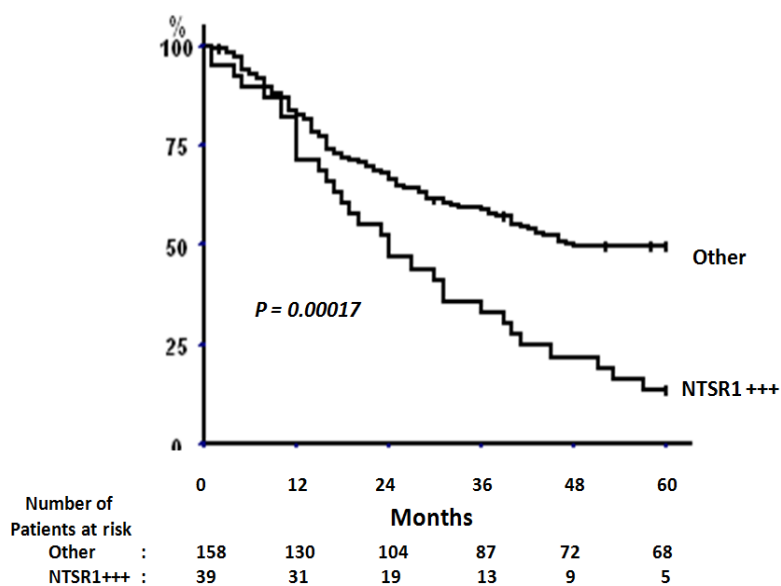


(Figure 32) Survie globale des patients opérés d'adénocarcinome bronchique stade III ($n = 127$) selon l'expression de NTSR1. Evaluation semi-quantitative par l'IHC de l'expression de NTSR1 : NTSR+++ : expression fortement positive (nombre des cellules marquées > 50% et l'intensité de marquage forte= score 2 de NTSR1), Other : le reste des patients (Score 1 ou 0 de NTSR1). Le nombre des patients à risque pour chaque période est montré sous chaque courbe

Ensuite, nous avons analysé l'impact de NTSR1 sur la survie dans les stades II et III. Cent quatre vingt dix-sept patients ont été inclus. La durée moyenne de suivi était de 35.9 mois. Dans cette population, l'âge, le sexe, le statut tabagique et la présence d'embolies vasculaires ou lymphatiques n'avaient pas d'influence sur la survie. Le stade de la maladie était un facteur déterminant pour la survie. Ainsi, le taux de survie à 5 ans était moins favorable dans

le stade III en comparaison avec le stade II 35.9 % (IC 95% : 27.86 – 44.72) vs 54.9% (IC 95% : 42.89 – 66.31) $p = 0.015$. Le score 2 de NTSR1 a été identifié dans 21% des patients (41/197). Ce score était corrélé à une moins bonne survie à 5 ans par rapport aux scores 0 et 1 de NTSR1 : 13.8% (IC 95% : 6.03% – 28.39%) vs 49.6% (IC 95% : 41.74% – 57.51%) $p = 0.00017$ (figure 33)

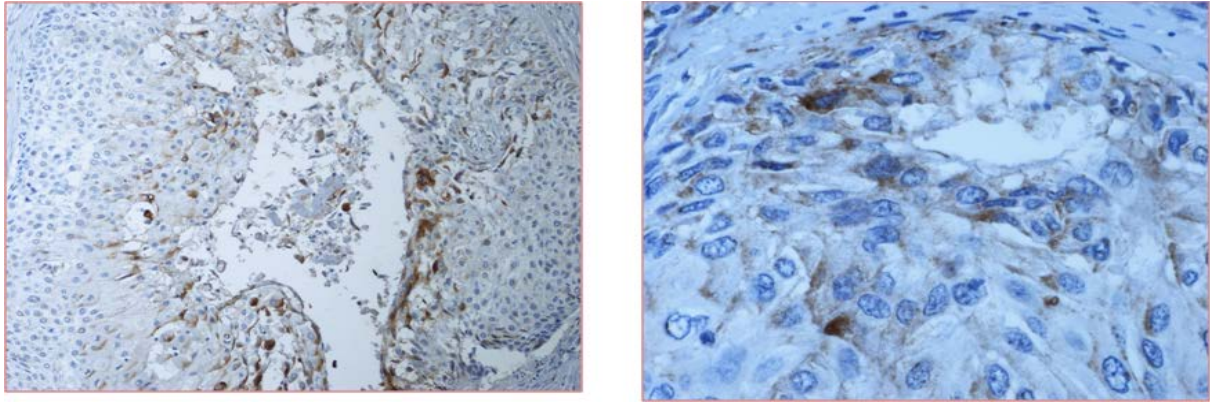
En utilisant l'analyse multivariée, le stade de la maladie ($p = 0.007$) et le score 2 de NTSR ($p = 0.00031$) étaient des facteurs prédictifs indépendants de mauvais pronostic.



(Figure 33) Survie globale des patients opérées d'adénocarcinome bronchique stade II et III ($n = 197$) selon l'expression de NTSR1. Evaluation semi-quantitative par l'IHC de l'expression de NTSR1 : NTSR1+++ : expression fortement positive (nombre des cellules marquées > 50% et l'intensité de marquage forte = score 2 de NTSR1), Other : le reste des patients (score 0 ou 1 de NTSR1). Le nombre des patients à risque pour chaque période est indiqué sous chaque courbe.

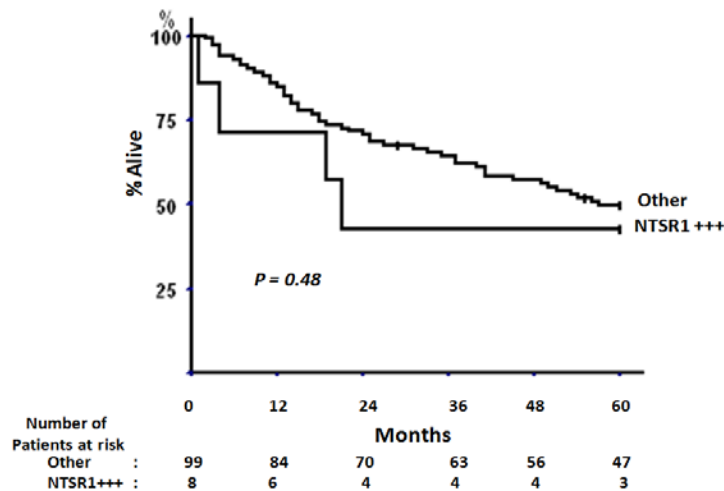
2.2.2.3 Expression de NTSR1 dans les carcinomes épidermoïdes et à grandes cellules : impacte sur la survie.

L'expression de NTSR1 a été étudiée dans 146 patients opérés de carcinome épidermoïde ou de carcinome à grandes cellules, stade I-III. Les caractéristiques de ces patients sont résumées dans la tableau 12. Dans le carcinome épidermoïde, l'expression de NTSR1 était souvent localisée au niveau membranaire (figure 34). En revanche, dans le carcinome à grandes cellules, l'expression de NTSR1 était de faible intensité.



(Figure 34) Exemple de marquage de NTSR1 par IHC dans le type histologique de carcinome épidermoïde.

L'expression de NTSR1 a été détectée dans 55/107 des patients (51%) ayant des carcinomes épidermoïdes et dans 15/36 des patients ayant de carcinome à grandes cellules (42%). Cette expression n'était pas corrélée avec, l'âge, le sexe, le statut tabagique, ou le stade de la maladie. Selon l'évaluation semi-quantitative, le score 1 et 2 a été détecté respectivement dans, 44% (46/104) et 7% (8/107) de carcinome épidermoïde et dans 39% (14/36) et 3% (1/36) de carcinome à grande cellules. L'impact de NTSR1 sur la survie a été évalué chez 107 patients. Dix huit patients ont été exclus en raison d'un décès postopératoire. Pour 20 patients, les données de survie étaient manquantes. Le taux de survie à 5 ans était de 56% (61/108). Aucune différence significative en terme de survie n'a été trouvée entre les patients ayant un score 2 de NTSR1 et ceux avec score 0 ou 1 (figure 35).



(Figure 35) *Survie globale des patients opérés de carcinome épidermoïde ou à grandes cellules stade I-III (n = 107) selon l'expression de NTSR1. Evaluation semi-quantitative par l'IHC de l'expression de NTSR1 : NTSR1+++ : expression fortement positive (nombre des cellules marquées > 50% et l'intensité de marquage forte= score 2 de NTSR1), Other : le reste des patients (score 0 ou 1 de NTSR1). Le nombre des patients à risque pour chaque période est indiqué sous chaque courbe.*

2.2.3 Discussion générale de deux travaux

Dans ces travaux, nous avons constaté que le marquage du NTSR1 et de la NTS n'est pas détecté dans les tissus pulmonaires normaux, ni dans les zones adjacentes normales de la zone tumorale. Par contre, ces facteurs sont fortement et fréquemment exprimés chez les patients présentant un adénocarcinome pulmonaire. De plus, le carcinome bronchiolo-alvéolaire ou le composant bronchiolo-alvéolaire dans l'adénocarcinome mixte n'expriment pas le NTSR1 alors que sa partie invasive l'exprime souvent.

Nos résultats ont aussi montré que, l'expression de NTSR1 était corrélée à un mauvais pronostic pour les patients opérés d'un adénocarcinome stade I (première étude), et les patients opérés de stade II ou III (deuxième étude). Ces résultats ont été confirmés par une analyse multivariée qui a montré que parmi les facteurs cliniques et pathologiques disponibles l'expression de NTSR1, étaient un prédicteur indépendant de mauvais pronostic. En revanche, cette valeur pronostique de NTSR1 n'a pas été retrouvée dans le carcinome épidermoïde ni dans le carcinome à grandes cellules. De même, aucune corrélation n'a été retrouvée entre l'expression de NTS et la survie des patients.

2.2.3.1 Rôle pronostique de *NTSR1* dans le CBNPC

La prise en charge des CBNPC est pluridisciplinaire. Le pronostique et les modalités thérapeutiques sont fondés principalement sur le stade de la maladie. Toutefois, les patients au même stade et ayant eu une résection complète de leur tumeur ont une grande hétérogénéité de pronostic, rendant nécessaire l'identification de facteurs pronostiques plus précis afin de pouvoir mieux adapter la prise en charge thérapeutique (indication des traitements complémentaires, modalité de surveillance..). Cependant, la détermination de tels facteurs utilisables en clinique pour le CBNPC opérable est extrêmement difficile en raison de l'hétérogénéité des patients en termes de type histologique, de staging de la maladie, de type de traitement chirurgical et de l'association avec les traitements adjuvants ou néoadjuvants. Devant cette hétérogénéité, l'influence de nombreux facteurs sur la survie comme les facteurs clinico-pathologiques (âge, sexe, tabagisme), anatomopathologiques (adénocarcinome, carcinome épidermoïde ou carcinome à grandes cellules), ou des marqueurs sériques (Hb..), ou des biomarqueurs comme ERCC1/RRM1 (Excision Repair Cross-Complementation1/Ribonucleotide Réductase M1), BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility gene 1), EML4 et ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), p53, et EGFR/KRAS ont été examinés dans de nombreux travaux (Tartarone, Lerose et al. ; Marijon, Bouyon et al. 2009). Bien que de nombreux travaux se soient orientés vers la recherche de biomarqueurs, aucun biomarqueur n'est actuellement utilisé dans la pratique clinique courante pour la prise de décision lors de la planification de la gestion thérapeutique des patients avec CBNPC réséqué. Les résultats publiés à ce jour sont extrêmement hétérogènes. Dans plusieurs cas, aucun impact sur la survie n'a été constaté, dans d'autres études certains marqueurs ont été identifiés comme facteurs prédictifs de bon ou mauvais pronostic à l'analyse univariée, mais pas à l'analyse multivariée, et dans de rares cas, des facteurs pronostiques indépendants ont pu être identifiés. De tels marqueurs pour qu'ils soient utilisés par les cliniciens doivent répondre à deux critères, d'une part, il doivent permettre de sélectionner les patients selon leur profil pronostique avec une marche d'erreur acceptable afin de ne pas ajouter de traitements complémentaires ou de ne pas suivre une surveillance particulière que pour les patients en besoin, et d'autre part, afin de confirmer leur valeur pronostique, leur impact sur la survie doit être validé dans au moins deux séries différentes de patients provenant de centres également différents. Donc, un énorme travail reste encore à réaliser afin de déterminer ou de valider des facteurs pronostiques dans le CBNPC.

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier l'impact du complexe NTS-NTSR1 sur la survie chez des patients opérés d'un CBNPC. Ce choix a été justifié par de nombreux arguments créditant un rôle important des neuropeptides et en particulier du système neurotensinergique dans le développement tumoral. Mais, la majorité de ces données sont réalisées, *in vitro*, et peu de données portent sur le rôle du système neurotensinergique dans le cancer bronchique.

Dans première étape, nous avons réalisé une étude exploratrice examinant d'une part le statut du complexe NTS-NTSR1 dans le CBNPC et d'autre part, l'impact de ce complexe sur la survie. Dans cette première étude, nous avons focalisé notre recherche sur les patients avec adénocarcinome de stade I traités par chirurgie seule (lobectomie pulmonaire et curage ganglionnaire complet). Ce choix de critères d'inclusion nous a permis d'étudier une maladie dont le staging était extrêmement fiable, et pour laquelle le seul traitement avec un possible impact sur la survie était l'opération. Dans cette population, nous avons trouvé que l'expression du NTSR1 était associée, en analyse univariée, à un pronostic défavorable par rapport aux patients qui n'avaient pas d'expression de ce marqueur. Ce résultat a été confirmé à l'analyse multivariée qui a montré que l'expression de NTSR1 était des facteurs indépendants de mauvais pronostic.

Les résultats que nous avons obtenus dans la première étude nous ont conduits à étudier si le NTSR1 pouvait avoir également un impact sur la survie des stades plus avancés, mais opérables. Donc, nous avons étudié l'éventuel rôle de NTSR1 dans une population non sélectionnée représentative des patients opérés de stades II et III de CBNPC. Nous avons trouvé que le score 2 de NTSR1 (nombre des cellules marquées > 50% et l'intensité de marquage est forte) était un facteur prédictif de mauvais pronostic dans cette population. Des résultats similaires ont été décrits dans d'autres types de cancers. Ainsi, Dupouy et al ont trouvé que l'expression de NTSR1 était associée à un mauvais pronostic de survie lorsqu'elle est détectée dans $\geq 80\%$ des cellules tumorales du cancer de sein (Dupouy, Viardot-Foucault et al. 2009). De même, dans les cancers des voies aérodigestives supérieures, les patients avec surexpression de NTS et de NTSR1 avaient un taux élevé de métastases à distance (Shimizu, Tsukada et al. 2008).

Cependant, les résultats de la deuxième étude sont différents de ceux de la première étude. Dans la première étude, c'est l'expression de NTSR1 qui était associée avec un mauvais

pronostic alors que dans la deuxième étude cette valeur pronostique n'est trouvée qu'avec le score 2 qui représente une expression de NTSR1 supérieure à 50% associée avec une intensité de marquage forte. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence. D'abord, les méthodes utilisées pour étudier l'expression de NTSR1 ne sont pas les mêmes, dans la première étude, la technique TMA (tissu microarrays) a été utilisée pour réaliser l'IHC, alors que dans la deuxième étude, afin d'améliorer la qualité de marquage ainsi que la surface marquée, l'IHC a été effectuée sur des coupes en paraffine. Dans les TMA le tissu à analyser est préalablement choisi par l'anatomopathologiste, souvent en plein cœur de la partie tumorale, et représente seulement une petite partie de la tumeur, alors que les sections de tissus individuels représentent une partie plus large de la tumeur et des tissus environnants. La vue d'ensemble du marquage et en conséquence le score va donc être selon des critères différents. Par ailleurs, un démasquage des sites a été fait pour toutes les coupes contrairement à la première étude où cette étape (de démasquage des sites) n'a pas été faite. Deuxièmement, les populations étudiées dans les deux études sont différentes, comme dans l'étude initiale, la population étudiée était extrêmement sélectionnée : les patients ont été choisis à partir de trois institutions avec adénocarcinome, traités par lobectomie et curage ganglionnaire sans traitement néoadjuvant ni adjuvant. Dans la deuxième série, nous avons inclus tous les patients opérés consécutivement d'un adénocarcinome, sans prendre en compte l'étendue de la résection ni le traitement éventuellement associé, ce qui peut avoir un impact sur la survie. Enfin, l'étude précédente était multicentrique et les facteurs liés aux légères différences de traitements peuvent également jouer un rôle déterminant dans les différences observées dans l'étude.

Nos résultats ont aussi montré que, le NTSR1 n'était pas associé à un mauvais pronostic de survie dans le carcinome épidermoïde ou le carcinome à grandes cellules, contrairement aux résultats obtenus avec l'adénocarcinome. Toutefois ce résultat est compatible avec nos observations microscopiques du marquage de NTSR1. En effet, dans l'adénocarcinome bronchique, le marquage de NTSR1 est granulaire intracytoplasmique et rarement membranaire. Inversement, dans le carcinome épidermoïde, le marquage est souvent localisé au niveau membranaire et dans le carcinome à grandes cellules il est faible. Ces données suggèrent un état d'activation du NTSR1 dans l'adénocarcinome, avec un processus d'internalisation et de recyclage du récepteur. Ces éléments indiquent peut-être que le système NTS/NTSR1 est chroniquement activé dans l'adénocarcinome et relativement moins actif

dans le carcinome épidermoïde ou à grandes cellules. L'équipe de mon Laboratoire d'accueil a précédemment démontré qu'une activation chronique du récepteur NTSR1 par la NTS induit un recyclage du récepteur vers la membrane plutôt que son acheminement vers les lysosomes pour la dégradation (Toy-Miou-Leong, Cortes et al. 2004). Ceci est responsable d'une stimulation permanente des récepteurs, avec la signalisation en aval qui s'y associe. Notre équipe a aussi démontré que, sous une stimulation chronique du NTSR1 par la NTS, une activation constitutive des MAP kinases se fait, mais aussi une activation permanente des autres gènes cibles de la NTS, comme le BCL 2 ou le MMP-9 (Somai, Gompel et al. 2002; Zhao, Zhan et al. 2004) Tous ces événements cellulaires participent probablement à la tumorigenèse et à la progression tumorale.

Donc, le NTSR1 pourrait être un marqueur pronostique du cancer bronchique, et surtout il présente plusieurs propriétés qui en font un bon biomarqueur : le récepteur NTSR1 est un marqueur tissulaire, facilement détectable par la technique d'immunohistochimie, qui, de plus, possède l'avantage d'être une méthode peu coûteuse et automatisable.

2.2.3.2 Dérégulation de l'expression de NTSR1 et de NTS dans le cancer bronchique

Dans ce travail, nous avons retrouvé que le NTSR1 est exprimé dans les CBNPC sans être détecté dans les tissus normaux, ni dans les zones adjacentes de la zone tumorale. Des résultats similaires ont été observés dans les tissus du côlon et du sein, où le NTSR1 est absent dans les cellules épithéliales normales, mais surexprimé dans les tissus tumoraux (Maoret, Pospai et al. 1994; Souaze, Dupouy et al. 2006). Comme il a été précédemment décrit dans le cancer colique, l'un des mécanismes moléculaires responsables de «up-régulation» de NTSR1 est l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (Souaze, Viardot-Foucault et al. 2006) en raison de la présence d'un site consensus pour les facteurs de transcription Tcf dans le promoteur NTSR1. Ce dernier peut être activé par le complexe β -caténine/Tcf. Pour rappel, la famille du gène Wnt comprend de nombreux membres reliés structurellement ; ce sont des protéines secrétées qui se fixent sur et activent le récepteur à sept domaines transmembranaires Frizzled (Fzd). L'activation de ces récepteurs par leurs ligands initie une cascade de signalisation qui empêche le glycogène synthase kinase 3 β (GSK-3 β) de phosphoryler la β -caténine, ce qui conduit à sa stabilisation et sa translocation nucléaire où elle active des gènes cibles après s'être associée aux facteurs TCF/Lef (van Noort and Clevers 2002). L'activation de cette voie est impliquée de façon déterminante dans la régulation de la

différentiation cellulaire et lors de différents processus développementaux au cours de l'embryogenèse. En plus, il a été montré que l'activation constitutive de cette voie est impliquée dans certains cancers (colique, sein, bronchique ..) (Polakis 2000). Dans le cancer bronchique, il a été démontré que la voie Wnt est suractivée dans environ 50% des lignées cellulaires humaines de CBNPC et des tumeurs primaires via la régulation autocrine de la voie Wnt (Akiri, Cherian et al. 2009). Huang CL et al, en analysant le statut de Wnt1 par IHC chez 216 patients opérés de CBNPC, ont trouvé que l'expression intratumorale Wnt1 peut affecter à la fois la prolifération tumorale et l'angiogenèse par l'induction des gènes cibles tels que c-Myc, la cycline D1, VEGF-A et de la MMP-7. De même, ces auteurs ont montré que la surexpression de Wnt1 était un facteur péjoratif de survie pour les patients atteints de CBNPC (Huang, Liu et al. 2008). Des résultats similaires ont été retrouvés par Nakashima et ses collègues en étudiant le statut de Wnt1 dans 151 opérés de CBNPC (Nakashima, Liu et al. 2008). Récemment, il a été montré que l'activation de la voie Wnt/TCF est impliquée dans les métastases cérébrales et osseuses au cours de la progression des adénocarcinomes pulmonaires par l'intermédiaire des facteurs de transcription LEF1 et HOXB9 (gènes cibles de Wnt/TCF) (Nguyen, Chiang et al. 2009). Donc, ces données de la littérature ont suggéré que la surexpression de NTSR1 pouvait être induite par un mécanisme impliquant la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine d'une part, et d'autre part, qu'il pouvait participer à la progression tumorale et être corrélé à un mauvais pronostic en tant que gène activé par Wnt/TCF. D'autres études seront nécessaires pour mettre en évidence les mécanismes potentiellement impliqués dans la dérégulation de NTSR1 dans le cancer bronchique.

Par ailleurs, bien que nos résultats n'aient pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de la neurotensine et la survie des patients, la dérégulation de l'expression de NTS dans les tissus tumorale suggère cependant que la neurotensine pourrait être impliquée dans les processus néoplasiques bronchiques, mais son critère de détection n'en fait pas un facteur déterminant de progression de la maladie. Le mécanisme moléculaire induisant l'expression de la neurotensine dans les tumeurs pulmonaire n'est pas clair. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'un des mécanismes, qui peut expliquer cette dérégulation est l'activation de la voie Ras. Dans le CBNPC, l'EGFR est surexprimé dans 60 à 80% cas et l'HER2 dans 30% des adénocarcinomes. Cette surexpression pourrait être associée à une activation de la voie Ras conduisant ainsi à la dérégulation de l'expression de NTS (Evers, Zhou et al. 1995).

Au total, ces résultats montrent que le complexe NTS-NTSR1 est dérégulé dans le CBNPC ce qui suggère un rôle du système neurotensinergique au cours de processus de développement tumoral.

2.2.3.3 Rôle dans l'invasion tumorale ?

Nos résultats ont montré que l'expression de NTSR1 n'a jamais été détectée dans les sous-types bronchiolo-alvéolaire ou dans la composante bronchiolo-alvéolaire de l'adénocarcinome mixtes, mais elle a souvent été détectée dans son compartiment invasif, ce qui suggère que le système neurotensinergique peut participer précocement dans les processus de progression cancéreuse. Les études, *in vitro*, ont montré que la NTS est capable de moduler la capacité migratoire des cellules cancéreuses adhérentes de différentes origines (cancer de côlon, de pancréas canalaire, carcinome de la tête et du cou, cancer de sein). En outre, il a été montré que NTSR1 induit et améliore le phénotype invasif de cellules tumorales LNCaP et HNSCC. Les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés, mais il semble que les métalloprotéinases sont probablement impliquées.

2.2.4 Conclusion et perspectives

Nos résultats ont montré dans un premier temps que le NTSR1 peut être identifié comme facteur pronostique dans les patients sélectionnés opérés d'adénocarcinome bronchique stade I. Ces résultats ont été retrouvés dans population non sélectionnés opérés consécutivement d'adénocarcinome bronchique stade II-III. La validation de ces résultats nécessite étudier l'expression de NTSR1 dans deuxième série de patients opérés consécutivement d'adénocarcinome bronchique stade I-III dans premier temps, puis par une étude clinique prospective à long terme sur la population ciblée. La mise en évidence de la valeur pronostique de NTSR1 pourrait jouer un rôle dans la prise en charge des patients opérés d'adénocarcinome bronchique. Il permettrait d'utiliser l'expression de NTSR1 comme biomarqueurs pronostic chez les patients présentant des adénocarcinomes bronchiques. L'identification des patients à pronostic réservé à l'intérieur d'un stade déterminé de maladie représenterait une avancée importante dans la prise en charge des patients avec cancer non à petites cellules, il permettrait de personnaliser le suivi et même d'envisager des traitements postopératoires.

La dérégulation de l'expression de NTS-NTSR1 nous laisse suggérer que la production probable et la sécrétion de NTS par les cellules tumorales associées à la présence aberrante de récepteurs NTSR1 dans les mêmes tumeurs offrent la possibilité de l'établissement de régulations autocrines ou paracrines à la NTS qui peut favoriser la progression tumorale. L'évaluation de cette hypothèse nécessite une étude plus approfondie examinant le rôle potentiel de NTS dans la progression de cancer bronchique. Cette étude est abordée dans le chapitre suivant.

Article III

NTSR1: New prognostic factor for advanced but operable lung adenocarcinomas

YOUNES Mohamad ¹, ALIFANO Marco ^{1,2}, Olivier Schussler², Jean-François Régnard ²,
DAMOTTE Diane ³, FORGEZ Patricia ¹

INSERM-UPMC U893, 75012 Paris, France

Service de chirurgie thoracique, Hôtel-Dieu, 75004 Paris, France

Service d'anatomopathologie, Hôtel-Dieu, 75004 Paris, France

Correspondences should be addressed to Dr. Forgez

Abstract

Background. The Neurotensin receptor 1 (NTSR1), has been identified as a potential new prognostic biomarker for surgically resected stage I lung adenocarcinoma. Its prognostic value is not known in more advanced stages. We investigated the prognostic impact of NTSR1 expression in more advanced but still operable lung adenocarcinoma treated in a multimodality setting. .

Patients and methods. The expression of NTSR1 was studied by immunohistochemistry in series of 207 consecutive patients operated on for stage II and III lung adenocarcinomas. NTSR1 staining of cancer cells was scored as 0: staining <10% of tumor cells; 2: more than 50% of tumor cells showing a positive stain of high intensity; 1: intermediate cases.

Results. NTSR1 expression was scored as 0, 1, and 2 in 51%, 29%, and 20% of cases, respectively. In the whole population, high expression of NTSR1 (score 2) was associated with worse 5-year survival as compared with NTSR1 expression scored 0- 1 (13.8% (95% CI: 6.03% - 28.39%) vs 49.6% (95% CI: 41.74% - 57.51%)) $p = 0.00017$ (figure 2 A). Multivariate analysis showed that the disease stage ($P = 0.007$) and NTSR1 score ($P = 0.0034$) were independent negative prognostic factors.

Conclusion: NTSR1 expression can be considered as new prognostic biomarker in patients with more advanced but operable lung adenocarcinoma treated in a multimodality setting.

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer related death worldwide (Parkin, Bray et al. 2005; Alberg, Ford et al. 2007), mainly because most patient had locally advanced or metastatic disease at initial presentation. Overall 5-year survival is approximately 15%, but among operable around 50% will survive over 5 years (Mountain 1997; Goldstraw, Crowley et al. 2007). Although the stage of the disease is the most useful parameter element in defining the therapy and prognosis, survival is heterogeneous also within a single stage (Mountain 1997; Mountain and Dresler 1997; Goldstraw, Crowley et al. 2007). Therefore, it is necessary to find new prognostic markers that can identify patients at high risk of recurrence to allow adapting the treatment at individual level.

In recent years, significant progress has been made in understanding the molecular mechanisms of bronchial carcinogenesis. Malignant transformation of lung epithelial cells is a multistep process, characterized by the accumulation of sequential genetic or epigenetic alterations (Hanahan and Weinberg) sometimes leading to the acquisition of deregulated proteins. such as neurotensin (NTS) and its cognate receptor (NTSR1). NTS is present and biologically active in the central nervous system and in endocrine cells of the intestinal mucosa (Carraway and Leeman 1973; Kitabgi, Carraway et al. 1976; Reinecke 1985; Vincent, Mazella et al. 1999) (Andersson, Rosell et al. 1977; Baca, Feurle et al. 1982; Vincent, Mazella et al. 1999). The effects of neurotensin are mediated mainly by its interaction with its high affinity receptor (NTSR1). Available data from the literature support an oncogenic role of the complex NTS-NTSR1. Indeed, the NTS and the NTSR1 are often abnormally expressed in solid tumors (Przedborski, Levivier et al. 1991; Reubi, Waser et al. 1998; Reubi, Waser et al. 1999; Ehlers, Kim et al. 2000). In vitro studies of NTSR1 have shown that stimulation of NTSR1 leads to cell proliferation, survival, mobility and invasiveness via activation of signaling pathways involved in tumor development and progression as PKC, mitogen

activated protein kinase (MAPK), Bcl2, RhoGtpas, focal adhesion kinase (Fak), and IL8 (Ehlers, Zhang et al. 2000; Leyton, Garcia-Marin et al. 2002; Somai, Gompel et al. 2002; Guha, Lunn et al. 2003; Zhao and Pothoulakis 2003). Moreover, it has been shown that NTS can transactivate the EGF receptor and therefore the strong oncogenic downstream pathways (Hassan, Dobner et al. 2004; Amorino, Deeble et al. 2007). Furthermore, the oncogenic effects of NTS in vitro were inhibited by the use of specific antagonist of NTSR1, SR48692. Administration of exogenous NTS increases significantly the size, weight and DNA synthesis of xenografts tumors implanted in nude mice (Yoshinaga, Evers et al. 1992; Iwase, Evers et al. 1997). Conversely SR48692 decreased significantly tumor growth (Iwase, Evers et al. 1997; Maoret, Anini et al. 1999). At last, in humans recent publications showed that tumor cell expression of NTSR1 could be a pejorative prognostic factor for breast adenocarcinoma and for head and neck squamous cell carcinoma (Shimizu, Tsukada et al. 2008; Dupouy, Viardot-Foucault et al. 2009).

A recent preliminary work of our team, suggested that the NTSR1 was a prognostic marker in a selected population of patients with NSCLC treated by surgery: we found that among patients with stage I primary pulmonary adenocarcinoma (the histological subtypes nowadays more common in western countries) treated by lobectomy and nodal dissection, expression of NTSR1 was an independent predictor of worse long-term survival (Alifano, Souaze et al. 2010).

In the present study, we addressed the question of whether NTSR1 could be a useful prognostic marker in patients with more advanced but operable lung adenocarcinoma treated in a multimodality setting.

Materials and Methods

Patients and tissue specimens for NTSR1 immunohistochemistry

We studied a population of consecutive patients operated for stage II and III lung adenocarcinoma in the Thoracic Surgery Dpt of the Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France between June 15, 2001 and December 2005. The population operated between June 15, 2001 and May 15, 2002 has been studied in two previous studies, concerning the occurrence of post-operative pneumonia and the prognostic significance of pre-resection C-reactive protein, respectively. All patients had major lung resection (lobectomy or pneumonectomy and nodal dissection) in a curative intent. All had macroscopically and microscopically complete resections. Perioperative management remained similar along the whole study time.

Patients' clinical records were retrospectively reviewed for clinical and etiological parameters. For all the patients, clinical characteristics, treatment procedures, and short-term outcomes were prospectively collected with a standardized case report form, which was initially designed to study the determinants of postoperative respiratory complications. For the purposes of this study, the variables shown in Table 1 were analyzed. In particular, we recorded the following: age, sex, tobacco consumption, indication for lung resection, possible pre-operative chemotherapy, pathologic data including histologic type, pTNM, stage, and presence of lymphatic or vascular tumoral emboli. Information on survival status was obtained from direct patient or family interview or by referring physicians and confirmed by interrogation of civilian registers of birth town.

Immunohistochemistry

For all cases, histologic slides of primary tumors were obtained by paraffin wax embedded tissues. Standard H&E staining was used to ensure the tumoral character of the specimen. Deparaffinized tissue sections (4 μ m) were labeled for NTSR using the avidin-biotin-peroxidase complex method. NTSR1 immunoreactivity was detected using a specific

antibody against the carboxy terminus of NTSR1 (1:100; C-20, Santa Cruz Biotechnology). These sections were then incubated with biotinylated secondary antibody (1:100; Vector laboratories, Inc). The antigen-antibody complex was revealed with avidin-biotinperoxidase complex, according to the manufacturer's instructions for the Vectastain ABC Kit (Vector laboratories, Inc.). All slides were rinsed with TBS-T three times before does each reaction. Staining was done with diamino-benzidine tetrahydrochlorid. All slides were counterstained with hematoxylin. All specimens were scored by an anatomopathologist. NTSR1 staining of cancer cells was scored as positive in the presence of staining cells >10 %. Semi-quantitative evaluation was also performed: 0: no staining; 2: more than 50% of tumor cell showing a positive stain of high intensity; 1: intermediate cases.

Ethics

The study was carried out according to the Declaration of Helsinki principles and in agreement with the French laws on biomedical research. The study was conducted on tissues obtained from surgical specimens obtained between 2001 and 2005 and the experiments were carried out under the current ethical regulations as defined by the Huriet-Sérusclat Act of December 20, 1988. Accordingly, patients or next of kin (in case of deceased patients) were specifically asked for verbal informed consent only.

Statistical analysis

Overall survival rates, excluding operative mortality, were estimated using the Kaplan-Meier method, and survival curves were compared using the Log-rank test. Variables showed to potentially influence survival at univariate analysis with a p value <0.05, were considered for a multivariate analysis using the Cox proportional hazards model.

Results

NTSR1 expression was studied in 207 patients treated by lobectomy or pneumonectomy and full nodal dissection for pathologic stage II-III primary lung adenocarcinomas. Clinical characteristics are detailed in table 1.

NTSR1 expression

NTSR1 positive staining was detected in 49 % of patients (102/207) but it was not detected in normal tissues adjacent to the tumor area. In the NTSR1 semi-quantitative evaluation, scores 0, 1, and 2 were observed in 105, 61 and 41 patients respectively. In the positive case, NTSR1 staining of cancer cells was granular, intracellular, heterogeneous and rarely localized at the plasma membrane (figure 1). Interestingly NTSR1 positive staining was not detected in bronchioloalveolar carcinomas or even in the bronchioloalveolar component of mixed adenocarcinoma. The NTSR1 score was not correlated with sex, age, smoking status, stage of disease and presence of vascular or lymphatic emboli.

According to disease stage, NTSR1 positivity was seen in 35 (47%) and 67 (51%) of patients in stage II and III respectively. Scores 0, 1 and 2 were observed in 39 (53%), 19 (26%), and 16 (21%) in stage II patients, whereas these figures were 66 (49%), 42 (32%), and 25 (19%) in stage III disease.

Impact of NTSR1 expression on survival of patients with stage II-III lung adenocarcinomas

The impact of NTSR1 expression on outcome could be assessed on 197 patients: seven patients were excluded because of postoperative death and for three other patients, survival data were not available. The mean duration of follow up was 35.9 months and the number of deaths occurred in this period was 124/197 (62.9%). In the population, age >65 years, sex, smoking status and presence of vascular or lymphatic emboli were not associated with differences in terms of 5-year survival. There was a significant difference in 5-year

survival according to stage (35.9% (95% CI: 27.86 - 44.72) in stage III versus 54.9% (95% CI: 42.89 - 66.31) in stage II, $p = 0.015$).

In the whole population, high expression of NTSR1 (score 2) was associated with worse 5-year survival as compared with NTSR1 expression scored 0- 1 (13.8% (95% CI: 6.03% - 28.39%) vs 49.6% (95% CI: 41.74% - 57.51%)) $p = 0.00017$ (figure 2 A). Similarly, survival analysis by stage of disease showed that the score 2 of NTSR1 expression was associated with poor prognosis: in the stage II, 5-year survival in patients with NTSR1 score 2 was 22.6% [95% confidence Interval CI 8.07% - 49.2%]) as compared with score 0-1 63.6% [95% CI 49.94% - 75.31%] respectively $p = 0.03$), (figure 2 B). This difference in survival was also observed in stage III (8.7% for score 2 [95% CI 2.42% -26.8%] versus 42.4% for score 0-1 [95% CI 33.08% - 52.21] ($p = 0,0087$) (figure 2 C).

At multivariate analysis, stage of disease ($p = 0.007$) and score of NTSR1 ($p = 0.0034$) were identified as independent predictors of worse overall survival:

Discussion

Lung cancer is the first cause of cancer related death worldwide. Long-term outcome depends mainly on disease stage: with the exception of stage I, results are globally mediocre and a significant percentage of patients die because of metastatic disease and/or local relapse. Identifying patients at high risk of recurrence or death would allow considering new therapeutic strategy at individual level. Thus, new prognostic factors are needed in order to identify patients at high risk of aggressive disease and for whom new therapies may be beneficial.

We have previously reported that expression of NTSR-1 was an independent prognostic factor in a selected population of 139 patients with stage I lung adenocarcinoma treated in three different institutions by lobectomy and nodal dissection only. Therefore the present study aimed to confirm the prognostic value of NTSR1 in a non selected population of lung

adenocarcinomas with more advanced but still operable disease referred to our center for surgical treatment, possibly as part of a multimodality management.

We found that NTSR1 score 2 significantly affected 5-year outcome in stages II-III ($p=0.0034$). High expression of NTSR-1 has been found to be associated to poor survival also in other cancers. Dupouy et al found that NTSR1 expression involving $\geq 80\%$ tumor cells was associated with worse survival in breast cancer (Dupouy, Viardot-Foucault et al. 2009). Similarly, in head and neck cancers, patients with high NTS and NTSR1 expression had a higher rate of distant metastasis [(Shimizu, Tsukada et al. 2008)]. However, in the previous study, the NTSR1 expression was associated with poor prognosis, whereas in the present study this prognostic value is found only with High expression of NTSR-1. Two reasons may explain this difference. First, the methods used to study the NTSR1 expression are different, in the previous study, IHC was made with TMA method (tissue microarrays), whereas in the present study, IHC was performed on paraffin tissue sections. In TMA, analyzed tissues are chosen by the pathologist and represents only a small portion of the tumor, while tissues sections represent a larger tumor and surrounding tissues. The overview of the marking and accordingly the score will be based on different criteria. Secondly, the studied populations in both studies are different, as in the previous study, the population was highly selected: Patients were selected from three institutions with adenocarcinoma treated with lobectomy and lymph node resection without neoadjuvant or adjuvant treatment. In our series, we included all patients operated consecutively with adenocarcinoma, without taking into account the extent of resection and associated treatment, which can have an impact on survival

Moreover, the prognostic role of neurotensin system is probably correlated with its activation rate. In this context, the difference in staining between the different histological subtypes in

our series explains the respective prognostic role of NTSR-1. Within adenocarcinomas, NTSR1 staining was never detected in bronchoalveolar subtypes or in the bronchoalveolar component of mixed adenocarcinoma but it was often detected in its invasive compartment, suggesting a role favoring tumor invasion and migration: In vitro studies have shown that NTS is capable of modulating the migratory ability of adherent cancer cells of different origins (colon, ductal pancreatic, head and neck squamous cell, breast). In addition, it has been showed that NTSR1 induces and enhances the invasive phenotype in LNCaP and HNSCC tumor cells. Involved mechanisms remain unclear but metalloproteinases are probably involved.

Our results in unselected patients with stage II-III adenocarcinoma treated by surgery in a multimodality setting suggest that NTSR1 is potential marker and/or a pejorative mediator of lung cancer progression.

Conclusion

The NTSR1 expression can be identified as new biomarker for advanced but operable lung adenocarcinome. However, studies of large size are required to confirm the results

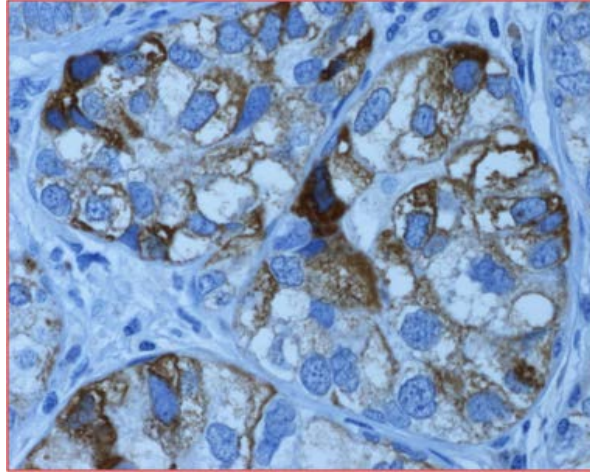
References

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
2. Alberg, A.J., J.G. Ford, and J.M. Samet, *Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 29S-55S.
3. Goldstraw, P., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours*. J Thorac Oncol, 2007. **2**(8): p. 706-14.
4. Mountain, C.F., *Revisions in the International System for Staging Lung Cancer*. Chest, 1997. **111**(6): p. 1710-7.
5. Mountain, C.F. and C.M. Dresler, *Regional lymph node classification for lung cancer staging*. Chest, 1997. **111**(6): p. 1718-23.
6. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. **144**(5): p. 646-74.
7. Carraway, R. and S.E. Leeman, *The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami*. J Biol Chem, 1973. **248**(19): p. 6854-61.
8. Kitabgi, P., R. Carraway, and S.E. Leeman, *Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin*. J Biol Chem, 1976. **251**(22): p. 7053-8.
9. Vincent, J.P., J. Mazella, and P. Kitabgi, *Neurotensin and neurotensin receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(7): p. 302-9.
10. Reinecke, M., *Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone*. Prog Histochem Cytochem, 1985. **16**(1): p. 1-172.
11. Andersson, S., et al., *Inhibition of gastric and intestinal motor activity in dogs by (Gln⁴) neurotensin*. Acta Physiol Scand, 1977. **100**(2): p. 231-5.
12. Baca, I., et al., *Effect of neurotensin on exocrine pancreatic secretion in dogs*. Digestion, 1982. **23**(3): p. 174-83.
13. Wang, H.L. and T. Wu, *G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **36**(1): p. 29-36.

14. Najimi, M., J.M. Maloteaux, and E. Hermans, *Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1*. FEBS Lett, 2002. **523**(1-3): p. 224-8.
15. Guha, S., et al., *Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1*. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2379-87.
16. Przedborski, S., M. Levivier, and J.L. Cadet, *Neurotensin receptors in human meningiomas*. Ann Neurol, 1991. **30**(5): p. 650-4.
17. Reubi, J.C., et al., *Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas*. Int J Cancer, 1999. **82**(2): p. 213-8.
18. Ehlers, R.A., et al., *Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers*. Ann Surg, 2000. **231**(6): p. 838-48.
19. Reubi, J.C., et al., *Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma*. Gut, 1998. **42**(4): p. 546-50.
20. Zhao, D. and C. Pothoulakis, *Rho GTPases as therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases*. Expert Opin Ther Targets, 2003. **7**(5): p. 583-92.
21. Leyton, J., et al., *Neurotensin causes tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in lung cancer cells*. Eur J Pharmacol, 2002. **442**(3): p. 179-86.
22. Ehlers, R.A., et al., *Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(3): p. 704-8.
23. Somai, S., et al., *Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **295**(2): p. 482-8.
24. Yoshinaga, K., et al., *Neurotensin stimulates growth of colon cancer*. Surg Oncol, 1992. **1**(2): p. 127-34.
25. Iwase, K., et al., *Inhibition of neurotensin-induced pancreatic carcinoma growth by a nonpeptide neurotensin receptor antagonist, SR48692*. Cancer, 1997. **79**(9): p. 1787-93.
26. Maoret, J.J., et al., *Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice*. Int J Cancer, 1999. **80**(3): p. 448-54.

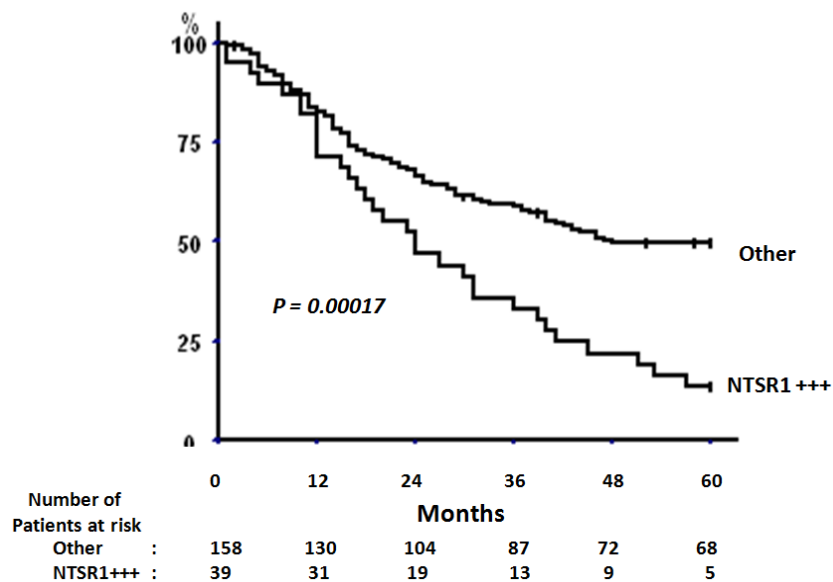
27. Hassan, S., P.R. Dobner, and R.E. Carraway, *Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells*. Regul Pept, 2004. **120**(1-3): p. 155-66.
28. Amorino, G.P., P.D. Deeb, and S.J. Parsons, *Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway*. Oncogene, 2007. **26**(5): p. 745-56.
29. Dupouy, S., et al., *The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4223.
30. Shimizu, S., et al., *Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway*. Int J Cancer, 2008. **123**(8): p. 1816-23.
31. Alifano, M., et al., *Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res. **16**(17): p. 4401-10.
32. Dupouy, S., V. Viardot-Foucault, et al. (2009). "The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression." PLoS One **4**(1): e4223.
33. Shimizu, S., J. Tsukada, et al. (2008). "Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway." Int J Cancer **123**(8): 1816-23.

(Figure 1): NTSR1 expression in patients with primary lung adenocarcinomas. Example of immunohistochemistry for NTSR1 with positive labeling

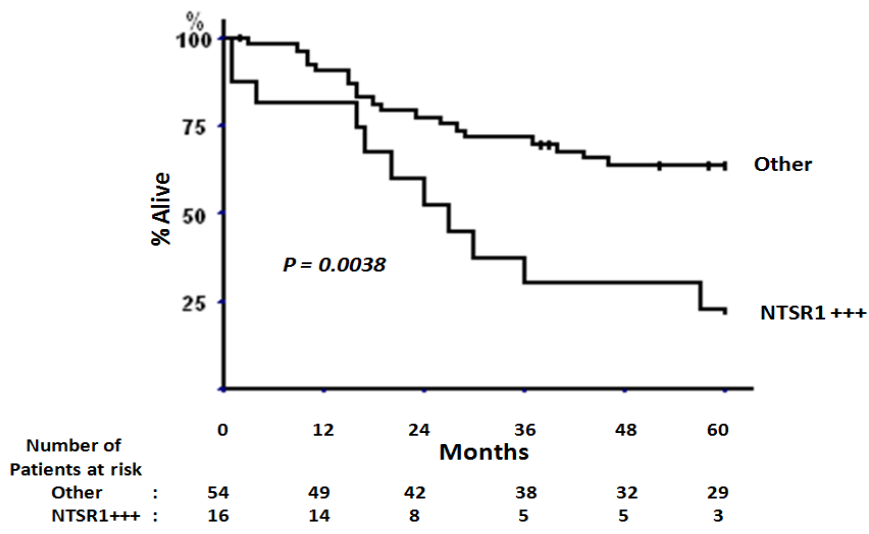


(Figure 2) Overall survival of patients operated for lung adenocarcinoma according to NTSR1 score. Semiquantitative immunohistochemistry evaluation of NTSR1: NTSR1 + + +: strongly positive expression (number of staining cells > 50% and the labeling intensity is high), other: the remaining patients. The number of patients at risk for each period is shown under each curve. A) Survival curve for stage II-III (N = 207), B) Survival curve for stage II (N= 70), C) Survival curve for stage III (N = 127 patients)

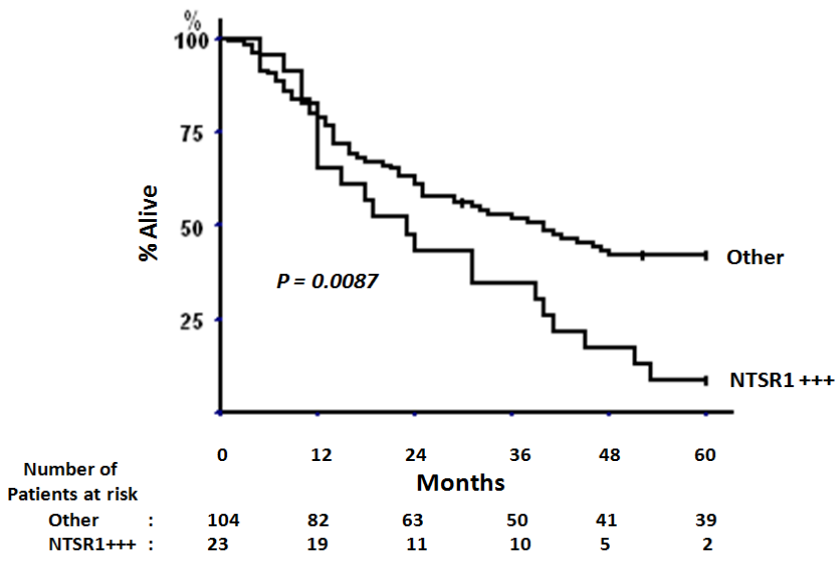
A



B



C



(Table 1) Clinical characteristics of patients

	Stage II (n%) N° = 74	Stage III (n%) N° = 133	Stage II - III (n%) N° = 207
Age mean-SD	59,52	59,51 (±11,57)	59,5 (±11,47)
Sexe			
mean	51 (69)	88 (66)	139 (67)
women	23 (31)	45(34)	67 (33)
Tobacco history (smokers 253)			
Former smokers (stop > 2 month)	33 (45)	54 (41)	87 (42)
Current smokers	26 (35)	35 (26)	61 (29)
Never smoker	5 (7)	28 (21)	33 (16)
Unknown	10 (13)	16 (12)	26 (13)
Resection type			
Lobectomy/bilobectomy	66 (91)	109(82)	175 (85)
Pneumonectomy	7 (9)	24(18)	31 (15)
Stage	74	133	207
Histological type (n = 484)			
Adenocarcinoma (ADNK)	74	132	206
Bronchioloalveolar	-	1	1
Intratumoral orperitumoral neoplastic vascular emboli	35 (47)	69(52)	104 (50)
Intratumoral or peritumoral neoplastic lymphatic emboli	27 (36)	68 (51)	95 (46)
Perioperative chemotherapy	19 (25)	77/130 (59)	96/203 (34))
Perioperative Radiotherapy	6	3/116 (2,59)	9/180 (5)
Postoperative death	2 (2.7)	5 (3.7)	7 (3.4)
Follow-up in month, mean-SD		33	40
Lost at follow-up	2 (2.7)	1	3 (1.4)
Death during follow-up, n (% of patients)	38/70 (54)	86/127 (68)	124/197 (63)
NTSR1 score		108	
0	39 (53)	66 (49)	105 (51)
1	19 (26)	42 (32)	61 (29)
2	16 (21)	25 (19)	41 (20)
NTSR			
positive	35 (47)	67 (51)	102 (49)
negative	39 (53)	66 (49)	105 (51)

Nos résultats précédents ont montré que le système neurotensinergique est dérégulé dans le cancer bronchique. Cette dérégulation est associée à un mauvais pronostic des patients. Cependant, ce résultat n'éclaircit pas le rôle exact du système neurotensinergique dans le cancer bronchique. Il est important de déterminer si l'expression du NTSR1 dans les cellules tumorales est tout simplement un marqueur pronostique associé à d'autres événements biologiques responsables de l'agressivité tumorale, ou si le système neurotensinergique via une régulation auto et/ou paracrine participe activement à la progression tumorale. Dans ce contexte, une première étude réalisée dans l'équipe, suggèrent l'implication du couple NTS-NTSR1 dans l'amplification de la croissance tumorale et l'émergence de métastases. Notre objectif est d'appréhender les mécanismes cellulaires induits par la NTS et associés à l'agressivité tumorale.

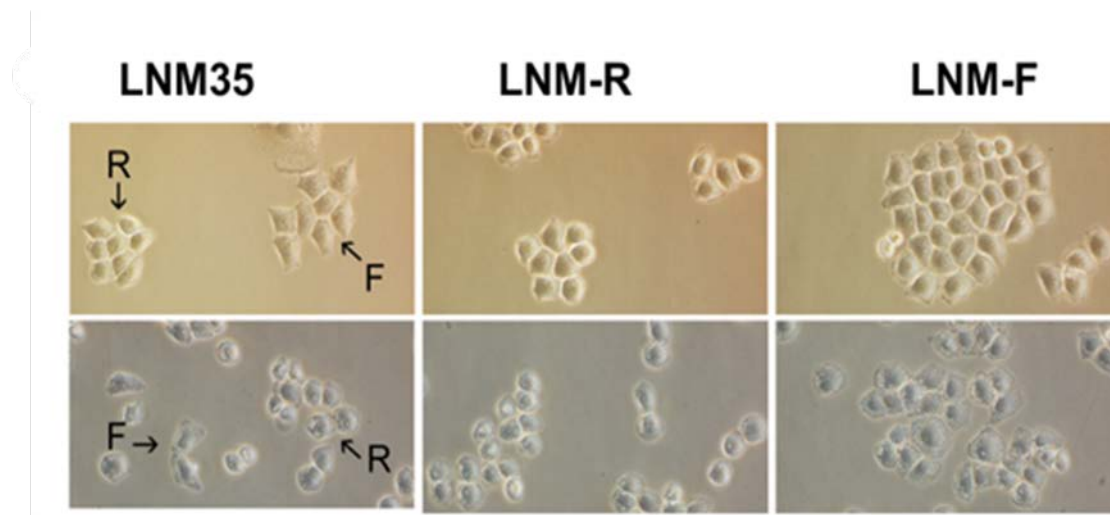
La croissance tumorale contribue à la promotion et à la progression du cancer en provoquant le développement anarchique du tissu et détruisant les tissus sains environnants. Afin d'étudier le rôle de NTS dans ce phénomène, j'ai mené une étude, *in vivo et in vitro*, en utilisant des lignées cellulaires de cancer bronchique exprimant le NTSR1 et/ou la NTS à différents degrés d'expression. Ainsi nous avons confirmé le lien entre l'expression du complexe NTS/NTSR1 et la croissance tumorale, puis nous avons montré l'influence de la NTS sur l'expression des récepteurs aux facteurs de croissances, ainsi que leur activation par la libération de leur propre ligand.

3.1 Résultats

3.1.1 *Modèles cellulaires du cancer bronchique*

La lignée cellulaire (LNM35) (Kozaki et al. 2000) a été sélectionnée à partir de la lignée NCI-H460 (carcinome bronchique à grandes cellules) de façon à obtenir une lignée très agressive. Cela a été fait par xénogreffe de la lignée NCI-H460 chez la souris puis isolement et clonage des cellules métastatiques ganglionnaires (Kozaki et al. 2000). Il a été montré que la lignée LNM35 exprime la NTS et le NTSR1 (Toy Miou Leong et al, 2004). L'observation

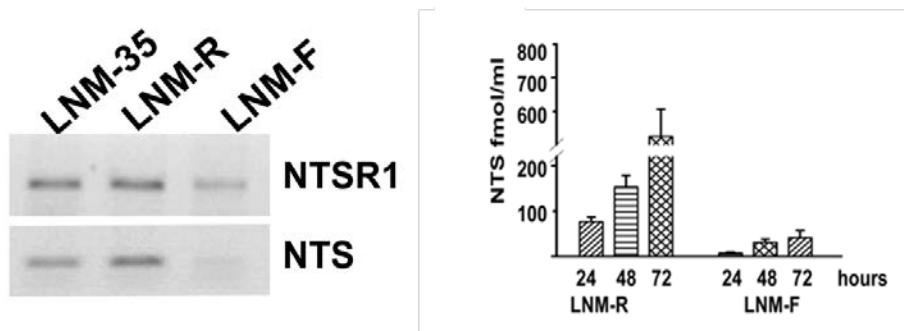
microscopique de la lignée LNM35 montre qu'elle est constituée de deux populations, l'une qui a une morphologie plus bombée d'apparence plus arrondie que nous avons dénommée (Ronded/Ronde) LNM-R et l'autre plus adhérente, plus étalée et aplatie sur la boîte de culture, que nous avons dénommée (Flat/Plate) LNM-F (figure 36). Le pourcentage de distribution de ces deux populations au sein de la lignée LNM35 est 25% pour les cellules LNM-R et 75% pour les cellules LNM-F. Ces deux populations ont été clonées au sein de notre équipe.



(Figure 36) L'observation en microscopie optique montrant la morphologie différente des deux sous-populations cellulaires constituant la lignée LNM35 parentale (gauche), des cellules LNM-R (milieu) et des cellules LNM-F (droite).

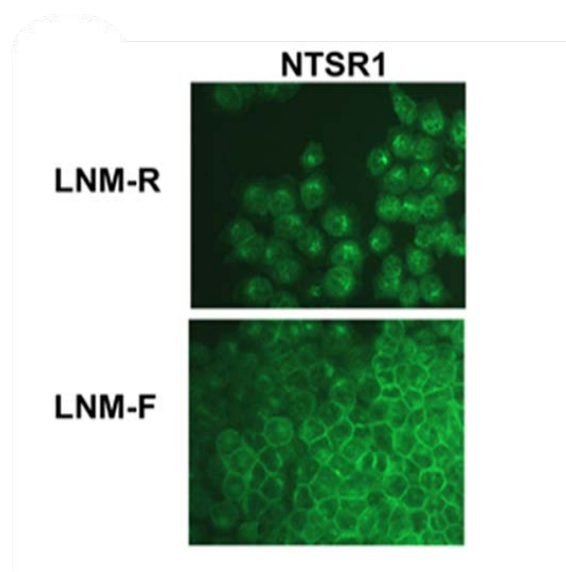
Le calcul des surfaces du noyau et de la cellule montre que le noyau a une surface équivalente entre les deux sous-populations ($5048 \pm 142 \text{ nm}^2$ pour les LNM-R vs $5719 \pm 150 \text{ nm}^2$ pour les LNM-F) mais que le cytoplasme est plus grand dans les cellules LNM-F, ce qui se traduit par rapport nucléo/cytoplasmique de 1/2.3 pour les LNM-R et de 1/3.45 pour les LNM-F

L'analyse de transcrit a montré que la lignée parentale ainsi que les cellules LNM-R expriment la NTS et le NTSR1, alors que la lignée LNM-F exprime le NTSR1 et la NTS à l'état du trace. Ces résultats ont été confirmés par le dosage de NTS par la technique RIA (RadioImmunoAssay). Une quantité importante de NTS s'accumule dans le milieu de culture des cellules LNM-R ($625 \pm 81,8 \text{ fmol/ml}$) en fonction du temps. Dans le milieu de culture des cellules LNM-F, cette quantité est 15 fois moins grande ($40,8500 \pm 16 \text{ fmol/ml}$) (figure 37).



(Figure 37) Expression de la NTS et du NTSR1 dans les lignées LNM-35, et ses sous clones (LNM-F et LNM-R). Gauche; Analyse des transcrit de NTS et de NTSR1 à partir des linges LNM-R, LNM-F et LNM-35. Droite; Dosage de NTS par technique RIA à partir des milieux conditionnés des cellules LNM-F et LNM-R extraits à 24h, 48h et 72h.

L'étude de localisation de NTSR1 par l'immunocytochimie a montré que celui-ci s'accumule à l'intérieur des cellules confirmant l'activation du récepteur par son ligand. En absence de celui-ci, le NTSR1 se localise principalement à la membrane plasmatisque comme dans les cellules LNM-F (figure 38).

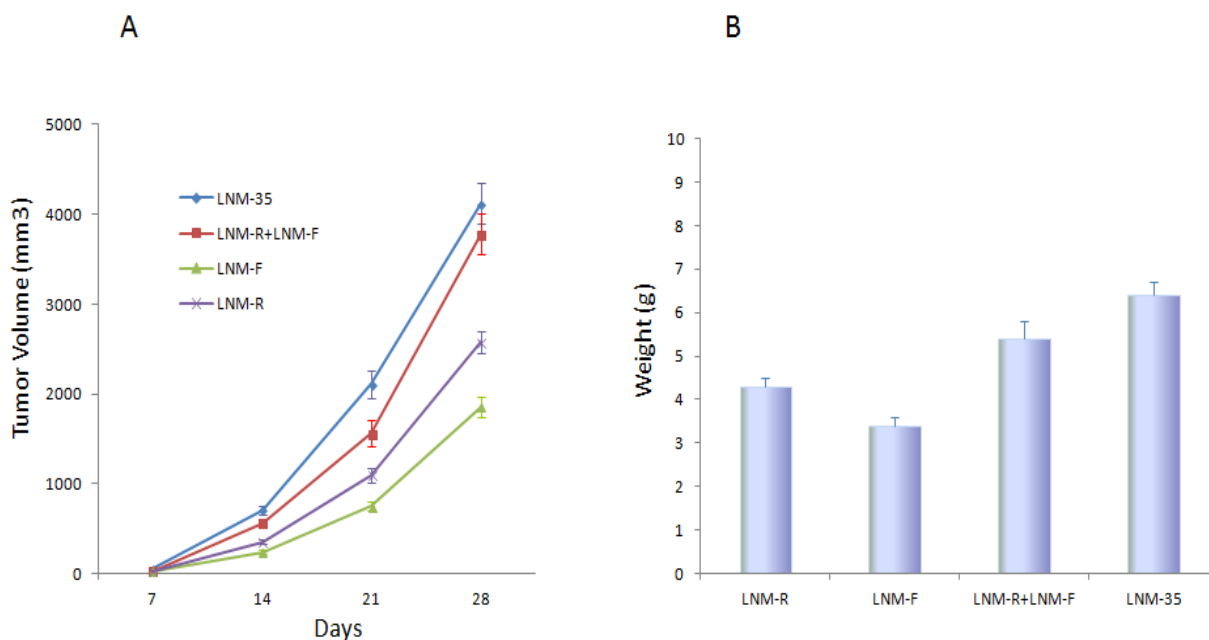


(Figure 38) Localisation des récepteurs NTSR1 dans les lignées LNM-F et LNM-R déterminée par Immunocytochimie.

3.1.2 Tumeurs expérimentales, rôle du complexe NTS-NTSR1 favorisant la progression tumorale.

3.1.2.1 Coopération cellulaire induisant l'amplification de la croissance tumorale

Des souris nues ont été injectées en sous-cutanée par les cellules LNM-35, LNM-F, LNM-R, ou un mélange de cellules cultivées ensemble préalablement pendant 48h. Le volume de la tumeur a été mesuré toutes les semaines et les souris ont été sacrifiées à j28. Les tumeurs induites par l'injection des cellules LNM-35 ont montré une vitesse de croissance supérieure à celle induites par les cellules LNM-F et LNM-R. Ainsi, le volume et le poids finaux des tumeurs générées par l'injection de LNM-35 (volume $4122 \pm 233 \text{ mm}^3$, poids $6.4 \pm 0.3 \text{ g}$) sont deux fois plus gros que ceux induits par les cellules LNM-F (volume $1858 \pm 114 \text{ mm}^3$, poids $3.4 \pm 0.2 \text{ g}$) mais aussi plus gros que ceux de LNM-R (volume $2582 \pm 124 \text{ mm}^3$, poids $4.3 \pm 0.2 \text{ g}$). Cette différence de croissance reflète la différence dans le temps de doublement des tumeurs entre les différentes populations cellulaires. Ainsi, ce temps était dans les cellules LNM-35, LNM-R et LNM-F est 2.45, 2.6, 2.7 jours respectivement ce qui a permis aux tumeurs générées par ces cellules de doubler de 11, 10.36, et 9.89 fois respectivement pendant 27 jours. En revanche, le mélange des cellules LNM-R et LNM-F a entraîné des tumeurs de tailles et de poids similaires à ceux induits par LNM-35 ($3782 \pm 233 \text{ mm}^3$, poids $5.4 \pm 0.4 \text{ g}$) (figure 39) avec le même temps de doublement (2.47 jours) Ces résultats suggèrent une coopération entre les cellules LNM-F et LNM-R permettant de favoriser la croissance tumorale.

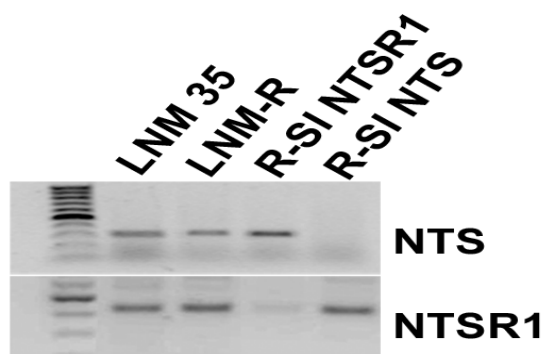


(Figure 39) *Coopération cellulaire favorisant la croissance tumorale. A) Taux de croissance des tumeurs expérimentales induites par les cellules LNM-35 par rapport aux cellules LNM-R et LNM-F et leur mélange, $6 \cdot 10^6$ cellules sont injectées dans 15 souris nues pour chaque lignée et les volumes tumoraux ont été mesurés toutes les semaines. Les souris ont été sacrifiées à J28. B) Poids des tumeurs générées par les lignées cellulaires précédentes.*

Notre hypothèse est que la NTS pourrait favoriser la croissance tumorale des cellules LNM-R par rapport aux cellules LNM-F qui ne l'exprime pas. De plus, une coopération entre les cellules LNM-R et LNM-F pourrait se mettre en place lorsque les cellules sont mélangées grâce aux boucles de régulations autocrines ou paracrines ou même endocrine de la NTS. Donc, dans les étapes suivantes, nous avons évalué cette hypothèse.

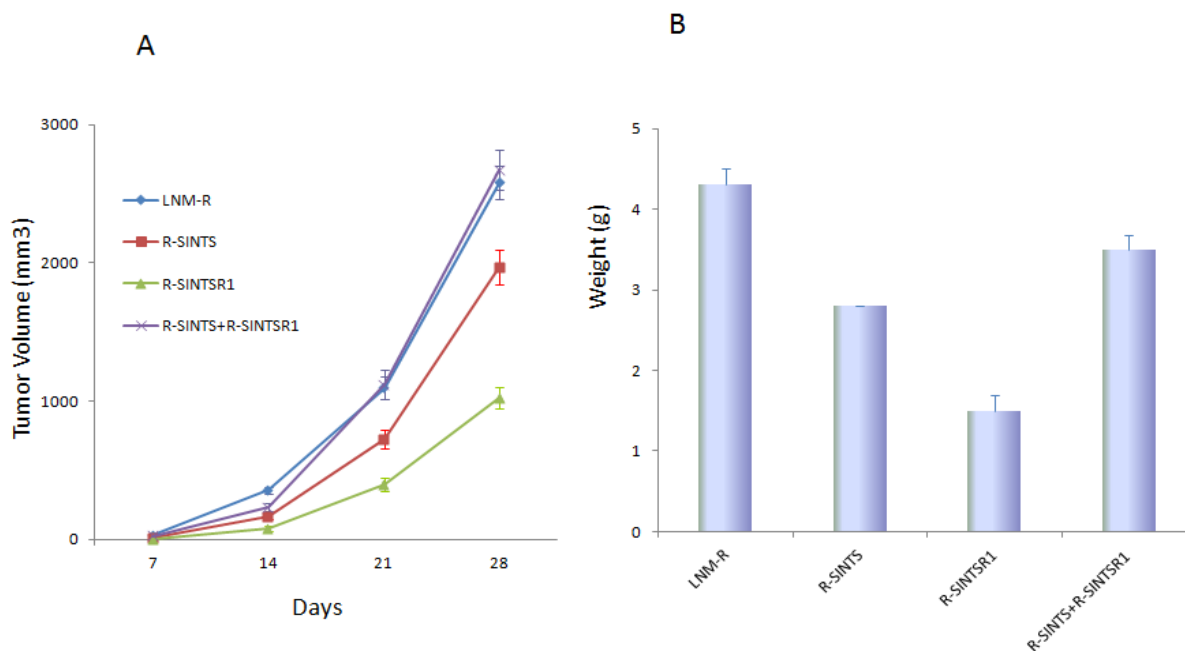
3.1.2.2 Implication du NTS-NTSR1 dans la promotion de la croissance tumorale.

Afin d'évaluer le rôle du complexe NTS-NTSR1 dans la croissance tumorale, nous avons aboli l'expression de la NTS ou du NTSR1 dans la sous population LNM-R par l'approche d'un plasmide exprimant de manière stable un ARN interférant pour la NTS ou le NTSR1. L'analyse de transcrit pour NTSR1 dans les cellules R-SINTSR1 a montré que son niveau a été réduit de façon importante alors que celui de la NTS était similaire à celui des LNM-R et LNM-35. Par contre, dans les cellules R-SINTS, le transcrit NTS a été supprimé tandis que le niveau de NTSR1 était similaire à celui observé dans les cellules LNM-R et LNM-35 (figure 40).



(Figure 40) Analyse des transcrits pour NTS et NTSR1 à partir des cellules, LNM-35, LNM-R, R-SINTS et R-SINTSR1.

Dans le but d'examiner le rôle du complexe NTS/NTSR1 dans la croissance tumorale, nous avons refait les expériences décrites dans le paragraphe précédent en utilisant les cellules R-SINTS, et R-SINTSR1. Les volumes finaux des tumeurs induites par les cellules R-SINTS et R-SINTSR1 étaient respectivement de 24% et de 60% inférieure à ceux induits par la lignée LNM-R. De même, le temps de doublement de tumeurs induites par ces cellules est plus long que celui des cellules LNM-R (2.7 jours pour R-SINTS, 3 jours pour R-SINTSR1). En revanche, lorsque nous avons mélangé les R-SINTS et les R-SINTSR1 (50/50), les tumeurs générées par ce mélange avaient des volumes et des poids finaux similaires à ceux obtenus par LNM-R (volume $2674 \pm 142 \text{ mm}^2$ vs $2581 \pm 124 \text{ mm}^2$, poids 3.5 ± 0.17 vs 4.3 ± 0.2) ainsi qu'un temps de doublement égal entre le mélange et les cellules LNM-R (2.6 jours) (figure 41). Ces expériences suggèrent une implication de la NTS dans la croissance tumorale.

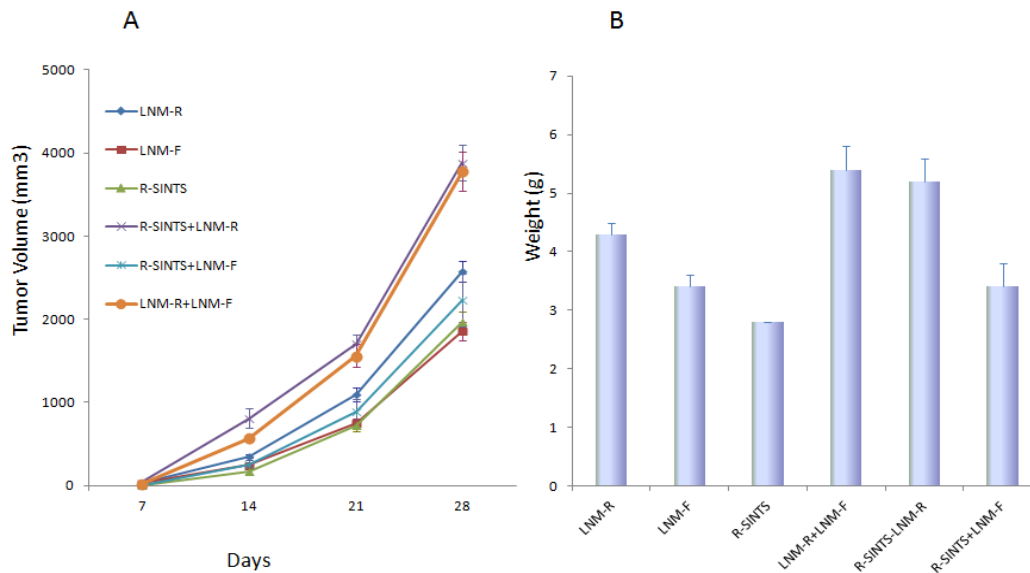


(Figure 41) Implication du complexe de NTS/NTSR1 dans la croissance tumorale. A) Taux de croissance des tumeurs expérimentales induits par les cellules LNM-R, R-SINTS, R-SINTSR1, et leur mélange. B) poids des tumeurs expérimentales générées par les cellules LNM-R, R-SINTS, R-SINTSR1, et le mélange R-SINTS/R-SINTR1.

3.1.2.3 Régulation auto-paracrine ou endocrine de la NTS favorise la croissance tumorale

La contribution de l'addition d'une boucle autocrine et paracrine de la NTS sur la croissance tumorale a été étudiée expérimentalement en réalisant des mélanges cellulaires présentant les deux ou l'absence de régulations de la NTS (figure 42). Le premier cas est présenté par le mélange LNM-R + LNM-F et le mélange LNM-R + R-SINTS. Ces mélanges présentent après 27 jours une augmentation de croissance tumorale d'environ deux fois plus grande comparée aux cellules xénogreffées seules. Cette augmentation de la croissance se traduit par des modifications dans le temps de doublement des tumeurs, qui passe de 2.6 jours pour LNM-R et de 2.73 pour les cellules LNM-F et R-SINTS à 2.5 jours pour les mélanges cellulaires composés de ces cellules (décrites ci-dessus). Cette modification de temps de doublement a permis aux cellules de se multiplier de 10.38, de 9.89, et 11 fois pour les cellules LNM-R, LNM-F et R-SINTS, et les mélanges cellulaires LNM-R-R-SINTS respectivement. Ces deux mélanges présentent l'addition d'une régulation autocrine à la NTS (LNM-R), et paracrine avec les cellules R-SINTS et LNM-F qui sont activées par la NTS provenant des cellules LNM-R. Dans le cas contraire où le mélange est composé de

xénogreffes de cellules n'exprimant pas la NTS comme R-SINTS, LNM-F, et le mélange R-SINTS/LNM-F, nous avons observé une croissance tumorale plus lente et un temps de doublement des tumeurs pour ces cellules plus long (2.7 jours pour R-SINTS et LNM-F et leur mélange). A noter que la lignée LNM-R présente une croissance statistiquement supérieure de 20% ($p < 0.01$) par rapport à ce dernier groupe.

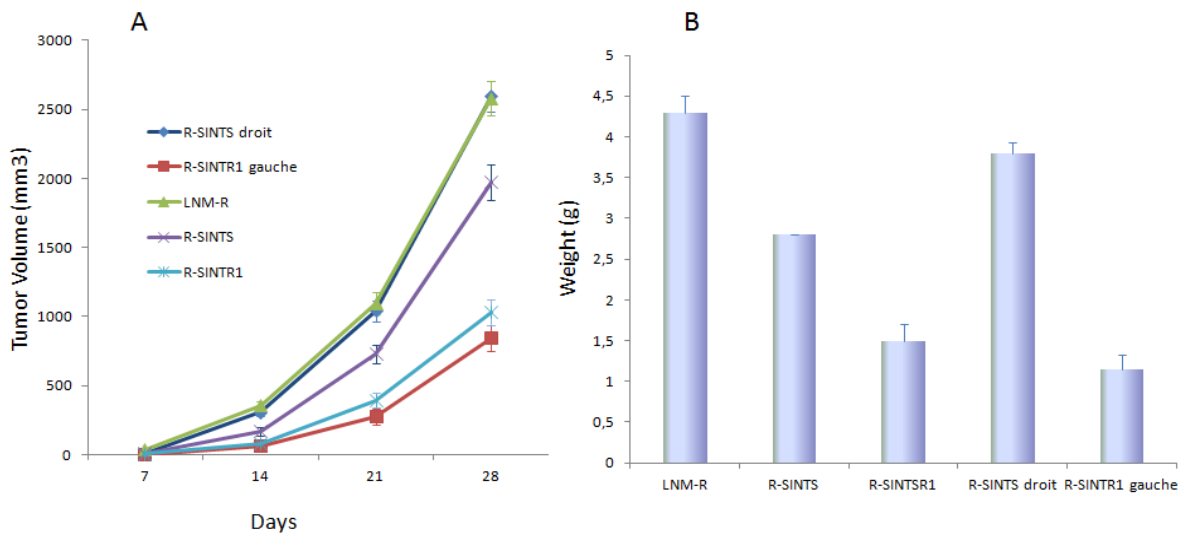


(Figure 42) Régulation paracrine/autocrine du complexe NTS-NTSR1 favorise la croissance tumorale. A) Vitesse de croissance des tumeurs expérimentales issues des cellules LNM-R, LNM-F, R-SINTS, et les mélanges cellulaires de LNM-R/R-SINTS, LNM-F/R-SINTS. B) Poids des tumeurs expérimentales générées par les cellules précédentes.

Globalement, ce résultat suggère que lorsque la NTS n'est pas exprimée dans la tumeur, il n'y a pas de coopération entre les cellules, et la croissance de la tumeur est plus lente. La présence d'une régulation autocrine de la NTS augmente la croissance tumorale qui s'amplifie encore lorsqu'elle est associée à une régulation paracrine.

Dans le but d'explorer l'effet de la régulation systémique de la NTS sur la croissance tumorale, les cellules R-SINTS ont été injectées au niveau du flanc droit (right) de la souris, tandis que des cellules R-SINTSR1 ont été injectées au niveau du flanc gauche (left) de la même souris (figure 43). Les tumeurs induites à partir de la lignée R-SINTS-right avaient une taille et un poids similaires aux tumeurs induites à partir des cellules LNM-R (2593 ± 108 mm, et poids 3.8 ± 0.13 g vs 2581 ± 124 mm, 4.3 ± 0.2) mais supérieure à celles générées chez des souris injectés uniquement par R-SINTS (2593 ± 108 mm, et poids 3.8 ± 0.13 g vs

1970±127mm, 2.8±0.01). Par contre, la taille des tumeurs générées à partir de la lignée R-SINTSR1-left restaient de très petite taille équivalente à celles observées chez les souris injectées uniquement avec les cellules R-SINTSR1 (volume 845±92, poids 1.15±0.17g vs 1028±77, 1.5±0.2g). Ces résultats suggèrent que la NTS circulante produite par les tumeurs R-SINTSR1 augmente la croissance des tumeurs R-SINTS implantées dans le flanc controlatéral.



(Figure 43) Régulation endocrine de la NTS favorisant la croissance tumorale. A) Taux de croissance de tumeurs expérimentales induites par l'injection des cellules R-SINTS dans le flanc droit et les cellules R-SINTSR1 dans le flanc gauche des mêmes souris nudes par rapport aux cellules R-SINTS, R-SINTSR1 et LNM-R injectées seules. B) poids des tumeurs expérimentales générées par les cellules L-NMR, R-SINTS, R-SINTSR d'après les conditions précédentes.

3.1.3 Implication du système neurotensinergique dans la prolifération cellulaire-mécanismes associés, étude *in vitro*,

3.1.3.1 Promotion de la prolifération cellulaire induite par le complexe NTS-NTSR1

Nos expériences précédentes ont montré que le complexe NTS-NTSR1 est un facteur favorisant la croissance tumorale. Afin de comprendre les mécanismes contribuant à ce phénomène, nous avons étudié la croissance cellulaire des lignées LNM-R, LNM-F, SINTS, SINTSR1 *in vitro*. Pour rappel, le statut d'expression NTS-NTSR1 est présenté dans le tableau 13.

Tableau 13 : Statut d'expression NTS-NTSR1 dans les différentes lignées cellulaires

	NTS	NTSR1
LNM-35	+	+
LNM-R	+	+
LNM-F	-	+
R-SINTS	-	+
R-SINTSR1	+	-

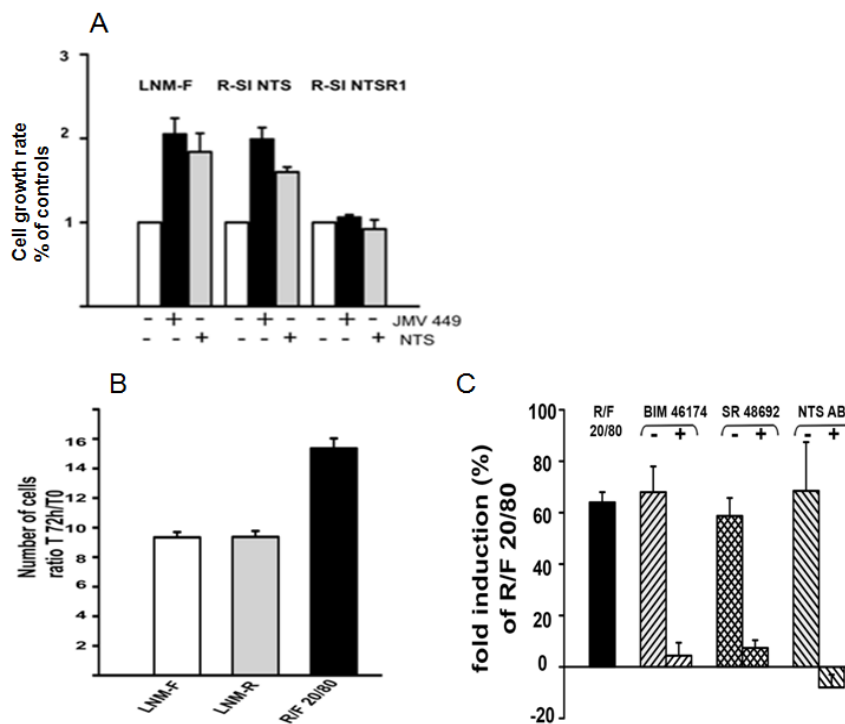
Afin de confirmer le rôle de la NTS dans la croissance cellulaire, les cellules LNM-F, R-SINTS et R-SINTSR1 ont été traitées par la NTS ou par son agoniste JMV449 faiblement dégradable pendant 5 jours. Plusieurs concentrations de JMV449 ou de NTS (de 10^{-7} à 10^{-10} M) ont été testées. La meilleure réponse a été observée pour la concentration 10^{-8} M de JMV449 et de NTS avec une augmentation de la croissance cellulaire de 90% dans les LNM-F et de 60 % pour les R-SINTS traitées par rapport aux cellules non traitées. Par contre, aucune différence dans la prolifération n'a pas été observée lorsque les cellules R-SINTSR1 traitées par la NTS ou le JMV449 (figure 44A).

En parallèle, dans le but d'étudier l'impact des régulations autocrines et paracrines à la NTS sur la croissance cellulaire, nous avons, comme dans les expériences *in vivo*, mélangé les cellules LNM-R et LNM-F. Nous avons choisi le pourcentage de 20/80 % de LNM-R/LNM-F car ce pourcentage correspond à la proportion des deux sous-populations rondes et aplatie, de la lignée parentale LNM-35. Tout d'abord, nous avons comparé le taux de croissance cellulaire des cellules LNM-R, et LNM-F et du mélange LNM-R/LNM-F-20/80 (R/F-20/80%). Le même nombre de cellules a étéensemencé pour les trois conditions à J0 et le taux de croissance est estimé après 72h (J3) dans culture à 0.1% de sérum. Dans ces conditions on observe que le mélange cellulaire présente une croissance cellulaire de 65% supérieure à celle des lignées LNM-R et LNM-F ensemencées seules (figure 44B).

La coopération entre les deux lignées cellulaires LNM-R et LNM-F observée dans les tumeurs a pu être retrouvée *in vitro*. Pour confirmer l'implication du système neurotensinergique dans la promotion de la croissance cellulaire du mélange R/F-20/80, nous avons fait une expérience en présence ou absence des inhibiteurs spécifiques qui ciblent l'activation du système neurotensinergique. Ainsi, l'inhibiteur spécifique des protéines G hétérotrimérique, le BIM46174, l'antagoniste spécifique de NTSR1, le SR4692 et un anticorps neutralisant anti

NTS, inhibent totalement l'amplification de la croissance cellulaire observée dans le mélange (R/F-20/80) (figure 44C).

Ces données montre une contribution de la NTS dans la croissance cellulaire des cellules bronchiques et suggèrent qu'une communication intercellulaire, par l'intermédiaire de la régulation paracrine de NTS, s'installe et permettant la promotion de la croissance cellulaire.

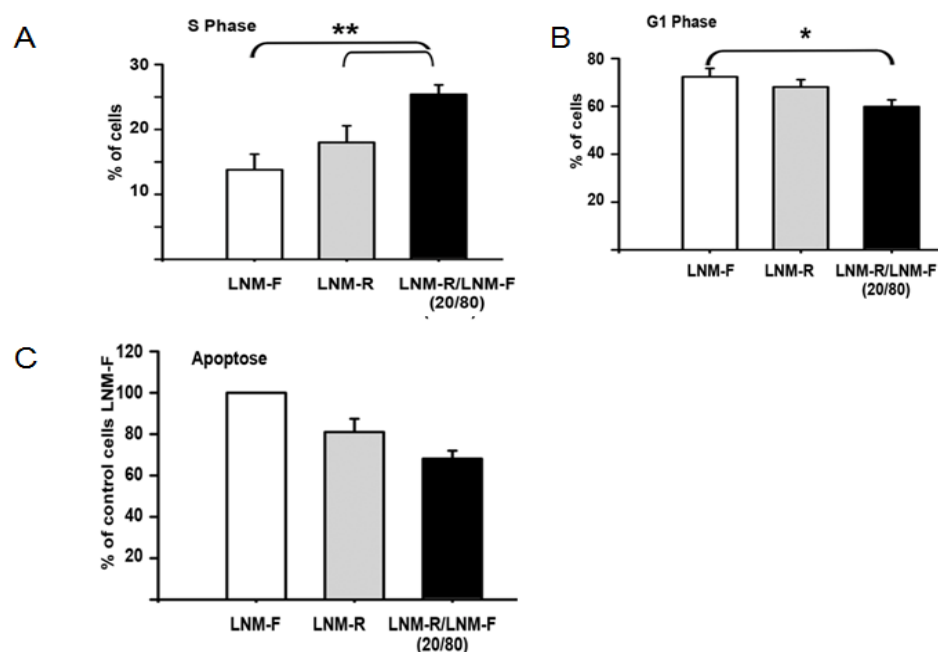


(Figure 44) Complexe NTS-NTSR1 favorise la prolifération cellulaire. A) Ratio de nombre des cellules LNM-F, R-SINTS, et R-SINTSR1 traitées par NTS $10^{-8}M$ ou JMV449 $10^{-8}M$ pendant 5j par rapport à leur nombre initial ensemencé. B) Ration de nombre des cellules LNM-R, LNM-F et leur mélange R/F-20/80 à 72h par rapport à leur nombre initiale ensemencé, nombre d'expériences =10. C) Comparaison de l'effet d'amplification de la croissance cellulaire dans le mélange R/F-20/80% à celui avec le traitement par BIM46174 ($10^{-6}M$), SR48692 ($10^{-6}M$) ou par anticorps anti-NTS (1/200) pendant 48h

3.1.3.2 Propriétés prolifératives et anti-apoptotiques du couple NTS-NTSR1

Les résultats obtenus montrent que le couple NTS-NTSR1 favorise la croissance cellulaire. Cependant, il est décrit que la NTS agit sur la prolifération et la survie cellulaire dans des cellules cancéreuses de différentes origines. Nous avons donc souhaité caractériser ces effets dans les cellules Nous avons étudié, par la technique du FACS, l'apoptose et le cycle cellulaire dans les cellules LNM-R, LNM-F et du mélange R/F-20/80. L'étude de cycle

cellulaire montre que le taux des cellules en phase S du mélange R/F-20/80 est de 12 % supérieur à celui des cellules LNM-F (figure 45A). En revanche, le pourcentage des cellules en phase G1 du mélange R/F-20/80 est 20 % inférieur à celui des cellules LNM-F (figure 45B). Ces données sont en faveur d'un effet de la NTS sur la prolifération cellulaire. La comparaison du taux des cellules en apoptose entre les LNM-R, LNM-F, et le mélange R/F-20/80% a montré que ce dernier présente un pourcentage des cellules apoptotiques 30% inférieur à celui des cellules LNM-F (figure 45C).



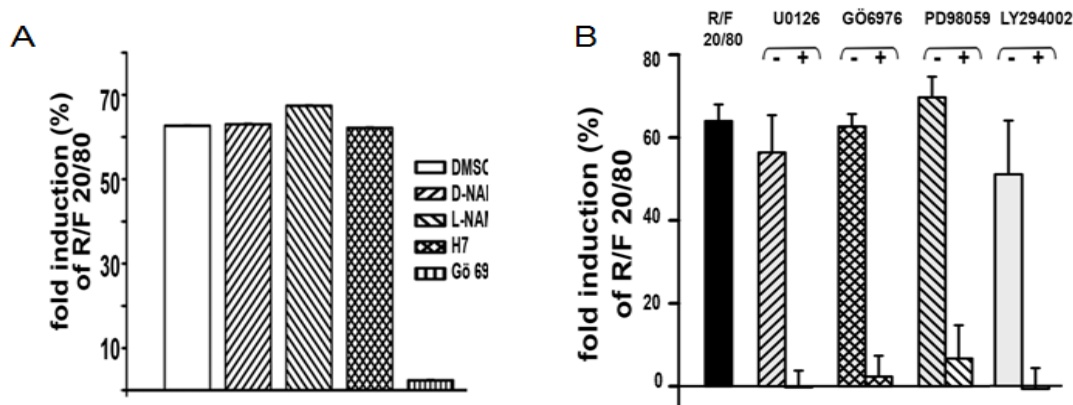
(Figure 45) Propriétés prolifératives et anti-apoptotiques de complexe NTS-NTSR1 étudiées par FACS. Taux des cellules LNM-R, LNM-F, et du mélange 20/80% en phase S (A) et G1(B) du cycle cellulaire, après 72h de l'encensement. (C) Taux des cellules LNM-R et le mélange cellulaire 20/80% en apoptose par rapport à celui dans les cellules LNM-F.

3.1.3.3 Voies de signalisation impliquées en aval du NTSR1

Les données de la littérature sur le rôle prolifératif de NTS sont riches et montrent que la NTS est capable d'activer plusieurs voies, en particulier la voie de protéine kinase C (PKC). D'autres effecteurs impliqués en aval de NTS sont le $[Ca^{2+}]_i$ et Nos. Donc, afin d'examiner les voies de signalisations activées en aval du NTSR1 contribuant à l'amplification de la croissance cellulaire, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologique. La figure 46 A montre que l'amplification de la croissance cellulaire du mélange R/F-20/80

est inhibée par un inhibiteur de PKC, alors que les inhibiteurs de PKA et de NOs sont sans effets.

Parallèlement, nous avons étudié le rôle probable de PI3K et MAPK en utilisant les inhibiteurs de phosphoinositide 3-kinase PI3K (LY 294002 10^{-7} M), et de MAPK (PD98059 et U0126 10^{-6} M) (figure 46B). Le traitement des cellules par ces inhibiteurs aboli totalement l'amplification de la croissance cellulaire induite par NTS. Ces résultats renforcent ceux obtenus par le FACS et plaident en faveur d' un rôle prolifératif et antiapoptotique de NTS.



(Figure 46) Voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire en aval du NTSR1. A) Comparaison de l'effet d'amplification de la croissance cellulaire dans le mélange R/F-20/80 à celui avec le traitement par inhibiteur de PKA (H7 ; 10^{-5} M), de PKC (G6976 ; 10^{-6} M) et de NOs (D-NAME/L-NAME ; 10^{-5} M) pendant 48h. B) Comparaison de l'effet d'amplification de la croissance cellulaire dans le mélange R/F-20/80 à celui avec le traitement par inhibiteur de PI3K (LY 294002 10^{-7} M), et de MAPK (PD98059 et U0126 10^{-6} M) pendant 48h

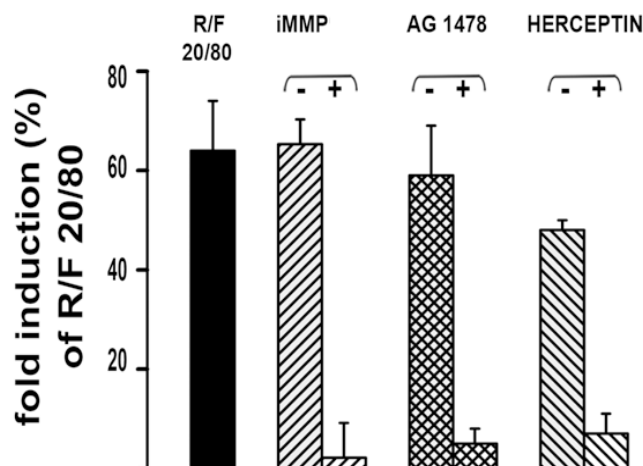
3.1.4 Interrelation entre les systèmes HERs et NTSR1

3.1.4.1 Implication de la famille d'HERs dans l'effet prolifératif du complexe NTS-NTSR1

Les voies de signalisation activées et nécessaires pour engendrer l'amplification de la croissance tumorale semblent dépasser largement celles associées classiquement aux récepteurs couplés aux protéines G. Nous nous sommes donc orientés vers la relation entre le système neurotensinergique et la famille des récepteurs aux facteurs de croissance (HERs): Notre réflexion est justifiée par le fait que les protéines MAPK, et PI3K sont activées en aval de NTSR1. Ces voies sont également impliquées dans les voies de signalisation mitogénique

déclenchées par la famille HERs. De plus, les données de la littérature montrent que la NTS est capable d'activer l'EGFR via l'activation successive de PKC et de la MMP9 qui libère des pro-ligands membranaires aboutissant à une activation autocrine d'EGFR. Devant ces données, nous avons testé un rôle éventuel des récepteurs HERs dans cet effet.

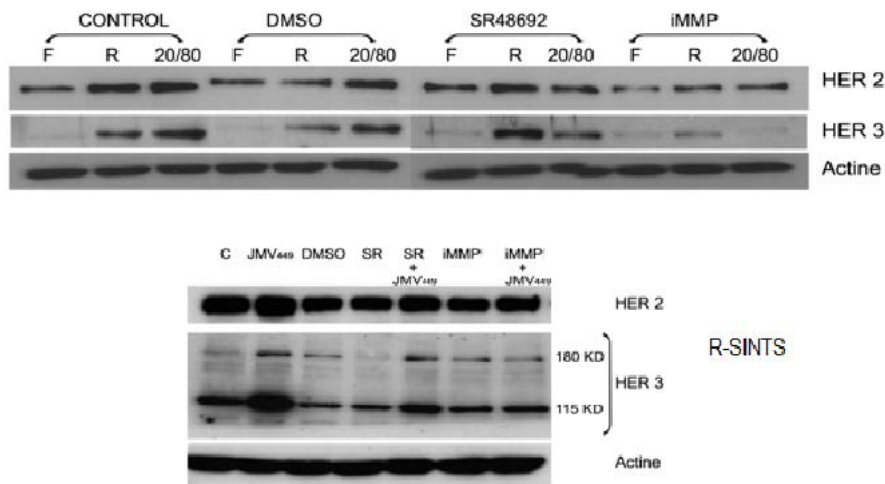
Après avoir vérifié que les cellules LNM-F et LNM-R, expriment les récepteurs EGFR, HER2 et HER3, en analysant les transcrits, nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs assez spécifiques de ces récepteurs, l'AG1478 (inhibiteur d'EGFR), et l'herceptine (anticorps spécifique anti-HER2), sur l'amplification de la croissance cellulaire observée dans le mélange R/F-20/80% (figure 47). Les mêmes traitements n'ont pas d'effet sur le taux de croissance des cellules LNM-R et LNM-F. Ce résultat suggère une contribution des récepteurs EGFR et HER2 dans l'induction de la croissance cellulaire par la NTS. Comme il est décrit ci-dessus, l'un des mécanismes pouvant expliquer cette transactivation est l'activation de matrice métalloprotéinases (MMP). Nous avons donc testé cette possibilité en traitant les cellules LNM-R, LNM-F et leur mélange R/F-20/80% avec un inhibiteur de MMP (Calbiochem 444278 ; inhibiteur MMP9, MMP1, et MMP13) (figure 47). L'utilisation de cet inhibiteur a aboli l'effet amplificateur de la croissance cellulaire du complexe NTS-NTSR1 et suggère un rôle déterminant de MMP dans la transactivation de la famille d'HERs.



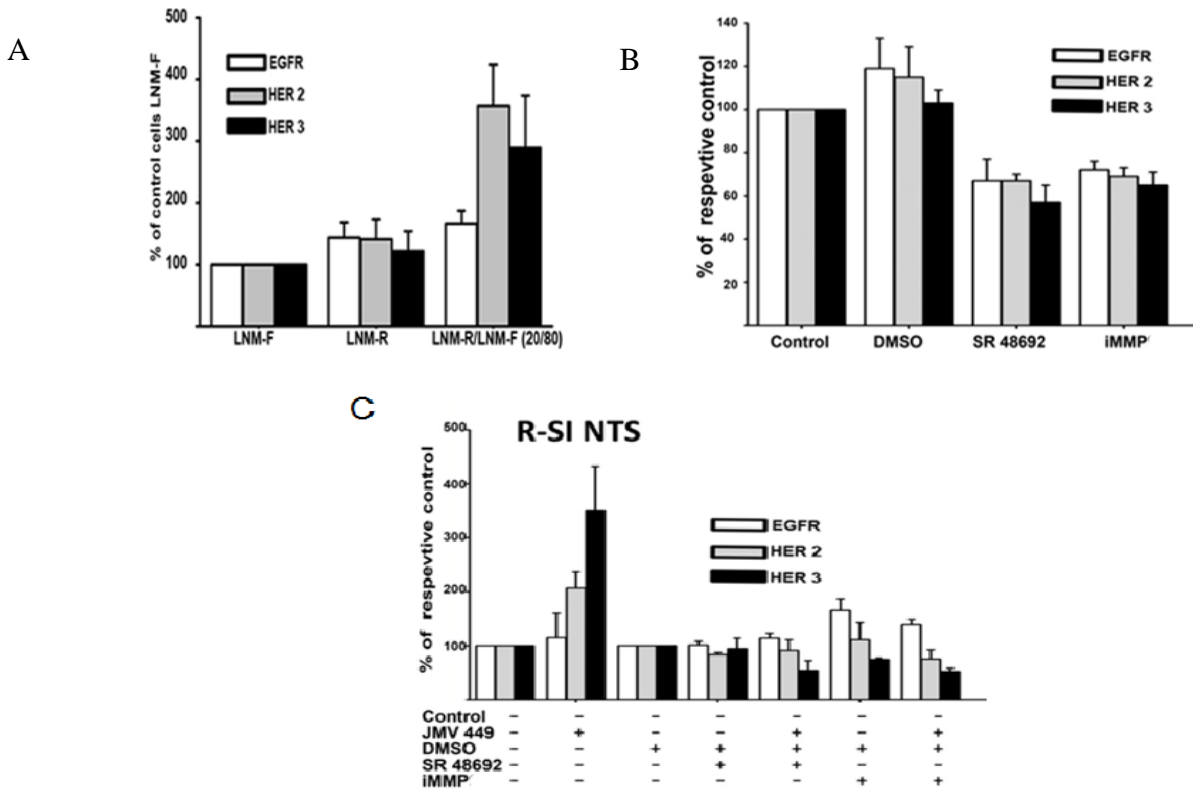
(Figure 47) Implication des récepteurs de la famille HERs dans l'amplification de la croissance tumorale induite par le complexe NTS/NTSR1. Inhibition de l'effet de l'amplification de la croissance cellulaire après traitement du mélange cellulaire R/F 20/80% par AG1478 ($10^{-5}M$) ou l'herceptine, ou par inhibiteur de MMP ($25 \cdot 10^{-9}M$).

3.1.4.2 Modification de l'expression basale des HERs induite par la stimulation du système neurotensinergique.

Afin de confirmer le rôle du NTS-NTSR1 dans l'activation de la famille HERs, Nous avons analysé par Western Blot le statut des protéines basales et phosphorylées des HERs dans les cellules LNM-R, LNM-F et leur mélange R/F-20/80%. De façon inattendue, cette analyse a montré que le mélange cellulaire R/F-20/80% présente une augmentation du taux de protéines basales d'HERs et en particulier, HER2 et HER3 (Figure 48, 49A). Le niveau total de protéine HER2 et HER3 a augmenté de 350 % et de 300% respectivement dans le mélange R/F-20/80 en comparaison avec le contrôle LNM-R et LNM-F. Par contre l'augmentation de la protéine EGFR était plus modeste dans le mélange R/F-20/80%. La confirmation de l'implication du système neurotensinergique dans l'induction des protéines HERs a été obtenue par l'utilisation du SR48692 qui a aboli cette augmentation (figure 49B). Des résultats similaires ont été obtenus en analysant par Western Blot le niveau des protéines basales dans les cellules R-SINTS traitées ou non par le JMV449. Ainsi, une augmentation importante au niveau des protéines basales HER2 et HER3 (200% et 350% respectivement) et plus modestement de la protéine EGFR a été observé dans les cellules R-SINTS traitées par JMV449 en comparaison avec celles non traitées. L'utilisation de SR48692 a également inhibé cette augmentation (figure 48, 49C).

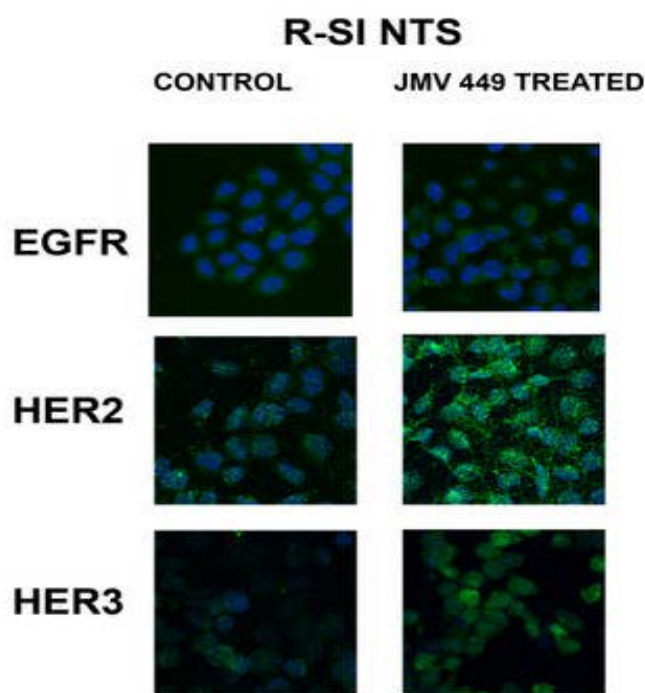


(Figure 48) Exemples de Western Blot HER2 et HER3 pour cellules LNM-R, LNM-F et le mélange R/F-20/80 (haut) et les cellules R-SINTS (bas) traitées par le SR 48693 et par un inhibiteur MMP.



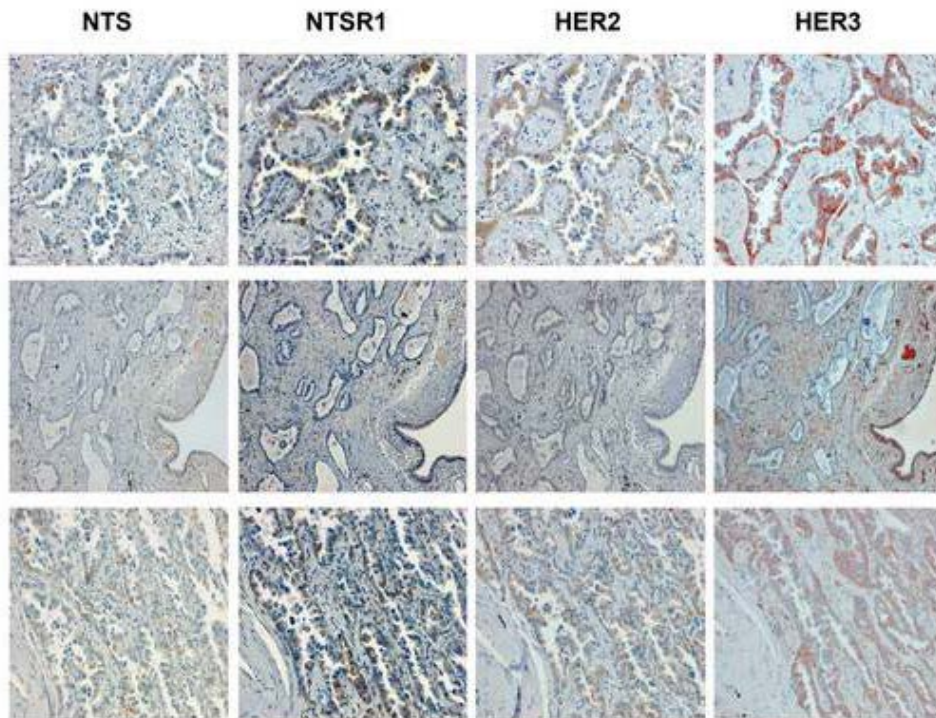
(Figure 49) Statut des protéines HERs basales étudié par Western Blot, dans les cellules LNM-R, LNM-F, leur mélange 20/80 et les cellules R-SINTS. A) histogramme quantitatif représentant le niveau des protéines basales d'HERs dans les cellules LNM-R et le mélange R/F-20/80 par rapport au contrôle LNM-F, B) histogramme quantitatif représentant le niveau des protéines basales dans le mélange R/F-20/80 en présence de SR48692 (10^6M) ou inhibiteur MMP ($25 \cdot 10^{-9}M$) par rapport au contrôle. C) histogramme quantitatif représentant le niveau des protéines basales dans les cellules R-SINTS en présence ou absence SR48692 (10^6M) ou inhibiteur MMP ($25 \cdot 10^{-9}$) par rapport au contrôle.

L'analyse du statut d'expression basale des récepteurs d'EGFR, HER2 et HER3 par immunocytochimie a confirmé nos résultats précédents. Ainsi, l'intensité de marquage des récepteurs d'HER2 et HER3 était clairement plus importante dans les cellules R-SINTS traitées par JM V 449 en comparaison avec celles non traitées. Par contre, l'intensité du marquage du récepteur EGFR a légèrement augmenté après le traitement de ces cellules par JM V 449 (figure 50).



(Figure 50) Immunocytochimie pour EGFR, HER2 et HER3 dans les cellules R-SINTS traitées ou non par JMV449. Augmentation de l'intensité de marquage en particulier pour HER2 (en milieu) et HER3 (en bas) et plus modestement pour EGFR (en haut) après le traitement par JMV449

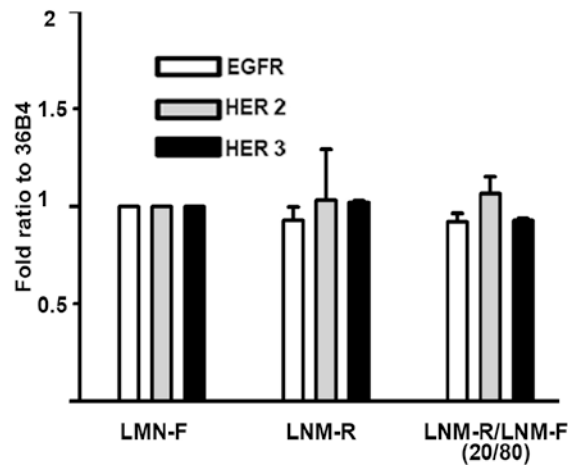
Afin de vérifier si cette augmentation de l'expression des récepteurs EGFR, HER2 et HER3 suite à la stimulation neurotensinergique peut être observée dans les tissus tumoraux humains, nous avons étudié, par immunohistochimie, l'expression de ces récepteurs dans des coupes d'adénocarcinomes bronchiques qui expriment ou non les deux NTS et NTSR1 (n = 3). La sélection de type d'adénocarcinome est justifiée par l'effet que l'expression de NTSR1 aurait une valeur pronostique en terme de survie chez les patients opérés de ce type du cancer mais ainsi car il est le type histologique prédominant. Comme attendu, dans les deux cas où les tissus expriment la NTS et le NTSR1, nous avons observé que l'intensité de marquage d'HER2 et d'HER3 est plus importante en comparaison avec le tissu ne les exprimant pas (figure 51). Cependant, l'étude de l'expression de ces récepteurs dans un échantillon de plus grand taille de cancer bronchique reste nécessaire afin de valider ces résultats.



(Figure 51) Immunohistochimie pour NTS, NTSR1, HER2 et HER3 dans trois cas opérés d'adénocarcinome bronchique. Augmentation de Marquage d'HER2 et HER3 en présence d'expression positive de NTS et NTSR1 (haut et bas) comparativement au cas d'expression négative (contrôle)

3.1.4.3 Mécanisme potentiel impliqué dans la surexpression des récepteurs d'HERs

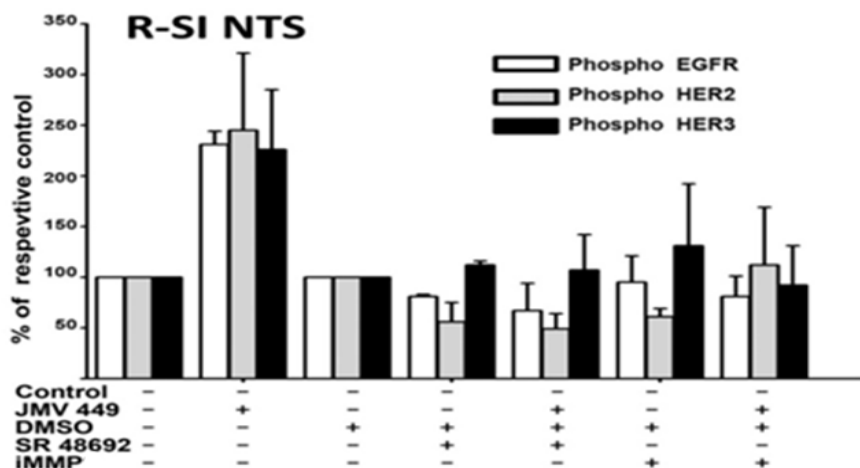
L'analyse par Q-PCR pour les transcrits (EGFR, HER2, HER3) dans les cellules LNM-F, LNM-R et le mélange R/F-20/80% n'a pas montré de différence dans l'activité transcriptionnelle entre les conditions (figure 52). Ce qui nous permet de suggérer que cette différence pourrait être due à la modification du trafic et du taux de dégradation de ces récepteurs.



(Figure 52) Q-PCR pour les transcrits codant EGFR, HER2 et HER3 représenté par histogramme quantitatif.

3.1.4.4 Transactivation des récepteurs HERs par l'intermédiaire du complexe NTS-NTSR1

L'étude du niveau de protéines phosphorylées a ensuite été étudiée. Dans les cellules R-SINTS traitées par le JMV449, le niveau des protéines phosphorylées d'EGFR, d'HER2 et d'HER3 a augmenté environ de 250% par rapport aux cellules non traitées. L'utilisation de SR48692 a également inhibé l'augmentation du taux de protéines phosphorylées d'EGFR, d'HER2, d'HER3 dans les cellules traitées par le JMV449 (figure 53).



(Figure 53) statut des protéines HERs phosphorylées étudié par Western Blot dans les cellules R-SINTS traitées par le JMV449. Histogramme quantitatif représentant le niveau des protéines phosphorylées d'EGFR, d'HER2, et d'HER3 en présence ou absence SR48692 ($10^{-6}M$) ou d'inhibiteur MMP ($25 \cdot 10^{-9}$) par rapport au contrôle.

Donc, ces résultats plaident pour l'implication du NTS dans la transactivation des récepteurs d'HERs. Comme nous l'avons vu ci-dessus, l'utilisation d'inhibiteur de MMP a inhibé l'effet prolifératif induit par la stimulation neurotensinergique. Donc, nous avons examiné son rôle possible dans l'augmentation du taux de protéines phosphorylées d'EGFR, HER2 et HER3. Comme prévu, l'utilisation de l'inhibiteur de MMP a entraîné une abolition totale de l'augmentation de niveau de ces protéines phosphorylées, suggérant une contribution de MMP dans cet effet (figure 53). Toutefois, les résultats obtenus ont aussi montré que cet inhibiteur a provoqué une suppression de l'augmentation observée au niveau des protéines basales de ces récepteurs (figure 49B et C).

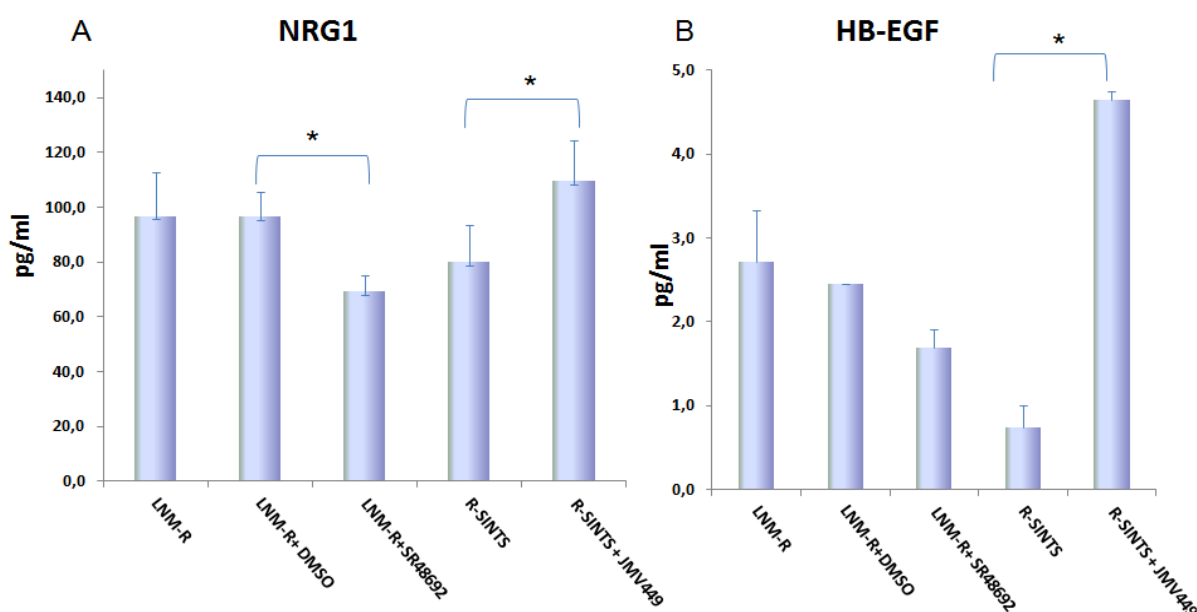
3.1.4.5 Ligands impliqués dans la transactivation de la famille HERs

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux ligands ont la capacité d'activer les récepteurs d'HERs. Ainsi l'EGFR peut être activé par plusieurs ligands, en particulier EGF, amphiréguline et TGF- α , et HBEGF (Olayioye, Neve et al. 2000; Hynes and Lane 2005). La stimulation d'HER3 peut être provoquée par les Neurégulines (NRG1 et 2). Par contre, aucun ligand n'a pas encore identifié pour HER2. La confrontation de ces données avec nos résultats (mentionnées ci-dessus) suppose l'implication au moins deux ligands différents l'un qui est capable d'activer EGFR et l'autre HER3.

Nous avons recherché à déterminer les ligands potentiels impliqués dans l'activation de ces récepteurs. Par la technique d'Elisa, nous avons dosé les ligands NRG1, NRG2 et HB-EGF dans les milieux conditionnés de ces cellules LNM-R (NTS + et NTSR1+) et R-SINTS (NTS -, NTSR1+). Le même nombre de cellules a étéensemencé pour les différentes conditions à *sub-confluence* à J0 et la concentration des ligands a été dosée après 72h (J3) dans culture à 0% de sérum

La concentration de NRG2 n'était pas modifiée par la NTS, par contre, la concentration de NRG1 β 1 dans les milieux des cellules de R-SINTS était de 79.43 \pm 13.82 pg/ML et une augmentation de 27 % (109.43 \pm 14.90 pg/ML) a été détectée après le traitement par JMV449 (10⁻⁸ M). Dans le milieu conditionnées des cellules LNM-R, la concentration de NRG1 β 1 était 96.76 \pm 15.78 pg/ML, celle-ci a diminuée de 28% lors d'un traitement par l'antagoniste spécifique de NTSR1 ((SR48692 (5*10⁺⁶M)) (79.83 \pm 13.82 pg/ML) (figure 54A). Des

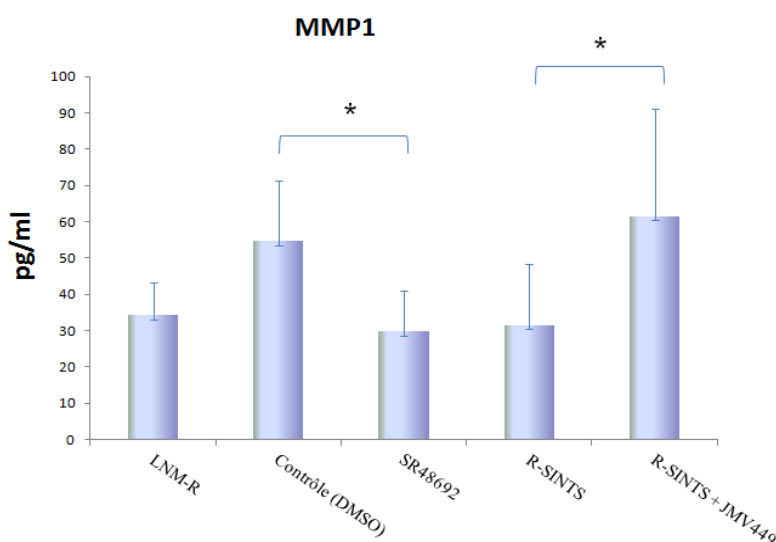
résultats similaires on été obtenus avec le dosage d'HB-EGF. Ainsi, le traitement de cellules R-SINTS par JMV449 (10^{-8} M) a entraîné une augmentation de la concentration d'HB-EGF libérée dans le milieu de 500 % (cellules non traitées ; 0.74 ± 0.26 pg/ML versus cellules traitées ; 4.65 ± 0.1 pg/ML (n=4)). Dans le milieu conditionnées des cellules LNM-R, la concentration d'HB-EGF était 2.71 ± 0.62 pg/ML et le traitement de ces cellules par SR48692 ($5 \cdot 10^{-6}$ M) a induit une diminution de 68% (1.68 ± 0.23 pg/ML (n=2)). (figure 54B). Ces résultats plaident donc pour l'implication de NTS dans l'activation et la libération des ligands NRG1 β 1 et HBEGF.



(Figure 54) : Concentration des ligands NRG1 β 1 et HB-EGF selon la stimulation neurotensinergique dans les cellules LNM-R et R-SINTS. A) Histogramme représentant la quantité de NRG1 β 1 dosée par la technique d'ELISA dans le milieu conditionné des cellules LNM-R (en présence ou absence SR48692 (10^{-6} M)) ou des cellules R-SINTS en présence ou absence JMV449 10^{-8} M. B) Histogramme représentant la concentration d'HB-EGF dosée par la technique d'ELISA dans le milieu conditionné des cellules LNM-R (en présence ou absence SR48692 (10^{-6} M)) ou des cellules R-SINTS en présence ou absence JMV449 10^{-8} M.

L'augmentation de ces ligands libérés reflète une augmentation parallèle dans l'activité de métalloprotéinases impliqués dans le clivage de ces ligands. Dans ce contexte, les données de la littérature ne montrent pas qu'une seule métalloprotéinase soit capable de cliver à la fois HB-EGF et NRG1. Pour cette raison, nous avons étudié deux métalloprotéinases. Nous avons tout à d'abord concentré sur le MMP1. Ce choix est justifié par l'effet que l'inhibiteur de

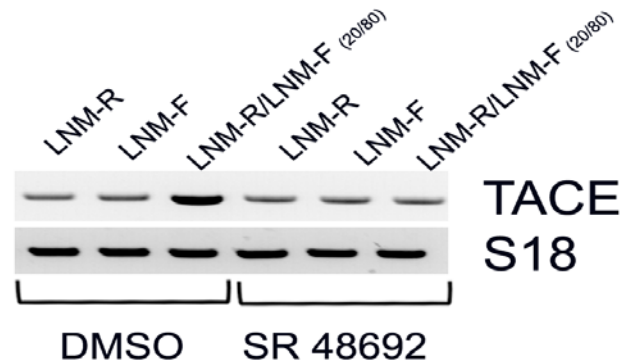
MMP que nous avons utilisé avec succès pour abolir l'amplification de la croissance cellulaire dans le mélange R/F-20/80 (figure 47) est capable d'inhiber MMP1, MMP9 et MMP13. Les données de la littérature montrent que les MMP1 et MMP9 ont la capacité de cliver HB-EGF. Cependant, l'analyse de transcrite de ces deux métalloprotéinases a avéré que nos cellules n'expriment que MMP1. Donc, nous avons étudié, par la technique d'Elisa, la concentration de MMP1 dans les milieux conditionnés des cellules LNM-R et R-SINTS ; la concentration de MMP1 dans les milieux des cellules de R-SINTS était de 31.54 ± 16.71 pg/ML (nombre de manip = 7) et une augmentation de 95 % (109.43 ± 14.90 pg/ML) a été détectée après le traitement par JMV449 (10^{-8} M). Dans le milieu conditionnées des cellules LNM-R, la concentration de MMP11 était 54.61 ± 16.76 pg/ML, celle-ci a diminuée de 45% lors d'un traitement par l'antagoniste spécifique de NTSR1 ((SR48692 (5×10^{-6} M)) (29.73 ± 11.37 pg/ML) (nombre de manip = 4) (figure 55)



(Figure 55) : Concentration de MMP1 selon la stimulation neurotensinergique dans les cellules LNM-R et R-SINTS. Histogramme représentant la quantité de MMP1 par la technique d'ELISA dans le milieu conditionné des cellules LNM-R (en présence ou absence SR48692 (10^{-6} M)) ou des cellules R-SINTS en présence ou absence JMV449 10^{-8} M.

Le deuxième que nous avons étudié était ADAMS17 (TACE). (mis en cause dans la libération de NRG1 β 1). Afin de vérifier l'implication de cette métalloprotéinase dans l'effet de NTS, nous avons étudié son transcrite dans les cellules issues des expériences de mélange R/F-20/80. Les résultats ont montré que la stimulation neurotensinergique survenue dans le mélange R/F-

20/80 induit une augmentation de transcrit de TACE comparativement avec le contrôle LNM-R et LNM-F (figure 56)



(Figure 56) Analyse des transcrits pour TACE (à droite) à partir des cellules, LNM-R, LNM-F et le mélange R/F-20/80.

Afin de confirmer ces résultats, nous allons quantifier la forme active de TACE par Western Blot. Par ailleurs, des expériences sont en cours afin de confirmer l'implication du système neurotensinergique dans l'augmentation de HBEGF et de NRG1 dans le milieu conditionné de R-SINTS et LNM-R en dosant ces ligands en présence ou absence l'inhibiteur spécifique de NTSR1 (SR48692).

3.2 Discussion

Dans ce travail que nous avons mené *in vivo et in vitro*, en utilisant des lignées cellulaires d'origine de cancer bronchique, nous avons montré que le complexe NTS-NTSR1 pourrait participer activement à l'agressivité tumorale. En effet, dans nos modèles, la NTS favorise la croissance tumorale par un mécanisme dépendant de la transactivation des récepteurs HERs (EGFR, HER2, et HER3). On a vu que cette activation nécessite l'intervention de MMP1 et probablement TACE et la libération d'EGF-like (NRG1 et HBEGF). L'un des résultats importants de ce travail est la mise en évidence d'augmentation de niveau des protéines basales d'HER2 et d'HER3 suite à la stimulation de NTSR1.

3.2.1 Impact de NTS-NTSR1 sur la croissance tumorale, signalisations associées

3.2.1.1 NTS facteur favorisant la croissance tumorale

Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'impact prolifératif potentiel du couple NTS-NTSR1 en utilisant une lignée cellulaire qui possède une agressivité, *in vivo* et *in vitro*, très élevée. L'analyse plus détaillée de cette lignée nous a permis de mettre en évidence que cette agressivité sur le plan de la croissance tumorale était due à l'association de deux sous populations que nous avons isolées, les LNM-R et LNM-F. Tout d'abord nous avons confirmé que ces deux sous populations ont bien le même génome. L'analyse de transcriptome a montré des différences, mais comme les observations *in vivo* et *in vitro* ont montré les mêmes caractéristiques tumorales avec de degrés différents, cette analyse n'a pas pu être conclusive dans l'identification de transcrits ou groupe de transcrits impliqué dans cette agressivité. Par contre, nous avons pu identifier le complexe NTS/NTSR1 comme un des éléments différentiels et impliqués dans la différence de croissance cellulaire et tumorale. Le différentiel observé est que les LNM-R expriment les deux facteurs alors que les LNM-F expriment seulement le NTSR1. Ces dernières sont donc susceptibles d'être activées par le ligand exogène. Les lignées LNM-F et LNM-R font de plus petites tumeurs que les LNM-35 et le mélange LNM-F et LNM-R, présente un taux de croissance similaire à celui des cellules parentales suggérant qu'un ou des facteur(s) coopératif(s) interviennent dans le mélange ou dans les populations de la lignée parentale et favorisent la croissance tumorale.

Nous avons émis l'hypothèse que la NTS pourrait être un de ces facteurs. A défaut d'outils pharmacologiques performants et bien caractérisés qui pourrait démontrer l'implication du complexe NTS:NTSR1 dans la croissance tumorale, nous avons démontré son implication de façon indirecte. Nous avons aboli la NTS ou le NTSR1 dans les cellules LNM-R par l'approche des ARN interférents produits de manière constante dans la cellule. Dans les deux situations nous avons observé une baisse de la croissance tumorale, par contre lorsque les cellules injectées dans la souris sont composées des deux lignées silences, la croissance cellulaire est équivalente aux cellules parentales non silences. Ce résultat plaide en faveur de la contribution du Couple NTS/NTSR1 dans la potentialisation de la croissance tumorale. Deux autres expériences viennent confirmer ce résultat d'une part lorsque les cellules LNM-R silences pour la NTSR1 sont remplacées dans le mélange par les cellules LNM-F qui

n'exprime pas la NTS on ne retrouve pas la potentialisation de la croissance tumorale. Par ailleurs, lorsque le clone silence pour le NTSR1 est greffé (tumeur donneuses de NTS) dans un flanc de la souris et que les cellules silences pour la NTS sont greffées dans l'autre flanc (tumeur accepteur de NTS) ces dernières présentent une croissance tumorale équivalente aux cellules parentales LNM-R. L'absence de NTS dans le premier cas, ou la régulation endocrine dans le deuxième cas semble être l'élément différentiel prépondérant dans le différentiel de croissance tumorale. Les résultats obtenus, *in vitro*, confirment cette hypothèse, l'exposition des cellules LNM-F ou R-SINTS par le JMV 449 ou la NTS exogène favorise également la croissance cellulaire. De même, le mélange R/F-20/80 (où une régulation auto-paracrine s'installe entraîne une amplification de la prolifération cellulaire. L'implication de NTS dans cet effet a pu être mise en évidence par l'utilisation SR48692 ou anticorps neutralisant à la NTS.

L'ensemble de nos données *in vivo* et *in vitro* se plaide pour impact de la NTS sur la croissance des cellules tumorales bronchiques. Ces données sont concordantes avec celles de la littérature. La NTS a un effet favorisant la croissance tumorale d'autre origine. Ainsi, la stimulation neurotensinergique par NTS exogène augmente significativement la taille, le poids, et la synthèse de l'ADN dans des cellules de cancer du côlon MC26, du cancer de pancréas MIA Paca-2, xéno greffées chez la souris nude (Yoshinaga, Evers et al. 1992; Iwase, Evers et al. 1997). De même, des résultats similaires ont été obtenus en retraits des cellules de cancer de côlon SW480 et HCT116 xéno greffées chez des souris nudes (Maoret, Anini et al. 1999) et le cancer du sein (Souaze, Dupouy et al. 2006)

3.2.1.2 Impact de la concentration de NTS sur l'effet prolifératif du système neurotensinergique

Dans les expériences réalisées *in vitro*, lorsque nous avons traité les cellules R-SINTS par plusieurs doses de JMV449, l'effet prolifératif maximal de cet agoniste a été retrouvé avec la concentration 10^{-8} M. Ceci avait déjà été observé par l'équipe pour les cellules mammaires MCF-7. Il faut donc une quantité de NTS optimale pour obtenir l'effet maximum de la NTS. L'une des explications possibles de ce phénomène est qu'une dose suffisante est nécessaire pour que le NTSR1 soit activé et qu'il recrute éventuellement d'autres facteurs de la cellule pour produire l'effet, comme le NTSR3. Le NTSR3 est exprimé de manière ubiquitaire, et impliqué dans des interactions moléculaires avec le NTSR1. A très forte dose, ce phénomène

s'éteint, nous pensons qu'un effet de saturation se met en place, car il corrobore avec des résultats de l'équipe qui montrent dans des cellules mammaires dans lesquelles l'expression de la NTS a été forcée, les clones qui expriment très fortement la NTS sont moins agressifs que ceux dont l'expression est moins forte. Dans les mélanges cellulaires, la concentration de NTS n'est pas homogène selon l'organisation de la culture et des clones tumoraux, cette situation est donc propice à ce que la concentration optimum de NTS soit obtenue dans différentes localisations de la culture ou de la tumeur, comme c'est le cas du mélange R/F-20/80

3.2.1.3 Croissance cellulaire ; signalisations associées

L'effet prolifératif de NTS a été observé sous stimulation chronique des récepteurs par leur ligand (traitement chronique par JMV449 ou régulation paracrine et/ou autocrine dans le mélange cellulaire R/F-20/80). Ce qui se traduit par sensibilisation permanente des cellules par une activation chronique du récepteur NTSR1. Cet effet d'activation chronique a été caractérisé par l'immunocytochimie dans la ligne LNM-R présentant une boucle autocrine de signalisation neurotensinergique et se traduisant par localisation des marquages intracellulaire. La sensibilisation chronique des récepteurs pourrait s'expliquer par un mécanisme peu étudié et impliquant la modification du trafic intracellulaire et le recyclage du récepteur à la surface cellulaire. Bien que le nombre des récepteurs au niveau membranaire reste inférieur à celui des cellules à l'état naïf, ce mécanisme permettrait néanmoins au NTSR1 d'échapper à la down-régulation au cours de stimulations permanentes par l'agoniste. L'activation de nombreuses voies corrélées à l'activation par la NTS et associée à la croissance tumorale pourrait en résulter.

L'abolition totale de l'effet prolifératif observée sous stimulation de NTS par l'utilisation d'inhibiteurs de PKC (Gö6976) suggère que cette dernière joue un rôle important dans la transmission des signaux en aval du NTSR1. PKCs qui sont des kinases sophistiquées avec de multiples isoformes peuvent conduire à l'activation rapide de la voie MAPK et préférentiellement d'ERK1/2. Nos résultats obtenus avec l'utilisation des inhibiteurs de la voie MAPK (U0126 et PD98059) et de la voie PI3K (LY294002) corrobore le rôle central de PKC qui intervient via l'activation des voies MAPK et PI3K offrant ainsi au NTSR1 ses propriétés prolifératives et antiapoptotiques observées *in vitro*. L'activité oncogénique du NTSR1 peut être renforcée via l'activation de PKD1 de façon dépendante également de la voie PKC (Guha, Rey et al. 2002). PKD1 est une protéine sérine/thréonine kinases activée en

aval de PKC et impliquée dans la progression cancéreuse (LaValle, George et al.). Ainsi, la PKD1 peut augmenter la durée d'activation d'ERK1/2, la synthèse de l'ADN et par conséquent la prolifération cellulaire (Kisfalvi, Hurd et al. 2010).

3.2.2 *Interrelation entre l'expression NTSR1 et la famille HERs*

3.2.2.1 *Surexpression d'HERs induite par NTS-NTSR1*

Nous avons montré que le complexe NTS-NTSR1 était capable de modifier le profil d'expression des récepteurs d'EGFR, d'HER2 et d'HER3. Il augmente, en particulier, l'expression d'HER2 et d'HER3 et plus modestement EGFR. Un tel effet modulateur de l'expression de la famille HERs en réponse à la stimulation neurotensinergique a été décrit pour l'EGFR dans une lignée colique humaine non transformée (Zhao, Zhan et al. 2007) mais jamais pour HER2 et HER3. Dans cette lignée, l'augmentation de l'expression d'EGFR était due à la stimulation de l'expression du facteur nucléaire de transcription Egr-1 avec un renforcement de sa liaison sur les sites Egr-1 du promoteur d'EGFR. Au contraire, nos résultats n'ont pas montré une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes HERs associée à l'augmentation de l'expression de ces récepteurs. Il est possible que le remodelage de la famille HERs implique un changement dans le trafic d'HERs intracellulaire et le recyclage de ces récepteurs à la membrane plasmique, sous l'effet de système neurotensinergique. Une autre possibilité qui peut expliquer, au moins dans une partie, cette augmentation est la formation éventuelle des hétérodimères comprenant l'isoforme HER2. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'hétérodimérisation entre HER2 avec une autre isoforme pourrait influencer sur le trafic endocytaire pour les deux récepteurs. Ceci résulterait de l'effet dominant-négatif d'HER2 sur l'endocytose de l'autre partenaire (Wang, Zhang et al. 1999), le mécanisme de cet effet peut être expliqué par empêchement de l'internalisation par endocytose dépendant de la clathrine (Haslekas, Breen et al. 2005; Offterdinger and Bastiaens 2008) ou de son orientation de la voie de dégradation vers celle de recyclage (Worthylake, Opresko et al. 1999). Devant ces données, on peut suggérer que l'augmentation de sécrétion de NRG et HBEGF suite à la stimulation neurotensinergique entraîne l'activation d'HER3 et d'EGFR et leur dimérisation en particulier avec leur partenaire préféré HER2 conduisant à un dimère stable et moins internalisé ou plus recyclé à la surface cellulaire par rapport aux autres dimères natif. Cette hypothèse est soutenue par l'effet que l'utilisation d'inhibiteur de métalloprotéinase impliqué dans la libération des ligands a entraîné une abolition de

l'augmentation observée dans les cellules traitées par JMV449 ou NTS. Cependant, des études plus approfondies sont donc nécessaires pour éclaircir le mécanisme responsable de ce remodelage

3.2.2.2 *HER2/HER3 : Dimère prédominant-rôle dans l'agressivité tumorale*

Les altérations du profil d'expression des HER impliquent une perturbation des dimères HER formés et des signalisations associées ce qui peut avoir des conséquences variées sur le comportement cellulaire comme l'exacerbation de l'état prolifératif. Dans nos conditions expérimentales, nous avons utilisé l'inhibiteur spécifique d'EGFR (AG1478) ou anticorps anti HER2, herceptine qui inhibe l'hétérodimérisation d'HER2. Tous les deux ont inhibé totalement l'effet de l'amplification de la prolifération cellulaire observée dans le mélange R/F-20/80%. Cependant, la dose d'AG1478 (10^{-5} M) qui a permis d'inhiber cet effet était fortement supérieure à celle qui inhibe spécifiquement l'EGFR (3nM). Une concentration très élevée d'AG1478 peut toutefois inhiber l'activité tyrosine kinase d'HER2. Par conséquent, ces données suggèrent que le mécanisme responsable de l'effet amplificatif de la croissance comprend la formation des dimères comportant l'HER2. Cette constatation nous laisse donc les possibilités suivantes: des dimères, EGFR/HER2 ou HER2/HER3.

La formation des dimères dépend à la fois du ligand stimulateur, des niveaux d'expression des différents membres de la famille et des affinités variables entre partenaires de dimérisation (Tzahar, Waterman et al. 1996). Comme nous l'avons vu, les résultats de dosage des ligands libérés dans le milieu extracellulaire des cellules SINTS et LNM-R a bien confirmé que la quantité de NRG1 (ligand d'HER3) secrétée, en réponse à la stimulation neurotensinergique, est largement supérieure à celle d'HBEGF (ligand d'EGFR), ce qui suggère raisonnablement que les hétérodimères HER2/HER3 sont les plus actifs. La réalisation d'expériences de co-immunoprécipitation HER3/HER2 permettrait, de montrer la prédominance de ce dimer dans un premier temps, de valider cette hypothèse dans nos modèles cellulaires.

On peut suggérer que l'activation du système neurotensinergique dans les tumeurs via la formation de boucle d'activation autocrine et/ou paracrine induit le remodelage des récepteurs HER2 et 3 aboutissant à la surexpression de ces récepteurs ce qui favorise leur dimérisation et par conséquent leur activation par libération de NRG1. La formation de ce dimère peut avoir

un impacte important sur la progression tumorale de tumeurs initialement peu agressives en accélérant le processus de dissémination métastatique.

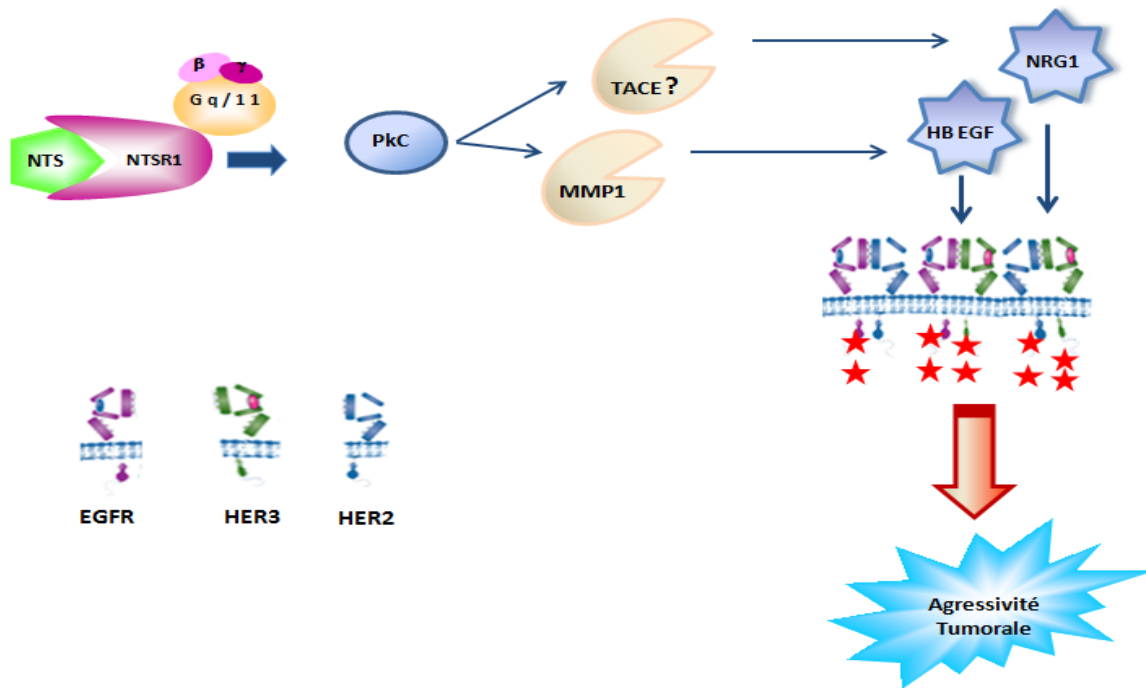
3.2.2.3 *Transactivation de la famille d'HERs induit par NTS-NTSR1*

L'un des résultats importants de ce travail est que nous avons montré, pour la première fois, que le complexe NTS-NTSR1 était capable de transactiver non seulement les récepteurs EGFR mais aussi HER2 et HER3. Dans la littérature, les seuls rares liens qui existaient jusqu'à présent entre ces deux systèmes concernaient l'existence d'un phénomène d'activation croisée de leur voie de signalisation soit par transactivation du récepteur EGFR (Hassan, Dobner et al. 2004; Zhao, Zhan et al. 2004), soit par action synergique au niveau des signalisations avalées (Kisfalvi, Guha et al. 2005). En revanche, de nombreux travaux ont décrit un lien entre les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et l'EGFR. L'activation d'EGFR en réponse à la stimulation RCPG apparaît critique pour l'activité oncogéniques des ligands tels l'acide lysophosphatique, l'endotheline, la thrombine, la bombésine, le carbachol et l'angiotensine II (Daub, Weiss et al. 1996; Prenzel, Zwick et al. 1999). Cette activation est responsable, au moins en partie, de la progression du cancer du côlon, du poumon, du sein, de la tête et du cou, de la prostate et des cancers de l'ovaire et du cancer de rein et de la vessie (Schafer, Marg et al. 2004; Bholra and Grandis 2008). Les RCPG peuvent activer EGFR par l'intermédiaire de deux mécanismes dépendants et indépendants des ligands ; soit par l'activation directement du domaine tyrosine kinase de l'EGFR, soit par le clivage des précurseurs membranaires de ligands EGFR. Ce dernier implique l'activation de métalloprotéinase et la libération des ligands EGF-like. Le plus étudié est l'HB-EGF, il peut être libéré par MMP1, 2 et 9, ADAM 10 ou 17 (Yan, Shirakabe et al. 2002; Gee and Knowlden 2003; Gschwind, Hart et al. 2003; Roelle, Grosse et al. 2003; Lu, Wang et al. 2009). D'autres ligands impliqués comprennent amphireguline, EGF, betacelluline, epireguline, TGF, TNF, NRG1 qui peuvent être libérés par ADAM17, ADAM10 (Gschwind, Hart et al. 2003; Sahin, Weskamp et al. 2004). Dans ce travail, nos résultats ont montrés que la NTS transactive les récepteurs EGFR, HER2 et HER3 par mécanisme dépendant de la libération des ligands EGF-like car cette transactivation a été inhibée par l'utilisation d'inhibiteur de métalloprotéinase. Nos conditions expérimentales ont montré que la NTS favorise la libération de NRG1 β 1 et HB-EGF. Le mécanisme responsable de la libération de ces ligands implique probablement le MMP1 car son inhibition abolit l'effet amplificatif de la NTS mais aussi la transactivation des récepteurs d'HERs d'une part et d'autre part, le

traitement des cellules par l'agoniste de NTSR1 a entraîné une augmentation significative de ce ligand. Néanmoins, la participation d'un autre métalloprotéinase tels que TACE (mise en cause dans le clivage NRG1 β 1) est probable compte tenu de l'absence des données en faveur de rôle de MMP1 dans le clivage de NRG1 β 1. Afin de finir ce travail, nous allons étudier le rôle éventuel d'ADAMs17 dans la libération de NRG1 β 1 par détection de sa forme activée par Western Blot.

Un autre facteur qui favorise l'activation des récepteurs EGFR, HER2 et HER3, c'est l'augmentation de leur expression. Cette augmentation de l'expression associée à l'augmentation de libération d'EGF-like peut jouer un rôle critique favorisant l'activation de ces récepteurs et amplifiant par conséquent les signalisations oncogéniques en aval.

Au total, les résultats obtenus de ce travail nous permettent de suggérer le mécanisme par lequel la NTS peut participer à l'agressivité du cancer bronchique : la NTS transactive les récepteurs EGFR, HER2 et HER3 via l'activation et l'augmentation de l'expression de métalloprotéinase ((probablement MMP1 et ADAM17 (TACE)). Une fois activé, les métalloprotéinases vont cliver et libérés des pro-ligands EGF-like (NRG1 et HBEGF). Les ligands libérés dans le milieu extracellulaire se fixent et activent les récepteurs correspondant (EGFR, HER2, et HER3) en formant les hétérodimères HER2/EGFR, HER2/HER3 et EGFR/HER3 (figure 57).



(Figure 57) Schématisation de mécanisme impliqué dans la transactivation des récepteurs HERs en réponse à la stimulation neurotensinergique.

3.3 Conclusion

Nous avons montré que La NTS participe activement dans l'agressivité du cancer bronchique par mécanisme dépendant de remodelage et d'activation des récepteurs de la famille d'HERs en particulier les hétérodimères d'HER2/HER3. Des études approfondies restent néanmoins nécessaires afin de mettre en évidence les mécanismes responsables de cette modification dans l'expression d'HERs et les conséquences y associées en particulier sur la formation des métastases et la réponse à la chimiothérapie.

3.4 Méthodes

3.4.1 *Xénogreffes tumorales*

Les xénogreffes tumorales ont été réalisées chez des souris nues par injection sous-cutanée de 10^6 cellules de LNM35, de LNM-F, ou de LNM-R, et des clones cellulaires dérivés. Pour les tumeurs générées à partir d'un mélange de cellules, 10^6 cellules de chaque clone ont été encensées ensemble dans p100 (72 heures avant l'injection chez les souris). Quatre à six séries ont été effectués; chaque série incluse 5-8 souris. Le volume tumoral a été calculé avec la formule ellipsoïde. Les animaux ont été tués et les tumeurs ont été pesées en 28 jours. Les animaux ont reçu des soins selon les directives INSERM.

3.4.2 *Culture cellulaire*

Les cellules ont été cultivées en milieu RPMI-1640 (Invitrogen) complété à 10% de sérum de veau foetal et 2 mM de glutamine (milieu complet). La ligne cellulaire LNM35 a été sous-clonée par dilution, après quelques jours de culture, les clones contenant exclusivement des cellules plates ou arrondies ont été conservés et nommés LNM-F (pour les cellules plates), et LNM-R (pour les cellules arrondies). Toutes les cellules ont été cultivées à 37 ° C, dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO₂.

3.4.3 *Test de prolifération cellulaire.*

Pour le mélange cellulaire LNM-F/LNM-R (20/80%), les cellules LNM-F, LNM-R et leur mélange ont étéensemencé dans plaques de culture de 48 puits et à une concentration de 40000 cellules/puits en milieu contenant 10 % de SVF (J0). Après 24 heures (J1), le milieu a été remplacé par milieu contenant 0,1% de SVF en présence ou absence des inhibiteurs suivants : le SR48692 10^{-6} M (antagoniste spécifique du NTSR1), le BIM-46174 (10^{-10} M) (inhibiteur spécifique des protéines G); le Gö6976 (2.5×10^{-6} M) (inhibiteur spécifique de la PKC), le H7 (10^{-5} M) (inhibiteur de PKA), le L-Name 10^{-5} M (inhibiteur de la NOS), le D-Name 10^{-5} M (composé dextrogyre et non actif à l'inhibition de la NOS), le U0126 (10^{-6} M) (inhibiteur spécifique de MEK) et le PD98052 (inhibiteur spécifique de ERK1/2); l'AG1478 (10^{-5} M) (inhibiteur spécifique d'EGFR), le M475271 10^{-6} M (inhibiteur spécifique de Src) l'inhibiteur de MMP (Calbiochem 444278 ; inhibe MMP1, MMP9, MMP13) (25×10^{-9} M), et le LY294002 (10^{-7} M) (inhibiteur de PI3K) ainsi que les anticorps ; l'anticorps neutralisant la neurotensine 1/200 (Monosan) et l'herceptin (30µg/ML) (anticorps spécifique de HER2)

(tableau 14). Pour le comptage, les cellules ont été trypsinisées et comptées après 72h (J3) par l'appareil (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter). Pour chaque point de données, trois puits ont été utilisés et chaque expérience a été reproduite au moins trois fois.

Pour les tests de prolifération de lignes LNM-F et SINT stimulées par JMV449 10^{-8} M ou NTS 10^{-8} M, les cellules ont étéensemencées dans plaques de culture de 24 puits avec concentration de 20000 cellules/puits dans milieu complet. Après 24 heures, le milieu a été remplacé par un milieu sans SVF en présence ou en absence de JMV449 10^{-8} M, NTS 10^{-8} M, SR48692 10^{-6} , inhibiteur de MMP9 (Calbiochem 444278) $25 \cdot 10^{-9}$. Les cellules ont été trypsinées et comptées après 5 jours du traitement dans compteur des particules (Z1 Coulter Particle Counter, Beckman Coulter). Pour chaque point de données, trois puits ont été utilisés et chaque expérience a été reproduite au moins trois fois.

Tableau 14 : Récapulatif de différents agents pharmacologiques utilisés

Agents pharmacologiques	Spécialité
JMV449	Agoniste de NTSR1
SR48692	Antagoniste spécifique du NTSR1
BIM-46174	Inhibiteur spécifique des protéines g
Gö6976	Inhibiteur spécifique de la PKC
H7	Inhibiteur de PKA
L-Name	Inhibiteur de la NOs (Nitric Oxide Synthase)
D-Name	composé dextrogyre et non actif à l'inhibition de la Nos
U0126	Inhibiteur spécifique de MEK
PD98052	Inhibiteur spécifique de ERK1/2
AG1478	Inhibiteur spécifique d'EGFR
M475271	Inhibiteur spécifique de Src
Calbiochem 444278	Inhibiteur de MMP9 MMP1, et MMP13
LY294002	Inhibiteur de PI3K
Anticorps neutralisant la neurotensine (Monosan)	
Herceptin	Anticorps anti-HER2

3.4.4 Extraction d'ARN

L'ARN total a été extrait par la méthode des acides thiocyanate de guanidine phénol/chloroforme comme documenté par Souza et al. (1997). Deux cycles de l'extraction au phénol-chloroforme (pH 4,7) ont été précédés par deux précipitations d'éthanol dans tampon de GTC (4 M guanidium thiocyanate, 50 mM Tris pH 7,5, EDTA 10 mM pH 8,0, 30% de sel de sodium de N-lauroylsarcosine, β -1% mercaptoéthanol) et suivie par une extraction finale avec chloroforme-alcool isoamylique 25:1 (v/v). Deux précipitations finales avec l'éthanol dans l'acide acétique et de tampon NET (150 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl pH 7,5, EDTA 1 mM) ont été successivement réalisées. Après lavage à l'éthanol 70%, les granules ont été remis en suspension dans 20 μ l d'eau stérile déionisée traitée par diéthyl pyrocarbonate et titré par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 260 nm

3.4.5 RT-PCR et PCR quantitative.

1 μ g d'ARN total a été soumis à une transcription inverse, pendant 1 heure à 37 ° C, en utilisant 1 μ g de non spécifiques hexamérique aléatoire dN amorces, 1 mM de dNTP, 10 mM de dithiothréitol, 24 RNaseOUT unités et 200 unités de M-MLV RT-enzymatique (Invitrogen). L'amplification par PCR a été réalisée sur 1: 6 (v/v) de la réaction de transcription inverse diluée 1 :10 en utilisant 0,2 mM dNTP, 2,5 mM de MgCl₂ et 1 unité de Taq ADN polymérase Thermostart (Thermo Scientific), et de 25 pmol de chaque amorce spécifique (5'-CAGCTCCTGGAGTCTGTGCT-3 'et 5'-GAGTATGTAGGGCCTTCTGGG-3' pour NTS ou 5'-CGTGGAGCTGTACAACCTTCA-3 'et 5'-CAGCCAGCAGACCACAAAGG-3' pour NTSR1), 5'-ATGGGGAACCTTGAGATTGTGCT-3 'et 5'-ACAGCTTCTGCCATTGTCCT-3' pour HER3, 5'-TTTCGATACCCAGGACCAAGCCACAGCAGC-3 'et 5'-AATATTCTTGCTGGATGCGTTTCTGTA-3 'pour l'EGFR, 5'-GTGCTAGACAATGGAGACC-3' et 5'-CACAAAATCGTGTCCCTGGTAGC-3 'pour HER2, 5'-GGAGACCTGAGAACCAATCTC -3 'et: 5'-TCCAATAGGTGATGTTGTCGT -3 »pour MMP9, 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3' et 5'-GTGCAGCCCCGGACATCTAAG-3 pour 18S.

3.4.6 Cytométrie en flux.

Le test de Dioc-IP a été réalisé pour évaluer l'apoptose sur LNM-R, LNM-F et le mélange LNM-R/LNM-F (20/80). Les cellules ont étéensemencées dans plaque de 48 puits à une concentration de 40000 cellules / puits dans milieu complet. Après 24 heures, le milieu a été remplacé par 0,1% de SVF. Les cellules ont été trypsinées après 48 heures et ont été sédimentées par centrifugation à 1300 rpm pendant 5 min à température ambiante. 500 ul de Dioc (1 nM) a été ajouté pour solubiliser le culot et incubées à 37 ° C pendant 20 min. 10 uL d'iodure de propidium (IP) (0,5 mg / mL) a été ajouté juste avant d'évaluer toutes les conditions.

L'évaluation des phases G1 et S du cycle cellulaire dans les lignes LNM-R, LNM-F et le mélange LNM-F/LNM-R (20/80) a été effectuée par le test d'IP. Le processus de culture cellulaire a été identique à celle de test DIOC-IP. Après trypsination, les cellules ont été sédimentées par centrifugation à 1300 rpm pendant 5 min à température ambiante. 500 ul d'IP (1 nM) a été ajouté pour solubiliser le culot et incubées à 37 ° C pendant 10 min.

3.4.7 Western Blot

Le western Blot a été réalisé à partir de deux conditions de culture cellulaire (décrit ci-dessus paragraphe-test de prolifération cellulaire). Ensuite, les cellules ont été lysées par tampon TNMG (20 mM Tris pH 8,0, NaCl 150 mM, 5 mM de MgCl₂, 0,5% NP40, glycérol 0,5% + 1 mM de PMSF, un cocktail inhibiteur de la protéase, un cocktail inhibiteur de phosphatase) à 4 ° C pendant 30 min. Des échantillons incluant tampon Laemmli et 100 µg de protéine pour HER1, PHER1, HER3 et PHER2, 60 µg pour HER2 et 300 µg pour PHER3 ont été bouillis pendant 5 min et puis ont été chargés sur PAGE-SDS de 8% et transférées sur des membranes de PVDF (PolyVinylidene Fluoride). La saturation a été réalisée pendant 30 min, à température ambiante, dans 5% de poudre de lait non gras solubilisée dans TBS -Tween 20 (0.1%). Les anticorps primaires ont été incubés pendant la nuit à 4 ° C selon les instructions du fabricant. Les anticorps des anti-EGFR (1:1000), anti-phospho-EGFR (1:1000), anti-phospho-HER2 (1:1000), anti-HER3 (1:1000), anti-phospho-HER3 (1:1000), étaient fournis par Cell Signaling, l'anti-PEGFR (1:1000) était de Santa-Cruz. L'anti-HER2 (1:1000) venus de Thermo et l'anti-βactin (1:50000) de Sigma. Les anticorps secondaire anti-lapin ou anti-âne (Santa Cruz Biotechnology) ou anti-souris (Sigma) conjugué à l'HRP ont été utilisés à

dilution 1:2000 pendant 1h. La révélation se fait à l'aide du substrat ECL+ et exposition à un film.

3.4.8 *Radioimmunoassay (RIA)*

Un million de cellules ont été cultivées en boîtes de P60 mm². Après 24 heures, le milieu a été remplacé par milieu privés de SVF., Le milieu a été recueilli; dans 24, 48 ou 72 heures, puis centrifugé 5 min à 2000g. Ensuite, 5000 Uik/ml de Trasylol a été ajouté au surnageant. RIA a été réalisée sur 1 ml de milieu lyophilisé selon la procédure développée dans Scarceriaux et al. Brièvement, la dilution de NTS (Sigma) ou des échantillons inconnus ont été incubées à 4°C pendant 5 jours, dans un tampon de dosage 1ml final (60 mM NaH₂PO₄, EDTA 10 mM, pH 7,4) avec anticorps anti-NTS A44 (Euro-Diagnostica Malmö Sweden), à la dilution finale 1/33,300, et [¹²⁵Ityr]-NTS 5000 dpm, 2000 Ci / mmol. Bound [¹²⁵Ityr] a été séparé de radioligand libre par précipitation avec polyéthylène glycol de 16% et 5 mg/ml gamma-globulines de lapin. Après centrifugation (2500 xg pendant 20 min), la radioactivité restant dans le culot a été mesurée dans un compteur gamma (Wallac model 1470 Wizard).

3.4.9 *Transfection*

Suivant les instructions du fabricant, Sh-RNAS pour les NTSR1 humains (AAGAAGTTCATCAGCGCCATC) et le NTS (5'-GCAATGTTGACAATATAACC-3 ') ont été préparés en utilisant psilencer 3.1-H1 conformément aux instructions du fabricant (Ambion, St.Austin, TX États-Unis). LNM-R ont été transfectées avec le réactif lipofectamine (Invitrogen SARL Cergy Pontoise France). La sélection a été effectuée après transfection avec 400 ug/ML d'hygromycine (Invitrogen) RCC ALIFANO. Les clones stables ont été obtenus par dilution de clonage et sélectionnées par RT-PCR et RIA pour le niveau d'expression NTS

3.4.10 *Immunocytochimie*

Les cellules sontensemencées sur lamelles en plaques de 24 puits. Les échantillons sont fixés au PFA (4%, HEPES 250mM) à température ambiante. Les lamelles sont incubées pendant toute la nuit à 4°C en présence d'anticorps primaires (NTSR1, EGFR, HER2, HER3) puis rincées 3 fois avec du PBS-Tween 0,1%. Les lamelles sont incubées pendant 20 min à 37°C en présence d'anticorps secondaires (Texas Red Conjugué affinité purifié anti-lapin anticorps, dilution au 1/1000 puis rincées. Les noyaux sont colorés au DAPI.

3.4.11 ELISA

Deux million cinq cents mille cellules (LNM-R, R-SINTS) ont étéensemencées dans des boîtes p100 mm²(J0) dans milieu 10 % SVF. Après 24 heures (J1), le milieu a été remplacé par milieu privé de sérum en présence ou absence le SR48692 10⁻⁶ M et/ou JMV449 10⁻⁸M (antagoniste spécifique du NTSR1), le milieu a été récolté dans 48 heures. Le dosage des ligands a été réalisé conformément aux instructions du fabricant (R&D SYSTEMS : DY259 pour HBEGF, DY377 pour NRG1β1)

IV- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

D'abord, dans première étude, nous montrons que les altérations de la connexion p53/p14^{arf} sont très fréquentes dans les adénocarcinomes bronchiques porteurs des mutations EGFR ou KRAS. Ces altérations pourraient jouer un rôle dans la variabilité de réponse aux ITK chez ces patients. Des études approfondies in vitro et in vivo, sont nécessaires afin de déterminer si le statut de la connexion p53/p14^{arf} est un prédicteur important de réponses TKI. La mise en évidence de ce rôle permettrait d'utiliser ces altérations comme biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement par ITK chez les patients présentant une mutation d'EGFR et par de là, adapter à l'échelle individuel le traitement, d'une part, et d'autre part d'envisager d'améliorer la réponse aux ITK via la restauration de la voie p53.

Deuxièmement, l'étude du rôle de système neurotensinergique dans des échantillons des patients opérés de CBNPC ou pneumothorax idiopathique a révélé l'existence d'une dérégulation aberrante du profil d'expression du couple NTS-NTSR1 dans les cellules tumorales de CBNPC. Cette dérégulation serait associée au pronostic des adénocarcinomes bronchique. Par ailleurs, le couple NTS-NTSR1 et en particulier le récepteur NTSR1 présente plusieurs propriétés qui en font un bon biomarqueur candidat pour le pronostic du cancer bronchique. Le récepteur NTSR1 est un marqueur tissulaire, facilement détectable par la technique d'immunohistochimie, qui, de plus, possède l'avantage d'être une méthode peu coûteuse et automatisable. Ces propriétés rendent de NTSR1 un bon candidat pour une utilisation future comme marqueur pronostique pour identifier les patients à pronostic plus défavorable et par conséquent, personnaliser le suivi et le traitement. Cependant, l'évaluation de la valeur pronostique de NTSR1 dans d'autres populations de patients provenant d'autres centres de recrutement semble nécessaire afin de valider ce résultat. En effet, pour que ce marqueur soit validé, il faut que la technique utilisée soit assez robuste pour résister aux variations de sélection des patients d'un centre (ou d'un pays) à l'autre. De plus, tant que le protocole n'est pas standardisé par un kit d'analyse, le résultat est assujetti aux changements de protocole, d'expérimentateurs, et à l'interprétation du résultat sachant que la lecture de lame d'immunohistochimie est par définition très subjective.

Nos travaux réalisés in vitro, et sur les tumeurs expérimentales suggèrent que le système de la NTS est possiblement, un médiateur de progression de cancer. Ainsi, la signalisation

neurotensinergique accélère la croissance tumorale de différentes lignées cellulaires xénotreffées chez des souris immunodéprimées. Le couple NTS-NTSR1 influence les processus cancéreux par des mécanismes dépendant de la transactivation des récepteurs de la famille d'HERs et du remodelage notamment le profil d'expression des récepteurs HER2/HER3. Ces observations suggèrent la contribution du système neurotensinergique en tant acteur de la progression tumorale possédant une position centrale dans la chaîne d'évènements cellulaires mis en jeu.

La dé-répression du récepteur NTSR1 dans un certain nombre de cancers dont les cancers bronchiques et mammaires, par rapport à l'épithélium normal, rend ce système spécifique des entités tumorales, offrant ainsi l'opportunité de cibler spécifiquement les tumeurs concernées avec des analogues neurotensinergiques. Le système neurotensinergique pourrait donc être considéré comme candidat pour le développement de thérapies anti-tumorales. L'un des moyens, est basé sur le développement de peptides radiomarqués spécifiques de récepteurs surexprimés. Cette technique repose sur l'exploitation des capacités de ciblage du peptide pour envoyer, de manière spécifique et sélective, un élément radioactif jusqu'aux cellules tumorales exprimant de manière aberrante le récepteur correspondant. Le radioélément couplé au peptide modifié est internalisé au sein de la cellule cible par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique puis subit une dégradation lysosomiale conduisant à la libération du radionucléide au sein du milieu intracellulaire ce qui permet alors de visualiser la tumeur ou de l'irradier pour la détruire. Dans ce contexte, des neuropeptides radiomarqués ciblant la NTSR1 ont été évaluées dans trois types d'applications : l'adénocarcinome pancréatique, les cancers du côlon et les tumeurs du poumon à petites cellules (Achilefu, Srinivasan et al. 2003; Buchegger, Bonvin et al. 2003; Zhang, An et al. 2006). C'est dans les cancers du pancréas que les analogues neurotensinergiques ont donné les résultats les plus encourageants. En effet, après de nombreux essais sur la souris, l'évaluation de l'analogue ^{99m}Tc -NTS-XI sur un faible échantillon de patients atteints d'un adénocarcinome canalaire du pancréas a permis de démontrer sa capacité à cibler spécifiquement l'unique patient présentant un fort taux d'expression du récepteur NTSR1, permettant ainsi de visualiser la tumeur (Buchegger, Bonvin et al. 2003).

Le deuxième moyen est basé sur l'utilisation des anticorps ciblant le couple du NTS/NTSR1. Dans ce contexte, un projet actuel de l'équipe consiste à développer, en partenariat avec une

entreprise pharmaceutique, un anticorps monoclonal susceptible d'interrompre les boucles de signalisation neurotensinergique dans les cancers bronchiques. Ce médicament ciblés qui pourraient être utilisés comme traitements adjuvant aux thérapies actuellement disponibles. L'efficacité de cette immunothérapie NTS permettrait de faire la preuve du concept du rôle du couple NTS-NTSR1 dans la progression tumorale bronchique humaine et de proposer une alternative thérapeutique au traitement adjuvant du cancer bronchique.

V- ANNEXE

C-reactive protein (CRP) est protéine sécrétée par le foie en réponse à l'élévation de niveau des cytokines proinflammatoire telles interleukine 1 et 6, TNF α . Ces cytokines peuvent aussi sécrétées par les cellules tumorales de CBNPC. La valeur pronostique de CRP a été retrouvée dans plusieurs tumeurs. En outre, son rôle pronostique a été suggéré dans les CBNPC avancés et encore dans les maladies résecables. Dans cette étude, on a évalué si les niveaux de CRP préopératoire peuvent être prédicteur indépendant de survie chez les patients opérés de CBNPC.

Trois cents patients opérés de CBNPC à Hôtel Dieu Paris France ont été étudiés rétrospectivement. Une série de validation de 68 patients a été aussi analysée. Dans la cohorte principale, la valeur préopératoire CRP était de 3 mg/L ou moins dans 136 patients (45,3%), entre 4 et 20 mg/L dans 89 (29,7%), et supérieure à 20 dans 64 (21,3%). Selon ces valeurs, la survie à cinq ans des patients était de 55,6%, 45,6% et 40,0% pour valeur de CRP de 3 mg/L ou moins, entre 4 et 20 mg/L, et supérieures à 20 mg/L, respectivement ($P = 0,0571$). En analyse multivariée, le taux de CRP supérieur à 20 mg/L était significativement associée à la survie, mais avec une interaction significative entre le niveau de CRP et le stade de la maladie ($p = 0,02$). Les patients ayant stade I ou II de la maladie avec des taux de CRP supérieur à 20 avaient de mauvais pronostique de survie en comparaison avec ceux présentant des taux indétectables de CRP (rapport de risque ajusté, 1,874, intervalle de confiance à 95%, 1.039 à 3.381), la différence n'était pas significative dans les stades III et IV. Dans la série de validation, le niveau de CRP supérieur à 20 mg / L est un aussi prédicteur de mauvais pronostique ($P = 0,018$).

Ce travail a montré que des taux préopératoire de CRP supérieurs à 20 mg/L chez les patients opérés de stade I-II de CBNPC sont associés significativement avec taux de survie moindre que ceux ayant des taux indictable de CRP

Preresection serum C-reactive protein measurement and survival among patients with resectable non-small cell lung cancer

Marco Alifano, MD, PhD,^{a,e,*} Pierre E. Falcoz, MD, PhD,^f Valérie Seegers, MD,^b Nicolas Roche, MD, PhD,^c Olivier Schussler, MD, PhD,^a Mohamad Younes, MD,^e Filippo Antonacci, MD,^f Patricia Forgez, PhD,^{e,*} Agnes Dechartres, MD,^b Gilbert Massard, MD,^{f,*} Diane Damotte, MD, PhD,^{d,g,h,i} and Jean-François Régnard, MD^{a,*}

Objective: Serum C-reactive protein (CRP) is a routinely measured marker of systemic inflammation. This study aimed to determine whether preresection serum CRP level independently predicts survival among patients with resectable non-small cell lung cancer.

Methods: Clinical, pathologic, and laboratory data from 300 patients operated on for non-small cell lung cancer in a single institution were studied in univariate and multivariate survival analyses. Validation was sought in another cohort of 68 similar patients from another institution.

Results: In the main cohort, preoperative CRP value was 3 mg/L or lower in 136 patients (45.3%), between 4 and 20 mg/L in 89 (29.7%), and greater than 20 in 64 (21.3%). CRP level was significantly associated with chronic bronchitis, hypoalbuminemia, pathologic stage, and peritumoral vascular emboli. Overall, 5-year survivals of patients with preoperative CRP 3 mg/L or lower, between 4 and 20 mg/L, and greater than 20 mg/L were 55.6%, 45.6%, and 40.0%, respectively ($P = .0571$). In multivariate analysis, CRP level greater than 20 was significantly associated with survival, but with significant interaction between CRP level and disease stage ($P = .02$). Patients in stage I or II disease with CRP levels greater than 20 had worse survival than did patients with undetectable CRP (adjusted hazard ratio, 1.874; 95% confidence interval, 1.039–3.381); the difference was not significant in stages III and IV. In the validation series, CRP level greater than 20 mg/L also predicted worse survival ($P = .018$).

Conclusions: Preoperative CRP level greater than 20 mg/L is significantly associated with worse survival than undetectable CRP in patients with stage I or II non-small cell lung cancer. (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; ■:1-7)

The role of systemic inflammation in patients with cancer is being increasingly investigated.^{1,2} Proinflammatory cytokines and associated growth factors are involved in carcinogenesis through their effects on tumor cell growth, survival, proliferation, and migration.³ In addition, tumor cells themselves release inflammatory cytokines.³ It has been shown that slight elevation of inflammatory markers is associated with the occurrence of non-small cell lung cancer (NSCLC).⁴ Lung cancer is frequently associated

with chronic obstructive pulmonary disease, which increases the risk of lung cancer's occurrence independently of smoking.⁵ Chronic obstructive pulmonary disease is also associated with systemic inflammation and shares several mechanisms with lung cancer, including airways inflammation protease/antiprotease imbalance, oxidative stress, and abnormal repair mechanisms.⁶ In chronic obstructive pulmonary disease, markers of systemic inflammation are related to survival and nutritional status.⁶

Serum C-reactive protein (CRP), a well known and routinely measured marker of chronic inflammation, is produced in the liver in response to elevated levels of proinflammatory cytokines, in particular interleukin 1, tumor necrosis factor α , and mainly interleukin 6.⁷ In NSCLC, the tumoral cells are able to release interleukin 6 and tumor necrosis factor α , as assessed by experimental studies on lung cancer cell lines and expression studies on resected specimens.⁸⁻¹⁰

CRP has been identified as a prognostic factor in several tumors.^{11,12} Its relationship with prognosis has also been suggested in advanced NSCLC^{13,14} and, to a lesser extent in resectable disease.^{15,16} In that context, CRP levels are related to several clinicopathologic features (mainly tumor size), which makes it difficult to determine their respective roles in survival.¹⁵

Q6 From the Departments of ^aThoracic Surgery, ^bClinical Epidemiology, ^cChest Disease, and ^dPathology, Hôtel-Dieu Hospital, APHP, Université Paris Descartes, Paris, France; ^eInserm UMRS 938, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris, France; ^fthe Department of Thoracic Surgery, Centre Hospitalier Universitaire de Strasbourg, France; ^gInserm UMRS 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; ^hInserm UMRS 872, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France; and ⁱInserm UMRS 872, Université Paris Descartes, Paris, France.

Disclosures: The authors have no financial interest in the topics discussed in this paper. No financial support was obtained.

*These authors contributed equally to the work.

Received for publication Feb 6, 2011; revisions received June 24, 2011; accepted for publication July 14, 2011.

Address for reprints: Marco Alifano, MD, PhD, Service de Chirurgie Thoracique, Hôtel-Dieu Hospital, 1 Place du Parvis de Notre Dame, 75181 Paris, France (E-mail: marco.alifano@htl.aphp.fr).
0022-5223/\$36.00

Copyright © 2011 by The American Association for Thoracic Surgery
doi:10.1016/j.jtcvs.2011.07.021

Abbreviations and Acronyms

CI	= confidence interval
CRP	= C-reactive protein
CT	= computed tomography
NSCLC	= non-small cell lung cancer

The aim of this study was to determine whether pre-resection serum CRP level is an independent predictor of survival for resected NSCLC. We analyzed data of 2 cohorts of consecutive patients undergoing surgery for NSCLC in 2 French Institutions.

MATERIALS AND METHODS

A 2-step process was followed. First, data from a prospective cohort of all consecutive patients who underwent lung resection at Hôtel-Dieu University Hospital in Paris were analyzed (main cohort). Then generalizability of results was assessed in another cohort of patients with similar inclusions characteristics cared for in another center (validation cohort).

Informed consent was obtained from all patients. The research was conducted according to recommendations outlined in the Helsinki Declaration. Institutional review board approval was obtained (CPP Ile de France II, No. 2008-133).

Serum CRP levels were measured in laboratories of both institutions by nephelometry as a part of routine presurgical laboratory examinations. Lower detection limit was 3 mg/L, which was chosen as a cutoff. On the basis of clinical relevance, a second cutoff was set at 20 mg/L.

Long-term survivals of patients in both cohorts were assessed retrospectively by direct telephonic patient or family (in the case of deceased patients) interviews. When no clinical follow-up was available, information on vital status was obtained through the municipality of birth of the patient.

Main Cohort

All patients undergoing major lung resection for NSCLC between June 15, 2001, and May 15, 2002, in the Thoracic Surgery Department of Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France, were included in this study. Patients were excluded if any of the following features were present: antibiotic treatment in the week before hospital admission, fever with temperature greater than 38°C, purulent sputum, or lung consolidation. Patients characteristics, treatment procedures, and short-term outcomes were prospectively collected with a standardized case report form, which was initially designed to study the determinants of postoperative respiratory complications.^{17,18} For the purposes of this study, the variables shown in Table 1 were analyzed. In particular, we recorded the following: age, sex, body mass index, medical history including tobacco consumption, lung function, indication for lung resection, CRP level, white blood cell count, chest radiography, and albumin and prealbumin levels. Data on long-term outcomes were obtained retrospectively.

Validation Cohort

The validation clinical series was obtained by retrospective analysis of clinical, pathologic, and laboratory files of patients undergoing surgery for NSCLC between April 1, 2005, and May 31, 2006, in the Department of Thoracic Surgery of Strasbourg University Hospital, France.

Patient Management

In both centers, the patient management was similar. Staging protocol involved chest radiography, fiberoptic bronchoscopy, thoracic and upper

abdominal computed tomography (CT). Cerebral CT scans were performed in the presence of neurologic symptoms or if N2 disease was suspected. Positron emission tomographic scans were seldom performed before 2006 at either institution.

Mediastinal Lymph Node Assessment and Neoadjuvant Chemotherapy

In the case of clinical suspicion of N2 disease (lymph node short axis >1 cm on CT scan), mediastinal staging was carried out by either transbronchial needle aspiration or, more frequently, mediastinoscopy. In rare cases the disease was staged N2 on the basis of CT and positron emission tomographic scans without histologic confirmation because of the presence of bulky homolateral lymph nodes. If N2 disease was confirmed, neoadjuvant chemotherapy was administered. Patients were then considered to have operable disease in the presence of clinical response or stable disease. In cases of progressive disease, surgery was not proposed and the patient was excluded from this analysis.

Surgical Procedure, Pathologic Data, and Adjuvant Treatment

Surgery was carried out through standard posterolateral thoracotomy. Full nodal dissection was carried out in all cases. Collected pathologic data included histologic type; T, N, and M parameters; and tumor stage according to the 1997 Union for International Cancer Control, American Thoracic Society, and American College of Chest Physicians lung cancer staging system. Information about the presence of vascular or lymphatic tumor emboli was also collected. Adjuvant radiotherapy or chemotherapy was proposed on an individual basis after multidisciplinary evidence-based discussions with patients under the care of their referring physicians.

Data Analysis

Characteristics of patients were described with numbers and percentage. The characteristics associated with CRP levels were identified with χ^2 or Fisher Exact tests as appropriate. Survival was described according to the Kaplan-Meier method. Survivals were compared according to the characteristics of participants with log-rank tests. All the variables associated with survival with a *P* value lower than .2 in univariate analysis were entered into the multivariate analysis with the Cox model. To further control for confounding, we also adjusted on a propensity score of having a CRP level greater than 20 mg/L. To do so, we performed a logistic regression model with CRP level greater than 20 mg/L as the dependent variable with all variables that were recorded in a sufficient number of patients.

The multivariate analysis also included an interaction term between CRP level and stage of the cancer to assess whether the effect of CRP varied with stage of cancer. This interaction proved significant, so we have presented the results separately for stages I and II and stages III and IV.

All the analyses were performed with the software R 2.10.1, a language and environment for statistical computing. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS**Main Cohort**

Among 347 patients undergoing lung resections for NSCLC between June 2001 and May 2002 at Hôtel-Dieu Hospital, 47 were excluded from the analysis: 29 with infection at time of surgery and 18 because they were not living in France (so follow-up was limited). Altogether, 300 patients were analyzed.

Preoperative, surgical, and pathologic data. An endobronchial tumor was seen at fiberoptic bronchoscopy in

127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148

CTIS

159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248

TABLE 1. Patient characteristics (main cohort)

	Total (N = 300)	C-reactive protein level (mg/L)			P value
		≤3 (N = 136)	4–20 (N = 89)	>20 (N = 64)	
Men	255 (85%)	117 (47.4%)	76 (30.8%)	54 (21.9%)	.9757
Age >70 y	77 (25.7%)	38 (50.7%)	21 (28%)	16 (21.3%)	.7635
Body mass index (kg/m ²)					.2237
<18.5	25 (8.6%)	15 (62.5%)	5 (20.8%)	4 (16.7%)	
18.5–25	151 (51.7%)	59 (40.7%)	49 (33.8%)	37 (25.5%)	
≥25	116 (39.7%)	59 (51.3%)	35 (30.4%)	21 (18.3%)	
Smoking history					
Past or present smoking	284 (94.7%)	128 (46.7%)	85 (31%)	61 (22.3%)	.9417
Cessation ≥2 wk before surgery	167 (59.2%)	74 (46.2%)	48 (30%)	38 (23.8%)	.6975
Comorbid illness					
Alcohol abuse	84 (28.1%)	42 (50.6%)	29 (34.9%)	12 (14.5%)	.1233
Diabetes mellitus	38 (13.7%)	17 (44.7%)	11 (28.9%)	10 (26.3%)	.9236
Angina history	33 (16%)	16 (48.5%)	12 (36.4%)	5 (15.2%)	.4842
Stroke	13 (6.3%)	10 (76.9%)	2 (15.4%)	1 (7.7%)	.2204
Lower limb atheroma	29 (14%)	18 (62.1%)	9 (31%)	2 (6.9%)	.142
Respiratory status					
Chronic bronchitis	201 (67%)	92 (47.9%)	58 (30.2%)	42 (21.9%)	.9338
Chronic obstructive pulmonary disease	198 (66.4%)	80 (41.5%)	64 (33.2%)	49 (25.4%)	.0186
American Society of Anesthesiologists score					
I or II	190 (64.8%)	87 (47.3%)	52 (28.3%)	45 (24.5%)	.4085
III or IV	103 (35.2%)	46 (46%)	35 (35%)	19 (19%)	
Albumin <40 g/L	63 (22.8%)	11 (17.7%)	15 (24.2%)	36 (58.1%)	<.0001
Prealbumin <200 mg/L	45 (18.4%)	5 (11.4%)	12 (27.3%)	27 (61.4%)	<.0001
Right-sided procedure	178 (59.3%)	84 (49.4%)	53 (31.2%)	33 (19.4%)	.3929
Type of resection					
Lobectomy or bilobectomy	230 (76.7%)	112 (49.8%)	70 (31.1%)	43 (19.1%)	.0582
Pneumectomy	70 (23.3%)	24 (37.5%)	19 (29.7%)	21 (32.8%)	
Chest wall resection or parietal pleura	18 (6%)	6 (33.3%)	3 (16.7%)	9 (50%)	.0241
Histologic type					.0209 Q4
Epidermoid carcinoma	119 (39.7%)	45 (39.5%)	37 (32.5%)	32 (28.1%)	
Adenocarcinoma	120 (40%)	61 (52.6%)	42 (36.2%)	13 (11.2%)	
Basaloid carcinoma	1 (0.3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
Bronchoalveolar carcinoma	11 (3.7%)	7 (63.6%)	2 (18.2%)	2 (18.2%)	
Large cell carcinoma	38 (12.7%)	16 (44.4%)	8 (22.2%)	12 (33.3%)	
Mixed carcinoma	6 (2%)	3 (50%)	0 (0%)	3 (50%)	
Large cell neuroendocrine carcinoma	3 (1%)	2 (66.7%)	0 (0%)	1 (33.3%)	
Pathologic stage					.0029
I	126 (42.4%)	74 (60.7%)	31 (25.4%)	17 (13.9%)	
II	67 (22.6%)	25 (37.3%)	21 (31.3%)	21 (31.3%)	
III	92 (31%)	33 (38.4%)	32 (37.2%)	21 (24.4%)	
IV	12 (4%)	3 (27.3%)	3 (27.3%)	5 (45.5%)	
Microvascular invasion					
Vascular emboli	130 (43.6%)	2 (100%)	51 (40.2%)	50 (31.2%)	.0433
Lymphatic emboli	76 (25.6%)	32 (43.2%)	26 (35.1%)	16 (21.6%)	.67

All data represent numbers and percentages of patients.

34.4% of cases; 8.5% of patients had a cavitory lesion on preoperative CT scan. Induction treatments had been carried out in 80 patients (68 chemotherapy, 12 radiotherapy). Main indication for preoperative induction therapy was N2 disease (n = 68), which was diagnosed on the basis of mediastinoscopy (n = 48), transtracheal needle aspiration (n = 4), or imaging (n = 16). All chemotherapy protocols

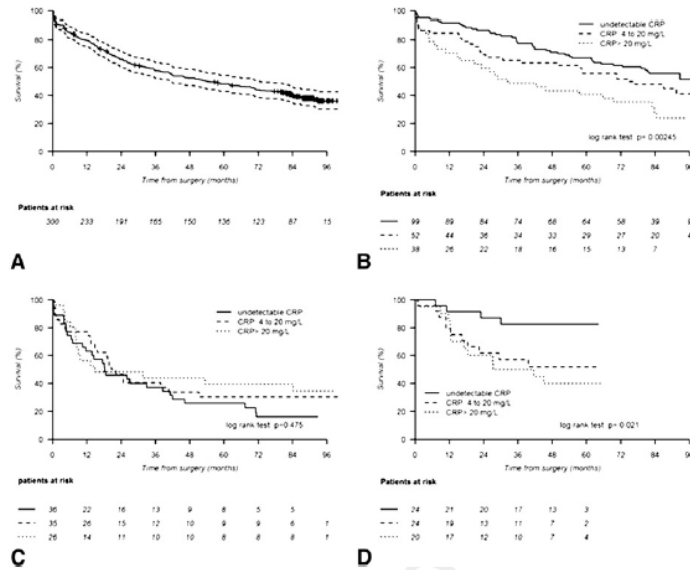
were platinum based. Operative mortality was 6.3% (n = 19).

Table 1 summarizes the main preoperative characteristics and surgical and pathologic data, including CRP levels, of all patients. CRP level of 3 mg/L or less was found in 136 patients (45.3%), and among patients with a detectable CRP (n = 153), 89 (29.7%) had a CRP level between

371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392

GTS

403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431



Q7 FIGURE 1. Kaplan-Meier estimates of survival. A, Overall survival in the main cohort. B, Survival curves of patients with stages I and II in the main cohort according to the C-reactive protein (CRP) levels. C, Survival curves of patients with stages III and IV in the main cohort according to the C-reactive protein levels. D, Survival curves in the validation cohort according to the C-reactive protein levels.

4 and 20 mg/L and 64 (21.3%) had a level higher than 20 mg/L. The CRP levels were associated with GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) stage II chronic obstructive pulmonary disease ($P = .0186$), hypoalbuminemia ($P < .0001$), and hypoprealbuminemia ($P < .0001$), as well as histologic type ($P = .0209$), pathologic stage ($P = .0029$), microvascular invasion ($P = .0433$), and chest wall resection ($P = .0241$).

Long-term survival. At completion of the study (June 2010), 120 patients (40%) were alive and 180 (60%) were dead. The median follow-up duration was 89.2 months (interquartile range, 82.6–92.9 months). For the whole population, median survival was 54.9 months (95% confidence interval [CI], 41.1–72.5 months). The 3-, 5-, and 7-year overall survivals were 57.8% (95% CI, 52.4%–63.7%), 48.3% (95% CI, 42.9%–54.4%), and 44.0% (95% CI, 38.6%–50.1%), respectively (Figure 1, A).

The univariate survival analysis is reported in Table 2. Factors associated with long-term survival were chronic bronchitis ($P = .0136$), hypoprealbuminemia ($P = .0215$), the type of resection ($P < .0001$), the pathologic stage ($P < .0001$), and the presence of vascular emboli ($P = .0381$). CRP level cut-offs of undetectable, higher than 3 mg/L, and higher than 20 mg/L tended to be associated with survival ($P = .0571$), with 5-year survivals of 55.6% (95% CI, 47.8%–64.8%), 45.6% (95% CI, 36.2%–57.5%), and 40.0% (95%

CI 29.4%–54.4%), respectively. Survival curves in stages I and II on the one hand and in stage III and IV on the other hand are presented in Figure 1 (B and C, respectively). In stages I and II, patients with an undetectable CRP had a better survival than did those with a CRP greater than 20 mg/L and those with a CRP between 4 and 20 ($P = .00245$). In stages III and IV, survival was not significantly different among the CRP levels ($P = .475$).

The results of the multivariate analysis are presented in Table 3. Stages III and IV ($P = .0040$), pneumonectomy ($P = .0025$), CRP greater than 20 mg/L ($P = .037$), and American Society of Anesthesiologists score III or IV ($P = .0031$) were independent predictors of death in the whole population. There was a statistically significant interaction between CRP level and stage of the cancer. Table 4 shows the adjusted hazard ratios for CRP levels according to the stage of the cancer. In stages I and II, the patients with CRP greater than 20 mg/L had a significantly increased adjusted hazard ratio of 1.874 (95% CI, 1.039–3.381) relative to patients with undetectable CRP, and those with a CRP between 4 and 20 mg/L had a nonsignificantly increased hazard ratio of 1.364 (95% CI, 0.824–2.257). In stages III and IV, the association was inverse but not significant: patients with a CRP greater than 20 mg/L had a lower adjusted hazard ratio of 0.492 (95% CI, 0.233–1.039) relative to those with undetectable CRP.

432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492

TABLE 2. Effects of clinical, laboratory, and pathologic parameters on survival in the whole population of the main cohort: Univariate analysis

Variable	Survival	Lower	Upper	P value
Age				.095
≤70 y	0.508	0.445	0.579	
>70 y	0.41	0.312	0.539	
Body mass index				.104
<18.5 kg/m ²	0.477	0.315	0.721	
18.5–24.99 kg/m ²	0.44	0.367	0.528	
≥25 kg/m ²	0.544	0.459	0.645	
Sex				.2707
Men	0.469	0.411	0.536	
Women	0.562	0.432	0.732	
Chronic bronchitis				.0136
Yes	0.433	0.368	0.508	
No	0.586	0.495	0.693	
Albumin				.0506
<40 g/L	0.39	0.283	0.538	
≥40 g/L	0.523	0.46	0.596	
Prealbumin				.0215
<200 mg/L	0.368	0.248	0.547	
≥200 mg/L	0.534	0.468	0.609	
Chronic obstructive pulmonary disease				.8185
No	0.472	0.382	0.583	
Yes	0.488	0.423	0.564	
Current or past smoker				.1979
Yes	0.478	0.422	0.541	
No	0.591	0.384	0.91	
Atheroma				.2792
No	0.435	0.316	0.599	
Yes	0.51	0.439	0.591	
American Society of Anesthesiologists score				.0131
I or II	0.526	0.459	0.603	
III or IV	0.394	0.308	0.504	
Resection				<.0001
Lobectomy or bilobectomy	0.549	0.488	0.618	
Pneumonectomy	0.261	0.173	0.392	
C-reactive protein				.0571
Undetectable	0.556	0.478	0.648	
4–20 mg/L	0.456	0.362	0.575	
>20 mg/L	0.400	0.294	0.544	
Pathologic stage				<.0001
I	0.696	0.62	0.782	
II	0.381	0.279	0.521	
III or IV	0.287	0.21	0.393	
Histologic type				.8353
Other	0.496	0.427	0.577	
Epidermoid	0.471	0.388	0.571	
Vascular emboli				.0381
No	0.554	0.483	0.636	
Yes	0.398	0.321	0.494	
Lymphatic emboli				.1179
No	0.514	0.452	0.586	
Yes	0.403	0.305	0.533	

Validation Cohort

Sixty-eight patients were evaluated in the validation cohort. There were 11 women and 57 men. Mean age was 62.2 ± 9.9 years. Ten pneumonectomies and 58 lobectomies or bilobectomies were performed for NSCLC. Histologic types were epidermoid carcinoma, adenocarcinoma, large cell carcinoma, bronchoalveolar carcinoma, mixed carcinoma, and large cell neuroendocrine carcinoma in 29, 23, 7, 6, 2, and 1 patients, respectively. Pathologic stages were IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, and IV in 13, 14, 1, 8, 23, 5, and 2 cases, respectively.

CRP values of 3 mg/L or less were found in 24 (35.3%) of 68 patients, 25 patients had a CRP value between 4 and 20 mg/L, and 20 had a CRP value greater than 20 mg/L. The median of the detectable CRP values was 17.5 mg/L (interquartile range 10–60.5 mg/L).

Age ($P = .32$), sex ($P = .84$), extent of resection ($P = .21$), and histologic type (epidermoid vs adenocarcinoma or large cell carcinoma, $P = .069$) failed to be associated with survival. Stage ($P = .012$) and CRP level ($P = .021$) were predictors of survival in univariate analysis. Patients with CRP levels of 3 mg/L or less had a 5-year survival of 82.7% (95% CI, 62.9%–93.1%), as compared with 51.7% (95% CI, 34.6%–77.4%) and 40.0% (95% CI 23.4%–68.4%) for patients with a CRP between 4 and 20 mg/L and those with a CRP greater than 20 mg/L, respectively ($P = .021$). After adjustment with the pathologic stage, the association between worse survival and CRP levels was maintained only between patients with undetectable CRP and patients with CRP greater than 20 mg/L ($P = .018$) and was lost between patients with a CRP between 4 and 20 ($P = .12$) and those with an undetectable CRP.

DISCUSSION

This large study found that CRP level is an independent predictor of long-term survival in patients with initial stage resected NSCLC. This suggests that systemic inflammation is related to outcome in these patients. These results are based on the study of 2 cohorts from 2 different surgical centers: in the first, preoperative and early postoperative data were prospectively collected, whereas survival data were retrospectively obtained; in the validation cohort, both preoperative and postoperative data were collected retrospectively.

Strengths and Limitations of the Study

In our opinion, a main strength of the study was the high number of consecutive patients evaluated in the main cohort with a standardized case report form that included a large number of clinical and laboratory parameters that are not usually measured in patients undergoing surgery for lung cancer. On the other hand, the retrospective character of

554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575

GTS

586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614

TABLE 3. Survival multivariate analysis based on a Cox model in the whole sample

	Coefficient	SE (coefficient)	Pr (> z)
Stage			
III or IV vs I or II	0.920	0.279	0,0010
Type of surgery			
Pneumonectomy vs lobectomy or bilobectomy	0.682	0.204	0,0008
American Society of Anesthesiologists score			
III or IV vs I or II	e	0.190	0,0270
C-reactive protein			
4–20 mg/L vs undetectable	0.310	0.257	0,2276
>20 mg/L vs undetectable	0.628	0.301	0,0368
Body mass index			
>25 kg/m ² vs 18.5–25 kg/m ²	-0.081	0.178	0,6497
≤18.5 vs >18.5–25 kg/m ²	0.360	0.313	0,2499
Age			
>70 y vs ≤70 y	0.078	0.201	0,7001
Lymphatic emboli			
Yes vs no	0.030	0.199	0,8786
Vascular emboli			
Yes vs no	0.263	0.182	0,1490
Smoking status			
Smoker vs not a smoker	0.852	0.599	0,1550
Chronic bronchitis			
Yes vs no	0.324	0.200	0,1048
Albumin			
<40 g/L vs ≥40 g/L	0.006	0.378	0,9876
Propensity score	0.483	0.765	0,5278
Interactions with stage III or IV			
C-reactive protein 4–20 mg/L	-0.636	0.398	0,1096
C-reactive protein >20 mg/L	-1.338	0.438	0,0023

the data collection prevented us from obtaining precise information on disease relapse after surgery. Overall survival, rather than progression-free survival, was therefore evaluated. Furthermore, missing data led us to exclude some potentially eligible patients. This limitation concerned only a minority of patients, however, and is therefore unlikely to have affected the results.

Abnormal CRP values (>3 mg/L), indicating some degree of systemic inflammation, were present in approximately half of operable patients with operable disease. This parameter could thus constitute the basis for development of specific management strategy in a significant proportion of cases. In the Japanese study by Hara and colleagues,¹⁵ only 38 out of the 203 surgically treated patients (18.7%) were found to have abnormal CRP values; however, their cutoff was set at 5 mg/L.

CRP Levels and Tumor Size

In our experience, the number of patients with increased CRP levels was relatively low in stage IA NSCLC (29% and 33% in the main and validation cohorts, respectively)

TABLE 4. Adjusted hazard ratios calculated from the multivariate analysis, taking into account the interaction between C-reactive protein levels and pathologic stage

C-reactive protein level	Stage I or II	Stage III or IV
4–20 mg/L vs undetectable	1.364 (0.824–2.257)	0.722 (0.395–1.319)
>20 vs undetectable	1.874 (1.039–3.381)	0.492 (0.233–1.039)

Figures are hazard ratios with 95% confidence intervals. Adjustments were done for age, propensity score for C-reactive protein greater than 20 mg/L, vascular and lymphatic emboli, type of surgery, chronic bronchitis, American Society of Anesthesiologists score, albuminemia, smoking status, pathologic stage, and interaction between C-reactive protein level and pathologic stage.

but increased dramatically in stage IB (57% and 78% in the main and validation cohorts, respectively). Although this finding is in agreement with the known relationship between CRP levels and primary tumor burden,¹⁹ the prognostic value of both CRP level and pT persisted in multivariate analysis, suggesting that the predictive values of these 2 features are at least in part independent. As already reported by others,¹⁹ we did not find a correlation between CRP and pN and pM parameters.

CRP as a Prognostic Factor in Resected NSCLC

High CRP levels were a marker of poor prognosis in patients with stage I and II disease. Comparison with the available literature is difficult, because only a few studies have assessed the prognostic value of CRP in resected lung cancer. In these studies,^{15,16} prognostic significance was demonstrated in the whole population but an analysis per stage was unavailable, probably because of the relatively low number of patients in each category.

Underlying Mechanisms

In a large cohort study of 10,408 individuals, it was recently shown that elevated CRP levels in cancer-free subjects were associated with an increased risk of subsequent occurrence of cancer, particularly lung cancer.⁴ The mechanisms underlying this association have not been elucidated. In particular, the cohort studies do not allow one to differentiate between whether systemic inflammation and CRP levels are markers of occult cancer or are causally related to the malignancy.⁶ A more recent analysis of the same cohorts, however, based on the mendelian randomization approach of 4 common single-nucleotide polymorphisms, suggests that elevated CRP levels do not cause cancer per se.²⁰ Thus in cancer-free patients, high levels of CRP might relate to occult cancers. Interestingly, in that study, increased baseline CRP levels were associated with early death after diagnosis of any cancer in patients without metastatic disease at diagnosis.⁴

In our study, CRP levels were significantly correlated with tumoral vascular emboli. Blood vessel invasion is known to be crucial for tumor spread, and it as been suggested that vascular invasion could be an indicator of occult metastases in early stages. Lee and associates¹⁹ also found

GTS

737 that tumor size and vascular invasion were independently
738 associated with CRP levels in a multiple linear regression
739 analysis. The mechanisms underlying this association re-
740 main poorly explained. The role of proinflammatory cyto-
741 kine secretion by endothelial cells encountering tumor
742 cells could be an interesting hypothesis.¹⁹

744 Other mechanisms explaining the prognostic role of CRP
745 have been advocated. CRP could be a marker of tumor pro-
746 duction of interleukin 6, which is known to block p53-
747 induced apoptosis.¹⁵ Thus increased CRP levels could be
748 a marker of the ability of tumors to maintain a microenviron-
749 ment suitable for the survival of remnant cells through the
750 upregulation of some acute inflammatory cytokines.¹⁵

752 Another possible explanation of the prognostic value of
753 CRP could be the relationship between systemic inflamma-
754 tion and nutritional status.⁷ Systemic inflammation has del-
755 eterious effects through the catabolic effects of cytokines
756 and acute-phase proteins, which increase resting energy ex-
757 penditure. Indeed, in our experience prealbumin levels and
758 Prognostic Inflammatory and Nutrition Index (which cor-
759 related negatively with CRP, data not shown) were predictors
760 of survival in univariate analysis, although their prognostic
761 value did not persist in multivariate analysis. This finding
762 suggests that nutritional derangement is a less robust deter-
763 minant of prognosis than is preoperative CRP level.

764 Perspectives

765 Patients with initial stage NSCLC are best treated with
766 surgery when possible, but at present there is no consensus
767 regarding the usefulness of postoperative follow-up. Re-
768 peated chest radiography, CT scan, fiberoptic bronchos-
769 copy, and positron emission tomographic scan have been
770 proposed, with enormous variations in medical resource
771 use and costs, as well as generation of patient stress. On
772 the other hand, adjuvant chemotherapy is known to improve
773 survival for patients with stage II or IIIa resected NSCLC,
774 although it provides no survival advantage for patients
775 with stage Ia disease. Results remain controversial for stage
776 Ib disease.²¹

777 Identification of patients with poor prognosis within a de-
778 termined stage would thus be useful for individual tailoring
779 of postoperative management. CRP measurement, together
780 with available clinicopathologic parameters, could help in
781 identifying patients requiring more aggressive manage-
782 ment. This potential utility remains to be formally demon-
783 strated in adequately designed studies.

784 We are grateful to Mrs Beatrice Marmey and Mrs Patricia Bon-
785 jour for precious technical assistance. M.A. cared for patients of
786 the main cohort, conceived the study, analyzed data, and wrote
787 the paper. P.E.F. cared for patients of the validation cohort and
788 contributed to study conception and hypothesis delineation. V.S.
789 analyzed data. N.R. was involved in the design of the study and
790 in manuscript writing. O.S. prospectively collected preoperative

791 data. M.Y. collected data on long-term survival. F.A. collected pre-
792 operative and survival data of the validation cohort. P.F. was in-
793 volved in the conception of the study and hypothesis delineation.
794 A.D. analyzed data and contributed to writing the paper. G.M.
795 cared for patients of the validation cohort and was involved in
796 the conception of the study. D.D. contributed to study conception
797 and hypothesis delineation. J.-F.R. cared for patients of main
798 cohort and was involved in the conception of the study.

Q3

References

1. McMillan DC. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12:223-6.
2. Balkwill F, Mantovani A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;87:401-6.
3. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010;16:133-44.
4. Allin KH, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Baseline C-reactive protein is associated with incident cancer and survival in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:2217-24.
5. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):29S-55.
6. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 2009;33:1165-85.
7. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111:1805-12. Erratum in: *J Clin Invest*. 2003;112:299.
8. Matsuguchi T, Okamura S, Kawasaki C, Shimoda K, Omori F, Hayashi S, et al. Constitutive production of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 by a human lung cancer cell line, KSNY: gene amplification and increased mRNA stability. *Eur J Haematol*. 1991;47:128-33.
9. Haura EB, Livingston S, Coppola D. Autocrine interleukin-6/interleukin-6 receptor stimulation in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2006;7:273-5.
10. Niiya M, Niiya K, Kiguchi T, Shibakura M, Asaumi N, Shinagawa K, et al. Induction of TNF- α , uPA, IL-8 and MCP-1 by doxorubicin in human lung carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;52:391-8.
11. McMillan DC, Elahi MM, Sattar N, Angerson WJ, Johnston J, McArdle CS. Measurement of the systemic inflammatory response predicts cancer-specific and non-cancer survival in patients with cancer. *Nutr Cancer*. 2001;41:64-9.
12. Elahi MM, McMillan DC, McArdle CS, Angerson WJ, Sattar N. Score based on hypoalbuminemia and elevated C-reactive protein predicts survival in patients with advanced gastrointestinal cancer. *Nutr Cancer*. 2004;48:171-3.
13. Wilop S, Crysandt M, Bendel M, Mahnken AH, Osieka R, Jost E. Correlation of C-reactive protein with survival and radiographic response to first-line platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Onkologie*. 2008;31:665-70.
14. Koch A, Föhlin H, Sörenson S. Prognostic significance of C-reactive protein and smoking in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with first-line palliative chemotherapy. *J Thorac Oncol*. 2009;4:326-32.
15. Hara M, Matsuzaki Y, Shimizu T, Tomita M, Ayabe T, Enomoto Y, et al. Preoperative serum C-reactive protein level in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2007;27:3001-4.
16. O'Dowd C, McRae LA, McMillan DC, Kirk A, Milroy R. Elevated preoperative C-reactive protein predicts poor cancer specific survival in patients undergoing resection for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010;5:988-92.
17. Schussler O, Alifano M, Dermine H, Strano S, Casetta A, Sepulveda S, et al. Postoperative pneumonia after major lung resection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1161-9.
18. Schussler O, Dermine H, Alifano M, Casetta A, Coignard S, Roche N, et al. Should we change antibiotic prophylaxis for lung surgery? Postoperative pneumonia is the critical issue. *Ann Thorac Surg*. 2008;86:1727-33.
19. Lee JG, Cho BC, Bae MK, Lee CY, Park IK, Kim DJ, et al. Preoperative C-reactive protein levels are associated with tumor size and lymphovascular invasion in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009;63:106-10.
20. Allin KH, Nordestgaard BG, Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Bojesen SE. C-reactive protein and the risk of cancer: a mendelian randomization study. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:202-6.
21. Wakelee HA, Schiller JH, Gandara DR. Current status of adjuvant chemotherapy for stage IB non-small-cell lung cancer: implications for the New Intergroup Trial. *Clin Lung Cancer*. 2006;8:18-21.

GTS

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859	000 Preresection serum C-reactive protein measurement and survival among	920
860	patients with resectable non-small cell lung cancer	921
861	<i>Marco Alifano, MD, PhD, Pierre E. Falcoz, MD, PhD, Valérie Seegers, MD, Nicolas Roche, MD,</i>	922
862	<i>PhD, Olivier Schussler, MD, PhD, Mohamad Younes, MD, Filippo Antonacci, MD, Patricia</i>	923
863	<i>Forgez, PhD, Agnes Dechartres, MD, Gilbert Massard, MD, Diane Damotte, MD, PhD, and</i>	924
864	<i>Jean-François Régnard, MD, Paris and Strasbourg, France</i>	925
865		926
866		927
867	Patients with resectable non-small cell lung cancer frequently have abnormal serum C-reactive	928
868	protein levels. Preresection C-reactive protein level higher than 20 mg/L independently predicts	929
869	worse survival after complete resection of stage I or II non-small cell cancer and thus could be an	930
870	inexpensive prognostic marker for these patients.	931
871		932
872		933
873		934
874		935
875		936
876		937
877		938
878		939
879		940
880		941
		942
		943
		944
		945
		946
		947
		948
		949
		950
		951
		952
		953
		954
		955
		956
		957
		958
		959
		960
		961
		962
		963
		964
		965
		966
		967
		968
		969
		970
		971
		972
		973
		974
		975
		976
		977
		978
		979
		980

891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919

VI- REFERENCES

- (1997). "IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Silica, Some Silicates, Coal Dust and Para-Aramid Fibrils. Lyon, 15-22 October 1996." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **68**: 1-475.
- (2004). "Tobacco smoke and involuntary smoking." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **83**: 1-1438.
- Achilefu, S., A. Srinivasan, et al. (2003). "Novel bioactive and stable neurotensin peptide analogues capable of delivering radiopharmaceuticals and molecular beacons to tumors." J Med Chem **46**(15): 3403-11.
- Akiri, G., M. M. Cherian, et al. (2009). "Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma." Oncogene **28**(21): 2163-72.
- Alberg, A. J., J. G. Ford, et al. (2007). "Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)." Chest **132**(3 Suppl): 29S-55S.
- Alberg, A. J. and J. M. Samet (2003). "Epidemiology of lung cancer." Chest **123**(1 Suppl): 21S-49S.
- Alderson, M. (1974). "Mortality from malignant disease in patients with asthma." Lancet **2**(7895): 1475-7.
- Alexander, M. J., P. R. Dobner, et al. (1989). "Estrogen induces neurotensin/neuromedin N messenger ribonucleic acid in a preoptic nucleus essential for the preovulatory surge of luteinizing hormone in the rat." Endocrinology **125**(4): 2111-7.
- Alexander, M. J. and S. E. Leeman (1994). "Estrogen-inducible neurotensin immunoreactivity in the preoptic area of the female rat." J Comp Neurol **345**(4): 496-509.
- Alifano, M., M. Loi, et al. "Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma." Biochimie **92**(2): 164-70.
- Alifano, M., M. Loi, et al. (2010). "Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma." Biochimie **92**(2): 164-70.
- Alifano, M., F. Souzae, et al. (2010). "Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **16**(17): 4401-10.
- Alimandi, M., A. Romano, et al. (1995). "Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas." Oncogene **10**(9): 1813-21.
- Allen, A. E., D. N. Carney, et al. (1988). "Neurotensin binds with high affinity to small cell lung cancer cells." Peptides **9 Suppl 1**: 57-61.
- Alroy, I. and Y. Yarden (1997). "The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions." FEBS Lett **410**(1): 83-6.
- 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): 3162-8.
- 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): 226-35.
- Amar, S., P. Kitabgi, et al. (1986). "Activation of phosphatidylinositol turnover by neurotensin receptors in the human colonic adenocarcinoma cell line HT29." FEBS Lett **201**(1): 31-6.
- Amorino, G. P., P. D. Deeb, et al. (2007). "Neurotensin stimulates mitogenesis of prostate cancer cells through a novel c-Src/Stat5b pathway." Oncogene **26**(5): 745-56.
- Andersson, S., S. Rosell, et al. (1977). "Inhibition of gastric and intestinal motor activity in dogs by (Gln⁴) neurotensin." Acta Physiol Scand **100**(2): 231-5.
- Anker, P., F. Lefort, et al. (1997). "K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer." Gastroenterology **112**(4): 1114-20.
- Baca, I., G. E. Feurle, et al. (1982). "Effect of neurotensin on exocrine pancreatic secretion in dogs." Digestion **23**(3): 174-83.

- 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): 6494-501.
- Banker, N. A., M. R. Hellmich, et al. (1997). "Src-mediated activation of the human neurotensin/neuromedin N promoter." *Surgery* **122**(2): 180-5; discussion 185-6.
- Barbero, P., C. Rovere, et al. (1998). "PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells." *J Biol Chem* **273**(39): 25339-46.
- Bargonetti, J., P. N. Friedman, et al. (1991). "Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication." *Cell* **65**(6): 1083-91.
- Basso, A. D., D. B. Solit, et al. (2002). "Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2." *Oncogene* **21**(8): 1159-66.
- Baulida, J. and G. Carpenter (1997). "Heregulin degradation in the absence of rapid receptor-mediated internalization." *Exp Cell Res* **232**(1): 167-72.
- Baulida, J., M. H. Kraus, et al. (1996). "All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired." *J Biol Chem* **271**(9): 5251-7.
- Bean, A. J., A. Dagerlind, et al. (1992). "Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls." *Neuroscience* **50**(2): 259-68.
- 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): 20932-7.
- Beguinot, L., R. M. Lyall, et al. (1984). "Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(8): 2384-8.
- Bell, D. W., I. Gore, et al. (2005). "Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR." *Nat Genet* **37**(12): 1315-6.
- Ben-Levy, R., H. F. Paterson, et al. (1994). "A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway." *EMBO J* **13**(14): 3302-11.
- Benhamou, S., W. J. Lee, et al. (2002). "Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk." *Carcinogenesis* **23**(8): 1343-50.
- Bhola, N. E. and J. R. Grandis (2008). "Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer." *Front Biosci* **13**: 1857-65.
- Blackburn, A. M., D. R. Fletcher, et al. (1980). "Neurotensin infusion in man: pharmacokinetics and effect on gastrointestinal and pituitary hormones." *J Clin Endocrinol Metab* **51**(6): 1257-61.
- Boffetta, P. (2002). "Involuntary smoking and lung cancer." *Scand J Work Environ Health* **28 Suppl 2**: 30-40.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res* **49**(17): 4682-9.
- Botto, J. M., J. Chabry, et al. (1997). "Identification in the rat neurotensin receptor of amino-acid residues critical for the binding of neurotensin." *Brain Res Mol Brain Res* **46**(1-2): 311-7.
- Bouali, S., A. S. Chretien, et al. (2009). "P53 and PTEN expression contribute to the inhibition of EGFR downstream signaling pathway by cetuximab." *Cancer Gene Ther* **16**(6): 498-507.
- Bouchet, B. P., C. C. de Fromental, et al. (2006). "p53 as a target for anti-cancer drug development." *Crit Rev Oncol Hematol* **58**(3): 190-207.
- Bozou, J. C., S. Amar, et al. (1986). "Neurotensin-mediated inhibition of cyclic AMP formation in neuroblastoma N1E115 cells: involvement of the inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase." *Mol Pharmacol* **29**(5): 489-96.
- Brambilla, E. (2002). "[Classification of broncho-pulmonary cancers (WHO 1999)]." *Rev Mal Respir* **19**(4): 455-66.

- Brennan, P., P. Hainaut, et al. (2011). "Genetics of lung-cancer susceptibility." *Lancet Oncol* **12**(4): 399-408.
- Brook, C. W., A. Shulkes, et al. (1987). "Hepatic metabolism of neurotensin." *Endocrinology* **120**(4): 1397-402.
- Brun, P., C. Mastrotto, et al. (2005). "Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(4): G621-9.
- Buchegger, F., F. Bonvin, et al. (2003). "Radiolabeled neurotensin analog, 99mTc-NT-XI, evaluated in ductal pancreatic adenocarcinoma patients." *J Nucl Med* **44**(10): 1649-54.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, et al. (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." *Mol Cell* **12**(3): 541-52.
- Buschmann, T., O. Potapova, et al. (2001). "Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress." *Mol Cell Biol* **21**(8): 2743-54.
- Cadranel, J., G. Zalcman, et al. (2010). "Genetic profiling and epidermal growth factor receptor-directed therapy in nonsmall cell lung cancer." *Eur Respir J* **37**(1): 183-93.
- Camby, I., I. Salmon, et al. (1996). "Neurotensin-mediated effects on astrocytic tumor cell proliferation." *Neuropeptides* **30**(2): 133-9.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* **296**(5573): 1655-7.
- Cao, Z., X. Wu, et al. (2007). "Neuregulin-induced ErbB3 downregulation is mediated by a protein stability cascade involving the E3 ubiquitin ligase Nrdp1." *Mol Cell Biol* **27**(6): 2180-8.
- 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): 643-55.
- Cappuzzo, F., M. Varella-Garcia, et al. (2005). "Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients." *J Clin Oncol* **23**(22): 5007-18.
- 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): 8163-71.
- Carraway, R. and S. E. Leeman (1973). "The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami." *J Biol Chem* **248**(19): 6854-61.
- Carraway, R. and S. E. Leeman (1976). "Radioimmunoassay for neurotensin, a hypothalamic peptide." *J Biol Chem* **251**(22): 7035-44.
- Carraway, R. E., L. M. Demers, et al. (1976). "Hyperglycemic effect of neurotensin, a hypothalamic peptide." *Endocrinology* **99**(6): 1452-62.
- Carraway, R. E. and S. P. Mitra (1990). "Differential processing of neurotensin/neuromedin N precursor(s) in canine brain and intestine." *J Biol Chem* **265**(15): 8627-31.
- Castagliuolo, I., C. C. Wang, et al. (1999). "Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation." *J Clin Invest* **103**(6): 843-9.
- Chalon, P., N. Vita, et al. (1996). "Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site." *FEBS Lett* **386**(2-3): 91-4.
- Chan, W. M., W. Y. Siu, et al. (2004). "How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer?" *Mol Cell Biol* **24**(8): 3536-51.
- Charloux, A., E. Quoix, et al. (1997). "The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma." *Int J Epidemiol* **26**(1): 14-23.
- Checler, F., S. Amar, et al. (1986). "Catabolism of neurotensin by neural (neuroblastoma clone N1E115) and extraneural (HT29) cell lines." *Peptides* **7**(6): 1071-7.
- Checler, F., P. C. Emson, et al. (1984). "Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the Pro10-Tyr11 bond by endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and a peptidase different from proline-endopeptidase." *J Neurochem* **43**(5): 1295-301.

- Checler, F., J. Mazella, et al. (1986). "High-affinity receptor sites and rapid proteolytic inactivation of neurotensin in primary cultured neurons." *J Neurochem* **47**(6): 1742-8.
- Checler, F., J. P. Vincent, et al. (1985). "Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes partly occurs through cleavage at the Arg8-Arg9 peptide bond by a metalloendopeptidase." *J Neurochem* **45**(5): 1509-13.
- Cheshire, D. R., C. M. Ewing, et al. (2002). "In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis." *Oncogene* **21**(17): 2679-94.
- Chung, G. T., V. Sundaresan, et al. (1995). "Sequential molecular genetic changes in lung cancer development." *Oncogene* **11**(12): 2591-8.
- Churg, A. and B. Stevens (1995). "Enhanced retention of asbestos fibers in the airways of human smokers." *Am J Respir Crit Care Med* **151**(5): 1409-13.
- Citri, A., K. B. Skaria, et al. (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." *Exp Cell Res* **284**(1): 54-65.
- Civenni, G., T. Holbro, et al. (2003). "Wnt1 and Wnt5a induce cyclin D1 expression through ErbB1 transactivation in HC11 mammary epithelial cells." *EMBO Rep* **4**(2): 166-71.
- Costa, D. B., B. Halmos, et al. (2007). "BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations." *PLoS Med* **4**(10): 1669-79; discussion 1680.
- Cragg, M. S., 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): 1681-89; discussion 1690.
- Dal Farra, C., P. Sarret, et al. (2001). "Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines." *Int J Cancer* **92**(4): 503-9.
- Daub, H., F. U. Weiss, et al. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* **379**(6565): 557-60.
- Davis, F. G., J. D. Boice, Jr., et al. (1989). "Cancer mortality in a radiation-exposed cohort of Massachusetts tuberculosis patients." *Cancer Res* **49**(21): 6130-6.
- Davis, T. P. and P. N. Konings (1993). "Peptidases in the CNS: formation of biologically active, receptor-specific peptide fragments." *Crit Rev Neurobiol* **7**(3-4): 163-74.
- de Lange, R., N. Dimoudis, et al. (2003). "Identification of genes associated with enhanced metastasis of a large cell lung carcinoma cell line." *Anticancer Res* **23**(1A): 187-94.
- de Nadai, F., C. Rovere, et al. (1994). "Post-translational processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in the central nervous system of the rat--I. Biochemical characterization of maturation products." *Neuroscience* **60**(1): 159-66.
- deFazio, A., Y. E. Chiew, et al. (2000). "Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines." *Int J Cancer* **87**(4): 487-98.
- Denissenko, M. F., J. X. Chen, et al. (1997). "Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3893-8.
- Denissenko, M. F., A. Pao, et al. (1996). "Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53." *Science* **274**(5286): 430-2.
- Ding, L., G. Getz, et al. (2008). "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma." *Nature* **455**(7216): 1069-75.
- Dobner, P. R., D. L. Barber, et al. (1987). "Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(10): 3516-20.
- Dockery, D. W., C. A. Pope, 3rd, et al. (1993). "An association between air pollution and mortality in six U.S. cities." *N Engl J Med* **329**(24): 1753-9.
- Doll, R. (1955). "Mortality from lung cancer in asbestos workers." *Br J Ind Med* **12**(2): 81-6.
- Doll, R. and R. Peto (1978). "Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers." *J Epidemiol Community Health* **32**(4): 303-13.
- Doll, R. and R. Peto (1981). "The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today." *J Natl Cancer Inst* **66**(6): 1191-308.

- Doll, R., R. Peto, et al. (1994). "Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors." *BMJ* **309**(6959): 901-11.
- Donehower, L. A., M. Harvey, et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." *Nature* **356**(6366): 215-21.
- Dong, Z., X. Wang, et al. (2000). "Site-specific DNA methylation contributes to neurotensin/neuromedin N expression in colon cancers." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**(6): G1139-47.
- Dong, Z., X. Wang, et al. (1998). "DNA methylation contributes to expression of the human neurotensin/neuromedin N gene." *Am J Physiol* **274**(3 Pt 1): G535-43.
- Dubuc, I., P. Sarret, et al. (1999). "Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin." *J Neurosci* **19**(1): 503-10.
- Dupouy, S., N. Mourra, et al. (2011). "The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers." *Biochimie* **93**(9): 1369-78.
- Dupouy, S., V. Viardot-Foucault, et al. (2009). "The neurotensin receptor-1 pathway contributes to human ductal breast cancer progression." *PLoS One* **4**(1): e4223.
- 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): 5900-9.
- Egle, A., A. W. Harris, et al. (2004). "Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 6164-9.
- Ehlers, R. A., 2nd, R. M. Bonnor, et al. (1998). "Signal transduction mechanisms in neurotensin-mediated cellular regulation." *Surgery* **124**(2): 239-46; discussion 246-7.
- Ehlers, R. A., S. Kim, et al. (2000). "Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers." *Ann Surg* **231**(6): 838-48.
- Ehlers, R. A., Y. Zhang, et al. (2000). "Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2." *Biochem Biophys Res Commun* **269**(3): 704-8.
- el-Deiry, W. S., S. E. Kern, et al. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." *Nat Genet* **1**(1): 45-9.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-25.
- Elek, J., W. Pinzon, et al. (2000). "Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer." *Anticancer Res* **20**(1A): 53-8.
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, et al. (2007). "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." *Science* **316**(5827): 1039-43.
- Evan, G. I., A. H. Wyllie, et al. (1992). "Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein." *Cell* **69**(1): 119-28.
- Evers, B. M. (2006). "Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues." *Peptides* **27**(10): 2424-33.
- Evers, B. M., X. Wang, et al. (1995). "Characterization of promoter elements required for cell-specific expression of the neurotensin/neuromedin N gene in a human endocrine cell line." *Mol Cell Biol* **15**(7): 3870-81.
- Evers, B. M., Z. Zhou, et al. (1995). "The neurotensin gene is a downstream target for Ras activation." *J Clin Invest* **95**(6): 2822-30.
- Eymin, B., S. Gazzeri, et al. (2002). "Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors." *Oncogene* **21**(17): 2750-61.
- Faull, R. L., J. W. Villiger, et al. (1989). "Neurotensin receptors in the human spinal cord: a quantitative autoradiographic study." *Neuroscience* **29**(3): 603-13.

- Feng, Z., W. Hu, et al. (2002). "Preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer." *J Natl Cancer Inst* **94**(20): 1527-36.
- Ferguson, K. M. (2004). "Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 5): 742-5.
- Ferris, C. F., J. K. George, et al. (1991). "Plasma levels of human neurotensin: methodological and physiological considerations." *Peptides* **12**(2): 215-20.
- Field, R. W. (2001). "A review of residential radon case-control epidemiologic studies performed in the United States." *Rev Environ Health* **16**(3): 151-67.
- Finlay, C. A. (1993). "The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth." *Mol Cell Biol* **13**(1): 301-6.
- Forrester, K., S. E. Lupold, et al. (1995). "Effects of p53 mutants on wild-type p53-mediated transactivation are cell type dependent." *Oncogene* **10**(11): 2103-11.
- Freemantle, S. J. and E. Dmitrovsky (2002). "Clinical link between p53 and angiogenesis in lung cancer." *J Clin Oncol* **20**(4): 883-4.
- Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998). "JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells." *Genes Dev* **12**(17): 2658-63.
- Gabriel, R., B. M. Dudley, et al. (1972). "Lung cancer and allergy." *Br J Clin Pract* **26**(5): 202-4.
- Gaiddon, C., M. Lokshin, et al. (2001). "A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1874-87.
- Gailly, P., M. Najimi, et al. (2000). "Evidence for the dual coupling of the rat neurotensin receptor with pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins." *FEBS Lett* **483**(2-3): 109-13.
- Garte, S., C. Zocchetti, et al. (1997). "Gene-environment interactions in the application of biomarkers of cancer susceptibility in epidemiology." *IARC Sci Publ*(142): 251-64.
- 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): 3926-31.
- Gee, J. M. and J. M. Knowlden (2003). "ADAM metalloproteases and EGFR signalling." *Breast Cancer Res* **5**(5): 223-4.
- Giagaspero, F., P. C. Burger, et al. (1985). "Regulatory peptides in neuronal neoplasms of the central nervous system." *Clin Neuropathol* **4**(3): 111-5.
- Goedert, M., P. W. Mantyh, et al. (1984). "Localization of specific neurotensin binding sites in the rat adrenal gland." *Brain Res* **299**(2): 389-92.
- Goldstraw, P., J. Crowley, et al. (2007). "The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours." *J Thorac Oncol* **2**(8): 706-14.
- 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.
- Grant, S. W., A. S. Kyshtoobayeva, et al. (1998). "Mutant p53 correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma." *Cancer Detect Prev* **22**(3): 185-94.
- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, et al. (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." *EMBO J* **16**(7): 1647-55.
- Graziano, S. L., L. Gu, et al. "Prognostic significance of mucin and p53 expression in stage IB non-small cell lung cancer: a laboratory companion study to CALGB 9633." *J Thorac Oncol* **5**(6): 810-7.
- Greulich, H., T. H. Chen, et al. (2005). "Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants." *PLoS Med* **2**(11): e313.
- Gruenberg, J. and F. R. Maxfield (1995). "Membrane transport in the endocytic pathway." *Curr Opin Cell Biol* **7**(4): 552-63.
- Gschwind, A., S. Hart, et al. (2003). "TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells." *EMBO J* **22**(10): 2411-21.

- Gschwind, A., N. Prenzel, et al. (2002). "Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation." Cancer Res **62**(21): 6329-36.
- Gschwind, A., E. Zwick, et al. (2001). "Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission." Oncogene **20**(13): 1594-600.
- Guha, S., J. A. Lunn, et al. (2003). "Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1." Cancer Res **63**(10): 2379-87.
- Guha, S., O. Rey, et al. (2002). "Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1." Cancer Res **62**(6): 1632-40.
- Guimaraes, D. P. and P. Hainaut (2002). "TP53: a key gene in human cancer." Biochimie **84**(1): 83-93.
- Gullo, L., R. Pezzilli, et al. (1998). "Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged time study." Gastroenterol Clin Biol **22**(1): 25-8.
- Guy, P. M., J. V. Platko, et al. (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8132-6.
- Hackshaw, A. K., M. R. Law, et al. (1997). "The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke." BMJ **315**(7114): 980-8.
- Hainaut, P., M. Olivier, et al. (2001). "TP53 mutation spectrum in lung cancers and mutagenic signature of components of tobacco smoke: lessons from the IARC TP53 mutation database." Mutagenesis **16**(6): 551-3; author reply 555-6.
- Hainaut, P. and G. P. Pfeifer (2001). "Patterns of p53 G-->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke." Carcinogenesis **22**(3): 367-74.
- Hammer, R. A., S. E. Leeman, et al. (1980). "Isolation of human intestinal neurotensin." J Biol Chem **255**(6): 2476-80.
- Hammond, E. C., L. Garfinkel, et al. (1976). "'Tar' and nicotine content of cigarette smoke in relation to death rates." Environ Res **12**(3): 263-74.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
- Haneda, H., H. Sasaki, et al. (2006). "A correlation between EGFR gene mutation status and bronchioloalveolar carcinoma features in Japanese patients with adenocarcinoma." Jpn J Clin Oncol **36**(2): 69-75.
- Harada, E., M. Niiyama, et al. (1986). "Hepatic bile and pancreatic exocrine secretions evoked by gastrointestinal peptides in sheep." Comp Biochem Physiol A Comp Physiol **85**(4): 729-34.
- Harper, J. W., G. R. Adami, et al. (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-16.
- Harris, J. E., M. J. Thun, et al. (2004). "Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8." BMJ **328**(7431): 72.
- Haslekas, C., K. Breen, et al. (2005). "The inhibitory effect of ErbB2 on epidermal growth factor-induced formation of clathrin-coated pits correlates with retention of epidermal growth factor receptor-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane." Mol Biol Cell **16**(12): 5832-42.
- Hassan, S., P. R. Dobner, et al. (2004). "Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF-receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells." Regul Pept **120**(1-3): 155-66.
- Haupt, Y., R. Maya, et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature **387**(6630): 296-9.

- Hecht, S. S. (2002). "Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention." *Lancet Oncol* **3**(8): 461-9.
- Helmstaedt, V., G. Muhlmann, et al. (1977). "Immunohistochemical identification of gastrointestinal neurotensin cells in human embryos." *Cell Tissue Res* **184**(3): 315-20.
- Hemann, M. T., A. Bric, et al. (2005). "Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants." *Nature* **436**(7052): 807-11.
- Hemann, M. T. and S. W. Lowe (2006). "The p53-Bcl-2 connection." *Cell Death Differ* **13**(8): 1256-9.
- Hermans, E., J. M. Maloteaux, et al. (1992). "Phospholipase C activation by neurotensin and neuromedin N in Chinese hamster ovary cells expressing the rat neurotensin receptor." *Brain Res Mol Brain Res* **15**(3-4): 332-8.
- Hermeking, H. and D. Eick (1994). "Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53." *Science* **265**(5181): 2091-3.
- Hibi, K., B. Trink, et al. (2000). "AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5462-7.
- Hinds, P. W., C. A. Finlay, et al. (1990). "Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes." *Cell Growth Differ* **1**(12): 571-80.
- Hirsch, F. R., G. V. Scagliotti, et al. (2003). "Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies." *Lung Cancer* **41** **Suppl 1**: S29-42.
- 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): 3798-807.
- Holbro, T., G. Civenni, et al. (2003). "The ErbB receptors and their role in cancer progression." *Exp Cell Res* **284**(1): 99-110.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* **253**(5015): 49-53.
- 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): 4232-5.
- Horstmann, O., R. Nustede, et al. (1999). "Neurotensin-related regulation of the postprandial lower-oesophageal-sphincter pressure." *Langenbecks Arch Surg* **384**(5): 467-72.
- 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): 4734-41.
- Huang, C. L., D. Liu, et al. (2008). "Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer." *Eur J Cancer* **44**(17): 2680-8.
- Huang, H. S., M. Nagane, et al. (1997). "The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling." *J Biol Chem* **272**(5): 2927-35.
- Hupp, T. R. and D. P. Lane (1994). "Allosteric activation of latent p53 tetramers." *Curr Biol* **4**(10): 865-75.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* **5**(5): 341-54.
- Ihle, J. N., T. Nosaka, et al. (1997). "Jaks and Stats in cytokine signaling." *Stem Cells* **15** **Suppl 1**: 105-11; discussion 112.
- Ishizuka, J., C. M. Townsend, Jr., et al. (1993). "Neurotensin regulates growth of human pancreatic cancer." *Ann Surg* **217**(5): 439-45; discussion 446.
- Iwase, K., B. M. Evers, et al. (1997). "Inhibition of neurotensin-induced pancreatic carcinoma growth by a nonpeptide neurotensin receptor antagonist, SR48692." *Cancer* **79**(9): 1787-93.

- Jackman, D. M., A. J. Holmes, et al. (2006). "Response and resistance in a non-small-cell lung cancer patient with an epidermal growth factor receptor mutation and leptomeningeal metastases treated with high-dose gefitinib." *J Clin Oncol* **24**(27): 4517-20.
- Jacobs, T. W., A. M. Gown, et al. (1999). "Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system." *J Clin Oncol* **17**(7): 1983-7.
- Jayaraman, L. and C. Prives (1999). "Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein." *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 76-87.
- Jeong, E. G., Y. H. Soung, et al. (2006). "ERBB3 kinase domain mutations are rare in lung, breast and colon carcinomas." *Int J Cancer* **119**(12): 2986-7.
- Ji, H., X. Zhao, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(20): 7817-22.
- Jiang, X. and A. Sorkin (2003). "Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation." *Traffic* **4**(8): 529-43.
- Jin, G., M. J. Kim, et al. "PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers." *Lung Cancer* **69**(3): 279-83.
- Jin, G., M. J. Kim, et al. (2009). "PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers." *Lung Cancer*.
- Joerger, A. C. and A. R. Fersht (2008). "Structural biology of the tumor suppressor p53." *Annu Rev Biochem* **77**: 557-82.
- Joerger, A. C. and A. R. Fersht (2010). "The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(6): a000919.
- Kalmes, A., B. R. Vesti, et al. (2000). "Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor." *Circ Res* **87**(2): 92-8.
- Kamijo, T., J. D. Weber, et al. (1998). "Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8292-7.
- Karunakaran, D., E. Tzahar, et al. (1996). "ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer." *EMBO J* **15**(2): 254-64.
- Kastan, M. B., Q. Zhan, et al. (1992). "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia." *Cell* **71**(4): 587-97.
- Kataoka, H. (2009). "EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments." *J Dermatol Sci* **56**(3): 148-53.
- Katsanos, G. S., A. Anagianaki, et al. (2008). "Biology of neurotensin: revisited study." *Int J Immunopathol Pharmacol* **21**(2): 255-9.
- Keilhack, H., T. Tenev, et al. (1998). "Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling." *J Biol Chem* **273**(38): 24839-46.
- Kieser, A., H. A. Weich, et al. (1994). "Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression." *Oncogene* **9**(3): 963-9.
- Kisfalvi, K., S. Guha, et al. (2005). "Neurotensin and EGF induce synergistic stimulation of DNA synthesis by increasing the duration of ERK signaling in ductal pancreatic cancer cells." *J Cell Physiol* **202**(3): 880-90.
- Kisfalvi, K., C. Hurd, et al. (2010). "Induced overexpression of protein kinase D1 stimulates mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma PANC-1 cells." *J Cell Physiol* **223**(2): 309-16.
- Kislauskis, E., B. Bullock, et al. (1988). "The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences." *J Biol Chem* **263**(10): 4963-8.

- Kislauskis, E. and P. R. Dobner (1990). "Mutually dependent response elements in the cis-regulatory region of the neurotensin/neuromedin N gene integrate environmental stimuli in PC12 cells." Neuron **4**(5): 783-95.
- Kitabgi, P. (2002). "Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes." Curr Opin Drug Discov Devel **5**(5): 764-76.
- Kitabgi, P., R. Carraway, et al. (1976). "Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin." J Biol Chem **251**(22): 7053-8.
- Kitabgi, P. and P. Freychet (1978). "Effects of neurotensin on isolated intestinal smooth muscles." Eur J Pharmacol **50**(4): 349-57.
- Kitabgi, P., G. Hamon, et al. (1979). "Electrophysiological study of the action of neurotensin on the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli." Eur J Pharmacol **56**(1-2): 87-93.
- Klapper, L. N., M. H. Kirschbaum, et al. (2000). "Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors." Adv Cancer Res **77**: 25-79.
- 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): 786-92.
- Kondo, H. (1985). "Immunohistochemical analysis of the localization of neuropeptides in the adrenal gland." Arch Histol Jpn **48**(5): 453-81.
- Kondo, K., H. Tsuzuki, et al. (1996). "A dose-response relationship between the frequency of p53 mutations and tobacco consumption in lung cancer patients." J Surg Oncol **61**(1): 20-6.
- Kornilova, E. S., D. Taverna, et al. (1992). "Surface expression of erbB-2 protein is post-transcriptionally regulated in mammary epithelial cells by epidermal growth factor and by the culture density." Oncogene **7**(3): 511-9.
- Kosaka, T., Y. Yatabe, et al. (2006). "Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib." Clin Cancer Res **12**(19): 5764-9.
- Kosaka, T., Y. Yatabe, et al. (2009). "Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma." J Thorac Oncol **4**(1): 22-9.
- Kubbutat, M. H., S. N. Jones, et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.
- 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): 7665-70.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-69.
- Labbe-Jullie, C., S. Barroso, et al. (1998). "Mutagenesis and modeling of the neurotensin receptor NTR1. Identification of residues that are critical for binding SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist." J Biol Chem **273**(26): 16351-7.
- Lang, G. A., T. Iwakuma, et al. (2004). "Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome." Cell **119**(6): 861-72.
- Lassus, P., C. Bertrand, et al. (1999). "Anti-apoptotic activity of p53 maps to the COOH-terminal domain and is retained in a highly oncogenic natural mutant." Oncogene **18**(33): 4699-709.
- Lassus, P., M. Ferlin, et al. (1996). "Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53." EMBO J **15**(17): 4566-73.
- Laurent-Puig, P., A. Lievre, et al. (2009). "Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors." Clin Cancer Res **15**(4): 1133-9.
- LaValle, C. R., K. M. George, et al. "Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy." Biochim Biophys Acta **1806**(2): 183-92.
- LaValle, C. R., K. M. George, et al. (2010). "Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy." Biochim Biophys Acta **1806**(2): 183-92.

- Le Calvez, F., A. Mukeria, et al. (2005). "TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers." *Cancer Res* **65**(12): 5076-83.
- Le, F., K. Groshan, et al. (1997). "Characterization of the genomic structure, promoter region, and a tetranucleotide repeat polymorphism of the human neurotensin receptor gene." *J Biol Chem* **272**(2): 1315-22.
- Le, L. Q. and L. F. Parada (2007). "Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs." *Oncogene* **26**(32): 4609-16.
- Le Marchand, L., C. Guo, et al. (2003). "Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States)." *Cancer Causes Control* **14**(4): 339-46.
- Leach, F. S., T. Tokino, et al. (1993). "p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas." *Cancer Res* **53**(10 Suppl): 2231-4.
- Lee, L. F., J. Guan, et al. (2001). "Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bmx, Src, and focal adhesion kinase." *Mol Cell Biol* **21**(24): 8385-97.
- Lee, S. H., M. S. Shin, et al. (1999). "Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers." *Cancer Res* **59**(22): 5683-6.
- Lefrancois, S., J. Zeng, et al. (2003). "The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin." *EMBO J* **22**(24): 6430-7.
- Lemoine, N. R., D. M. Barnes, et al. (1992). "Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer." *Br J Cancer* **66**(6): 1116-21.
- Levkowitz, G., L. N. Klapper, et al. (1996). "Coupling of the c-Cbl protooncogene product to ErbB-1/EGF-receptor but not to other ErbB proteins." *Oncogene* **12**(5): 1117-25.
- Levkowitz, G., H. Waterman, et al. (1998). "c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor." *Genes Dev* **12**(23): 3663-74.
- Leyton, J., L. Garcia-Marin, et al. (2002). "Neurotensin causes tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in lung cancer cells." *Eur J Pharmacol* **442**(3): 179-86.
- Lin, L., C. T. Miller, et al. (2002). "The hepatocyte nuclear factor 3 alpha gene, HNF3alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas." *Cancer Res* **62**(18): 5273-9.
- Linardou, H., I. J. Dahabreh, et al. (2008). "Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer." *Lancet Oncol* **9**(10): 962-72.
- Linares, L. K., A. Hengstermann, et al. (2003). "HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(21): 12009-14.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." *Cell* **17**(1): 43-52.
- Liu, C. X., S. Musco, et al. (2000). "LRP-DIT, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines." *Cancer Res* **60**(7): 1961-7.
- Lloyd, J. W. (1971). "Long-term mortality study of steelworkers. V. Respiratory cancer in coke plant workers." *J Occup Med* **13**(2): 53-68.
- Lomazzi, M., M. C. Moroni, et al. (2002). "Suppression of the p53- or pRB-mediated G1 checkpoint is required for E2F-induced S-phase entry." *Nat Genet* **31**(2): 190-4.
- Lonardo, F., V. Rusch, et al. (1999). "Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development." *Cancer Res* **59**(10): 2470-6.
- Lowe, S. W. (1999). "Activation of p53 by oncogenes." *Endocr Relat Cancer* **6**(1): 45-8.
- Lozano, G. and S. J. Elledge (2000). "p53 sends nucleotides to repair DNA." *Nature* **404**(6773): 24-5.

- Lu, T., Y. Pan, et al. (2004). "Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain." Nature **429**(6994): 883-91.
- Lu, X., Q. Wang, et al. (2009). "ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis." Genes Dev **23**(16): 1882-94.
- Luo, J., B. D. Manning, et al. (2003). "Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise." Cancer Cell **4**(4): 257-62.
- Luttinger, D., R. A. King, et al. (1982). "The effect of neurotensin on food consumption in the rat." Eur J Pharmacol **81**(3): 499-503.
- 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): 2129-39.
- Maeda, K. and L. A. Frohman (1978). "Dissociation of systemic and central effects of neurotensin on the secretion of growth hormone, prolactin, and thyrotropin." Endocrinology **103**(5): 1903-9.
- Mailleux, P., S. Przedborski, et al. (1990). "Neurotensin high affinity binding sites and endopeptidase 24.11 are present respectively in the meningotheial and in the fibroblastic components of human meningiomas." Peptides **11**(6): 1245-53.
- Manberg, P. J., W. W. Youngblood, et al. (1982). "Regional distribution of neurotensin in human brain." J Neurochem **38**(6): 1777-80.
- Mao, L., J. S. Lee, et al. (1997). "Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers." J Natl Cancer Inst **89**(12): 857-62.
- Maoret, J. J., Y. Anini, et al. (1999). "Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice." Int J Cancer **80**(3): 448-54.
- Maoret, J. J., D. Pospai, et al. (1994). "Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies and RT-PCR experiments." Biochem Biophys Res Commun **203**(1): 465-71.
- Marais, R., Y. Light, et al. (1998). "Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C." Science **280**(5360): 109-12.
- Marijon, H., A. Bouyon, et al. (2009). "[Prognostic and predictive factors in lung cancer]." Bull Cancer **96**(4): 391-404.
- Marin, M. C., C. A. Jost, et al. (2000). "A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour." Nat Genet **25**(1): 47-54.
- Marin, M. C. and W. G. Kaelin, Jr. (2000). "p63 and p73: old members of a new family." Biochim Biophys Acta **1470**(3): M93-M100.
- Marine, J. C. and A. G. Jochemsen (2005). "Mdmx as an essential regulator of p53 activity." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 750-60.
- Markowe, H. L., C. J. Bulpitt, et al. (1987). "Prognosis in adult asthma: a national study." Br Med J (Clin Res Ed) **295**(6604): 949-52.
- Marondel, I., B. Renault, et al. (1996). "Physical mapping of the human neurotensin gene (NTS) between markers D12S1444 and D12S81 on chromosome 12q21." Genomics **38**(2): 243-5.
- Martin, S., V. Navarro, et al. (2002). "Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line." Gastroenterology **123**(4): 1135-43.
- Martin, S., J. P. Vincent, et al. (2003). "Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia." J Neurosci **23**(4): 1198-205.
- Massague, J. and A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." Annu Rev Biochem **62**: 515-41.
- Matakidou, A., T. Eisen, et al. (2005). "Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk." Br J Cancer **93**(7): 825-33.
- Maxfield, F. R. and T. E. McGraw (2004). "Endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 121-32.
- Mazella, J., J. Chabry, et al. (1988). "Solubilization and characterization of active neurotensin receptors from mouse brain." J Biol Chem **263**(1): 144-9.

- Mazella, J. and J. P. Vincent (2006). "Internalization and recycling properties of neurotensin receptors." *Peptides* **27**(10): 2488-92.
- Mazella, J., N. Zsurger, et al. (1998). "The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor." *J Biol Chem* **273**(41): 26273-6.
- Meert, A. P., B. Martin, et al. (2002). "The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis." *Eur Respir J* **20**(4): 975-81.
- Melero, J. A., D. T. Stitt, et al. (1979). "Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells." *Virology* **93**(2): 466-80.
- Mellinghoff, I. K., T. F. Cloughesy, et al. (2007). "PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors." *Clin Cancer Res* **13**(2 Pt 1): 378-81.
- Mendez, M., F. Souzae, et al. (1997). "High affinity neurotensin receptor mRNA distribution in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR." *J Mol Neurosci* **9**(2): 93-102.
- Midgley, C. A. and D. P. Lane (1997). "p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding." *Oncogene* **15**(10): 1179-89.
- Mihara, M., S. Erster, et al. (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." *Mol Cell* **11**(3): 577-90.
- Mijatovic, T., P. Gailly, et al. (2007). "Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration." *Cell Oncol* **29**(4): 315-26.
- Miller, K., J. Beardmore, et al. (1986). "Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells." *J Cell Biol* **102**(2): 500-9.
- Mills, A. A., B. Zheng, et al. (1999). "p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis." *Nature* **398**(6729): 708-13.
- Milner, J. and E. A. Medcalf (1991). "Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation." *Cell* **65**(5): 765-74.
- Mitsudomi, T., N. Hamajima, et al. (2000). "Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis." *Clin Cancer Res* **6**(10): 4055-63.
- Mok, T. S., Y. L. Wu, et al. (2009). "Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma." *N Engl J Med* **361**(10): 947-57.
- Monnier, L., G. Milano, et al. (2004). "[Targeting of membrane receptor tyrosine kinases: is there resistance in the HER?]." *Bull Cancer* **91**(9): 685-94.
- Moody, T. W., D. N. Carney, et al. (1985). "Neurotensin is produced by and secreted from classic small cell lung cancer cells." *Life Sci* **36**(18): 1727-32.
- Mori, S., G. Ito, et al. (2004). "p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma." *Cancer* **100**(8): 1673-82.
- 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): 5667-72.
- Mountain, C. F. (1997). "Revisions in the International System for Staging Lung Cancer." *Chest* **111**(6): 1710-7.
- Mountain, C. F., D. T. Carr, et al. (1974). "A system for the clinical staging of lung cancer." *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* **120**(1): 130-8.
- Mountain, C. F. and C. M. Dresler (1997). "Regional lymph node classification for lung cancer staging." *Chest* **111**(6): 1718-23.
- Mukhopadhyay, D., L. Tsiokas, et al. (1995). "Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression." *Cancer Res* **55**(24): 6161-5.
- Mulcahy, R. (1990). "The health benefits of smoking cessation." *Ir Med J* **83**(2): 45-6.
- Muller, T., A. Choidas, et al. (1999). "Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration." *J Biol Chem* **274**(15): 10173-83.

- Munster, P. N., D. C. Marchion, et al. (2002). "Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway." *Cancer Res* **62**(11): 3132-7.
- Muraki, K., Y. Nishi, et al. (1987). "Neurotensin receptors on the rat liver plasma membranes." *Biochem Biophys Res Commun* **145**(3): 1071-9.
- Naidu, R., M. Yadav, et al. (1998). "Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas." *Br J Cancer* **78**(10): 1385-90.
- Najimi, M., J. M. Maloteaux, et al. (2002). "Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1." *FEBS Lett* **523**(1-3): 224-8.
- Najimi, M., J. J. Robert, et al. (2002). "Neurotensin induces tyrosine hydroxylase gene activation through nitric oxide and protein kinase C signaling pathways." *Mol Pharmacol* **62**(3): 647-53.
- Najimi, M., F. Souzae, et al. (1998). "Activation of receptor gene transcription is required to maintain cell sensitization after agonist exposure. Study on neurotensin receptor." *J Biol Chem* **273**(34): 21634-41.
- Nakashima, T., D. Liu, et al. (2008). "Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients." *Oncol Rep* **19**(1): 203-9.
- Nelson, H. H. and K. T. Kelsey (2002). "The molecular epidemiology of asbestos and tobacco in lung cancer." *Oncogene* **21**(48): 7284-8.
- Nemeroff, C. B., A. J. Osbahr, 3rd, et al. (1979). "Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(10): 5368-71.
- Neve, R. M., H. Sutterluty, et al. (2000). "Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells." *Oncogene* **19**(13): 1647-56.
- Nguyen, D. X., A. C. Chiang, et al. (2009). "WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis." *Cell* **138**(1): 51-62.
- Nguyen, H. M., C. M. Cahill, et al. (2002). "Receptor-mediated internalization of [3H]-neurotensin in synaptosomal preparations from rat neostriatum." *Neuropharmacology* **42**(8): 1089-98.
- Nielsen, M. S., C. Jacobsen, et al. (1999). "Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase." *J Biol Chem* **274**(13): 8832-6.
- Noda, N., D. Matsuzoe, et al. (2001). "K-ras gene mutations in non-small cell lung cancer in Japanese." *Oncol Rep* **8**(4): 889-92.
- Nouel, D., P. Sarret, et al. (1999). "Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors." *Neuroscience* **94**(4): 1189-97.
- Nustede, R., H. Kohler, et al. (1989). "The biological relevance of N-terminal neurotensin fragments in the regulation of exocrine pancreas secretion." *Pancreas* **4**(1): 114-9.
- Offterdinger, M. and P. I. Bastiaens (2008). "Prolonged EGFR signaling by ERBB2-mediated sequestration at the plasma membrane." *Traffic* **9**(1): 147-55.
- Ohsaki, Y., S. Tanno, 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**(3): 603-7.
- Olayioye, M. A. (2001). "Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members." *Breast Cancer Res* **3**(6): 385-9.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *EMBO J* **19**(13): 3159-67.
- Oliner, J. D., K. W. Kinzler, et al. (1992). "Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas." *Nature* **358**(6381): 80-3.
- Olive, K. P., D. A. Tuveson, et al. (2004). "Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome." *Cell* **119**(6): 847-60.
- Olivier, M., R. Eeles, et al. (2002). "The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users." *Hum Mutat* **19**(6): 607-14.

- Olivier, M., M. Hollstein, et al. (2010). "TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(1): a001008.
- Oren, M. and V. Rotter (2010). "Mutant p53 gain-of-function in cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(2): a001107.
- Paez, J. G., P. A. Janne, et al. (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." Science **304**(5676): 1497-500.
- Pang, Y. P., B. Cusack, et al. (1996). "Proposed ligand binding site of the transmembrane receptor for neurotensin(8-13)." J Biol Chem **271**(25): 15060-8.
- 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): 13306-11.
- 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.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Parsons, S. J. and J. T. Parsons (2004). "Src family kinases, key regulators of signal transduction." Oncogene **23**(48): 7906-9.
- Paz-Ares, L., D. Soulieres, et al. (2010). "Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis." J Cell Mol Med **14**(1-2): 51-69.
- Pelaprat, D. (2006). "Interactions between neurotensin receptors and G proteins." Peptides **27**(10): 2476-87.
- Peles, E. and Y. Yarden (1993). "Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors." Bioessays **15**(12): 815-24.
- Pellegrini, C., M. Falleni, et al. (2003). "HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry." Clin Cancer Res **9**(10 Pt 1): 3645-52.
- Peric-Golia, L., C. F. Gardner, et al. (1979). "The effect of neurotensin on the plasma cholesterol levels in the rat." Eur J Pharmacol **55**(4): 407-9.
- Petitjean, A., E. Mathe, et al. (2007). "Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database." Hum Mutat **28**(6): 622-9.
- Pettibone, D. J. and J. A. Totaro (1987). "High affinity binding of [3H]neurotensin of rat uterus." Peptides **8**(6): 1169-72.
- Pfeifer, G. P., M. F. Denissenko, et al. (2002). "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers." Oncogene **21**(48): 7435-51.
- Pichon, M. F., G. Coquin, et al. (1999). "Serum cholecystokinin and neurotensin during follow-up of pancreas, prostate and medullary thyroid tumors." Anticancer Res **19**(2B): 1445-50.
- Pluquet, O. and P. Hainaut (2001). "Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction." Cancer Lett **174**(1): 1-15.
- Poinot-Chazel, C., M. Portier, et al. (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24." Biochem J **320** (Pt 1): 145-51.
- Polager, S. and D. Ginsberg (2009). "p53 and E2f: partners in life and death." Nat Rev Cancer **9**(10): 738-48.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.
- 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): 1496-510.
- Polsky, D., B. C. Bastian, et al. (2001). "HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma." Cancer Res **61**(20): 7642-6.
- Polyak, K., Y. Xia, et al. (1997). "A model for p53-induced apoptosis." Nature **389**(6648): 300-5.

- Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, et al. (1998). "The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53." *Cell* **92**(6): 713-23.
- Pommery, N. and J. P. Henichart (2005). "Involvement of PI3K/Akt pathway in prostate cancer--potential strategies for developing targeted therapies." *Mini Rev Med Chem* **5**(12): 1125-32.
- Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, et al. (2002). "Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution." *JAMA* **287**(9): 1132-41.
- Pope, C. A., 3rd, M. J. Thun, et al. (1995). "Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults." *Am J Respir Crit Care Med* **151**(3 Pt 1): 669-74.
- Portier, M., T. Combes, et al. (1998). "Neurotensin type 1 receptor-mediated activation of krox24, c-fos and Elk-1: preventing effect of the neurotensin antagonists SR 48692 and SR 142948." *FEBS Lett* **432**(1-2): 88-93.
- Prenzel, N., E. Zwick, et al. (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." *Nature* **402**(6764): 884-8.
- Prigent, S. A. and W. J. Gullick (1994). "Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera." *EMBO J* **13**(12): 2831-41.
- Prives, C. and J. L. Manley (2001). "Why is p53 acetylated?" *Cell* **107**(7): 815-8.
- Przedborski, S., M. Levivier, et al. (1991). "Neurotensin receptors in human meningiomas." *Ann Neurol* **30**(5): 650-4.
- Reinecke, M. (1985). "Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone." *Prog Histochem Cytochem* **16**(1): 1-172.
- Reinecke, M., E. Weihe, et al. (1982). "Localization of neurotensin immunoreactive nerve fibers in the guinea-pig heart: evidence derived by immunohistochemistry, radioimmunoassay and chromatography." *Neuroscience* **7**(7): 1785-95.
- Resat, H., J. A. Ewald, et al. (2003). "An integrated model of epidermal growth factor receptor trafficking and signal transduction." *Biophys J* **85**(2): 730-43.
- Reubi, J. C., B. Waser, et al. (1998). "Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma." *Gut* **42**(4): 546-50.
- Reubi, J. C., B. Waser, et al. (1999). "Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas." *Int J Cancer* **82**(2): 213-8.
- Rho, J. K., Y. J. Choi, et al. (2007). "p53 enhances gefitinib-induced growth inhibition and apoptosis by regulation of Fas in non-small cell lung cancer." *Cancer Res* **67**(3): 1163-9.
- Rideout, W. M., 3rd, G. A. Coetzee, et al. (1990). "5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes." *Science* **249**(4974): 1288-90.
- Riely, G. J. and M. Ladanyi (2008). "KRAS mutations: an old oncogene becomes a new predictive biomarker." *J Mol Diagn* **10**(6): 493-5.
- 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): 7232-41.
- Riese, D. J., 2nd and D. F. Stern (1998). "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network." *Bioessays* **20**(1): 41-8.
- Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, et al. (1994). "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras." *Nature* **370**(6490): 527-32.
- Roelle, S., R. Grosse, et al. (2003). "Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone." *J Biol Chem* **278**(47): 47307-18.
- Rosell, R., T. Moran, et al. (2009). "Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer." *N Engl J Med* **361**(10): 958-67.
- Rostene, W. H. and M. J. Alexander (1997). "Neurotensin and neuroendocrine regulation." *Front Neuroendocrinol* **18**(2): 115-73.

- Rovere, C., P. Barbero, et al. (1996). "Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin." *J Biol Chem* **271**(19): 11368-75.
- Rusch, V., D. Klimstra, et al. (1995). "Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development." *Cancer Res* **55**(6): 1365-72.
- Sahin, U., G. Weskamp, et al. (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." *J Cell Biol* **164**(5): 769-79.
- Sanchez-Cespedes, M., P. A. Decker, et al. (2001). "Increased loss of chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers." *Cancer Res* **61**(5): 2092-6.
- 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): 5843-9.
- Sanderson, M. P., P. J. Dempsey, et al. (2006). "Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors." *Growth Factors* **24**(2): 121-36.
- Santillan, A. A., C. A. Camargo, Jr., et al. (2003). "A meta-analysis of asthma and risk of lung cancer (United States)." *Cancer Causes Control* **14**(4): 327-34.
- Santiskulvong, C., J. Sinnott-Smith, et al. (2001). "EGF receptor function is required in late G(1) for cell cycle progression induced by bombesin and bradykinin." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(3): C886-98.
- Sarrieau, A., F. Javoy-Agid, et al. (1985). "Characterization and autoradiographic distribution of neurotensin binding sites in the human brain." *Brain Res* **348**(2): 375-80.
- Sato, M., M. B. Vaughan, et al. (2006). "Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells." *Cancer Res* **66**(4): 2116-28.
- Schaeffer, P., M. C. Laplace, et al. (1995). "Human umbilical vein endothelial cells express high affinity neurotensin receptors coupled to intracellular calcium release." *J Biol Chem* **270**(7): 3409-13.
- Schafer, B., B. Marg, et al. (2004). "Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival." *J Biol Chem* **279**(46): 47929-38.
- Schmitt, C. A., M. E. McCurrach, et al. (1999). "INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53." *Genes Dev* **13**(20): 2670-7.
- Schotte, A., J. E. Leysen, et al. (1986). "Evidence for a displaceable non-specific [3H]neurotensin binding site in rat brain." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **333**(4): 400-5.
- Schultzberg, M., T. Hokfelt, et al. (1980). "Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine beta-hydroxylase." *Neuroscience* **5**(4): 689-744.
- Schwartz, A. G., P. Yang, et al. (1996). "Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives." *Am J Epidemiol* **144**(6): 554-62.
- Seethalakshmi, L., S. P. Mitra, et al. (1997). "Neurotensin receptor expression in prostate cancer cell line and growth effect of NT at physiological concentrations." *Prostate* **31**(3): 183-92.
- Servotte, S., I. Camby, et al. (2006). "The in vitro influences of neurotensin on the motility characteristics of human U373 glioblastoma cells." *Neuropathol Appl Neurobiol* **32**(6): 575-84.
- Sharma, S. V., D. W. Bell, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(3): 169-81.
- Sharpless, N. E. (2005). "INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus." *Mutat Res* **576**(1-2): 22-38.
- Sherr, C. J. (2006). "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 663-73.

- Shibata, T., A. Ochiai, et al. (1996). "Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells." *Oncogene* **13**(5): 883-9.
- 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): 339-46.
- Shigematsu, H., T. Takahashi, et al. (2005). "Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas." *Cancer Res* **65**(5): 1642-6.
- Shimizu, S., J. Tsukada, et al. (2008). "Identification of a novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinomas: a role for the neurotensin-neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway." *Int J Cancer* **123**(8): 1816-23.
- Shulkes, A., S. Bijaphala, et al. (1984). "Metabolism of neurotensin and pancreatic polypeptide in man: role of the kidney and plasma factors." *J Clin Endocrinol Metab* **58**(5): 873-9.
- Shvarts, A., W. T. Steegenga, et al. (1996). "MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2." *EMBO J* **15**(19): 5349-57.
- Siegel, P. M., E. D. Ryan, et al. (1999). "Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer." *EMBO J* **18**(8): 2149-64.
- Silva, C. M. (2004). "Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis." *Oncogene* **23**(48): 8017-23.
- Singh, A. B. and R. C. Harris (2005). "Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands." *Cell Signal* **17**(10): 1183-93.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science* **235**(4785): 177-82.
- Smith, A. H., P. A. Lopipero, et al. (1995). "Meta-analysis of studies of lung cancer among silicotics." *Epidemiology* **6**(6): 617-24.
- Smith, L. E., M. F. Denissenko, et al. (2000). "Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons." *J Natl Cancer Inst* **92**(10): 803-11.
- Snider, R. M., C. Forray, et al. (1986). "Neurotensin stimulates inositol phospholipid metabolism and calcium mobilization in murine neuroblastoma clone N1E-115." *J Neurochem* **47**(4): 1214-8.
- 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): 561-6.
- Somai, S., A. Gompel, et al. (2002). "Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **295**(2): 482-8.
- Song, H., M. Hollstein, et al. (2007). "p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM." *Nat Cell Biol* **9**(5): 573-80.
- Sordella, R., D. W. Bell, et al. (2004). "Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways." *Science* **305**(5687): 1163-7.
- Sorkin, A., P. P. Di Fiore, et al. (1993). "The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired." *Oncogene* **8**(11): 3021-8.
- Sorkin, A. D., L. V. Teslenko, et al. (1988). "The endocytosis of epidermal growth factor in A431 cells: a pH of microenvironment and the dynamics of receptor complex dissociation." *Exp Cell Res* **175**(1): 192-205.
- Souaze, F., S. Dupouy, et al. (2006). "Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression." *Cancer Res* **66**(12): 6243-9.
- Souaze, F. and P. Forgez (2006). "Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation." *Peptides* **27**(10): 2493-501.
- Souaze, F., W. Rostene, et al. (1997). "Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms." *J Biol Chem* **272**(15): 10087-94.

- Souaze, F., V. Viardot-Foucault, et al. (2006). "Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/beta-catenin pathway is an early event in human colonic adenomas." Carcinogenesis **27**(4): 708-16.
- Soung, Y. H., J. W. Lee, et al. (2006). "Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers." Int J Cancer **118**(6): 1426-9.
- Soussi, T. (2005). "The p53 pathway and human cancer." Br J Surg **92**(11): 1331-2.
- Speizer, F. E. (1983). "Assessment of the epidemiological data relating lung cancer to air pollution." Environ Health Perspect **47**: 33-42.
- Spencer, K. S., D. Graus-Porta, et al. (2000). "ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases." J Cell Biol **148**(2): 385-97.
- Srivastava, S., S. Wang, et al. (1993). "Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis." Cancer Res **53**(19): 4452-5.
- Steenland, K., D. Loomis, et al. (1996). "Review of occupational lung carcinogens." Am J Ind Med **29**(5): 474-90.
- Stoscheck, C. M. and G. Carpenter (1984). "Characterization of the metabolic turnover of epidermal growth factor receptor protein in A-431 cells." J Cell Physiol **120**(3): 296-302.
- Subramanian, J. and R. Govindan (2008). "Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked." Lancet Oncol **9**(7): 676-82.
- Sun, Q., L. Ming, et al. (2009). "PUMA mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in head and neck cancer cells." Oncogene **28**(24): 2348-57.
- Sundvall, M., A. Korhonen, et al. (2008). "Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(11): 4162-7.
- Tallett, A., E. R. Chilvers, et al. (1996). "Neuropeptides stimulate tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity in small cell lung cancer cell lines." Peptides **17**(4): 665-73.
- Tammemagi, M. C., J. R. McLaughlin, et al. (1999). "Meta-analyses of p53 tumor suppressor gene alterations and clinicopathological features in resected lung cancers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **8**(7): 625-34.
- Tanaka, K., M. Masu, et al. (1990). "Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor." Neuron **4**(6): 847-54.
- Tartarone, A., R. Lerosé, et al. "Evaluation of molecular prognostic and predictive factors: an important step towards personalised treatment in non small cell lung cancer." Med Oncol.
- Tateishi, M., T. Ishida, et al. (1990). "Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung." Cancer Res **50**(21): 7077-80.
- Theodorsson-Norheim, E. and S. Rosell (1983). "Characterization of human plasma neurotensin-like immunoreactivity after fat ingestion." Regul Pept **6**(3): 207-18.
- Thomas, S. M. and J. S. Brugge (1997). "Cellular functions regulated by Src family kinases." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 513-609.
- Tommasino, M., R. Accardi, et al. (2003). "The role of TP53 in Cervical carcinogenesis." Hum Mutat **21**(3): 307-12.
- Toy-Miou-Leong, M., C. M. Bachelet, et al. (2004). "NT agonist regulates expression of nuclear high-affinity neurotensin receptors." J Histochem Cytochem **52**(3): 335-45.
- Toy-Miou-Leong, M., C. L. Cortes, et al. (2004). "Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation." J Biol Chem **279**(13): 12636-46.
- Toyooka, S., T. Tsuda, et al. (2003). "The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer." Hum Mutat **21**(3): 229-39.
- Travis, W. D., E. Brambilla, et al. (2011). "International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma." J Thorac Oncol **6**(2): 244-85.

- Tredaniel, J., P. Boffetta, et al. (1997). "Non-smoker lung cancer deaths attributable to exposure to spouse's environmental tobacco smoke." *Int J Epidemiol* **26**(5): 939-44.
- Trichopoulos, D., A. Kalandidi, et al. (1981). "Lung cancer and passive smoking." *Int J Cancer* **27**(1): 1-4.
- Tsao, M. S., S. Aviel-Ronen, et al. (2007). "Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **25**(33): 5240-7.
- Tsao, M. S., A. Sakurada, et al. (2005). "Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome." *N Engl J Med* **353**(2): 133-44.
- Turashvili, G., J. Bouchal, et al. (2006). "Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis." *Pathobiology* **73**(5): 213-23.
- Turner, J. T., M. R. James-Kracke, et al. (1990). "Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT29 cells." *J Pharmacol Exp Ther* **253**(3): 1049-56.
- Tzahar, E., H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5276-87.
- Ueba, T., T. Nosaka, et al. (1994). "Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 9009-13.
- Ushiro, S., K. Mizoguchi, et al. (1997). "Stimulation of cell-surface urokinase-type plasminogen activator activity and cell migration in vascular endothelial cells by a novel hexapeptide analogue of neurotensin." *FEBS Lett* **418**(3): 341-5.
- Vahakangas, K. H., W. P. Bennett, et al. (2001). "p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women." *Cancer Res* **61**(11): 4350-6.
- van Noort, M. and H. Clevers (2002). "TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer." *Dev Biol* **244**(1): 1-8.
- Van Scoyk, M., J. Randall, et al. (2008). "Wnt signaling pathway and lung disease." *Transl Res* **151**(4): 175-80.
- van Wimersma Greidanus, T. B., M. C. van Praag, et al. (1982). "Behavioral effects of neurotensin." *Ann N Y Acad Sci* **400**: 319-29.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science* **294**(5545): 1299-304.
- Vias, M., G. Burt, et al. (2007). "A role for neurotensin in bicalutamide resistant prostate cancer cells." *Prostate* **67**(2): 190-202.
- Vincent, J. P., J. Mazella, et al. (1999). "Neurotensin and neurotensin receptors." *Trends Pharmacol Sci* **20**(7): 302-9.
- Vineis, P., F. Veglia, et al. (2003). "CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls." *Int J Cancer* **104**(5): 650-7.
- Vita, N., F. Oury-Donat, et al. (1998). "Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells." *Eur J Pharmacol* **360**(2-3): 265-72.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." *Nature* **408**(6810): 307-10.
- Voisin, L., S. Foisy, et al. (2002). "EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(2): C446-55.
- Vojtek, A. B. and C. J. Der (1998). "Increasing complexity of the Ras signaling pathway." *J Biol Chem* **273**(32): 19925-8.
- Wang, H. L. and T. Wu (1996). "G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons." *Brain Res Mol Brain Res* **36**(1): 29-36.
- Wang, Q., Y. Zhou, et al. (2006). "Neurotensin phosphorylates GSK-3alpha/beta through the activation of PKC in human colon cancer cells." *Neoplasia* **8**(9): 781-7.
- Wang, S. E., A. Narasanna, et al. (2006). "HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors." *Cancer Cell* **10**(1): 25-38.

- Wang, X., L. N. Jackson, et al. (2010). "Suppression of neurotensin receptor type 1 expression and function by histone deacetylase inhibitors in human colorectal cancers." Mol Cancer Ther **9**(8): 2389-98.
- Wang, X., Q. Wang, et al. (2006). "Curcumin inhibits neurotensin-mediated interleukin-8 production and migration of HCT116 human colon cancer cells." Clin Cancer Res **12**(18): 5346-55.
- Wang, Z., L. Zhang, et al. (1999). "Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation." Mol Biol Cell **10**(5): 1621-36.
- Waterman, H., I. Alroy, et al. (1999). "The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing." EMBO J **18**(12): 3348-58.
- Waterman, H., I. Sabanai, et al. (1998). "Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency." J Biol Chem **273**(22): 13819-27.
- Waterman, H. and Y. Yarden (2001). "Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases." FEBS Lett **490**(3): 142-52.
- Weinberg, R. L., S. M. Freund, et al. (2004). "Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain." J Mol Biol **342**(3): 801-11.
- Wendel, H. G., E. de Stanchina, et al. (2006). "Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(19): 7444-9.
- Wikstrand, C. J., C. J. Reist, et al. (1998). "The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target." J Neurovirol **4**(2): 148-58.
- Wiley, H. S. (1988). "Anomalous binding of epidermal growth factor to A431 cells is due to the effect of high receptor densities and a saturable endocytic system." J Cell Biol **107**(2): 801-10.
- Wiley, H. S. (2003). "Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling." Exp Cell Res **284**(1): 78-88.
- Witton, C. J., J. R. Reeves, et al. (2003). "Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer." J Pathol **200**(3): 290-7.
- Wood, J. G., H. D. Hoang, et al. (1988). "Effect of neurotensin on pancreatic and gastric secretion and growth in rats." Pancreas **3**(3): 332-9.
- Worthylake, R., L. K. Opreko, et al. (1999). "ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors." J Biol Chem **274**(13): 8865-74.
- Wu, X., J. H. Bayle, et al. (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." Genes Dev **7**(7A): 1126-32.
- Yamada, M., M. A. Watson, et al. (1993). "Neurotensin stimulates cyclic AMP formation in CHO-rNTR-10 cells expressing the cloned rat neurotensin receptor." Eur J Pharmacol **244**(1): 99-101.
- Yamaguchi, T., K. Matsuda, et al. (2001). "p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint." Cancer Res **61**(22): 8256-62.
- Yan, Y., K. Shirakabe, et al. (2002). "The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors." J Cell Biol **158**(2): 221-6.
- Yang, A., N. Walker, et al. (2000). "p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours." Nature **404**(6773): 99-103.
- Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.
- Yokota, J., M. Nishioka, et al. (2003). "Genetic alterations responsible for metastatic phenotypes of lung cancer cells." Clin Exp Metastasis **20**(3): 189-93.
- Yoshinaga, K., B. M. Evers, et al. (1992). "Neurotensin stimulates growth of colon cancer." Surg Oncol **1**(2): 127-34.
- Zhang, K., R. An, et al. (2006). "Radionuclide imaging of small-cell lung cancer (SCLC) using 99mTc-labeled neurotensin peptide 8-13." Nucl Med Biol **33**(4): 505-12.

- 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.
- Zhao, D., S. Kuhnt-Moore, et al. (2003). "Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF-kappa B pathways." Am J Physiol Cell Physiol **284**(6): C1397-404.
- Zhao, D. and C. Pothoulakis (2003). "Rho GTPases as therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases." Expert Opin Ther Targets **7**(5): 583-92.
- Zhao, D., Y. Zhan, et al. (2004). "Metalloproteinase-dependent transforming growth factor-alpha release mediates neurotensin-stimulated MAP kinase activation in human colonic epithelial cells." J Biol Chem **279**(42): 43547-54.
- Zhao, D., Y. Zhan, et al. (2007). "Neurotensin stimulates expression of early growth response gene-1 and EGF receptor through MAP kinase activation in human colonic epithelial cells." Int J Cancer **120**(8): 1652-6.
- Zhu, C. Q., G. da Cunha Santos, et al. (2008). "Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21." J Clin Oncol **26**(26): 4268-75.
- Zilfou, J. T. and S. W. Lowe (2009). "Tumor suppressive functions of p53." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(5): a001883.
- Zwick, E., P. O. Hackel, et al. (1999). "The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems." Trends Pharmacol Sci **20**(10): 408-12.