



Rôle des calpaïnes extracellulaires dans la progression des adénocarcinomes lépidiques

Anne-Marie Ruppert

► To cite this version:

Anne-Marie Ruppert. Rôle des calpaïnes extracellulaires dans la progression des adénocarcinomes lépidiques. Pneumologie et système respiratoire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066317 . tel-01255399

HAL Id: tel-01255399

<https://theses.hal.science/tel-01255399>

Submitted on 13 Jan 2016

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire GRC n°04 Therascan

Rôle des calpaïnes extracellulaires dans la progression des adénocarcinomes lépidiques

Par Anne-Marie RUPPERT

Thèse de doctorat de Sciences du Vivant

Dirigée par Marie WISLEZ

Co dirigée par Laurent BAUD

Présentée et soutenue publiquement le 10 septembre 2015

Devant un jury composé de :

Jacques Cadranel, Professeur des Universités, Université Paris 6 (Président du jury)

Marie Wislez, Professeur des Universités, Université Paris 6 (Directrice de thèse)

Philippe Birembaut, Professeur des Universités, Université de Reims (Rapporteur)

Arnaud Scherpereel, Professeur des Universités, Université de Lille (Rapporteur)

Michèle Beau-Faller, Professeur des Universités, Université de Strasbourg (Examineur)

Lhousseine Touqui, Chargé de Recherche, Institut Pasteur Paris (Examineur)

Remerciements

Je remercie le Pr. Jacques Cadranel d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je lui suis profondément reconnaissant de son enseignement et de sa disponibilité. Sa compétence, sa rigueur et son dévouement à la pratique médicale sont pour moi un exemple.

Je souhaite remercier le Pr. Marie Wislez de m'avoir accompagnée au cours de ce travail de thèse. Je lui suis aussi reconnaissante de m'avoir guidée au cours de ma recherche. Enfin, je lui sais gré de sa gentillesse, de sa disponibilité et de ses compétences en clinique, tout comme en recherche.

Je remercie aussi le Pr. Laurent Baud pour les connaissances que j'ai pu acquérir à son contact. Sa détermination, ses qualités scientifiques et ses compétences en recherche ont marqué ma thèse.

J'exprime également mes profonds remerciements au Pr. Philippe Birembaut, au Pr Arnaud Scherpereel, au Pr. Michèle Beau-Faller et au Dr Lhousseine Touqui d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand Merci à Nathalie Mathiot et à Joëlle Perez qui m'ont accueillie dans leur laboratoire, soutenue et aidée tout au long de cette thèse.

Une pensée pour Thierry et Céline qui partagent mes joies et mes peines. Merci à eux de m'avoir soutenue et encouragée à continuer ce projet.

Table des matières

<u>I. INTRODUCTION</u>	<u>9</u>
1. GENERALITES SUR LE CANCER BRONCHIQUE	9
EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE	9
ANATOMOPATHOLOGIE	11
CLASSIFICATION TNM	12
TRAITEMENT DU CBNPC	15
2. LES MUTATIONS ONCOGENIQUES DANS LE CANCER BRONCHIQUE.....	17
LES MUTATIONS D’EGFR.....	17
LES REARRANGEMENTS D’ALK	18
BIOMARQUEURS EMERGENTS	19
3. PARTICULARITES DU CANCER BRONCHIQUE DE TYPE LEPIDIQUE.....	21
4. ROLE DES NEUTROPHILES DANS LA PROGRESSION TUMORALE.....	25
INFLAMMATION CHRONIQUE ET CANCER	25
LES CELLULES INFLAMMATOIRES	26
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES	27
5. CALPAÏNES	29
STRUCTURE ET ACTIVATION	29
SUBSTRATS DES CALPAÏNES.....	32
PHYSIOLOGIE DES CALPAÏNES.....	33
CALPAÏNES EXTRACELLULAIRES	35
PHYSIOPATHOLOGIE DES CALPAÏNES	38

CALPAÏNES ET CANCER	40
---------------------------	----

II. OBJECTIFS DE LA THESE

43

III. MATERIEL ET METHODES

47

1. COHORTE DE PATIENTS ET MODELES UTILISES

47

1.1 COHORTE DE PATIENTS

47

1.2 LIGNEES CELLULAIRES

50

1.3 MODELE MURIN

51

1.4 ISOLEMENT CELLULAIRE.....

51

2. TECHNIQUES UTILISEES

52

2.1 BIOPLEX

52

2.2 ELISA

52

2.3 IMMUNOHISTOCHEMIE.....

52

2.4 CYTOMETRIE DE FLUX

53

2.5 MESURE *IN VITRO* DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE PAR MARQUAGE AU BrdU

53

2.6 MESURE *IN VITRO* DE L'ACTIVITE CALPAÏNE.....

54

2.7 STATISTIQUES.....

54

IV. ARTICLE 1 : LES CALPAÏNES 1 EXTRACELLULAIRES CLIVENT TLR2 ET ETAIENT DES FACTEURS DE MAUVAIS PRONOSTIC CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'ADENOCARCINOMES PULMONAIRES DE TYPE LEPIDIQUES. ..

56

RESULTATS

56

1. CALPAÏNES 1 EXTRACELLULAIRES.....

56

2 MECANISMES D’ACTION DES CALPAÏNES 1 EXTRACELLULAIRES POUVANT EXPLIQUER LE PRONOSTIC	63
3. LE FRAGMENT SOLUBLE DE TLR 2 ETAIT ASSOCIE AU PRONOSTIC DES PATIENTS ATTEINTS D’ADL	69
DISCUSSION	76

V. VERSICAN, LIGAND DE TLR2 ASSOCIE A LA PROGRESSION TUMORALE DANS LES ADENOCARCINOMES PULMONAIRES LEPIDIQUES..... 83

RATIONNEL	83
RESULTATS	85
1. LA CONCENTRATION DE VERSICAN EST SIGNIFICATIVEMENT PLUS ELEVEE DANS LES SURNAGEANTS DE LBA DES ADL VERSUS CONTROLES	85
2. LA CONCENTRATION DE VERSICAN ETAIT SIGNIFICATIVEMENT CORRELEE A LA FORME SOLUBLE DE TLR2	86
3. VERSICAN ET PROGRESSION TUMORALE	86
DISCUSSION	95

VI. ETUDE DES CALPAÏNES DANS UN MODELE MURIN D’ADENOCARCINOME PULMONAIRE MUTE RAS 97

RATIONNEL	97
RESULTATS	98
1. ANALYSE ANATOMOPATHOLOGIQUE	98

2. LA CONCENTRATION DE CALPAÏNE 1 INTRACELLULAIRE ETAIT COMPARABLE DANS LE TISSU SAIN ET LE TISSU TUMORAL	99
3. LA CONCENTRATION DE CALPAÏNES EXTRACELLULAIRES ETAIT SIGNIFICATIVEMENT PLUS ELEVEE DANS LE SURNAGEANT DU LBA DES SOURIS SAUVAGES COMPAREE AUX SOURIS KRAS.	100
4. ETUDE DE LA CALPAÏNE 1 INTRACELLULAIRE PAR IMMUNOHISTOCHEMIE DANS LE MODELE MURIN	101
5. ETUDE DE L'EXPRESSION D'ABCA1 PAR IMMUNOHISTOCHEMIE : TRANSPORTEUR DE CALPAÏNE ?	102
6. LA CONCENTRATION DE TLR2 SOLUBLE ETAIT SIGNIFICATIVEMENT PLUS ELEVEE DANS LE SURNAGEANT DU LBA DE SOURIS SAUVAGES COMPAREE AUX SOURIS KRAS.	103
7. LA CONCENTRATION DE CALPAÏNE 1 ETAIT CORRELEE A LA CONCENTRATION DE LA FORME SOLUBLE DE TLR2 DANS LE SURNAGEANT DU LBA DE SOURIS SAUVAGES ET DE SOURIS KRAS.	104
8. LA CONCENTRATION D'IL 17 ETAIT COMPARABLE DANS LES SURNAGEANTS DU LBA DES SOURIS SAUVAGES ET KRAS.....	105
9. MESURE DE L'ACTIVITE CALPAÏNE <i>IN VITRO</i> SUR LES LIGNEES CELLULAIRES LKR10 ET LKR13	106
10. PROLIFERATION DES LIGNEES CELLULAIRES LKR10 ET LKR13	107
DISCUSSION	108
<u>VII. DISCUSSION GENERALE</u>	<u>110</u>
<u>VIII. REFERENCES</u>	<u>113</u>

<u>IX. ANNEXES</u>	<u>127</u>
<u>X. TABLE DES TABLEAUX</u>	<u>128</u>
<u>XI. TABLE DES FIGURES</u>	<u>129</u>

Abréviations

ADL : adénocarcinome de type lépidique

ALK : anaplastic lymphoma kinase

CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules

EGFR : facteur de croissance épidermique (ou epidermal growth factor receptor)

HER2 : facteur de croissance épidermique humain 2(ou human epidermal growth factor receptor 2)

HGF : facteur de croissance épidermique (ou hepatocyte growth factor receptor)

IL:interleukine

ITK : inhibiteur tyrosine kinase

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LLC Lewis lung carcinoma, lignée cellulaire murine de cancer bronchique

TTF1 : thyroïde transcription factor 1

MET: mesenchymal epithelial transition facteur

I. Introduction

1. Généralités sur le cancer bronchique

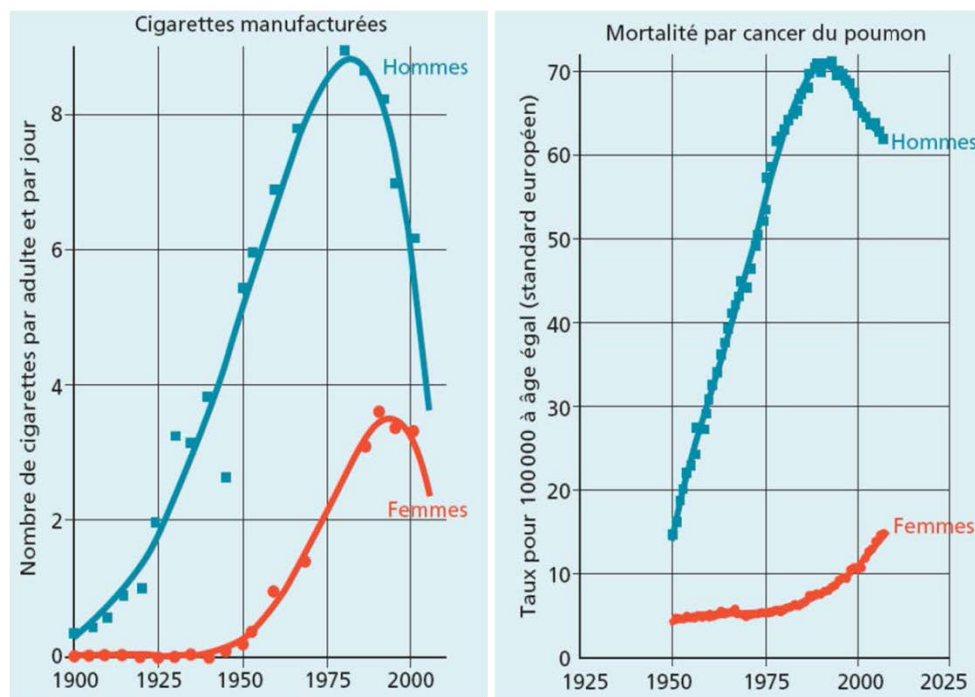
Epidémiologie et facteurs de risque

Le cancer bronchique est la **première cause de mortalité** par cancer dans le monde avec en France avec plus de 30 000 décès par an (P Boffetta et al. 2009)(Hill 2012). La survie à 5 ans des cancers bronchiques est faible autour de 15% tous stades confondus et inférieur à 5% dans les stades métastatiques (Goldstraw et al. 2007)(« Les données - Institut National Du cancer » 2011).

La très grande majorité (90%) des cancers bronchiques est due au tabac. L'évolution de la mortalité par cancer bronchique suit étroitement la consommation du **tabac** avec un délai d'environ 20 ans entre la consommation de tabac et la mortalité par cancer bronchique (**Figure 1**) (DOLL et HILL 1950)(Peto et al. 2000). En France, la réduction récente de la mortalité par cancer bronchique dans la population masculine est une conséquence de la diminution du tabagisme chez les hommes depuis les années 80 (C Hill, Jouglà E, et Beck F 2010). L'épidémie du cancer bronchique chez les femmes suit la consommation de tabac beaucoup plus récente chez les femmes (C Hill, Jouglà E, et Beck F 2010). On peut donc s'attendre à une poursuite de l'augmentation de l'incidence et de la mortalité du cancer bronchique chez la femme pendant encore plusieurs années. Chez l'homme, le cancer bronchique est toujours la première cause de décès par cancer et chez la femme, le cancer bronchique est la 2^{ème} cause de décès par cancer (« Les données - Institut National Du cancer » 2011).

L'effet carcinogène du tabac est lié à la présence dans la fumée de la cigarette d'un très grand nombre de produits cancérigènes, dont les nitrosamines, les benzopyrènes, les métaux lourds (Smith et al. 2003). Parmi les **autres facteurs de risque de cancer bronchique** figurent le tabagisme passif qui serait responsable d'environ 25% des cancers du non-fumeur, l'exposition à l'amiante en particulier chez les patients fumeurs (risque synergique multiplicatif) et l'exposition au radon dans certaines régions riches en granit en France (Corse, Bretagne) (Paolo Boffetta 2004)(« Afsset, INSERM. Expertise collective. Cancer et environnement. 2008. » 2008). Enfin, le rôle de la pollution atmosphérique reste débattu (Raaschou-Nielsen et al. 2013).

Figure 1 :



Consommation moyenne de cigarettes par jour et mortalité par cancer bronchique en France (C Hill, Jouglu E, et Beck F 2010)

Anatomopathologie

Dans le cancer bronchique, deux principaux types histologiques sont distingués, les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC, 85%) et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) (Travis et Cancer 2004). Tous ces types histologiques sont liés au tabac, mais l'association est plus forte pour le CBPC et le carcinome épidermoïde (Khuder 2001).

Le **CBPC** représente environ 15% de l'ensemble des cancers bronchiques. Il se caractérise par une croissance rapide, et une fréquente dissémination métastatique. Sur le plan histopathologique, le CBPC se présente sous forme de cellules pauvres en cytoplasme, avec des noyaux volumineux, une chromatine d'apparence granuleuse, une activité mitotique élevée et de grandes plages de nécrose. Ce type tumoral est particulièrement chimiosensible, mais avec des rechutes fréquentes à l'issue du traitement.

Le **CBNPC** représente environ 85% de l'ensemble des cancers bronchiques et comporte principalement trois sous-types : les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes indifférenciés.

L'**adénocarcinome** représente environ 50% des CBNPC (Travis et al. 2011). Les adénocarcinomes invasifs sont subdivisés en fonction de leur architecture: adénocarcinome acinaire (formation de tubes ou de glandes), papillaire (formation de papilles), micropapillaire (formation de papilles sans axe conjonctivo-vasculaire), solide (massifs de cellules de grande taille), lépidique (prolifération cellulaire le long des parois alvéolaires et bronchiolaires sans modification de l'architecture pulmonaire sous-jacente) (Travis et al. 2011). L'hyperplasie alvéolaire atypique (HAA) correspond à une lésion pré-néoplasique de l'adénocarcinome *in situ* : de moins de 5 millimètres, elle est composée de cellules alvéolaires disposées le long de

la paroi alvéolaire et/ou des bronchioles. L'HAA est fréquente chez le fumeur, et particulièrement chez les patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire invasif.

Le **carcinome épidermoïde** représente environ 30% des CBNPC. Les cellules tumorales sont de grande taille, avec des ponts d'union intercellulaire et/ou produisant de la kératine. Ce carcinome se développe à partir des lésions pré-néoplasiques de l'épithélium bronchique appelées dysplasie (légère, modérée ou sévère), puis évoluant vers un carcinome *in situ* (dysplasie sévère avec absence d'orientation de l'épithélium, mais respect de la membrane basale épithéliale), et enfin à un carcinome invasif épidermoïde par franchissement de la membrane basale.

Le **carcinome à grandes cellules** représente environ 5 à 20% des CBNPC. Il est constitué de cellules de grande taille, sans différenciation malpighienne, glandulaire ou neuroendocrine.

Classification TNM

La **classification TNM** permet de regrouper les cancers bronchiques selon leur stade, en décrivant la tumeur T (tumor), les ganglions médiastinaux N (nodes) et la présence ou non de métastases M (metastasis). Elle a un intérêt pronostic et thérapeutique (Goldstraw et al. 2007) (**tableau I, II**).

Tableau I : Classification TNM des cancers bronchiques (7^{ième} édition)

T – Tumeur primitive
T1 : Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d’invasion plus proximale que la bronchique lobaire (c-à-d pas la bronche souche)
T1a : Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension
T1b : Tumeur de plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension
T2 : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes :
• atteinte de la bronche de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène • invasion de la plèvre viscérale • présence d’une atelectasie ou d’une pneumopathie obstructive s’étendant à la région hilare sans atteindre l’ensemble du poumon.
T2a : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension
T2b : Tumeur de plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension
* les tumeurs avec ces caractéristiques sont classées T2a si leur dimension est de 5 cm ou moins
T3 : Tumeur de plus de 7 cm ; ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleural ou pariétal ou le péricarde ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l’envahir ; ou associée à une atelectasie ou d’une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d’un nodule tumoral distinct dans le même lobe
T4 : Tumeur de tout taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène; ou présence d’un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint
N – Ganglions lymphatiques régionaux
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 lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou sous-carénaires
N3 : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou controlatéraux
M – Métastases à distance
M0 : absence de métastase à distance
M1 : métastase à distance
M1a : Nodule(s) tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin
M1b : métastase à distance

Tableau II : Regroupement par stades TNM et corrélation au pronostic

Stade	T	N	M	Survie à 5 ans cTNM	Survie à 5 ans pTNM
IA	T1a, b	N0	M0	50 %	73 %
IB	T2a	N0	M0	43 %	58 %
IIA	T1a, b	N1	M0	36 %	46 %
	T2a	N1	M0		
	T2b	N0	M0		
IIB	T2b	N1	M0	25 %	36 %
	T3	N0	M0		
IIIA	T1, T2	N2	M0	19 %	24 %
	T3	N1, N2	M0		
	T4	N0, N1	M0		
IIIB	T4	N2	M	7 %	9 %
	Tout T	N3	M0	3 %	
IV	Tout T	Tout N	M1	2 %	

cTNM : classification TNM clinico-radiologique ; pTNM : classification TNM basée sur l'analyse anatomo-pathologique de la pièce opératoire

Traitement du CBNPC

Dans les **stades localisés** de CBNPC, le traitement curatif est basé sur la **chirurgie** en première intention. La radiothérapie stéréotaxique peut être une alternative en cas de contre-indication à la chirurgie. Cependant, les résultats de la chirurgie seule sont imparfaits avec un taux de guérison variant de 80 % dans les stades I à 30% dans les stades IIIA. Pour améliorer le taux de guérison, la chimiothérapie périopératoire à base de platine a démontré un bénéfice sur la survie dans le traitement des CBNPC de stades II, IIIA et peut être IB. Ce gain de survie varie entre 4 et 8% selon les études. Le niveau de preuve est plus élevé pour la chimiothérapie adjuvante que néoadjuvante.

Dans les **stades localement avancés** de CBNPC de stade IIIB le traitement est basé sur l'association de **chimiothérapie et de radiothérapie thoracique**. Pour les CBNPC de stade IIIA N2, la stratégie reste discutée: chirurgie et chimiothérapie adjuvante, chirurgie après chimiothérapie d'induction ou radio-chimiothérapie concomitante. Aucune stratégie n'a montré de supériorité (Robinson et al. 2007).

La prise en charge des **CBNPC métastatiques** a considérablement évolué depuis quelques années. Actuellement **certaines thérapies ciblées** ont une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le CBNPC. La prescription de ces médicaments peut être conditionnée par la présence de l'anomalie moléculaire cible (EGFR, ALK) qu'il faut rechercher en routine (Anne-Marie Ruppert et al. 2012).

En l'absence de mutation oncogénique, le traitement de référence est une **chimiothérapie à base de sel de platine** (cisplatine, carboplatine) en association avec des chimiothérapies de 3^{ième} génération (vinorelbine, gemcitabine, taxanes, pemetrexed). La chimiothérapie a montré un bénéfice sur la survie et sur la qualité de vie (Schiller et al. 2002).

Depuis 2008, il est proposé d'adapter le choix thérapeutique à l'histologie (Scagliotti et al. 2008). Dans une phase III randomisée, le doublet cisplatine/pemetrexed était supérieur dans les CBNPC non-épidermoïdes au doublet cisplatine/gemcitabine. A l'inverse, ce même doublet était délétère dans les carcinomes épidermoïdes. Actuellement, la prescription de pemetrexed est restreinte aux CBNPC non-épidermoïdes (Scagliotti et al. 2008).

Il est possible d'ajouter à la chimiothérapie à base de platine une thérapie anti-angiogénique, le **bevacizumab**, qui est un **anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF** avec un bénéfice sur la survie sans progression et la survie globale (Soria et al. 2013). Les principales contre-indications à l'utilisation du bevacizumab sont l'histologie épidermoïde, les cancers proximaux, les antécédents d'hémoptyxies et l'association à la radiothérapie.

2. Les mutations oncogéniques dans le cancer bronchique

Actuellement sont réalisées en routine sur les plateformes de génétique moléculaire la recherche des mutations d'*EGFR* et les réarrangements impliquant le gène *ALK*,

Les mutations d'EGFR

Les mutations d'EGFR sont retrouvées au sein des exons 18 à 21 codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur dans environ 10% des CBNPC de la population caucasienne et dans 40% des populations asiatiques (Cadranel et al. 2013). Les délétions respectant le cadre de lecture situées dans l'exon 19 ou la mutation ponctuelle faux-sens située dans l'exon 21 (p.L858R) d'*EGFR* sont associées à un meilleur pronostic et confèrent une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) d'EGFR. Les mutations de l'*EGFR* sont plus fréquentes chez les patients d'origine asiatique, non-fumeurs et les femmes. Les mutations sont essentiellement retrouvées dans les adénocarcinomes non-mucineux.

A ce jour, trois ITK d'EGFR, l'erlotinib, le gefitinib et l'afatinib ont obtenu une AMM pour un traitement en 1^{ière} ligne dans le CBNPC muté EGFR (T. S. Mok et al. 2009)(Rosell et al. 2012)(Wu et al. 2014). L'ensemble des essais de phase III montre une efficacité supérieure d'un traitement par ITK d'EGFR par rapport à une chimiothérapie standard avec un taux de réponse supérieur à 60% et une probabilité de progression réduite de plus de 50%.

La technique du séquençage selon le principe de Sanger est la technique de référence, car elle étudie de façon exhaustive l'ADN à la recherche d'une mutation du gène (Beau-Faller

et al. 2014). Des techniques alternatives au séquençage basées sur les techniques de PCR spécifiques d'allèles ont été développées.

Pour plus d'informations concernant EGFR, deux revues auxquelles j'ai contribué et traitant le sujet sont en Annexe 1 et 2 (Cadranel et al. 2013; A-M Ruppert, Wislez, et al. 2011).

Les réarrangements d'ALK

La protéine de fusion EML4-ALK est un oncogène dans le cancer bronchique (Soda et al. 2007) qui résulte d'une inversion au niveau du bras court du chromosome 2 aboutissant à l'expression d'une protéine chimérique présentant une activation constitutive de la kinase ALK. La présence d'une translocation ALK est rare et retrouvée dans environ 5% des CBNPC de type adénocarcinome et plus particulièrement chez les sujets jeunes non-fumeurs (Fallet et al. 2014).

Le crizotinib (PF-02341066) est un ITK multicible inhibant ALK. Le crizotinib a obtenu en Europe une AMM en 2^{ème} ligne à partir des résultats de phase III comparant le crizotinib à une monochimiothérapie en février 2013. Les résultats préliminaires d'une phase III du crizotinib en première ligne montrent des résultats supérieurs à une chimiothérapie de référence (Shaw et al. 2013)(T. Mok 2014). La technique diagnostique par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur tissu tumoral est actuellement la technique de référence. La protéine ALK est très peu exprimée dans les tissus normaux alors que la protéine de fusion ALK a une expression cytoplasmique dans les cellules tumorales facilement mise en évidence par l'IHC. L'IHC est une technique sensible et spécifique qui permet une sélection des

patients et en cas de positivité ou de doute une confirmation par FISH peut être réalisée (McLeer-Florin et al. 2011).

Biomarqueurs émergents

D'autres biomarqueurs émergents tels que les mutations des gènes, *BRAF*, *HER2* et *PI3KCA* sont réalisés en routine sur les plateformes soutenues par l'INCA. Depuis 2014, l'INCA soutient le programme ACSE qui évalue l'efficacité du crizotinib dans les cancers bronchiques amplifiés pour MET ou transloqués pour ROS et le vemurafenib dans les cancers bronchiques mutés BRAF.

Pour plus d'informations concernant les biomarqueurs, un article rédigé avec notre équipe et traitant le sujet figure en Annexe 3 (Anne-Marie Ruppert et al. 2012).

Mutations de KRAS

KRAS est une protéine qui joue un rôle important dans la signalisation des récepteurs membranaires, en particulier EGFR. Les mutations du gène *KRAS* sont trouvées dans environ 15 à 30% des CBNPC, plus particulièrement dans les adénocarcinomes, chez les patients fumeurs, d'origine caucasienne (Sequist et al. 2011). La valeur pronostique des mutations de *KRAS* reste controversée. Une méta-analyse basée sur 2163 patients atteints d'un CBNPC métastatique montrait que la présence d'une mutation de *KRAS* était associée à un risque accru de mortalité (Mascaux et al. 2005). Les mutations de *KRAS* seraient associées à une résistance primaire aux ITK d'EGFR (Linardou et al. 2008). La recherche de mutations de *KRAS* se justifie pour favoriser l'inclusion des patients dans des essais thérapeutiques par

inhibiteurs de MAP kinases ou pour mieux choisir la deuxième ligne après progression sous sel de platine, en évitant pour certains un ITK d'EGFR en cas de mutation de *KRAS* (Linardou et al. 2008).

Surexpression, amplification et mutations de MET

MET est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, dont le ligand est le facteur de croissance hépatocytaire (HGF). Différentes anomalies de MET sont décrites dans le CBNPC : surexpression retrouvée dans environ 50% des CBNPC, amplification dans moins de 10% des adénocarcinomes et mutation rare dans le domaine de régulation de MET (Y. Feng, Thiagarajan, et Ma 2012). L'amplification et les mutations de *MET* sont des altérations génomiques rares, qui pourraient constituer une cible thérapeutique d'addiction oncogénique. Le programme ACSE évalue l'efficacité du crizotinib dans les cancers bronchiques amplifiés pour MET.

Pour plus d'informations concernant le biomarqueur MET, un article rédigé avec notre équipe et traitant le sujet figure en Annexe 4 (A-M Ruppert, Beau-Faller, et al. 2011)

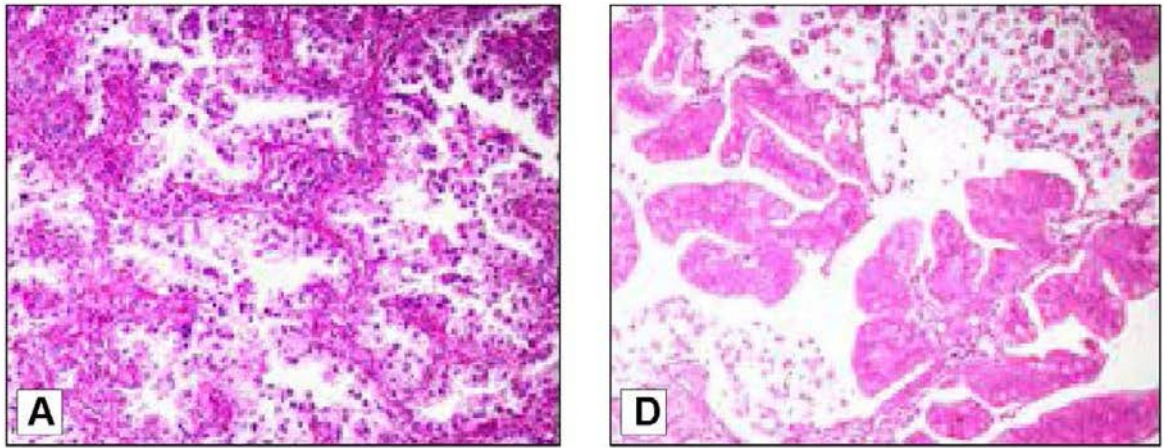
3. Particularités du cancer bronchique de type lépidoïde

L'**adénocarcinome bronchique de type lépidoïde** (ADL) est une tumeur rare qui ne représentait qu'environ 5 % CBNPC (Zell et al. 2005). Dans la classification anatomopathologique de l'OMS de 2011, l'ADL est défini par une prolifération adénocarcinomateuse développée à partir des cellules épithéliales de l'unité respiratoire terminale tout en respectant l'architecture pulmonaire dans sa progression tumorale (**Figure 2A et B**) (Travis et al. 2011). Ainsi, le diagnostic ne peut être affirmé que sur une pièce opératoire permettant de démontrer son sous-type histologique ADL pur (c'est-à-dire sans autre composante associée, par exemple, papillaire ou acineuse) et l'absence de signe histologique d'invasion stromale, pleurale ou vasculaire (Travis et Cancer 2004; Travis et al. 2011). Trois types de ADL sont distingués, non mucineux (les plus fréquents), mucineux et mixte (non mucineux et mucineux) (Travis et al. 2011).

Deux présentations cliniques différentes sont décrites (**Figure 2 C et D**). D'abord, la **forme nodulaire unique**, qui est la plus fréquente et particulièrement bien décrite dans les séries chirurgicales d'ADC périphériques (Garfield et al. 2006). Il s'agit le plus souvent d'une découverte fortuite à l'occasion d'une imagerie systématique. L'examen physique est normal. Sur le plan radiologique, il s'agit d'un nodule périphérique unique pouvant mesurer jusqu'à 10 cm de diamètre, en général bien limité (Travis et al. 2005)(Gardiner, Jogai, et Wallis 2014). L'aspect en verre dépoli ou sub-solide du nodule au scanner thoracique est hautement spécifique du diagnostic d'ADL. Ces formes sont le plus souvent non-mucineuses (Travis et al. 2005)(Gardiner, Jogai, et Wallis 2014).

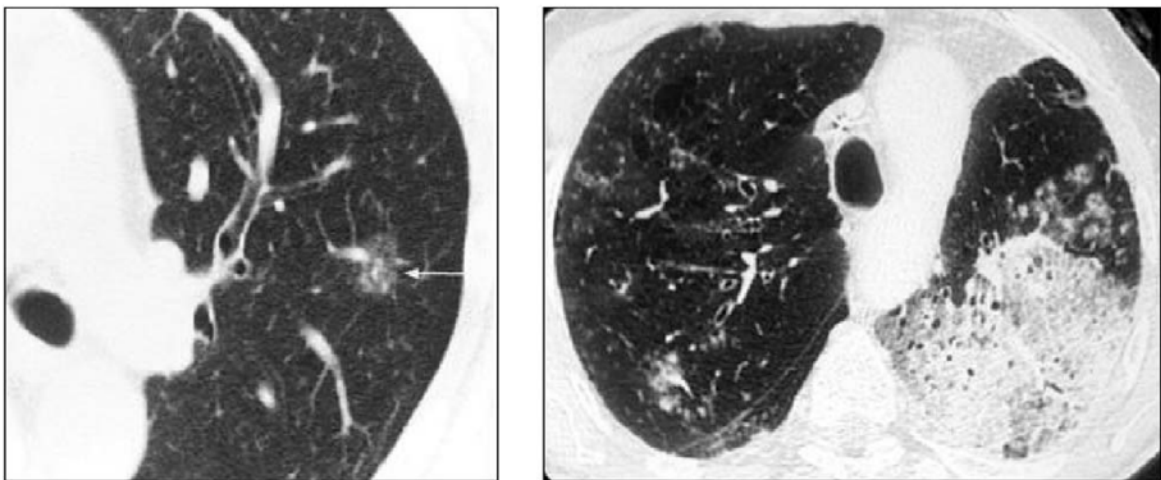
Figure 2

A et B : anatomopathologie (HES)



Adénocarcinome bronchique lépidique A, non mucineux ; B.mucineux

C et D : radiologie



C, forme nodulaire ; D, forme pneumonique

Les **formes pneumoniques ou nodulaires multiples** ne sont pas, par définition, des ADL purs mais des ADC avec composante lépidique. Elles sont le plus souvent symptomatiques ; la présence d'une **bronchorrhée** parfois très abondante, la présence de **râles crépitants** à l'auscultation et parfois l'installation progressive d'une insuffisance respiratoire sont caractéristiques (Garfield et al. 2006). De façon inattendue, l'état général de ces malades reste fréquemment conservé (Garfield et al. 2006). Sur le plan radiologique, il s'agit de nodules multiples ou encore d'une condensation alvéolaire chronique (adénocarcinome pneumonique) avec fréquemment un bronchogramme aérien (Gardiner, Jogai, et Wallis 2014). La condensation peut être unique ou multiple, associée à un (des) nodule(s) ou à la présence de verre dépoli.

La **progression tumorale** est essentiellement lépidique, mais aussi aérogène, expliquant les présentations radiologiques volontiers diffuses, pneumonique ou multifocale et un décès plus souvent lié à la diffusion pulmonaire bilatérale qu'à la survenue de métastases extrathoraciques (Garfield et al. 2006). La présence d'une réaction inflammatoire alvéolaire à neutrophiles dans certaines tumeurs pourrait favoriser la progression lépidique et aérogène en facilitant la desquamation et la motilité des cellules tumorales (Bellocq et al. 1998a)(Marie Wislez, Rabbe, et al. 2003).

Par ailleurs, il est important sur le plan biologique de distinguer dans les adénocarcinomes avec composante lépidique les formes non-mucineuses et mucineuses. En effet, les **formes non-mucineuses** se caractérisent par une **expression forte du TTF1** (thyroïde transcription factor 1) (Marie Wislez et al. 2010) et dans certaines tumeurs une **mutation activatrice du gène de l'EGFR** (Marie Wislez et al. 2010). Ces anomalies sont plus souvent observées chez des personnes non ou ex-fumeuses et associées à un sous-type

papillaire. D'un autre côté, les **formes mucineuses** se caractérisent par l'absence ou la **faible expression du TTF1** et l'absence de mutation activatrice d'EGFR (Duruissaux et al. 2014). En revanche, ces tumeurs ont une fréquence élevée de **mutations de l'oncogène RAS**, y compris chez des malades non-fumeurs (Duruissaux et al. 2014).

Plus récemment d'autres oncogènes rares ont été décrits dans l'adénocarcinome avec composante lépidique, en particulier les translocations ALK, ROS et RET (Warth et al. 2014)(Rizzo et al. 2015)(Tsuta et al. 2014). Ces différences biologiques importantes témoignent d'une oncogenèse différente et ont une implication thérapeutique importante.

Le **traitement** de référence de l'ADL et des adénocarcinomes avec composante lépidique est la **chirurgie** lorsqu'elle est possible. La prise en charge thérapeutique des formes disséminées repose essentiellement sur la **chimiothérapie** et les **thérapeutiques ciblées**, si une anomalie moléculaire d'EGFR, ALK ou ROS a été mise en évidence. Il est possible d'ajouter à la chimiothérapie à base de platine le bévacizumab, traitement anti-angiogénique ciblant le VEGF, qui semble particulièrement efficace sur la bronchorrhée et les signes d'insuffisance respiratoire favorisé par un shunt intra tumoral.

4. Rôle des neutrophiles dans la progression tumorale

Jusqu'à récemment, la recherche en cancérologie a surtout porté sur la cellule tumorale. Cependant, les cellules tumorales sont entourées d'un microenvironnement dans lequel se situent les cellules de la réaction inflammatoire et immunitaire, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les péricytes. Ce microenvironnement favorise la sécrétion de multiples facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines qui peuvent exercer un effet anti ou pro-tumoral sur la cellule cancéreuse. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses vont pouvoir utiliser et/ou contourner les signaux issus des cellules du microenvironnement afin de favoriser la croissance tumorale, l'invasion tissulaire et la formation de métastases (de Visser, Eichten, et Coussens 2006).

Inflammation chronique et cancer

Virchow a postulé il y a 150 ans, que l'inflammation était un facteur prédisposant à la carcinogenèse. Cette hypothèse est fondée sur l'observation que les cancers se développaient au cours de maladies inflammatoires chroniques, au niveau de sites inflammatoires chroniques et que les cellules inflammatoires étaient présentes sur les pièces d'exérèse chirurgicale des cancers (Balkwill et Mantovani 2001). De multiples études épidémiologiques ont décrit au cours des dernières décennies le risque accru de développer un cancer en cas de maladies inflammatoires chroniques (Mantovani et al. 2008). Ainsi, les maladies inflammatoires du tube digestif, l'infection à *Helicobacter pylori*, les hépatites virales chroniques B et C, prédisposent au cancer du côlon, de l'estomac ou du foie.

Le risque de cancer bronchique est augmenté d'un facteur 10 suite à l'exposition à la fumée de cigarettes. Le tabac provoque une inflammation chronique qui est associée au à la bronchite chronique obstructive et au développement d'un cancer bronchique (Shiels et al. 2014). La bronchite chronique obstructive comme la fibrose pulmonaire idiopathique sont associées à une augmentation de risque de développer un cancer bronchique (Tomassetti et al. 2015). Par ailleurs, certains cancers bronchiques se développent sur des cicatrices en particulier infectieuses comme celles de la tuberculose, sans relation avec les habitudes tabagiques.

Les cellules inflammatoires

Le développement tumoral est associé à une inflammation chronique. Les principaux constituants cellulaires sont les macrophages dits « macrophages associés aux tumeurs » (TAM), les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes, les cellules naturelles tueuses NK (natural killer), et les lymphocytes T et B (Remark et al. 2014)(Bremnes et al. 2011).

La valeur pronostique de ces infiltrations cellulaires a été longtemps controversée. En effet, ces cellules ont des propriétés à la fois pro et anti tumorale dont l'expression est dépendante du microenvironnement dans lequel elles se trouvent ; ceci rend les études mécanistiques *in vitro* difficiles. Les données ont été initialement très descriptives à partir de l'étude de tissus tumoraux issus de pièce d'exérèse chirurgicale. Les modèles murins ont ensuite permis des études plus mécanistiques.

La réaction immunitaire se compose des **réponses immunitaires innées et adaptatives**. Le système immunitaire inné se compose des phagocytes (macrophages,

neutrophiles, cellules dendritiques, mastocytes, MDSC (Cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes) et cellules naturelles tueuses (cellules NK). Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre une agression tissulaire telle que des agents pathogènes ou des cellules transformées. La réponse immunitaire innée conduit à l'activation du système immunitaire adaptatif (cellules B et T), par interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes. La réponse adaptative est plus lente et aboutit à la production d'anticorps. Cette interaction entre cellules B et T est une cible thérapeutique intéressante avec des résultats prometteurs.

Pour plus d'informations concernant inflammation et cancer bronchique, une revue à laquelle j'ai contribué et traitant le sujet se trouve en Annexe 5.

Polynucléaires Neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont les cellules clés du système immunitaire inné. Ils ont été décrits initialement au cours du processus de lutte contre les agents pathogènes. Pour accomplir cette fonction, les neutrophiles sont recrutés sur les sites infectés, détectent les agents pathogènes (endogènes ou exogènes) par des récepteurs de l'immunité innée, tels que les récepteurs Toll-like (TLR) et d'autres récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRR, pattern recognition receptor). Les maladies pulmonaires chroniques sont caractérisées par une accumulation de neutrophiles, dans la fibrose pulmonaire idiopathique au niveau alvéolaire et la bronchite chronique obstructive au niveau de l'épithélium bronchique (Koller et al. 2009).

L'infiltration des polynucléaires neutrophiles a été décrite au cours des CBNPC, en particulier dans le sous-type lépidique ou anciennement appelé bronchioloalvéolaire [28][29]. L'activation de l'oncogène Ras pourrait favoriser le recrutement tumoral des polynucléaires neutrophiles via l'activation de la transcription d'une chimiokine, CXCL8 (ou IL-8). CXCL8 est aussi proangiogénique. Le rôle protumoral de CXCL8, via les neutrophiles et l'angiogenèse a été démontré à partir de modèles murins. (Murphy et al. 2005). Dans ces modèles, l'inhibition de CXCL8 n'affectait pas la prolifération des cellules tumorales, mais favorisait la mort cellulaire tumorale via l'altération des microvaisseaux et la diminution de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (Murphy et al. 2005)(Marie Wislez et al. 2006a)(Johnson et al. 2001a).

Chez l'homme, l'augmentation des polynucléaires neutrophiles dans les adénocarcinomes lépidiques est associée à un mauvais pronostic (Bellocq et al. 1998b) (Marie Wislez, Massiani, et al. 2003b). La sécrétion de chimiokines (CXCL8) et de facteurs anti apoptotiques des neutrophiles (GM-CSF et G-CSF) par les cellules tumorales favoriseraient le recrutement de polynucléaires neutrophiles et leur survie au sein de la tumeur (M. Wislez et al. 2001). Les mécanismes protumoraux des polynucléaires neutrophiles sont multiples. Ils libèrent des radicaux libres qui sont mutagènes ; ils libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'HGF (hepatocyte growth factor) qui est le ligand du récepteur membranaire Met. Met exprimé par la cellule tumorale favorise la prolifération et migration tumorale lorsqu'il est activé (Marie Wislez, Rabbe, et al. 2003). Met est aussi exprimé sur les cellules endothéliales et est proangiogénique. Des mécanismes plus inhabituels ont été décrits tels que des interactions directes avec les cellules tumorales via des molécules membranaires (ICAM LFA1, TNF / récepteur du TNF) (Marie Wislez et al. 2007). Ces interactions favorisent la migration cellulaire tumorale.

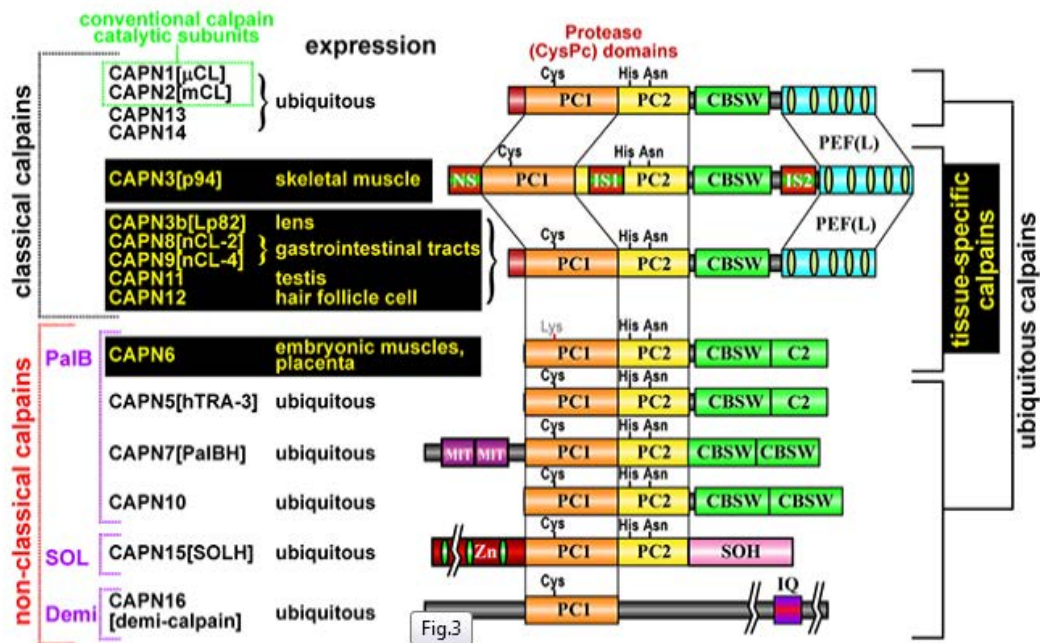
5. Calpaïnes

La calpaïne a été découverte en 1964 par Guroff et ses collaborateurs (Guroff 1964) sur du cerveau de rat. Le nom calpaïne provient de la fusion de calcium et papaïne.

Structure et activation

Les calpaïnes sont des **protéases à cystéine** (Goll et al. 2003)(Sorimachi et Suzuki 2001). Actuellement, quinze membres de la classe des calpaïnes ont été identifiés. Les calpaïnes peuvent être classées en deux groupes selon la présence ou l'absence d'un domaine « calmodulin-like » ; ce domaine comporte comme la calmoduline des structures EF-hands capables de lier fortement le calcium. Les calpaïnes classiques (calpaïnes 1, 2, 3, 8, 9, 11 et 12) possèdent ce domaine tandis que les calpaïnes non classiques (calpaïnes 5, 6, 7, 10, 13, 14, 15 et 16) ou atypiques en sont dépourvues. La majorité des calpaïnes sont ubiquitaires (calpaïnes 1, 2, 5, 7, 10, 12, 14 et 15), les autres étant spécifiques de tissu (**Figure 5**, classification FASEB 2013). Parmi ces quinze membres identifiés, seules les calpaïnes 1 ou μ et 2 ou m sont isolées sous leur forme protéique (Goll et al. 2003).

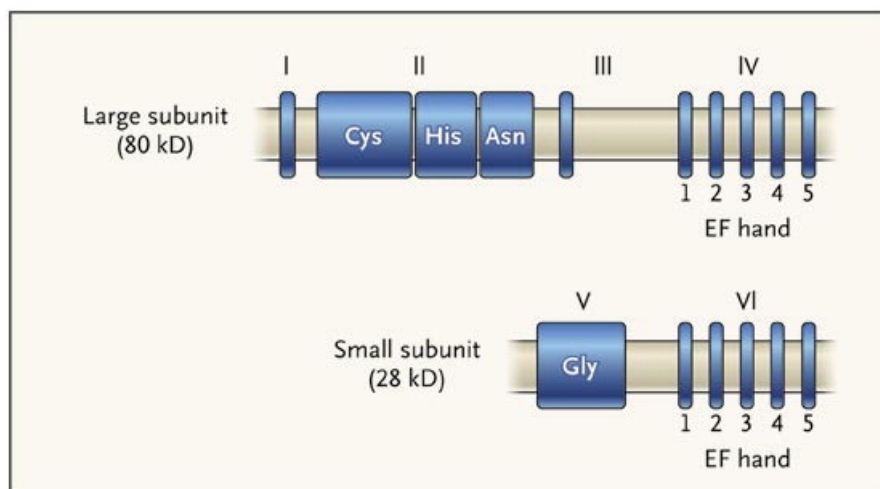
Figure 3 : Nomenclature internationale des Calpaïnes (FASEB Summer Research Conferences, 2013)



Abréviations utilisées: CysPc: séquence calpaïn-like cystéine protéase composée de deux protéases (PC1 et PC2), **PC1**: protéase core (noyau) domaine 1, **PC2**: protéase core (noyau) domaine 2, **CBSW**: calpaïn-type bêta-sandwich domaine, **PEF(L)**: penta-EF-hand domaine dans la large sous-unité catalytique, **PEF(S)**: penta-EF-hand domaine dans la petite sous-unité catalytique régulatrice, **NS, IS1, IS2**: CAPN3[p94]-séquences, **MIT**: motif interagissant avec les microtubules et le transport (microtubules interacting and transport motif), **C2**: C2 domaine, **Zn**: motif Zn-finger, **SOH**: domaine SOL-homologie, **IQ**: motif interagissant avec la calmoduline

Les formes principales sont la **calpaïne 1 ou μ** , calpaïne activée par des concentrations micromolaires de calcium et la **calpaïne 2 ou m**, calpaïne activée par des concentrations millimolaires de calcium. D'un poids moléculaire de 78-80 kDa, elles sont présentes dans le cytoplasme de toutes les cellules (**Figure 6**). Cette sous-unité catalytique comporte quatre domaines : domaine I correspond à un site d'ancrage d'une hélice α N-terminale et est important pour la régulation et la dissociation de la sous-unité ; le domaine II correspond un domaine catalytique, a deux sous-domaines en l'absence de calcium ; le domaine III lie le calcium et les phospholipides ; et le domaine IV, également appelé penta-EF-hand, est constitué de cinq structures d'hélices peptiques reliées par le calcium. Le domaine IV est impliqué dans l'interaction avec les sous-unités régulatrices de 28 kDa appelées Cssl (calpain small subunit 1, également nommé Calpaïne 4) et Cssh (Schád et al. 2002)(Goll et al. 2003). Les sous-unités régulatrices comportent deux domaines : le domaine V N-terminal, riches en glycérine et hydrophobe ; et le domaine VI, similaire au domaine IV de l'unité catalytique, avec cinq structures d'hélices peptiques penta-EF-hand.

Figure 4 : Structure de la Calpaïne 1 avec sa sous-unité régulatrice d'après Zatz et al. (Zatz et Starling 2005)



Plusieurs mécanismes interviennent dans le contrôle de leur activité enzymatique. Le plus important est leur interaction avec la **calpastatine**. De distribution ubiquitaire, elle se lie aux calpaïnes et les inactive (Zatz et Starling 2005). Le mécanisme d'interaction entre calpaïnes et calpastatine reste mal connu. Certaines études ont montré que cette interaction aboutit à l'apoptose dans certains tissus (Goll et al. 2003).

Une **régulation intrinsèque** de la calpaïne semble nécessaire en raison de son abondance intracytoplasmique et ses multiples substrats, protéines structurales ou voies de signalisation (Goll et al. 2003)(Sorimachi et Suzuki 2001). Initialement, la localisation membranaire était considérée comme un mécanisme de régulation importante : en se liant à la membrane, la calpaïne se transforme d'une forme inactive en enzyme protéolytique active par autolyse (Goll et al. 2003). Cependant, les calpaïnes semblent actives avant autolyse et l'interaction à la membrane permet de lier les calpaïnes à leurs substrats. Une fois activée sur la membrane, la calpaïne diffuse vraisemblablement dans le cytosol et devient résistante à l'action inhibitrice de la calpastatine. Les substrats protéiques sont digérés par la calpaïne activée sur la membrane ou dans le cytosol (Goll et al. 2003).

Ainsi l'activité des calpaïnes est régulée à la fois par la calpastatine, mais aussi par sa localisation intracellulaire.

Substrats des calpaïnes

Plus d'une centaine de substrats potentiels des calpaïnes ont été identifiées in vitro (Goll et al. 2003). Parmi ces protéines, sont identifiées :

- des protéines du cytosquelette : cadhérine, β -caténine, desmine, tropomyosine etc.

- des enzymes : protéine kinase C, phospholipase C, caspases 3 et 7 etc.
- des protéines associées à la membrane : EGFR, PDGFR (platelet derived growth factor receptor)
- des facteurs de transcription : p53, IκB, c-Fos

Il reste à démontrer que ces protéines identifiées *in vitro* jouent aussi un rôle *in vivo*.

Physiologie des calpaïnes

Les données concernant les fonctions des calpaïnes ont été obtenues à partir de modèles de maladies différentes comme les maladies neurodégénératives, le diabète, l'hypertension artérielle, et aussi les cancers. Ces données n'étant pas spécifiques aux cellules tumorales, je ne les détaillerai pas à part les données obtenues spécifiquement dans les modèles *in vitro* de cancer.

Les calpaïnes interviennent dans la **motilité cellulaire** par son organisation du cytosquelette, au niveau des filaments d'actine et au niveau des rétractions membranaires. L'utilisation de lignées fibroblastiques invalidées pour le gène *CAPN4* (également appelé Cssl ou petite sous-unité régulatrice) a permis de montrer une diminution de la migration cellulaire et une organisation anormale de l'actine du cytosquelette (Dourdin et al. 2001).

Les calpaïnes sont essentielles **à la réponse aux VEGF et l'angiogenèse** ; elles pourraient favoriser la vascularisation tumorale (Su et al. 2006).

L'effet des calpaïnes sur la **prolifération cellulaire** reste discuté. L'adjonction d'inhibiteur de calpaïnes inhiberait la prolifération cellulaire sur des lignées épithéliales bronchiques alors que l'adjonction de calpaïne favoriserait la prolifération cellulaire (Mellgren, Shaw, et Mericle 1994) (Schollmeyer 1988). L'implication des calpaïnes dans la prolifération serait liée à son interaction avec des facteurs de transcription tels que c-fos, c-jun et certaines protéines du cycle cellulaire comme p53 (Mellgren, Shaw, et Mericle 1994)(Gonen et al. 1997).

D'autres équipes rapportent **un effet anti-apoptotique** des calpaïnes par **activation NF- κ B**, puissant facteur de transcription de protéines anti-apoptotiques. Ainsi sur des lignées épithéliales bronchiques, les calpaïnes 1 et 2 dégradent I κ B et activent NF- κ B (Shumway, Maki, et Miyamoto 1999) (Chen et al. 2000).

Les calpaïnes sont aussi impliquées dans **l'apoptose des polynucléaires neutrophiles sénescents** (Knepper-Nicolai, Savill, et Brown 1998). En synergie avec les enzymes du protéasome, et sous le contrôle des caspases, les calpaïnes déclenchent le programme d'apoptose constitutive des polynucléaires neutrophiles.

Les calpaïnes participent à **la réponse immunitaire**. Ainsi l'activation des lymphocytes T augmente l'expression de la calpaïne (Deshpande et al. 1995). L'activité calpaïne est impliquée dans la migration des lymphocytes T et la calpeptine, inhibiteur pharmacologique de la calpaïne, bloque ce chimiotactisme (Butler et al. 2009). L'activité calpaïne favorise dans les cellules mononuclées la sécrétion d'interleukine-2 (IL-2), l'expression de son récepteur de surface CD25 et la sécrétion d'interféron- γ (IFN- γ) pour orienter une réponse lymphocytaire de type TH1 (Schaecher, Goust, et Banik 2001)(Imam et al. 2007). L'activité

calpaïne favorise dans les lymphocytes la sécrétion d'IL- 17 pour une réponse lymphocytaire de type TH17 (Letavernier et al. 2011a).

Les calpaïnes participent à **l'activation des polynucléaires neutrophiles** (Pontremoli et al. 1988). En activant la protéine kinase C, elles induisent la phosphorylation de protéines du cytosquelette. La réorganisation du cytosquelette qui en résulte entraîne l'exocytose des granules des polynucléaires.

Les calpaïnes contrôlent la **sensibilité des cellules inflammatoires aux glucocorticoïdes** (Bellocq et al. 1999). Les calpaïnes hydrolysent la heat shock protein 90 (Hsp 90), une molécule chaperon qui s'associe au récepteur des glucocorticoïdes et lui permet de reconnaître son ligand. Les inhibiteurs pharmacologiques de l'activité des calpaïnes restaurent la capacité de réponse des cellules aux glucocorticoïdes.

Calpaïnes extracellulaires

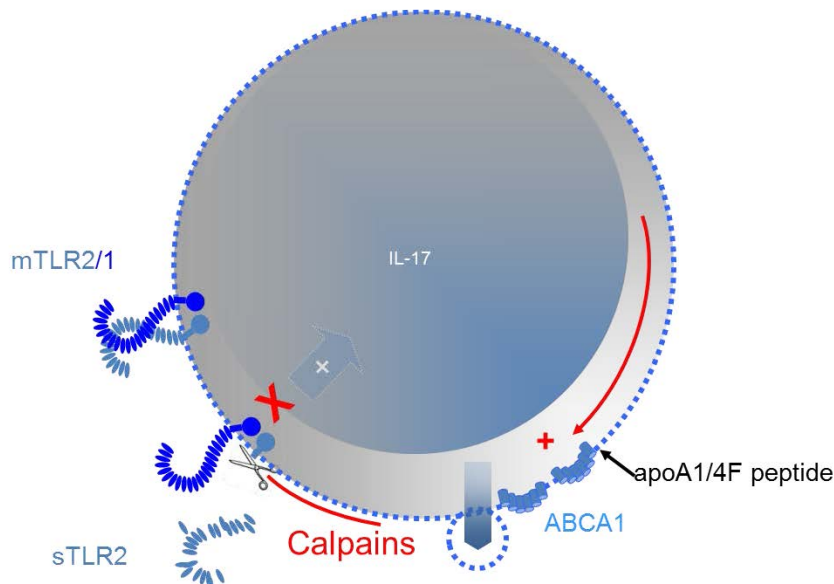
Des recherches récentes ont montré que les calpaïnes peuvent s'extérioriser (Dourdin et al. 1997)(McGowan, Yeo, et Detwiler 1983)(Suzuki et al. 1992). Cette extériorisation n'est pas liée à la mort cellulaire, apoptose ou nécrose. Elle pourrait impliquer soit la **formation de microparticules** (Zafrani et al. 2012), soit le passage à travers la membrane plasmique en empruntant des canaux spécialisés. L'équipe du Pr Baud a identifié l'importance du **transporteur membranaire ABCA1** dans la sécrétion des calpaïnes (Perez et al. 2015).

Plusieurs équipes dont celles du Professeur Laurent Baud ont montré que, contrairement aux calpaïnes intracellulaires, les calpaïnes extracellulaires favorisent la **résolution de l'inflammation** et la **réparation des tissus** plutôt que le développement de la

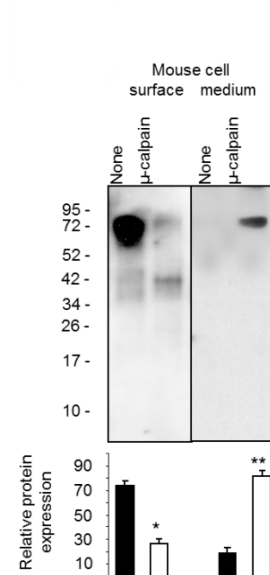
réaction inflammatoire (Frangié et al. 2006)(Xu et Deng 2004)(Perez et al. 2015). Elles augmentent l'expression de peptides anti-inflammatoires (en particulier TGF- β), diminuent l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17 et accélèrent la reconstitution des barrières épithéliale et endothéliale après dommage ischémique ou inflammatoire (Frangié et al. 2006)(Xu et Deng 2004)(Perez et al. 2015). Leur rôle dans la réparation est expliqué par leur capacité de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire, en particulier la fibronectine. Les calpaïnes extracellulaires favorisent ainsi la mobilité des cellules qui colonisent la zone lésée et la prolifération des cellules. Récemment l'équipe du Pr Baud a identifié dans les lymphocytes humains et murins le récepteur TLR2 comme cible des calpaïnes extracellulaires (Perez et al. 2015). Une fois extériorisées, les calpaïnes clivent le domaine extracellulaire de TLR2, donnant naissance à une forme soluble de ce récepteur, (sTLR2) puis le dégradent, limitant ainsi le rôle de TLR2 dans l'expression de cytokines, principalement l'interleukine-17 (**Figure 5**) (Perez et al. 2015).

Figure 5 : TLR2 est une cible des calpaïnes externalisées

A. Schéma



B. Western Blot



A. Les calpaïnes sont sécrétées par les lymphocytes murins et humains sous le contrôle du transporteur membranaire ABCA1. Les calpaïnes extériorisées clivent le domaine extracellulaire du récepteur TLR2, libèrent sa forme soluble qu'elles dégradent et inhibent ainsi l'expression d'IL-17.

B. Expression de TLR2 sur la membrane des lymphocytes murins ainsi que dans leur milieu de culture. Après traitement de lymphocytes spléniques murins par μ -calpaïnes, l'analyse par Western blot montre une diminution de la bande correspondant au TLR2 membranaire et une apparition de la bande correspondant au domaine extracellulaire de TLR2 dans le milieu de culture.

Physiopathologie des calpaïnes

Le rôle *in vivo* de ces enzymes a été déterminé en analysant chez l'animal, le phénotype de souris invalidées pour les gènes de la calpaïne et chez l'homme, les pathologies liées aux mutations de ces gènes.

Données issues du phénotype de souris invalidées pour les gènes de la calpaïne

L'invalidation du gène codant pour la calpaïne 4 (ou *Css1*), sous-unité régulatrice des calpaïnes 1 et 2, supprime l'activité de ces deux enzymes sans modifier la prolifération des cellules souches embryonnaires. Cependant, les embryons des souris mutées meurent au cours de leur développement par déficit de maturation du système cardio-vasculaire et hématologique (Arthur et al. 2000). De même, l'invalidation du gène *CAPN 2* codant pour la calpaïne 2 est létale à partir du stade embryonnaire sans que le mécanisme n'ait pu être déterminé (Dutt et al. 2006). En comparaison, l'invalidation par recombinaison homologue du gène *CAPN 1* codant pour la calpaïne 1 n'est pas létale.

Données issues des maladies chez l'homme liées à des mutations ou altération d'expression des calpaïnes

Chez l'homme, plusieurs pathologies ont été associées aux calpaïnes. Ainsi des **mutations dans le gène *CAPN 3*** codant pour la calpaïne 3 sont impliquées dans la **dystrophie musculaire des ceintures**, myopathie héréditaire autosomique récessive caractérisée par

l'atrophie des muscles du tronc et des ceintures et par l'absence d'activité calpaïne 3 dans les myocytes (Baghdiguian et al. 1999). Le déficit en calpaïne 3 est responsable de l'accumulation de la protéine IκB qui se lie à NF-κB (nuclear transcription factor B), un facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes anti-apoptotiques (Baghdiguian et al. 1999).

L'expression altérée de la calpaïne a été observée dans de **nombreuses pathologies**, dont les **maladies neurodégénatives** (maladie d'Alzheimer en particulier), la formation de la cataracte et le développement de la sclérose en plaque (Zatz et Starling 2005). Le diabète de type 2 est associé à des polymorphismes du gène de la calpaïne 10. Les variantes génétiques de la calpaïne 5 sont associés à l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle et le syndrome des ovaires polykystiques (Zatz et Starling 2005).

L'équipe du Professeur Laurent Baud a montré le rôle pro-inflammatoire des calpaines à partir d'un modèle murin surexprimant la calpastatine dans tous les tissus (CalpTG). Avec cet outil, elle a démontré que les calpaines jouent un rôle dans l'inflammation glomérulaire à la phase hétérologue de la **néphrite néphrotoxique** (Peltier et al. 2006), dans l'inflammation et le remodelage cardiovasculaire associés à **l'hypertension** (Letavernier et al. 2012), dans le **rejet d'allogreffe de peau** (Letavernier et al. 2011b) et dans la défaillance multiviscérale au cours du **sepsis** (Zafrani et al. 2012). Les calpaines favorisent particulièrement la mobilisation et l'activation des cellules inflammatoires en modifiant la distribution des points d'ancrage du cytosquelette à la membrane plasmique et en activant des voies de signalisation comme celle du facteur de transcription NF-κB.

Calpaïnes et Cancer

Il existe quelques données récentes concernant les calpaïnes en cancérologie. L'expression accrue de la calpaïne a été rapportée dans les méningiomes ou schwannomes, les cancers du sein, les adénocarcinomes gastro-duodénaux et ainsi que les cancers bronchiques (Sarah J. Storr, Carragher, et al. 2011).

Dans les schwannomes et méningiomes, la calpaïne participe au développement tumoral. Son rôle a été identifié à partir du modèle de la neurofibromatose de type 2, maladie autosomique dominante liée à une mutation du **gène suppresseur de tumeur NF2** responsable du développement de schwannomes et méningiomes. Bien que le développement de ces tumeurs dépende de NF2, dans certains cas les mutations de NF2 ne sont pas détectées, ce qui indique que des mécanismes alternatifs existent pour inactiver la protéine NF2. Il a été montré dans des schwannomes et méningiomes que la calpaïne clive NF2, entraîne une perte d'expression de NF2 et favorise le développement de ces tumeurs (Kimura et al. 1998).

L'**impact pronostique** de l'expression des calpaïnes a été étudié sur différents types de cancer. Son impact varie selon le type de cancer : de **bon pronostic** dans le cancer de l'ovaire, le cancer du pancréas et le plus souvent de **mauvais pronostic** dans le cancer bronchique, le cancer gastro-oesophagien, le cancer du sein et le cancer du sein traité par trastuzumab, (S J Storr et al. 2012)(Sarah J Storr et al. 2013)(Sarah J Storr et al. 2012)(Sarah J Storr et al. 2012) (Gu et al. 2015).

Ainsi dans une cohorte de 208 patients atteints **cancer bronchique non à petites cellules**, la surexpression en immunohistochimie de la petite unité de calpaïne 1 (Casp1 ou calpaïne 4) a été corrélée à l'extension ganglionnaire et à la taille tumorale. L'expression de la

calpaïne 4 a été associée à une **diminution de la survie globale** en analyse univariée ($p=0,001$) et multivariée ($p=0,03$)(Sarah J Storr et al. 2013)(Sarah J Storr et al. 2013)(Sarah J Storr et al. 2013)(Sarah J Storr et al. 2013) (Gu et al. 2015). L'utilisation de siARN bloquant la calpaïne 4 inhiberait la migration des cellules tumorales. La calpaïne 4 augmenterait l'invasion tumorale par l'expression de la matrix métalloprotéinase 2 (Gu et al. 2015).

Dans une cohortes de 88 patients atteints de **cancers gastro-oesophagiens**, traités par chimiothérapie néoadjuvante suivi de chirurgie, l'expression de calpaïne 1, calpaïne 2 et calpastatine a été associée à une **diminution de la survie** spécifique en analyse univariée ($p=0,004$, $p=0,001$ et $p=0,012$) et en analyse multivariée ($p=0,015$, $p=0,020$ et $p=0,022$)(Sarah J Storr et al. 2013). Ces résultats ont été validés sur une deuxième cohorte chirurgicale de 144 patients opérés de cancers gastro-duodénaux ; l'expression de calpaïne 1 et de calpastatine a été associée à une diminution de la survie spécifique en univariée ($p=0,001$ et $p=0,01$) et multivariée ($p=0,001$ et $p=0,016$) (Sarah J Storr et al. 2013).

Dans **le cancer du sein**, l'expression de calpaïne 1 et de calpastatine a été significativement associée au grade tumoral ainsi qu'à l'expression des récepteurs hormonaux (S J Storr et al. 2012). La surexpression de calpaïne 2 dans les cancers du sein basal-like ou triple-négatif est associée à une **diminution de la survie** ($p=0,003$ et $p<0,001$). De façon intéressante, les patientes présentant un cancer du sein basal-like ou triple-négatif avec une expression faible de calpaïne 2 avaient une survie spécifique comparable aux patientes avec un cancer du sein exprimant les récepteurs hormonaux (oestrogène, progestérone ou HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) (S J Storr et al. 2012).

Comme des données in vitro ont indiqué un rôle des calpaïnes dans la résistance au trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé ciblant HER2, l'étude d'expression de calpaïne

1, calpaïne 2 et calpastatine a été effectuée en immunohistochimie dans une cohorte prospective de 93 patientes atteints de cancers du sein HER positif traitée par chimiothérapie avec ou sans trastuzumab (Sarah J. Storr, Woolston, et al. 2011). La **résistance au trastuzumab** a été définie par une récurrence au cours du traitement. L'expression de calpaïne 1 a été associée à la survie sans progression en analyse univariée ($p=0,001$) et multivariée ($p=0,043$). Calpaïne 1 pourrait être un biomarqueur prédictif de la survie sans progression dans les cancers du sein HER2 sous trastuzumab (Sarah J. Storr, Woolston, et al. 2011).

Storr et al. a étudié l'expression de calpaïne 1, calpaïne 2 et calpastatine dans une cohorte de 154 patientes atteints de **cancers de l'ovaire** localement étendus opérées et traitées par chimiothérapie adjuvante à base de platine. Une surexpression de calpaïne 2 a été associée à la **chimiosensibilité aux sels de platine** ($p = 0,031$) ainsi qu'à une **augmentation** de la survie sans progression et **de la survie globale** ($p=0,049$) (Sarah J. Storr et al. 2012).

Dans le **cancer du pancréas**, la surexpression de calpaïne 2 a été associée à une **augmentation de la survie globale** en analyse univariée ($p=0,036$) et multivariée ($p=0,007$) (Sarah J Storr et al. 2012).

Toutefois, l'expression de la calpaïne n'est pas altérée dans les carcinomes épidermoïdes de la peau et les résultats dans le cancer de la prostate sont discordants (Sarah J. Storr, Carragher, et al. 2011).

Comme l'impact pronostique des calpaïnes varie selon le type de cancer, il se pourrait que les calpaïnes amènent à des effets tumoraux opposés. Ainsi, il a été montré dans un modèle murin de mélanome, que l'inhibition des calpaïnes est associée à un effet anti-tumoral par inhibition de la prolifération et pro-métastatique en favorisant la migration cellulaire (Raimbourg et al. 2013).

II. Objectifs de la thèse

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine dont les deux formes principales sont la calpaïne 1 ou μ , calpaïne activée par des concentrations micromolaires de calcium et la calpaïne 2 ou m , calpaïne activée par des concentrations millimolaires de calcium. D'un poids moléculaire de 78-80 kDa, elles sont ubiquitaires (Goll et al. 2003). Leurs inhibiteurs est la calpastatine (Goll et al. 2003).

Les calpaïnes intracellulaires interviennent i) dans la motilité cellulaire en modifiant la distribution des points d'ancrage du cytosquelette à la membrane plasmique, ii) dans l'activation des cellules inflammatoires par la voie de signalisation comme celle du facteur de transcription NF- κ B (Franco et Huttenlocher 2005)(Han et al. 1999)(Dourdin et al. 2001), iii) dans la réponse au VEGF et l'angiogenèse en favorisant la vascularisation tumorale (Su et al. 2006), iv) dans la prolifération cellulaire, même si ce rôle reste controversé (Mellgren, Shaw, et Mericle 1994)(Schollmeyer 1988)(Gonen et al. 1997). Ces différentes propriétés suggèrent que les calpaïnes intracellulaires puissent être un acteur important en cancérologie mais dont le rôle précis reste à définir. Dans le cancer de l'ovaire et du pancréas, leur expression accrue est associée à un bon pronostic, alors qu'elles sont décrites comme étant de mauvais pronostic dans le cancer bronchique, les cancers de l'estomac et de l'œsophage et le cancer du sein (S J Storr et al. 2012)(Sarah J Storr et al. 2013)(Sarah J Storr et al. 2012)(Sarah J. Storr, Carragher, et al. 2011)(Sarah J Storr et al. 2012)(Gu et al. 2015). L'impact pronostique des calpaïnes et leur effet au cours du cancer reste controversé. Ainsi, il a été montré dans un modèle murin de mélanome, que l'inhibition des calpaïnes était associée à la fois à un effet anti-tumoral par inhibition de la prolifération et à un effet pro tumoral en favorisant la migration cellulaire et la dissémination métastatique (Raimbourg et al. 2013).

Des recherches récentes ont montré que les calpaïnes peuvent s'extérioriser. Contrairement aux calpaïnes intracellulaires, les calpaïnes extracellulaires favorisent la résolution de l'inflammation et la réparation des tissus plutôt que le développement de la réaction inflammatoire. Elles augmentent l'expression de peptides anti-inflammatoires (en particulier TGF- α), diminuent l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17 et accélèrent la reconstitution des barrières épithéliale et endothéliale après dommage ischémique ou inflammatoire (Frangié et al. 2006)(Xu et Deng 2004). Leur rôle dans la réparation est expliqué par leur capacité à dégrader les protéines de la matrice extracellulaire, en particulier la fibronectine. Les calpaïnes extracellulaires favorisent ainsi la mobilité des cellules qui colonisent la zone lésée et la prolifération des cellules. Il n'existe aucune donnée sur les calpaïnes extracellulaires en cancérologie.

Comme l'inflammation et la prolifération sont des facteurs majeurs au cours de la carcinogenèse bronchique, l'objectif de ce travail est d'étudier le rôle des calpaïnes extracellulaires dans la progression tumorale des adénocarcinomes bronchiques de type lépidique (ADL).

L'ADL est une tumeur rare qui représente environ 5 % des CBNPC (Zell et al. 2005) et qui se définit par une prolifération adénocarcinomateuse développée à partir des cellules épithéliales de l'unité respiratoire terminale respectant l'architecture pulmonaire. Cette progression tumorale est essentiellement lépidique, mais aussi aérogène, expliquant les présentations radiologiques volontiers diffuses, pneumoniques ou multifocales. Le décès est plus souvent lié à une diffusion pulmonaire bilatérale de la tumeur qu'à la survenue de métastases extrathoraciques (Garfield et al. 2006).

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié :

Partiel 1 : le rôle des calpaïnes 1 extracellulaires dans le surnageants de lignées cellulaires tumorales et de LBA de patients atteints d'un ADL. Ces données étaient corrélées aux caractéristiques cliniques, biologiques et moléculaires des patients. L'analyse de calpaïne 1 intracellulaire était effectuée en immunohistochimie sur les prélèvements chirurgicaux afin de déterminer quelle était la source des calpaïnes sécrétées. Récemment le récepteur membranaire *toll like 2* (TLR2) a été identifié comme cible des calpaïnes extracellulaires dans les lymphocytes humains et murins (Perez et al. 2015). Nous avons étudié son expression par cytométrie de flux sur les lignées et mesuré la concentration de la forme soluble dans les surnageants de culture ou de LBA de patients atteints d'ADL. Ces données étaient corrélées aux caractéristiques cliniques, biologiques et moléculaires des patients.

Partie 2 : le rôle de versican, ligand de TLR2. Le TLR2 est un récepteur membranaire. Nous nous sommes intéressés à son ligand. Plusieurs ligands de TLR2 sont connus dont les principaux sont les lipopolysaccharides (bacille gram négatif), les lipoarabinomannanes (mycobactéries), diverses protéines dont le zymosan (levures) et le peptidoglycane (bacille gram positif)(Rakoff-Nahoum et Medzhitov 2009). Dans un modèle murin de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC), le versican était identifié comme ligand de TLR2 (Kim et al. 2009a). Versican est un protéoglycane de la matrice extracellulaire.

Versican est dosé dans le surnageant de LBA de patients atteints d'un ADL. Ces données étaient corrélées aux caractéristiques cliniques, biologiques et moléculaires des patients ainsi qu'aux concentrations de TLR2 solubles.

Partie 3 : l'expression de la calpaïne 1 dans un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire primitif muté pour *RAS*. Dans ce modèle, tous les animaux développent des lésions d'adénocarcinomes pulmonaires primitifs précédés d'hyperplasies alvéolaires atypiques et d'adénomes. Calpaïne 1 est étudié par ELISA dans le surnageant de LBA et le broyat du poumon. La forme soluble de TLR2 est étudié par ELISA dans le surnageant de LBA.

III. Matériel et Méthodes

1. Cohorte de Patients et Modèles utilisés

1.1 Cohorte de Patients

Entre Janvier 1992 et Juillet 2010, 92 patients atteints de ADL étaient diagnostiqués et suivis dans le service de pneumologie (Hôpital Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France). La maladie était classée selon la 7^{ième} version de la classification TNM pour le cancer bronchique (Goldstraw et al. 2007). Pour tous les patients, le diagnostic était évalué par un pathologiste spécialiste selon la classification ERS/ATS/IASLC (Travis et al. 2011). Les données de suivi étaient enregistrées jusqu'au décès du patient.

Un lavage bronchiolo-alvéolaire était utilisé comme procédure diagnostique ; il était réalisé comme précédemment décrit (Marie Wislez, Rabbe, et al. 2003). Après la procédure diagnostique, le LBA restant était centrifugé, et le surnageant séparé de manière aseptique et conservé à -80 ° C. Un échantillon congelé de surnageant de LBA était disponible chez 68 patients. Une exérèse chirurgicale était réalisée chez 33 (47%) patients. Un échantillon du prélèvement chirurgical inclus en paraffine était disponible chez 31 patients.

Les surnageants de LBA contrôles étaient obtenus à partir de six sujets subissant des procédures diagnostiques. Ils étaient quatre hommes et deux femmes âgés de 61 ± 7 ans. Trois étaient des fumeurs. Aucun des patients n'avait d'antécédent néoplasique ou pulmonaire parenchymateux. Les analyses cytologiques de leur LBA étaient strictement normales.

Tous les patients avaient signé un consentement éclairé d'approbation de recherche permettant des analyses de leurs échantillons biologiques. Tous les consentements éclairés étaient

collectés et stockés dans le Département de Pathologie Tenon (Tumorotheque des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Hôpital Tenon). Les caractéristiques cliniques de la cohorte sont résumées dans le tableau I.

Tableau I. : Caractéristiques démographiques des patients atteints d'ADL avec LBA disponibles

	Patients (n=68)
Age (années, moy±SEM)	65±1
Sexe	
Femme	30 (44%)
Hommes	38 (56%)
Statut Tabac	
Non Fumeur	17 (25%)
Fumeur ou Ex-Fumeur	51 (75%)
Bronchorrhée	15 (25%)
Crépitants	29 (48%)
PerformansStatus	
0	39 (59%)
>0	27 (41%)
Stade	
I-III	28 (41%)
IV	40 (59%)
Chirurgie	31 (46%)
Cancer bronchique lépidique	
Sous- type Mucineux	36 (59%)
Cytologie positive	29 (47%)
LBA formule	
Comptage cellulaire/mm3	593 709 ± 107 809
Macrophages (%±SEM)	60±3,5
Neutrophiles (%±SEM)	24±3,5
Lymphocytes (%±SEM)	14±1,8
Mutations (n=39)	
EGFR	3 (8%)
RAS	4 (11%)
ALK	0

1.2 Lignées cellulaires

Quatre lignées cellulaires d'adénocarcinomes bronchiques primitifs humains disponibles auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection Company, Etats-Unis) et deux lignées murines étaient utilisées. Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau II. Les statuts mutationnels pour *EGFR*, *K-ras* étaient réalisés au sein de la plateforme de biologie moléculaire de l'hôpital Tenon (Pr Lacave, Dr Antoine).

Tableau II : Statut mutationnel des lignées

humaines	Kras	EGFR
H322	Sauvage	Sauvage
A549	G12S	Sauvage
H1975	Sauvage	L858R et T790M
H1650	Sauvage	Del exon 19
murines		
LKR-10	G12S	Sauvage
LKR-13	G12S	Sauvage

Les cellules adhérentes étaient cultivées dans des flasques de 75 cm² contenant du milieu RPMI 1640 (Gibco, France) pour toutes les lignées à l'exception de la lignée A549 milieu DMEM 41966 (Gibco, France), supplémenté avec du SVF 10% (Biowest, France), de l'hepes 1M (Gibco, 10µl/ml) et un mélange de pénicilline-streptomycine (Gibco, 5µl/ml). Les cultures étaient réalisées à 37°C sous atmosphère humide contenant 95% d'air et 5% de CO₂. Le milieu de culture était renouvelé trois fois par semaine et les cellules étaient multipliées

après avoir été décollées à l'aide de trypsine en moyenne deux fois par semaine, lorsqu'elles avaient atteint la confluence.

1.3 Modèle murin

Un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire primitif muté pour KRAS (Kras^{LA1} sur fond génétique sv/129)(Johnson et al. 2001b) était utilisé. Dans ce modèle, un gène supplémentaire de KRAS ayant une mutation au niveau du codon 12 était inséré. L'allèle ayant les 2 gènes, sauvage et muté, est inactivé. Au cours du développement de l'animal, il existe une recombinaison homologue entre ces 2 gènes conduisant à l'élimination de l'un d'entre eux et à l'activation du gène restant. Les expériences étaient réalisées sur des souris sauvages ou Kras^{LA1}, âgées de 3, 5, 7 et 9 mois. Avant sacrifice, un lavage broncho-alvéolaire (LBA) était effectué en injectant par voie trachéale 1 ml de sérum physiologique, ensuite collecté par aspiration douce. Le poumon droit était congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C alors que le poumon gauche était inclus en paraffine.

Toutes les études sur les souris avaient été soumises et approuvées par le Comité institutionnel de protection des animaux et l'utilisation (Hôpital Tenon, AP- HP, Paris, France) et le Comité d'éthique Charles Darwin (Paris , France).

1.4 Isolement cellulaire

L'isolement des PNN était obtenu à partir du sang périphérique de sujets sains par centrifugation à gradient de densité (milieu de séparation de polynucléaires; Eurobio, Les Ulis, France). Les PNN étaient séparés des érythrocytes par un choc hypotonique et étaient

lavés trois fois dans une solution saline stérile. Cette méthode avait donné > 97% de PNN, tel qu'évaluée par une coloration MGG (Marie Wislez et al. 2007).

2. Techniques utilisées

2.1 Bioplex

Les concentrations de chimiokines, de cytokines et de facteurs de croissance dans les surnageants de LBA étaient quantifiées selon la technologie Bio-plex® System (laboratoire BIORAD®, Marne la Coquette) au sein de la plateforme de la société BIORAD® (Marne la Coquette). Le kit commercial 27-multiplex de cytokines humaines et 3 kits monocytokine (VCAM-1 humaine, GRO α et HGF) étaient utilisés.

2.2 ELISA

Les kits ELISA humains calpaïne 1 (SEB964Hu, Cloud-Clone Corp., USA), TLR2 (DTLR20, R & D, USA), versican (DL-VS-Hu, Wuxi Dongline Science, Chine), VEGF (DVE00, R & D, USA), CXCL10 (DIP100, R & D, USA), HGF (DHG00, R & D, USA) et murins calpaïne 1 (Cloud-clone corp, USA), TLR2s (Cusabio, USA), IL-17 (Quiagen, USA) étaient utilisés selon les données du fabricant dans le surnageant du LBA et des cellules en culture ainsi que dans le broyat de poumon de souris.

2.3 Immunohistochimie

Avant immunomarquage, les coupes en paraffine étaient déparaffinées par bains successifs de xylène et alcool puis traitées au citrate (0,3%, pH6) pendant 30 min. Pour les analyses immunohistochimiques, les échantillons étaient exposés pendant 1h30 à 37°C avec l'anticorps

primaire murin anti-calpaïne 1 humaine (sc-81171, Santa Cruz, USA) au 1/200^{ème} (Dako, USA), rabbit anti-calpain au 1/200^{ème} (Dako, USA) ou rabbit anti-ABCA1 au 1/800^{ème} (Abcam, USA) et lavés 3 fois 10 minutes dans le PBS 10X puis incubées pendant 1h30 à température ambiante avec l'anticorps secondaire polyclonal (histofine anti-goat, Bioscience), selon les recommandations du fabricant. La révélation du marquage était réalisée à l'aide d'un chromogène diaminobenzène pendant 5-15 minutes, suivie d'une contre coloration à l'hématoxyline.

2.4 CYTOMETRIE DE FLUX

Les cellules (PNN ou cellules épithéliales) à une concentration de 10⁶/ml étaient traitées pendant 1 heure à 37°C avec de la calpaïne 1 (4µg/ml) ou BSA, puis incubées pendant 1 h à 4 ° C avec l'anticorps murin APC-conjugué anti-TLR2 humain (R & D System) ou omission de l'anticorps primaire. Les données étaient recueillies sur un cytomètre de flux MACSQuant (MiltenylBiotec) et analysées avec le logiciel FlowJo (TreeStar).

2.5 Mesure *in vitro* de la prolifération cellulaire par marquage au BrdU

La mesure de la prolifération cellulaire par le BrdU était effectuée en utilisant le kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche applied science). Les cellules étaient mises en culture dans une boîte de 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits dans un volume de milieu de 200µl (numération cellulaire sur cellule de Malassez). Une modulation pharmacologique par la calpaïne (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml et 4 µg/ml) ou la calpastatine (20 µg/ml) était ensuite réalisée.

2.6 Mesure *in vitro* de l'activité calpaïne

L'activité calpaïne était mesurée par une technique spectrofluorimétrique analysant la libération d'AMC (Amino-Méthyl-Cumarine) à partir d'un substrat spécifiquement clivé par les calpaïnes. Après mise en culture des cellules dans des puits (boîtes 24 puits) à raison de 1,5 millions de cellules par puits, le surnageant était prélevé (mesure de l'activité calpaïne extracellulaire) et dilué dans du tampon KRH supplémenté en CaCl_2 4 mM. Les cellules étaient reprises dans 500 μl de tampon KRH (KCl 5mM, NaCl 155mM, KH_2PO_4 1mM, MgSO_4 1.2mM, Hepes 25mM, pH 7.4) supplémenté en CaCl_2 2 mM (mesure de l'activité calpaïne intracellulaire). Les cellules et le surnageant étaient ensuite exposés au substrat à 37°C (N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methyl-Coumarin, Sigma, USA) (50 μM) avec ou sans inhibiteur spécifique de l'activité calpaïne (N-acetyl-Leu-Leu-Nor-Leu-Al, Sigma, USA) (30 μM). Après une période d'incubation de 30 mn pour les cellules et 1h30 pour le surnageant, la fluorescence était analysée à une longueur d'onde de 360 nm d'excitation et 460 nm d'émission par un spectrofluoromètre FLX 800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). L'activité calpaïne était déterminée en calculant la différence entre la fluorescence mesurée avec et sans inhibiteur. Une modulation pharmacologique par D4F à 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, USA), agoniste d'ABCA1, et glibenclamide à 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, USA), antagoniste d'ABCA1, était aussi réalisée.

2.7 Statistiques

Les résultats des mesures de concentrations de cytokines étaient exprimés en médiane et Quartiles 25-75. Les médianes de survie étaient calculées en utilisant le modèle de Kaplan-Meier et comparées à l'aide du test de log-rank. Une analyse univariée était réalisée afin

d'identifier les variables associées à un risque de décès, puis une analyse multivariée pour les variables avec un $p < 0.1$ en utilisant le modèle de Cox. Des tests non paramétriques étaient utilisés pour l'analyse des concentrations de cytokines avec le test de Rho Spearman pour corréler les variables quantitatives et le test de Mann-Whitney pour comparer des variables quantitatives et qualitatives. Un $p < 0,05$ était considéré comme significatif. Le logiciel SPSS (SAS) était utilisé pour réaliser les calculs statistiques.

IV. Article 1 : Les calpaïnes 1 extracellulaires clivent

TLR2 et étaient des facteurs de mauvais pronostic chez les patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires de type lépidiques.

Résultats

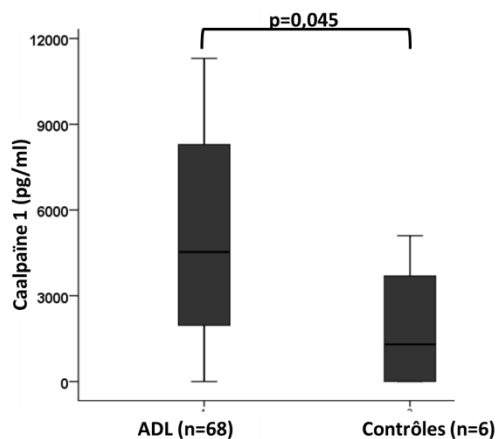
1. Calpaïnes 1 extracellulaires

1.1 Calpaïne 1 extracellulaire était plus élevée dans les surnageants de LBA des adénocarcinomes lépidiques

La concentration médiane de calpaïne 1, mesurée par ELISA, dans les surnageants de LBA d'ADL (n=68) était de 4029 pg/ml [Q25-75 : 1947-8327]. La concentration médiane de calpaïne 1 dans les surnageants de LBA des contrôles (n=6) était de 1299 pg/ [Q25-75 : 0 - 4044]. La concentration de calpaïne 1 était significativement plus élevée dans les surnageants de LBA d'ADL que de ceux des contrôles (p=0,025).

Les données cliniques étaient comparées en fonction de la concentration médiane de calpaïne (4029 pg/ml) dans le surnageant de LBA: groupe calpaïne 1 élevé correspond aux patients présentant une concentration de calpaïne au-dessus de la médiane et groupe calpaïne 1 bas aux patients présentant une concentration en dessous de la médiane.

Figure 1



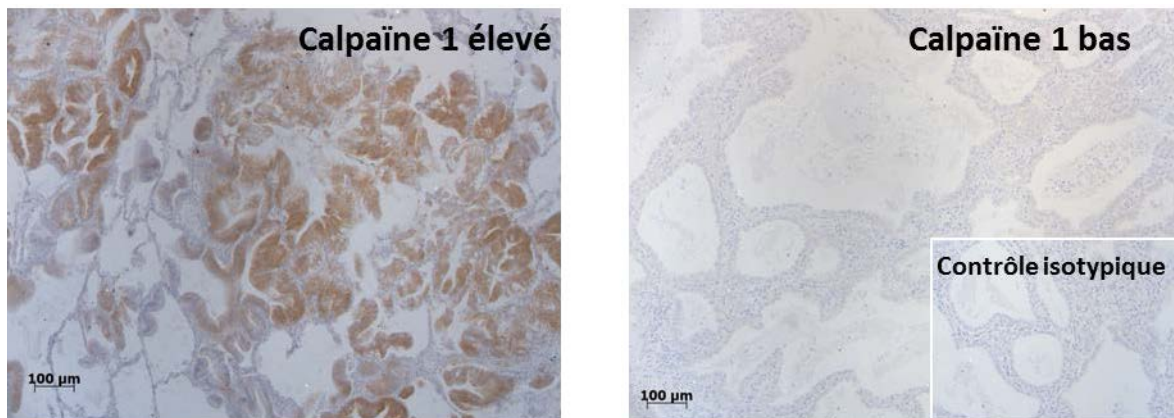
Concentration de calpaïne 1 dans les surnageants de LBA d'ADL et contrôles (Test de Mann Whitney). Trait, médiane; Colonne, Q25-Q75; Barres, min, max.

1.2 Source cellulaire des calpaïnes sécrétées : les cellules tumorales

Afin d'étudier la source des calpaïnes 1 sécrétées dans le surnageant des LBA, une analyse de l'expression de la calpaïne 1 en immunohistochimie était effectuée sur 6 prélèvements chirurgicaux d'ADL.

L'analyse en immunohistochimie de la calpaïne 1 intracellulaire montrait une expression hétérogène au niveau des cellules tumorales avec un score H variant de 0 à 270. L'expression était cytoplasmique avec présence d'un renforcement membranaire. Il n'existait pas d'expression nucléaire. L'infiltrat inflammatoire, composé de macrophages ou de lymphocytes n'exprimaient pas la calpaïne 1. Seules, les cellules endothéliales et bronchiques exprimaient au niveau cytoplasmique la calpaïne 1. Aucune corrélation avec la concentration de calpaïne 1 extracellulaire dans le LBA n'était retrouvée. La calpaïne 1 était donc sécrétée par les cellules tumorales.

Figure 2



IHC calpaïne 1 : Expression tumorale élevée à gauche, expression tumorale basse à droite, contrôle isotypique

1.3 Calpaïnes 1 extracellulaires: facteur de mauvais pronostic sur la survie des adénocarcinomes lépidiques

1.3.1 Calpaïne 1 associée à la progression tumorale

Une concentration élevée de calpaïne 1 était significativement associée à un stade métastatique (**Tableau III**). Ainsi, 76,5% (26/34) des patients du groupe calpaïne élevé présentaient un stade métastatique *versus* 23,5% (8/34) du groupe calpaïne bas ($p=0,003$). Il y avait plus de patients avec crépitations dans le groupe calpaïne 1 élevé que dans le groupe calpaïne 1 bas (73% *versus* 23% ; $p=0,001$).

Il n'existait pas de différence significative selon le sexe, le statut tabagique, l'âge ou le Performans Status dans les deux groupes.

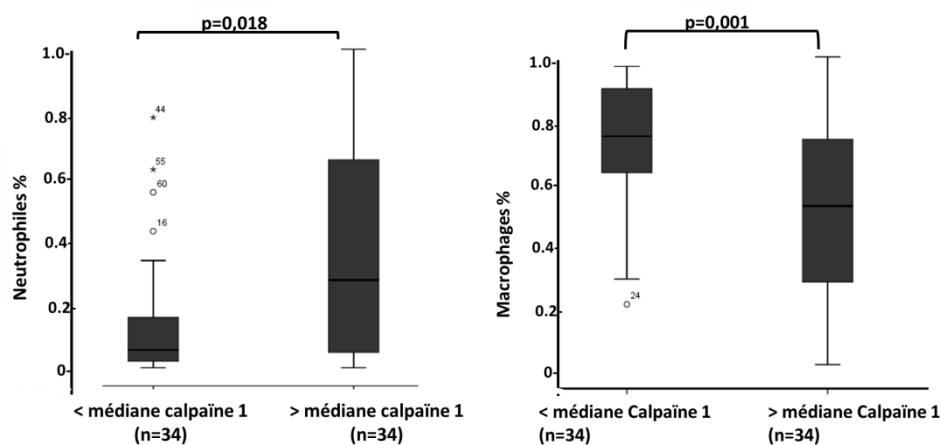
Tableau III : Caractéristiques des patients atteints d'ADL selon la concentration de calpaïne 1 dans le surnageant de LBA

	< médiane Calpaïne 1 (n=34)	≥ médiane Calpaïne 1 (n=34)	P
Age (années, moy±SEM)	65,6±2,4	65,8 ±2,8	NS
Sexe			
Femme	16 (47%)	14 (59%)	NS
Homme	18 (53%)	20 (41%)	
Statut tabac			
Non Fumeur	10 (29%)	7 (21%)	NS
Fumeur ou Ex-fumeur	24 (71%)	27 (79%)	
Bronchorrhée	6 (19%)	9 (30%)	NS
Crépitants	7 (23%)	22 (73%)	<0,001
Performans Status			
0	22 (69%)	17 (50%)	NS
≥1	10 (30%)	17 (50%)	
Lésions bilatérales	15 (44%)	22 (64%)	NS
Stade			
I-III	20(59%)	8 (23,5%)	0,003
IV	14 (41%)	26 (76,5%)	
Chirurgie	20 (59%)	11 (32%)	0,025
Histologie			
ADL de sous-type mucineux	16 (48%)	20 (71%)	NS
Cytologie positive	12 (39%)	17 (55%)	NS
LBA (médiane+/-SEM)			
cellules/mm3	505 000 ±165 180	587 931 ±96 745	0,01
Macrophages (%)	72±3.5	48±5.2	<0,001
Neutrophiles (%)	14±3.4	32±6.0	0,018
Lymphocytes (%)	12±1.7	17±3.4	NS
Mutations (n=30)			
EGFR	2 (10.5%)	1 (6%)	NS
RAS	3 (16%)	1 (6%)	NS

1.3.2 Calpaïne 1 extracellulaire élevée associée à un fort taux de polynucléaires neutrophiles dans le LBA

Dans le groupe calpaïne 1 élevé, 32 % de PNN étaient présents *versus* 14 % dans le groupe calpaïne 1 bas ($p=0,018$) dans le liquide de LBA. Par ailleurs, le taux de macrophages évoluait en miroir avec un taux plus élevé dans les prélèvements présentant une concentration de calpaïne 1 basse ($p=0,001$).

Figure 3



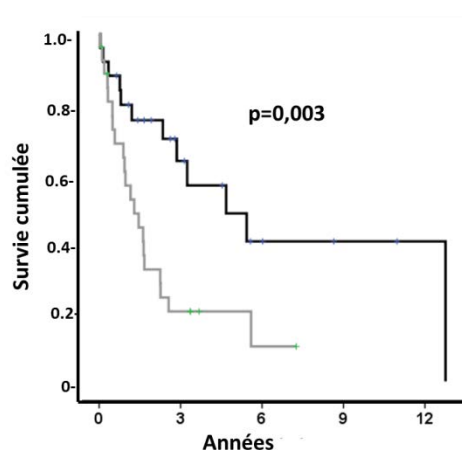
Valeur relative des neutrophiles (%) et des macrophages (%) dans le LBA des patients atteints ADL en fonction de la concentration de Calpaïne 1 < ou . médiane (Test de Mann Whitney). Trait, médiane; Colonne, Q25-Q75; Barres, min, max.

Aucune différence n'était retrouvée entre les deux groupes selon le caractère mucineux, la présence d'une cytologie tumorale positive dans le LBA ou le statut mutationnel *KRAS* et *EGFR*.

1.3.3 Calpaïne 1 extracellulaire élevée, un facteur de mauvais pronostic sur la survie

La survie était significativement plus courte dans le groupe calpaïne 1 élevé (1,3 ans ; Q25-75 : 0,5 à 3,2 ans) que le groupe calpaïne 1 bas (3,2 ans ; Q25-75 : 0,8 à 12,7 ans)($p=0,002$).

Figure 4:



Courbe de survie cumulée selon Kaplan Meier des patients présentant dans le surnageant du LBA une concentration de calpaïne 1 > médiane (—) vs < médiane (---) (log rank test)

L'analyse multivariée incluait toutes les variables avec un $p < 0.1$ en analyse univariée : le stade métastatique ($p < 0,001$), le Performans Status ($p = 0,003$), le taux de PNN ($p = 0,003$), le sexe ($p = 0,07$) et le taux de calpaïne 1 ($p = 0,002$). En analyse multivariée, uniquement le stade métastatique ($p < 0,001$) et le sexe masculin ($p = 0,001$) étaient associés à une diminution significative de la survie.

Tableau IV. Analyses uni et multivariées des facteurs associés à la survie

Variable	Nombre patients	Hazard ratio (95%CI) Univariée	p-value	Hazard ratio (95%CI) Multivariée	p-value
<i>Calpaïne 1</i>					
≥médiane	34	0,398 (0,212-0,749)	0,003	0,712 (0,345-1,472)	0,360
<médiane	34	1			
<i>Sexe</i>					
Hommes	38	0,555 (0,297-1,036)	0,061	2,197 (1,106-4,367)	0,025
Femmes	30				
<i>Age</i>	68	1,019 (0,989-1,048)	0,2		
<i>Statut Tabac</i>					
Fumeur	51	0,860 (0,440-1,681)	0,6		
Non Fumeur	17				
<i>Performance Status</i>					
>0	27	0,393 (0,209-0,738)	0,004	0,860 (0,384-1,951)	0,782
0	41				
<i>Stade</i>					
IV	40	0,286 (0,145-0,561)	<0,001	0,207 (0,097-0,442)	<0,001
I-III	28				
<i>Neutrophiles médiane</i>	63	5,328 (1,758-156,144)	0,003	2,133 (0,653-6,974)	0,210

Variables avec un $p < 0,1$ en analyse univariée incluses dans l'analyse multivariée par la méthode de vraisemblance descendant, CI=95% intervalle de confiance

2 Mécanismes d'action des calpaïnes 1 extracellulaires pouvant expliquer le pronostic

2.1 Récepteur membranaire TLR2, cible des calpaïnes 1 extracellulaires

Le récepteur membranaire TLR2 (*toll like receptor 2*) a été identifié comme cible des calpaïnes extracellulaires sur les lymphocytes humains et murins (Perez et al. 2015). Une fois extériorisées, les calpaïnes clivent le domaine extracellulaire de TLR2, donnant naissance à une forme soluble de ce récepteur (TLR2s). Dans notre modèle d'ADL, le pronostic est déterminé par les PNN et les cellules tumorales (Marie Wislez, Rabbe, et al. 2003)(Bellocq et al. 1998a). Comme, il existait une association positive entre PNN et calpaïne élevée, l'hypothèse était que la calpaïne clivait TLR2 sur les PNN et/ou cellules tumorales.

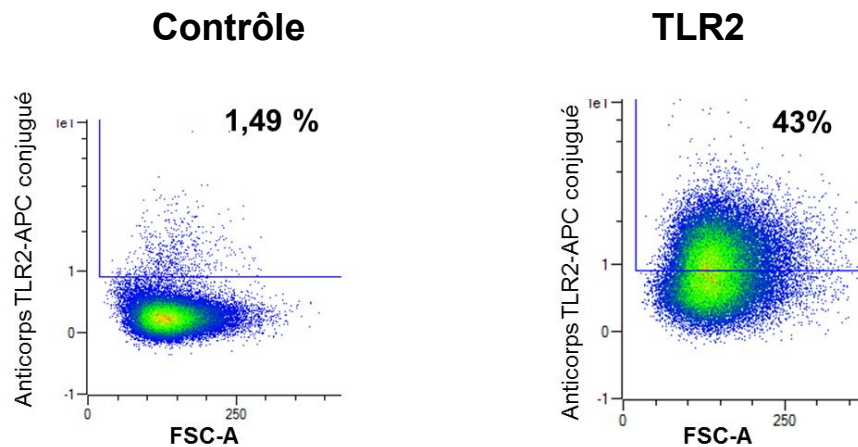
L'expression de la cible des calpaïnes 1 extracellulaires -TLR2 membranaire - était étudiée sur ces deux types cellulaires.

2.1. Récepteur membranaire TLR2 exprimé sur les polynucléaires neutrophiles et sur les cellules tumorales

a) PNN

L'expression de TLR2 membranaire était étudiée par analyse en cytométrie de flux sur les PNN isolés de volontaires sains. Nous avons constaté que 43% à 74% des PNN avaient une expression membranaire de TLR2 ($n=3$ expériences).

Figure 5

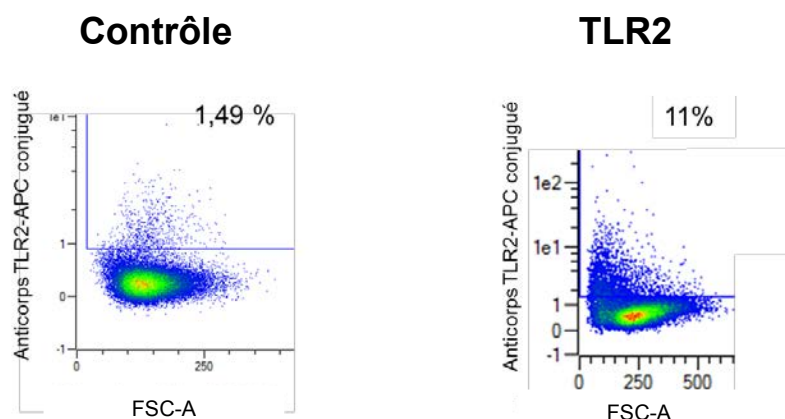


Analyse en cytométrie de flux en utilisant un anticorps anti-TLR2 conjugué APC sur les PNN. A. analyse avec omission de l'anticorps primaire B. analyse avec anticorps anti-TLR2 conjugué APC Cette figure illustre les résultats de 3 expériences différentes

b) Lignées tumorales

L'expression de TLR2 membranaire était étudiée par analyse en cytométrie de flux sur les cellules épithéliales issues de lignées de cancers broncho-pulmonaires. Nous avons constaté que 11% à 24% des cellules de la lignée A549, 16 % à 37% des cellules de la lignée H322, 18% à 43% des cellules de la lignée H1650 et 48% à 87% des cellules de la lignée H441 avaient une expression membranaire de TLR2 ($n=3$ expériences).

Figure 6



Analyse en cytométrie de flux en utilisant un anticorps anti-TLR2 conjugué APC sur les cellules issues de lignées de cancers bronchiques (A549). Panel gauche : analyse avec omission de l'anticorps primaire. Panel droit analyse avec anticorps anti-TLR2 conjugué APC. Cette figure illustre les résultats de 3 expériences différentes.

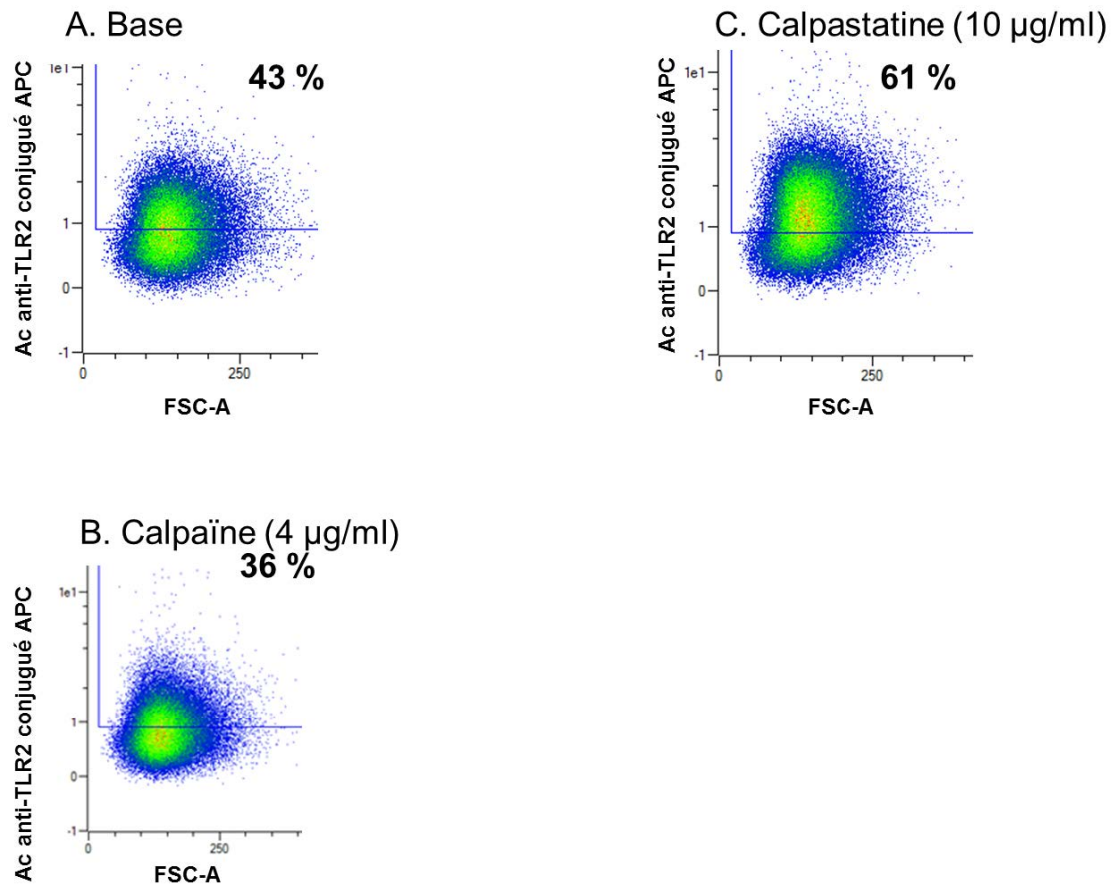
2.2 Le récepteur membranaire TLR2 était clivé par la calpaïne 1 extracellulaire

Le TLR2 membranaire était exprimé sur les PNN et les cellules tumorales. La calpaïne 1 extracellulaire était-elle capable de cliver TLR2 membranaire sur ces types cellulaires ?

a) PNN

L'analyse par cytométrie de flux de l'expression de TLR2 sur les polynucléaires neutrophiles traités pendant 1 heure par calpaïne 1 (4µg/ml) ou BSA (contrôle) montrait une réduction de l'expression membranaire de TLR2. Cette réduction était comprise entre 16% à 38% ($n=3$) par rapport à l'expression basale. Après traitement des PNN par calpastatine (10 µg/ml), inhibiteur de calpaïne 1, il existait une augmentation de l'expression de TLR2 membranaire de 42% par rapport à l'expression basale.

Figure 7

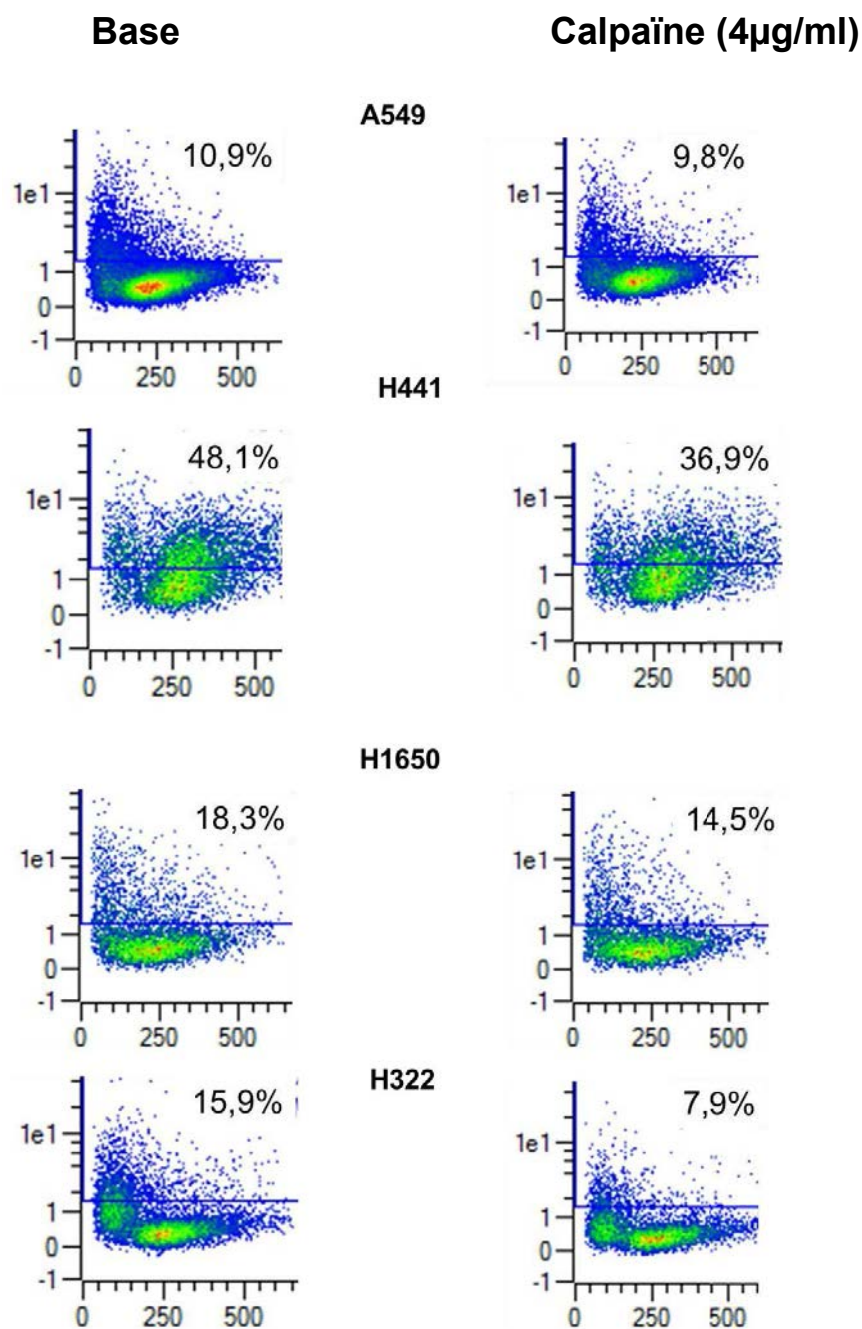


Analyse en cytométrie de flux en utilisant un anticorps anti-TLR2 conjugué APC sur les PNN. A. condition de base. B. calpaïne (4 µg/ml) C. calpastatine (10 µg/ml)

b) Lignées tumorales

L'analyse par cytométrie de flux de l'expression de TLR2 sur les cellules issues de lignées tumorales traitées pendant 1 heure par calpaïne 1 (4µg/ml) ou BSA (contrôle) montrait une réduction de l'expression membranaire de TLR2. Cette réduction était comprise entre 9% à 18% sur la lignée A549, de 13% à 15% sur la lignée H441, de 16% à 32% sur la lignée H1650 et de 10% à 43% sur la lignée H322 par rapport à l'expression basale ($n=3$).

Figure 8



Lignées épithéliales tumorales : analyse en cytométrie de flux en utilisant un anticorps anti-TLR2 conjugué APC sur les cellules issues de lignées de cancers bronchiques. Panel gauche : analyse avec omission de l'anticorps primaire. Panel droit analyse avec anticorps anti-TLR2 conjugué APC. Cette figure illustre les résultats de 3 expériences différentes.

L'étude de l'expression de TLR2 après traitement par calpastatine (10 µg/ml), inhibiteur de calpaïne 1, est en cours.

2.3 Détection du TLR2 soluble dans les surnageants de culture de PNN et de cellules tumorales

a) PNN

Après traitement par calpaïne 1 (4 µg/ml) ou contrôle, les surnageants de culture des PNN étaient récupérés à H1 et à H24. L'analyse par ELISA permettait de détecter le fragment soluble du TLR2 dans le surnageant de culture des PNN à H24 sans différence significative entre les PNN traités ou non par calpaïne 1 (Moyenne 85 834pg/ml vs. 91 356 pg/ml, respectivement, $n=3$ expériences). Il n'y avait pas de détection du fragment soluble du TLR2 à H1.

b) Lignées tumorales

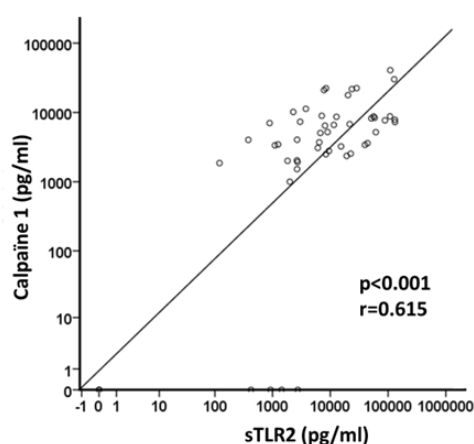
Après traitement par calpaïne 1 (4 µg/ml) ou contrôle, les surnageants de culture des lignées cellulaires étaient récupérés à H1. L'analyse par ELISA du fragment soluble du TLR2 ne permettait pas de le détecter dans le surnageant de culture à H1. L'analyse à H24 est en cours.

2.4 Corrélation de la concentration de TLR2 soluble à celle des calpaïnes extracellulaires 1 dans les surnageants du LBA

Le TLR2 membranaire, exprimé sur les PNN et les cellules tumorales, était clivé par la calpaïne 1 extracellulaire. Le fragment soluble de TLR2 était-il corrélé à la concentration des calpaïnes 1 dans le surnageant de LBA d'ADL ?

La concentration du fragment soluble du récepteur TLR2 était fortement corrélée à la concentration des calpaïnes 1 extracellulaires dans les surnageants de LBA des patients atteints d'ADL ($r=0,615$, $p<0,001$).

Figure 9 :



Corrélation entre la concentration de calpaïne 1 (pg/ml) et TLR2 soluble (pg/ml) dans les surnageants de LBA (test de Rho Spearman)

3. Le fragment soluble de TLR 2 était associé au pronostic des patients atteints d'ADL

La concentration élevée de calpaïne 1 extracellulaire était associée à un pronostic défavorable.

Le TLR2 membranaire était la cible des calpaïnes extracellulaires. Est-ce que le fragment soluble de TLR2 était associé au pronostic ?

3.1 La concentration de fragment soluble de TLR2 dans les surnageants de LBA était associée à la progression tumorale

Les données cliniques étaient comparées en fonction de la concentration médiane de TLR2s (8093 pg/ml) dans les surnageants de LBA d'ADL: groupe TLR2s élevé correspond aux patients présentant une concentration de TLR2s au-dessus de la médiane et groupe TLR2s bas aux patients présentant une concentration en dessous de la médiane (**Tableau V**).

Une concentration élevée de TLR2s était significativement associée à un stade métastatique (**Tableau V**). Ainsi, 79% (27/34) des patients du groupe TLR2s élevé présentaient un stade métastatique contre 35% (12/34) du groupe TLR2s bas ($p=0,034$). Il y avait plus de patients avec crépitants dans le groupe TLR2s élevé comparé au groupe TLR2s bas (80%, 20/34 vs 20%, 8/34; $p=0,001$), plus de patients avec bronchorrhée (41%, 14/34 vs 6%, 2/34 ; $p=0,001$) et plus de formes bilatérales (70%, 24/34 vs 30%, 12/34 ; $p=0,004$). Moins de patients étaient opérés dans le groupe TLR2s élevé que le groupe TLR2s bas (26%, 9/34 vs 65%, 22/34 ; $p=0,002$)

Il n'existait pas de différence significative selon le sexe, le statut tabagique, l'âge ou le Performans Status selon la concentration de TLR2s..

Tableau V : Caractéristiques des patients atteints d'ADL selon la concentration de TLR2 soluble

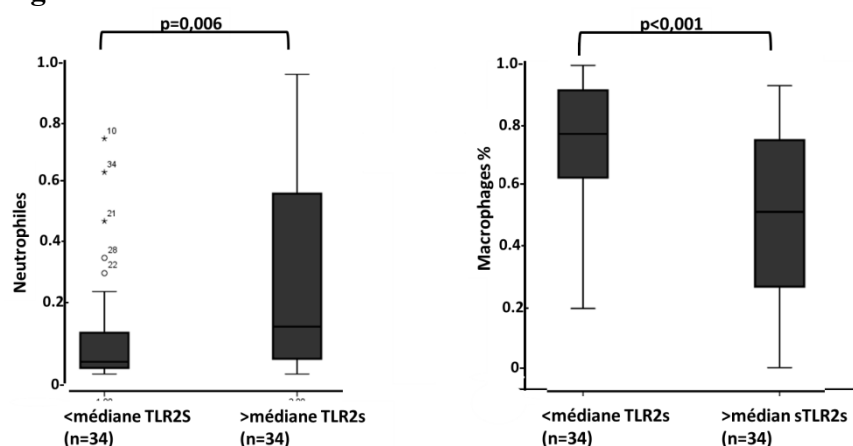
	< median TLR2s (n=34)	≥ median TLR2s (n=34)	p
Age (années, moy±SEM)	64.3±2.3	67.6±1.8	NS
Sexe			
Femme	22 (65%)	16 (47%)	NS
Homme	12 (35%)	18 (53%)	
Statut tabac			
Non Fumeur	7 (21%)	10 (29%)	NS
Fumeur ou Ex-fumeur	27 (79%)	24 (71%)	
Bronchorrhée	2 (6%)	14 (41%)	0,001
Crépitants	8 (27%)	20 (67%)	0,002
Performans Status			
0	20 (61%)	20 (61%)	NS
≥1	13(39%)	13 (39%)	
Lésions bilatérales	12 (35%)	24 (70%)	0,004
Stade			
I-III	22(65%)	7 (21%)	<0,001
IV	12 (35%)	27 (79%)	
Chirurgie	22 (65%)	9 (26.5%)	0,002
Histologie			
Sous-type mucineux	15 (50%)	21 (68%)	NS
Cytologie positive	10 (30%)	18 (62%)	0,012
LBA (médiane+/-SEM)			
cellules/mm3	230 000	350 000	NS
Macrophages (%)	77±21	52±27	<0,001
Neutrophiles (%)	4±20	15.5±31	0,006
Lymphocytes (%)	11±10	11±18	NS
Mutations (n=30)			
EGFR	2 (9%)	1(6%)	NS
RAS	5 (23%)	0 (0%)	0,041

NS, non significatif

3.2 Une concentration élevée de TLR 2 soluble était associée aux taux de polynucléaires neutrophiles

Dans le groupe TLR2s élevé, 15,5% de PNN étaient détectés *versus* 4 % dans le groupe TLR2 bas ($p=0,006$). Par ailleurs, le taux de macrophages évoluait en miroir avec un taux plus élevé dans les prélèvements présentant une concentration de calpaïne 1 basse ($p<0,001$).

Figure 10 :



Valeur relative des neutrophiles (%) et des macrophages (%) dans le LBA des patients atteints ADL en fonction de la concentration de TLR2s < ou ≥ médiane (Test de Mann Whitney). Trait, médiane; Colonne, Q25-Q75; Barres, min, max.

3.3 La concentration élevée de TLR 2 était associée à une cytologie tumorale positive

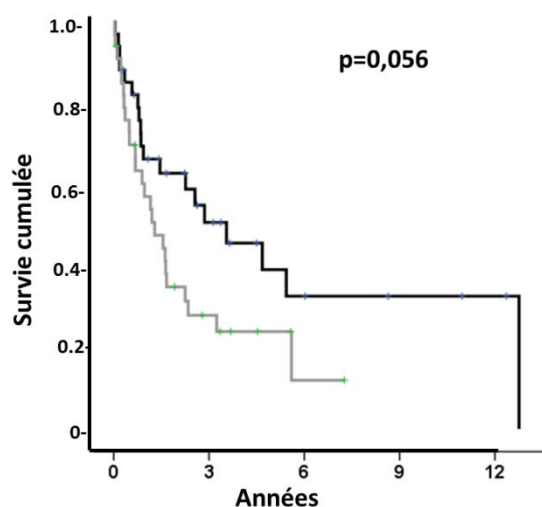
Dans le groupe TLR2s élevé, 62% (18/34) des patients avaient une cytologie tumorale positive dans le LBA contre 30 % (10/34) dans le groupe TLR2 bas ($p=0,006$).

Il n'existait pas de différence d'expression du caractère mucineux en fonction de la concentration de TLR2s.

3.4 La concentration élevée de TLR2 soluble avait tendance à être un facteur de mauvais pronostic

La survie avait tendance à être plus courte dans le groupe TLR2s élevé (1,2 ans ; Q25-75 : 0,5 à 3,2 ans) que le groupe TLR2s bas (3,5 ans ; Q25-75 : 0,8 à 12,7ans) ($p=0,056$).

Figure 11 :



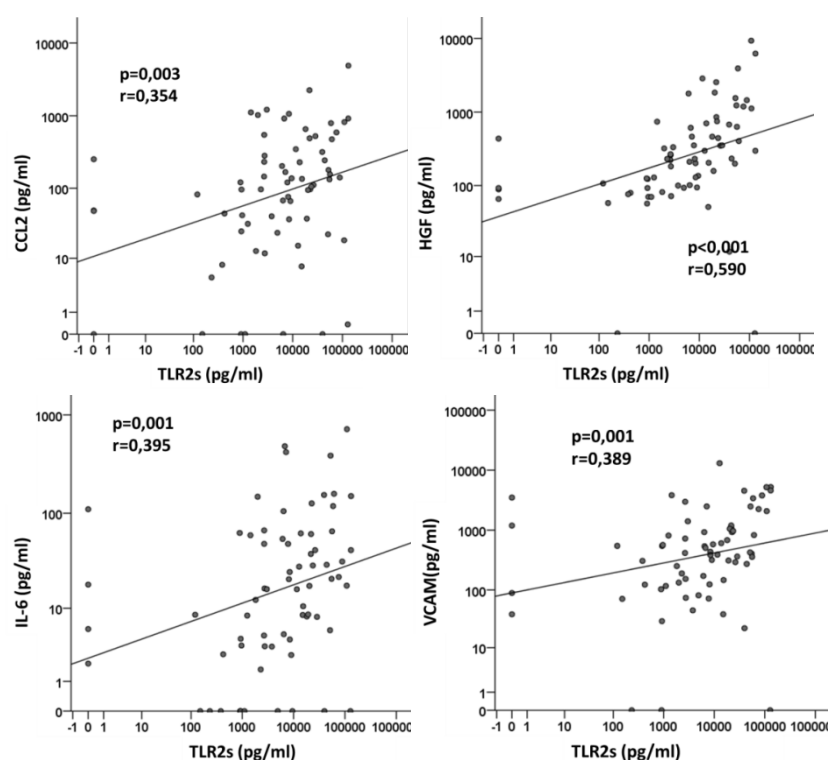
Courbe de survie selon Kaplan Meier des patients présentant un taux de TLR2s > médiane (---) vs < médiane (—) (log rank test)

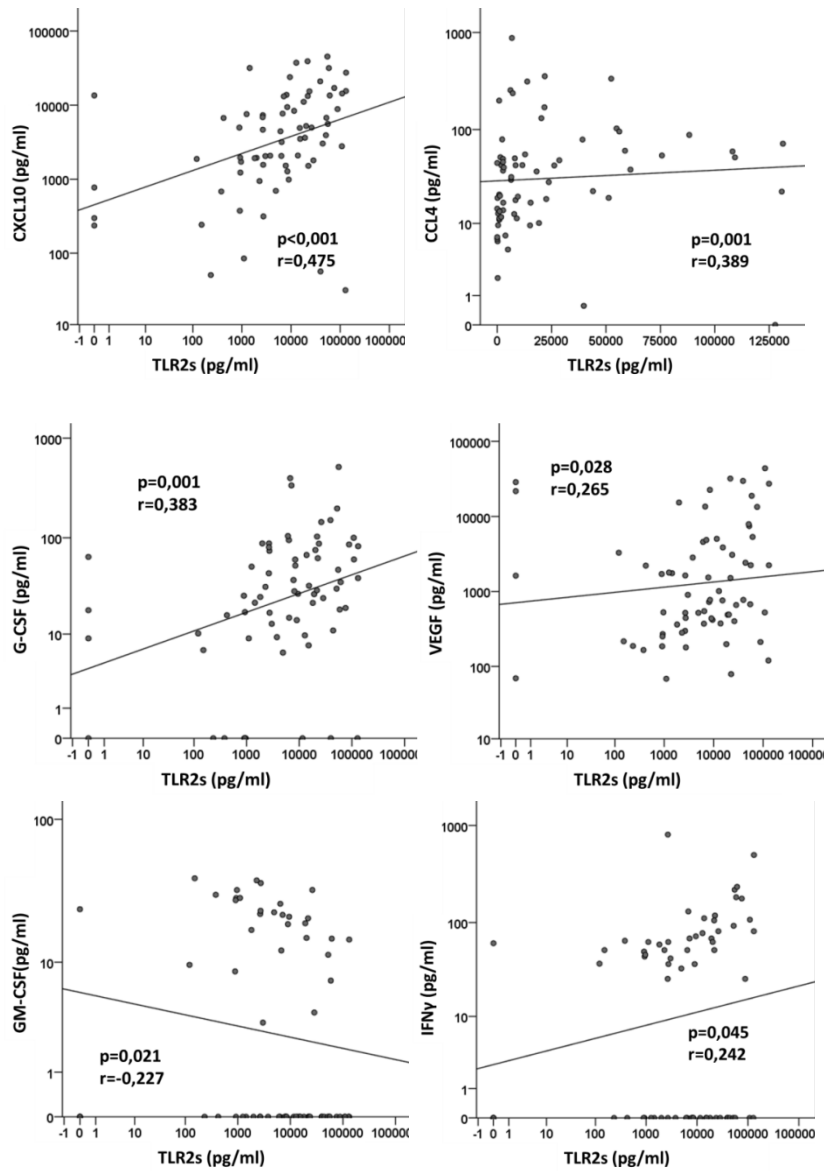
En incluant toutes les variables avec un $p < 0.1$ en analyse univariée, dans l'analyse de survie multivariée, uniquement le stade métastatique ($p < 0,001$) et le sexe masculin (0,001) étaient associés à une diminution significative de la survie.

3.5 La concentration de TLR2 soluble était significativement associée à un environnement proinflammatoire

Parmi les cytokines analysées, les concentrations d'HGF, CXCL10, IL-6, VCAM, CCL4, G-CSF, CCL2, GM-CSF, VEGF et IFN- γ étaient significativement corrélées à la concentration de TLR2s. Toutes ces cytokines, à l'exception de GM-CSF, présentaient une concentration élevée en cas de concentration de TLR2 soluble élevée. Seules les cytokines CXCL 8, CCL5 et CXCL1 n'étaient pas corrélées à TLR2s (données non montrées).

Figure 12





Corrélation entre la concentration de TLR2s (pg/ml) et celles d' HGF, CXCL10, IL-6, VCAM, CCL4, G-CSF, CCL2, GM-CSF, VEGF et IFN γ dans les surnageants de LBA (test de Rho Spearman).

Discussion

Les calpaïnes dans le cancer bronchopulmonaire

Peu de données sont disponibles sur les calpaïnes extracellulaires. Contrairement aux calpaïnes intracellulaires, les calpaïnes extracellulaires sont associées à la résolution de l'inflammation et à la réparation des tissus (Frangié et al. 2006)(Xu et Deng 2004)(Perez et al. 2015). Cependant chez les patients atteints d'un ADL, la concentration de calpaïne 1 extracellulaire était associée de façon significative à la dissémination métastatique, à une inflammation alvéolaire et à un pronostic défavorable. Ces données sont les premières à identifier un rôle aux calpaïnes extracellulaires en cancérologie.

L'analyse en immunohistochimie des prélèvements chirurgicaux d'ADL a identifié les cellules tumorales comme source des calpaïnes 1 sécrétées. L'étude de l'expression de calpaïne 1 intracellulaire en immunohistochimie selon les caractéristiques cliniques, anatomopathologiques et le pronostic est en cours. L'impact pronostique de l'expression des calpaïnes a été étudié sur différents types de cancer. Dans le cancer de l'ovaire et du pancréas, leur expression accrue est associée à un bon pronostic, alors qu'elles sont décrites comme étant de mauvais pronostic dans le cancer bronchique, les cancers de l'estomac et de l'œsophage et le cancer du sein (S J Storr et al. 2012)(Sarah J Storr et al. 2013)(Sarah J Storr et al. 2012)(Sarah J. Storr, Carragher, et al. 2011)(Sarah J Storr et al. 2012)(Gu et al. 2015).

Ainsi chez 208 patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, la surexpression mesurée par méthode immunohistochimique de la petite unité de calpaïne 1 (également appelé calpaïne 4) a été corrélée à l'extension ganglionnaire, à la taille tumorale et

à une diminution de la survie globale (Gu et al. 2015). Il n'existait pas de données concernant la calpaïne 1 dans le cancer bronchique.

Le transporteur membranaire ABCA1, un transporteur impliqué dans le mécanisme d'extériorisation des calpaïnes dans l'ADL ?

Le mécanisme d'extériorisation des calpaïnes dans l'ADL reste à déterminer. Cette extériorisation ne serait pas liée à la mort cellulaire, l'apoptose ou la nécrose. Elle pourrait impliquer soit la formation de microparticules (Zafrani et al. 2012), soit le passage à travers la membrane plasmique en empruntant des canaux spécialisés, comme le transporteur membranaire ABCA1 (Perez et al. 2015). Les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) sont une famille de protéines transmembranaires qui transportent une grande variété de substrats dont les lipides et le surfactant à travers les membranes biologiques (van der Deen et al. 2005). Trois transporteurs ABC sont connus pour jouer un rôle pathologique important dans le poumon : les mutations du gène *CFTR* sont impliquées dans le développement de la mucoviscidose, les mutations du gène *ABCA1* dans le développement de la maladie de Tangier et les mutations du gène *ABCA3* dans un déficit fatal en surfactant (van der Deen et al. 2005). ABCA1 est exprimé dans le poumon et a montré un rôle dans la sécrétion des calpaïnes par les lymphocytes (Perez et al. 2015). Il est prévu d'étudier l'expression ABCA1 en immunohistochimie sur les prélèvements chirurgicaux de la cohorte d'ADL et de vérifier si l'expression d'ABCA1 explique la sécrétion de la calpaïne.

TLR2 membranaire clivé par la calpaïne 1 extracellulaire, mécanisme impliqué dans la progression tumorale ?

Comme la concentration de calpaïne 1 extracellulaire dans le surnageant de LBA est un facteur de mauvais pronostic, nous nous sommes intéressés au mécanisme responsable de la progression tumorale. Récemment l'équipe du Pr Baud a identifié dans les lymphocytes humains et murins, le récepteur TLR2 comme cible des calpaïnes extracellulaires (Perez et al. 2015). Une fois extériorisées, les calpaïnes clivent le domaine extracellulaire de TLR2 et donnant naissance à la forme soluble de ce récepteur (sTLR2) (Perez et al. 2015). L'hypothèse est que l'effet pronostic des calpaïnes 1 extracellulaires soit médié par le clivage du récepteur membranaire TLR2 sur les neutrophiles et/ou cellules tumorales, libérant des cytokines pro-inflammatoires, responsables de la progression tumorale des ADL. Deux arguments soutiennent cette hypothèse.

1/ Les calpaïnes extracellulaires clivent TLR2. D'abord, l'analyse par cytométrie de flux a montré que les polynucléaires neutrophiles et les cellules tumorales de cancer bronchique expriment le récepteur membranaire TLR2. Le traitement des polynucléaires neutrophiles et des cellules tumorales par calpaïne 1 aboutit à une réduction de l'expression membranaire de TLR2. Le traitement par calpastatine, inhibiteur de calpaïne, aboutit à une augmentation de l'expression de TLR2.

2/ TLR2s et cytokines pro-inflammatoires. L'analyse de la fraction soluble de TLR2 par ELISA est fortement corrélée à la concentration des calpaïnes 1 extracellulaires dans le surnageant du LBA. Comme pour les calpaïnes 1 extracellulaires, une concentration élevée de TLR2s est significativement corrélée à la présence d'une inflammation à neutrophiles et au stade tumoral métastatique. TLR2s est significativement corrélée à des cytokines pro-inflammatoires dont HGF, CCL 4, CXCL10, IL 6, G-CSF, GM-CSF, CCL2, IFN γ , VEGF et

VCAM-1. Toutes ces cytokines, à l'exception de GM-CSF, sont positivement corrélées à TLR2s.

TLR2 et progression tumorale

L'effet pro-tumoral pourrait être lié soit à l'activation de voies de signalisation en aval de TLR2 membranaire, soit à une activité propre de la forme soluble. L'activation des TLR peut être régulée par des molécules cytoplasmiques, tels que MyD88s, IRAK-M, TOLLIP et par la voie PI3K / Akt (Liew et al. 2005). En outre, il existe une fonction de régulation négative décrite pour les formes solubles de TLR2 humain (LeBouder et al. 2003). TLR2 soluble est présent de façon physiologique dans le lait maternel, le plasma, le liquide amniotique et la salive. La diminution de TLR2 soluble dans le sérum entraînerait une réponse cellulaire accrue aux lipopeptides bactériens (LeBouder et al. 2003)(Dulay et al. 2009)(Henrick et al. 2014). Le TLR2 soluble a également été mis en évidence dans et le lait maternel des patientes VIH et aurait un rôle protecteur vis à vis de l'inflammation induite par le VIH ainsi que de la transmission de l'infection au nourrisson (Henrick et al. 2014). Cependant au cours de l'ADL, la présence de la forme soluble de TLR2 était associée aux cytokines pro-inflammatoires et à la progression tumorale. Le mécanisme d'action de calpaïnes sur TLR2 et celui de la forme soluble reste à étudier.

Des données récentes sur un modèle murin suggèrent que TLR2 joue un rôle clé dans la progression tumorale du cancer bronchique (Kim et Karin 2011)(Kim et al. 2009a). La progression métastatique dépend à la fois des altérations génétiques intrinsèques des cellules cancéreuses mais aussi du microenvironnement inflammatoire des tumeurs. Dans un modèle murin de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC), les macrophages activés par l'hétérodimère

TLR2/TLR6 favorisaient la production d'interleukine-6 et de TNF- α . TNF- α et TLR2 étaient nécessaires pour la progression métastatique dans ce modèle (Kim et al. 2009a). Le versican, protéoglycane de la matrice extracellulaire, a été identifié comme ligand de TLR2 et est sécrété par les cellules tumorales. Ainsi, versican active les macrophages par l'intermédiaire de TLR2 et son co-récepteur TLR6. Le complexe TLR2/TLR6 induit la sécrétion de TNF- α par les cellules myéloïdes et favorise la progression tumorale (Kim et al. 2009a)(Kim et Karin 2011). Ces résultats indiquent que TLR2 était protumoral dans ce modèle. Les cellules cancéreuses utilisaient le système immunitaire inné pour générer un microenvironnement inflammatoire favorisant la croissance tumorale.

Dans un modèle murin de mélanome, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-TLR2 inhibait la croissance tumorale (Yang, Cui, Liu, Mi, et al. 2009). D'autres équipes rapportent un rôle anti-tumoral de TLR2 (Zhang et al. 2011). Des agonistes TLR1/TLR2 entraînaient une régression tumorale par l'intermédiaire de lymphocytes T effecteurs ou des mastocytes (Zhang et al. 2011)(Asprodites et al. 2008).

Interactions entre calpaïnes 1 et système immunitaire dans l'ADL

Dans l'ADL, les concentrations de calpaïne 1 extracellulaire et de la forme soluble de TLR2 étaient associées à une inflammation alvéolaire à neutrophiles. Le rôle de l'inflammation alvéolaire à neutrophiles dans la progression tumorale des ADL a été décrit il y a plusieurs années par notre équipe et d'autres (Zell et al. 2005)(Zell et al. 2005)(Garfield et al. 2006)(Bellocq et al. 1998a)(Marie Wislez, Rabbe, et al. 2003). Les mécanismes d'action des polynucléaires neutrophiles étaient multiples : ils libèrent des radicaux libres qui sont mutagènes ; ils libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'HGF (hepatocyte

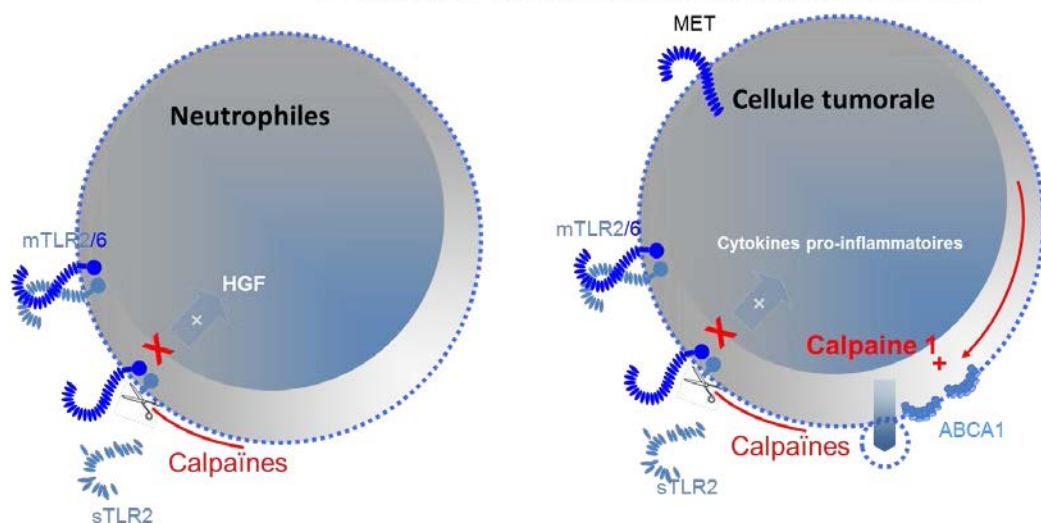
growth factor) qui est le ligand de l'oncogène Met qui favorise la migration cellulaire dans le modèle des ADL (Marie Wislez, Rabbe, et al. 2003). Les calpaïnes pourraient participer à l'activation des polynucléaires neutrophiles par phosphorylation de protéines du cytosquelette permettant la dégranulation des polynucléaires (Pontremoli et al. 1988). Le rôle des calpaïnes sur les polynucléaires neutrophiles en clivant le TLR2 membranaire reste à démontrer. Des tests pharmacologiques sont prévus combinant la calpaïne 1 et son inhibiteur Calpastatine avec un agoniste et/ou antagoniste de TLR2 sur des lignées cellulaires de cancer bronchique ainsi que des polynucléaires neutrophiles

Calpaïnes extracellulaires et progression tumorale : perspectives

L'hypothèse d'un rôle protumoral des calpaïnes extracellulaire par activation du récepteur membranaire TLR2 peut donc être évoquée. Pour étudier l'effet des calpaïnes extracellulaires sur la progression tumorale, nous utiliserons un modèle murin exprimant la calpastatine sous le contrôle du promoteur humain de la CRP et d'un peptide signal. En réponse à un stress inflammatoire, ce promoteur est activé (seul le promoteur humain de la CRP est activé, alors que le promoteur murin est insensible), entraînant la synthèse hépatique de calpastatine qui est extériorisée grâce au peptide signal. L'excès de calpastatine dans le milieu extracellulaire bloque l'activité des seules calpaïnes extériorisées. Des tumeurs syngéniques issues des lignées murines de cancers bronchiques seront implantées au niveau du flanc de ces souris transgéniques et contrôles de même fond génétique. Seront examinés sur ces souris : la taille de la tumeur, le pouvoir métastasant, mais également au l'inflammation et l'angiogenèse *in situ*.

Schéma récapitulatif :

1. Calpaïne 1 sécrétée par les cellules tumorales
2. Mécanisme de sécrétion: hypothèse du transporteur ABCA1
3. Calpaïnes 1 extracellulaire clive TLR2 membranaire
4. TLR2 membranaire exprimé par les PNN et les cellules tumorales
5. Production de cytokines pro-inflammatoires
6. Sécrétion d'HGF par les PNN
7. Fixation sur le récepteur MET situé sur la cellule tumorale



Calpain 1 and soluble TLR2 levels in bronchoalveolar lavage fluid are associated with poor prognosis in lepidic lung adenocarcinoma

Anne-Marie Ruppert ^{1, 2}, Laurent Baud ^{3, 4}, Nathalie Rabbe ¹, Joëlle Perez ³, Michaël Duruisseaux¹, Thibault Vieira ^{1,2}, Martine Antoine ^{1,5}, Jacques Cadranel ^{1,2}, Marie Wislez ^{1,2}

1. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, GRC n°04, Therascan, Hôpital Tenon (AP-HP), 4 rue de la Chine, F-75252 Paris, France
2. AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, , 4 rue de la Chine, F-75970 Paris, France.
3. UMR_S1155 and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B) Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, F-75020,4 rue de la Chine, 75020 Paris, France
4. INSERM, UMR_S 1155, F-75020, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France
5. Service d'Anatomie pathologique, Hôpital Tenon (AP-HP), 4 rue de la Chine, F-75020 Paris, France.

Correspondance to: Marie Wislez, MD, PhD, Service de Pneumologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, F-75970, Paris; Tel: +33 ; Email: marie.wislez@tnn.aphp.fr

Running head: Extracellular Calpain 1 in lepidic adenocarcinoma

Take home message:

Extracellular Calpain 1 and soluble TLR2 could be markers of severity in lepidic lung adenocarcinoma.

ABSTRACT

Calpain 1 is a pro inflammatory calcium-activated cysteine protease, which can be partly externalized. Extracellular calpains limit inflammatory processes and promote tissue repair, through cell proliferation and migration. Toll like receptor (TLR) 2 has been identified as a target of extracellular calpains in lymphocytes. The aim was to investigate the externalization of calpain 1 and the release of soluble TLR2 during tumor progression of lepidic pulmonary adenocarcinoma (LPA).

Extracellular calpain 1, soluble fragment of TLR2 and cytokines were analyzed by ELISA in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) supernatants from patients with LPA (n=68). Source of calpain and soluble TLR2 was analyzed by immunohistochemistry and flow cytometry, respectively, on polymorphonuclear neutrophils (PMN) and human lung cancer cell lines.

Extracellular calpain 1, secreted by tumor cells, was associated to tumor progression, neutrophilic inflammation, with a poor prognostic factor on survival ($p=0,003$). TLR2 was expressed on PMN or tumor cells and decreased after calpain exposure. Soluble fragment of TLR2 in BALF supernatants was correlated to the extracellular calpain 1 concentration ($r=0.624$; $p<0.001$), and its high level was associated with tumor progression and a pro-inflammatory environment.

Extracellular calpain 1 secreted by tumor cells, could participate in inflammatory microenvironment and tumor progression through TLR2 in LPA.

Words count: 199/200

INTRODUCTION

Calpains are ubiquitous cytosolic calcium-activated cysteine proteases [1]. Two main isoforms are ubiquitously expressed: calpain 1 which requires micromolar and Calpain 2 millimolar Ca^{2+} concentrations for activity. Their activity is tightly controlled by calpastatin, a specific endogenous calpain inhibitor [1].

Calpains have several biological effects that could play an important role in cancer biology. They promote i) cell mobility by modifying the distribution of cytoskeletal anchors to the cell membrane [2-3], ii) activation of inflammatory cells by the NF- κ B transcription factor signaling pathway [4-5], iii) tumor vascularization by VEGF response [6], iv) cell proliferation, although this role remains controversial [7-8].

However, the prognostic impact of calpains and their effect in cancer remains controversial. Increased calpain expression is associated with poor prognosis in lung, stomach and breast cancer, while it is associated with a good prognosis in ovarian and pancreatic cancer [9-12]. In a mouse model of melanoma, inhibition of calpains promoted an antitumor effect by inhibiting cell proliferation and a protumoral effect in promoting cell migration and metastasis [13].

Although calpains are considered as intracellular enzymes, few studies show that they are partly externalized. Calpains are secreted by lymphocytes, macrophages, and endothelial cells among other cells [14-15]. When externalized, they seem to promote inflammation resolution and tissue repair. For instance, externalized calpains activate anti-inflammatory cytokines (TGF- β) [16] and inhibit pro inflammatory proteins such as chemerins or IL-17 [17-18]. In addition, extracellular calpains participate in epithelium and endothelium regeneration after ischemic or inflammatory damage [15, 19-20]. Recently, Perez et al demonstrated that extracellular calpains also cleave Toll like receptor 2 (TLR2) on human lymphocytes, thereby

limiting IL-17 expression [18]. Finally, no data on extracellular calpain are available in oncology.

Lung adenocarcinomas are the most frequent histological type of non-small cell lung cancer (NSCLC) [21]. They consist of a mixture of different histological patterns referred to as lepidic, acinar, solid, papillary or micropapillary [22]. Lepidic predominant adenocarcinomas (LPA) are characterized by a proliferation of terminal unit cells with no evidence of stromal, pleural, or vascular invasion [23-24]. Tumor progression by aerogenous spreading explains its propensity for multicentric and bilateral lung involvement with respiratory signs at diagnosis, including bronchorrhea or crackles [23-24]. LPA are characterized by an intense inflammatory reaction involving complex interactions between tumor and inflammatory cells [25-27].

As inflammation and proliferation are major features in the lung carcinogenesis, the aim of this study was to determine whether calpain 1 exteriorization is associated with tumor progression of LPA. We analyzed bronchoalveolar lavage fluid (BALF) supernatants from patients with LPA and identified extracellular calpain 1 and its target, TLR2, as negative prognostic factors.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples and ethical considerations

Between January 1992 and July 2010, 92 patients with LPA were diagnosed and followed-up in the Tenon Hospital Chest Department (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France). Clinical findings are summarized in supplementary data (Table S1). For all patients, diagnosis was assessed by a lung cancer pathologist, based on the 2011 IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma [22]. The disease was classified according to the seventh International TNM Classification System for Lung Cancer [28]. Follow-up data were recorded until death. A surgical exeresis was performed in 54 patients.

BALF was used as a diagnostic procedure and performed as previously described [26]. After diagnostic procedure, the remaining BALF was spun, and the supernatant aseptically separated and stored at -80°C. A frozen BALF supernatant sample was available in 68 patients. BALF supernatants from controls were obtained from six subjects undergoing diagnostic procedures. They were four men and three women aged 61 ± 7 years. Three were smokers. None had a history of neoplastic disease and all had normal results of BALF analysis.

All patients signed a research approval informed consent permitting analyses of their biological samples. All informed consents were collected and stored in the Department of Pathology, Tumorotheque des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien (AP-HP). This study was approved by the Ethics of Human Research Committee of our institution.

Cell Lines and culture conditions

The human A549, H322, H441, H1650 lung adenocarcinoma cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in Dulbecco's Modified

Eagle Medium (DMEM) (A549) or RPMI-1640 (H322, H441, H1650) with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (0.1 mg/mL) (Life Technologies) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. For experiments, cell lines were grown in a serum-free medium and treated for 1 hour with or without 4 µg/ml calpain 1 (Merck Chemicals) or 10 µg/ml calpastatin (Sigma Aldrich).

Cell isolation

Peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN) were isolated from peripheral blood of healthy volunteers by means of density gradient centrifugation (PMN cell separation medium, Eurobio). PMNs were separated from erythrocytes by hypotonic shock and washed thrice in sterile saline.

Chemokine and cytokine quantification in BALF samples

Chemokine and cytokine concentrations in BALF supernatants were quantified using Bio-Plex multiplex bead-based assays with Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-Plex Immunoassay and three individual assays for human VCAM-1, GRO α and HGF (Bio-Rad Laboratories) as previously reported [29].

Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded 3 µm tissue sections from surgical specimens were used for calpain immunohistochemical (IHC) studies. After rehydration, deparaffinized sections were pretreated by epitope retrieval solution, endogenous peroxidase activity was quenched and a non-specific binding sites blocking was performed. Sections were incubated with primary antibody anti-calpain 1 monoclonal antibody (clone P-6) (Santa Cruz, Clinisciences; 1:400) 90 min at room temperature. Sections were incubated with Dako Envision+ System-

HRP labelled polymer anti-mouse and revealed by diaminobenzidine. Appropriate isotype mouse IgG1 (Dako) was used as negative control. Two investigators (NR and MA) blinded to clinico-pathological variables evaluated immunostaining independently. The H-scores (0–300) were ascribed as previously reported [30].

ELISA assays

Calpain 1(Cloud-Clone Corp, Euromedex) and soluble TLR2 (R&D Systems,Bio-Techne) expressions were determined in BALF by ELISA detection kits according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence

Cells at a concentration of $10^6/100\ \mu\text{l}$ were incubated 1h at 4°C with APC-conjugated anti-human TLR2 (Miltenyi Biotec) or control antibody expression. Data were collected on a MACSQuant cytofluorometer (Miltenyi Biotec) and analyzed with FlowJo software (TreeStar)

Statistical analysis

Results were expressed as median (Q25-75). Clinical data were compared according to the median concentration of calpain or TLR2s in BALF supernatant: high group in patients with concentration above the median and low group in patients having a concentration below the median. For quantitative variables, comparisons were made using the Mann-Whitney non-parametric tests. For qualitative variables, the χ^2 test was used for comparisons and Spearman's coefficient (ρ) for correlation studies. The survival time was defined as delay from diagnosis to death or to the cutoff date, defined as August 2011. Survival rates were calculated with the Kaplan-Meier method, and survival curves were compared using the log-

rank test. Quantitative variables were coded as dichotomous (present or absent, high or low level), and the cutoff values were the medians of distribution. Variables with p -value below 0.1 in univariate analysis were tested in the multivariate Cox model using a backward stepwise variable selection. A p value below 0.05 was considered significant. Data were processed using SPSS 20.0 software (IBM Corporation).

RESULTS

1. Extracellular 1 Calpain

1.1 Calpain 1 concentration is higher in BALF supernatant of LPA than controls

Median extracellular calpain 1 concentration, measured by ELISA, was significantly higher in BALF supernatants of LPA than those of controls ($p = 0.045$) (**Figure 1a**). In BALF supernatants of LPA ($n = 68$), median calpain 1 concentration was 4029 pg / ml [Q25-75: 1947-8327] compared to controls ($n = 6$) 1299 pg / ml [Q25-75: 0-4044].

1.2 Source of secreted calpain 1

To investigate the source of calpain 1 secretion into the BALF, an immunohistochemistry analysis of the expression of calpain 1 was performed on 6 surgical specimens of LPA, three with high and 3 with low median calpain 1 BALF supernatant concentrations. A heterogeneous cytoplasmic expression with a membrane reinforcement of calpain 1 on tumor cells was noted with an H-score between 0-270 (**Figure 1b**). No nuclear staining was detected. The inflammatory infiltrate, macrophages or lymphocytes, did not fix the antibody. Only, endothelial and bronchial cells expressed calpain 1 in their cytoplasm. No correlation with calpain 1 concentrations in the supernatant of BALF was noted. Calpain 1 would be secreted mainly by tumor cells.

1.3 High Calpain 1 concentration is a negative prognostic factor

1.3.1 High Calpain 1 concentration is associated with tumor progression

A high calpain 1 concentration was significantly associated with metastatic stage (**Table 1**). Thus, 76.5% (26/34) patients had a metastatic stage in the calpain 1 high group compared to 23.5% (8/34) in the calpain 1 low group ($p = 0.003$). There were more patients with crackles in the calpain 1 high group compared to the calpain 1 low group (73% *versus* 23%, $p < 0.001$).

There were no significant differences according to sex, smoking status, age or Performans status.

1.3.2 High Calpain 1 concentration is associated with neutrophilic inflammation

In the calpain 1 high group, 32 ± 6.0 % of PMNs were detected versus 14 ± 3.4 % in 1 calpain low group ($p = 0.018$) (**Figure 1c**).

1.3.3 High Calpain 1 concentration is associated with poor ~~prognostic factor~~ on survival

Survival was significantly shorter in the calpain 1 high group (1.3 years; Q25-75: 0.5 to 3.2 years) than the calpain 1 low group (3.2 years; Q25-75: 0.8 12.7 years) ($p = 0.003$) (**Figure 1d**). Multivariate analysis included all variables with $p < 0.1$ in univariate analysis: metastatic stage ($p < 0.001$), Performans Status ($p = 0.003$), PMN ($p = 0.003$), sex ($p = 0.07$) and calpain 1 median concentration ($p = 0.002$). In multivariate analysis, only the metastatic stage ($p < 0.001$) and male gender ($p = 0.025$) were associated with a significant decrease in survival (Table S2).

2 Extracellular calpain 1 mechanisms of action: toll like receptor 2 target of extracellular calpain 1

As there was a positive association between PMN and high calpain 1 concentration, we hypothesized that calpains cleave TLR2 on PMN and / or tumor cells. Thus, the expression of membranous TLR2 was investigated in these two cell types.

2.1 TLR2 is expressed on neutrophils and tumor cells

Expression of membranous TLR2 was studied by flow cytometry analysis on isolated PMN from healthy volunteers. Forty three percent to 74% of PMN had a membranous expression of TLR2 ($n = 3$) (**Figure 2 a**).

Expression of membranous TLR2 was studied by flow cytometry analysis on epithelial cells from lung cancer lines. Eleven % to 24% of the A549, 16% to 37% of the H322, 18% to 43% of the H1650 and 48% to 87% of the H441 cell lines had a membranous expression of TLR2 ($n = 3$) (**Figure 2b**).

2.2 TLR2 is cleaved by extracellular calpain 1 on neutrophils and tumor cells

As TLR2 is expressed on PMN and tumor cells, we questioned whether extracellular calpain 1 cleaves TLR2 on these cell types.

Analysis by flow cytometry of PMN showed a decrease of membranous TLR2 expression after 1 hour exposure to calpain 1 (4 μ g / ml) as compared to BSA (control). This decrease ranged from 16% to 38% ($n = 3$) compared to the basal expression. Conversely, TLR2 expression increased by 42% compared to basal expression after treatment by calpain inhibitor, calpastatin (10 μ g / ml) (**Figure 2a**).

Analysis by flow cytometry of epithelial cell lines from lung cancer showed a decrease of membranous TLR2 expression after 1 hour exposure to calpain 1 (4 μ g / ml) as compared to BSA (control).. This decrease ranged from 16% to 38% ($n = 3$) compared to the basal expression, ranging from 9% to 18% for the A549, from 13% to 15% for the H441, from 16% to 32% for the H1650 and from 10% to 43% for the H322 cell lines compared to the basal expression ($n = 3$) (**Figure 2b**).

2.3 Soluble fragment of TLR2 is correlated to the extracellular calpain 1 concentration in the BALF supernatants

Because TLR2 expressed on PMN and tumor cells is cleaved by extracellular calpain 1, we determined the concentration of the soluble fragment of TLR2 (TLR2s) by ELISA in BALF supernatants of LPA patients. The concentration of TLR2s was strongly correlated to the

concentration of extracellular calpain 1 in BALF supernatant ($r = 0.624$, $p < 0.001$) (**Figure 2c**).

3 High soluble fragment of TLR2 is associated with a negative prognosis in patients with LPA

High extracellular calpain 1 concentration is associated with a poor prognosis. The membranous TLR2 is the target of extracellular calpain 1. Is the soluble fragment of TLR2 associated with prognosis?

3.1 High soluble fragment of TLR2 in BALF supernatants is associated with tumor progression

A high concentration of TLR2s was significantly associated with metastatic stage. Thus, 79% (27/34) of patients in the high TLR2s group had a metastatic stage against 35% (12/34) of the TLR2s low group ($p = 0.034$). In the TLR2s high group, there were more patients with crackles compared to the TLR2s low group (67%, 20/34 vs 27%, 8/34; $p = 0.002$), more patients with bronchorrhea (41%, 14/34 vs 6%, 2/34; $p = 0.001$) and bilateral forms (70%, 24/34 vs 30%, 12/34; $p = 0.004$). Fewer patients had a surgical treatment in the TLR2s high group compared to the TLR2s low group (26% vs 65% 9/34, 22/34, $p = 0.002$). There were no significant differences by sex, smoking status, age or Performans Status.

3.2 High soluble fragment of TLR2 in BALF supernatants is associated with neutrophilic inflammation and positive tumor cytology

In the TLR2s high group, $32.5 \pm \%$ PMN were detected compared to 13.8% in the TLR2 low group ($p = 0.006$) (**Figure 3a**). In the TLR2s high group, 62% (18/34) positive tumor cytology were detected in BALF compared to 30% (10/34) in the TLR2 low group ($p = 0.006$).

3.3 High soluble fragment of TLR2 tend to be a poor prognostic factor

Survival tended to be shorter in the high TLR2s group (1.2 years; Q25-75: 0.5 to 3.2 years) than the low TLR2s group (3.5 years; Q25-75: 0.8 to 12,7ans) ($p = 0.056$) (**Figure 3b**). In multivariate analyses, all variables with $p < 0.1$ in univariate analysis were included. Only metastatic stage ($p < 0.001$) and male gender (0.001) were associated with a significant decrease in survival (Data not shown).

3.4 High soluble fragment of TLR2 is associated with a pro-inflammatory environment

Among analyzed cytokines and growth factors, concentrations of HGF, CXCL10, IL-6, VCAM, CCL4, G-CSF, CCL2, GM-CSF, IFN- γ and VEGF were significantly correlated to the TLR2s concentration (**Figure 3c**). All of these cytokines, except for GM-CSF, had a high concentration in the case of high soluble TLR2 concentration. The cytokines CXCL 8, CCL5 and CXCL1 were not correlated to TLR2s (data not shown).

DISCUSSION

Few data are available on extracellular calpains. Unlike intracellular calpain, extracellular calpains are associated with inflammation resolution and tissue repair [18, 20, 31]. However in patients with LPA, high extracellular calpain 1 is significantly associated with metastasis, alveolar inflammation and an unfavorable prognosis. These data are the first to identify an importance for extracellular calpain 1 in oncology.

Analysis of surgical specimens in LPA identified tumor cells as source of secreted calpain 1. Interestingly, no correlation was noted between intracellular calpain identified by immunohistochemistry and extracellular calpain by ELISA. The mechanism implicated in externalizing calpain in LPA remains unknown. This externalization could be linked to cell death, apoptosis or necrosis. It could involve either the formation of microparticles [32] or the passage through the cell membrane via channels, such as ABCA1 transporter [18]. ATP-binding cassette (ABC) transporters are a family of transmembrane proteins that transport a wide range of substrates, including lipids and the surfactant through the biological membranes [33]. As ABCA1 is expressed in the lung and has showed its role in the secretion of calpain in lymphocytes, ABCA1 might be the calpain transporter in LPA.

As extracellular calpain 1 concentration in BALF supernatant is a poor prognostic factor, we investigated the mechanism of action of extracellular calpain 1. Recently Perez et al identified TLR2 as a target for extracellular calpain in human lymphocytes [18]. Once externalized, calpains cleave the extracellular domain of TLR2 and release a soluble form of this receptor. In LPA, prognosis is determined by both PMN and tumor cells [26-27, 34]. The hypothesis is that calpains cleave TLR2 on PMN and / or tumor cells. Several arguments support this hypothesis. Flow cytometry analysis demonstrated that PMN and tumor cells express the membranous TLR2. Treatment of PMN and tumor cells by calpain1 results in a decrease of membranous TLR2 expression. Analysis of the soluble fraction of TLR2 by

ELISA is highly correlated to the concentration of extracellular calpain 1 in the supernatant of BALF in LPA.

As for the extracellular calpain 1, a high concentration of TLR2s is significantly associated to neutrophilic inflammation and metastatic tumor stage. Neutrophilic inflammation is associated to tumor progression in LPA [23, 26-27]. Various mechanisms of action of neutrophils are reported: they release mutagenic free radicals, proinflammatory cytokines such as HGF (hepatocyte growth factor) which is the ligand of the Met receptor that promotes cell proliferation and migration. The role of TLR2 cleavage by calpains on tumor progression remains to be demonstrated using in vitro functional tests.

Recent data suggest in a mouse model that TLR2 plays a key role in tumor progression of lung cancer [36]. Versican, a proteoglycan from the extracellular matrix, has been identified as a ligand of TLR2 and is secreted by tumor cells. Versican activates macrophages via TLR2, induces the secretion of TNF- α and promotes tumor growth [36]. Whether versican is the ligand of TLR2 in LPA is hypothetical. In LPA, TLR2s is significantly correlated with pro inflammatory environment including HGF, CCL 4, CXCL10, IL-6, G-CSF, GM-CSF, CCL2, IFN gamma, VEGF and VCAM-1. All of these cytokines, except for GM-CSF, are positively correlated with TLR2s.

These results indicate a negative prognosis of extracellular calpain 1 in LPA. Calpain 1 is secreted by cancer cells and cleaves membranous TLR2 on PMN or cancer cells. Soluble fragment of TLR2 is associated with a pro inflammatory tumor environment. These results suggest that cancer cells use the innate immune system to generate an inflammatory microenvironment supporting tumor growth.

Acknowledgment : We thank the « Tumorothèque des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien (HUEP) », AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'Anatomie Pathologique, F-75970 Paris, France, for providing the samples.

Conflicts of interest: none

word count: 3000/3000

Bibliography

1. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* juill 2003;83(3):731-801.
2. Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci.* 1 sept 2005;118(Pt 17):3829-38.
3. Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, et al. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* 21 déc 2001;276(51):48382-8.
4. Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR. Tumor necrosis factor- α -inducible IkappaB α proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem.* 8 janv 1999;274(2):787-94.
5. Shumway SD, Maki M, Miyamoto S. The PEST domain of IkappaB α is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *J Biol Chem.* 22 oct 1999;274(43):30874-81.
6. Su Y, Cui Z, Li Z, Block ER. Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* juill 2006;20(9):1443-51.
7. Mellgren RL, Shaw E, Mericle MT. Inhibition of growth of human TE2 and C-33A cells by the cell-permeant calpain inhibitor benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone. *Exp Cell Res.* nov 1994;215(1):164-71.
8. Schollmeyer JE. Calpain II involvement in mitosis. *Science.* 13 mai 1988;240(4854):911-3.
9. Gu J, Xu F, Zhao G, Lu C, Lin Z, Ding J, et al. Capn4 promotes non-small cell lung cancer progression via upregulation of matrix metalloproteinase 2. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* mars 2015;32(3):51.
10. Storr SJ, Pu X, Davis J, Lobo D, Reece-Smith AM, Parsons SL, et al. Expression of the calpain system is associated with poor clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinomas. *J Gastroenterol.* nov 2013;48(11):1213-21.
11. Storr SJ, Lee KW, Woolston CM, Safuan S, Green AR, Macmillan RD, et al. Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* sept 2012;23(9):2289-96.
12. Storr SJ, Zaitoun AM, Arora A, Durrant LG, Lobo DN, Madhusudan S, et al. Calpain system protein expression in carcinomas of the pancreas, bile duct and ampulla. *BMC Cancer.* 2012;12:511.

13. Raimbourg Q, Perez J, Vandermeersch S, Prignon A, Hanouna G, Haymann J-P, et al. The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PloS One*. 2013;8(4):e60469.
14. Deshpande RV, Goust JM, Chakrabarti AK, Barbosa E, Hogan EL, Banik NL. Calpain expression in lymphoid cells. Increased mRNA and protein levels after cell activation. *J Biol Chem*. 10 févr 1995;270(6):2497-505.
15. Letavernier B, Zafrani L, Nassar D, Perez J, Levi C, Bellocq A, et al. Calpains Contribute to Vascular Repair in Rapidly Progressive Form of Glomerulonephritis: Potential Role of Their Externalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2 janv 2012;32(2):335-42.
16. Abe M, Oda N, Sato Y. Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J Cell Physiol*. févr 1998;174(2):186-93.
17. Yoshimura T, Oppenheim JJ. Chemerin reveals its chimeric nature. *J Exp Med*. 29 sept 2008;205(10):2187-90.
18. Perez J, Dansou B, Herve R, Levi C, Tamouza Houda, Baud L. Calpains released by T Lymphocytes cleave TLR2 to control IL-17 expression. *J Immunol*. 2015; in review.
19. Frangié C, Zhang W, Perez J, Dubois Y-CX, Haymann J-P, Baud L. Extracellular calpains increase tubular epithelial cell mobility. Implications for kidney repair after ischemia. *J Biol Chem*. 8 sept 2006;281(36):26624-32.
20. Xu L, Deng X. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J Biol Chem*. 17 déc 2004;279(51):53683-90.
21. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko TK, Teo ASM, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. avr 2012;18(4):521-8.
22. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. févr 2011;6(2):244-85.
23. Garfield DH, Cadranel JL, Wislez M, Franklin WA, Hirsch FR. The bronchioloalveolar carcinoma and peripheral adenocarcinoma spectrum of diseases. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. mai 2006;1(4):344-59.
24. Wislez M, Massiani M-A, Milleron B, Souidi A, Carette M-F, Antoine M, et al. Clinical characteristics of pneumonic-type adenocarcinoma of the lung. *Chest*. juin 2003;123(6):1868-77.
25. Wislez M, Philippe C, Antoine M, Rabbe N, Moreau J, Bellocq A, et al. Upregulation of bronchioloalveolar carcinoma-derived C-X-C chemokines by tumor infiltrating

- inflammatory cells. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. janv 2004;53(1):4-12.
26. Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, et al. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res*. 15 mars 2003;63(6):1405-12.
 27. Wislez M, Antoine M, Rabbe N, Gounant V, Poulot V, Lavolé A, et al. Neutrophils promote aerogenous spread of lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 juin 2007;13(12):3518-27.
 28. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, 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 Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. août 2007;2(8):706-14.
 29. Duruisseaux M, Mathiot N, Antoine M, Vieira T, Poulot V, Cadranell JL, et al. CXCL10/CXCR3-A autocrine loop promotes pro-tumoral capacities in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2015 submitted;
 30. Duruisseaux M, Antoine M, Rabbe N, Poulot V, Fleury-Feith J, Vieira T, et al. The impact of intracytoplasmic mucin in lung adenocarcinoma with pneumonic radiological presentation. *Lung Cancer Amst Neth*. mars 2014;83(3):334-40.
 31. Frangié C, Zhang W, Perez J, Dubois Y-CX, Haymann J-P, Baud L. Extracellular calpains increase tubular epithelial cell mobility. Implications for kidney repair after ischemia. *J Biol Chem*. 8 sept 2006;281(36):26624-32.
 32. Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, Hu X, Perez J, Lévi C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 avr 2012;185(7):744-55.
 33. Van der Deen M, de Vries EGE, Timens W, Scheper RJ, Timmer-Bosscha H, Postma DS. ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res*. 2005;6:59.
 34. Bellocq A, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF, et al. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol*. janv 1998;152(1):83-92.
 35. Garfield DH, Cadranell JL, Wislez M, Franklin WA, Hirsch FR. The bronchioloalveolar carcinoma and peripheral adenocarcinoma spectrum of diseases. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. mai 2006;1(4):344-59.
 36. Kim S, Takahashi H, Lin W-W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 1 janv 2009;457(7225):102-6.

Table I: Clinical characteristics of patients according to median extracellular calpain 1 and soluble fragment of TLR2 concentrations in BALF supernatant of patients with LPA

	Calpain 1			sTLR2		
	< (n=34)	> (n=34)	p	< (n=34)	> (n=34)	p
Age (years. av±SEM)	65.6±2.4	65.8 ±2.8	NS	64.3±2.3	67.6±1.8	NS
Gender						
Female	16 (47%)	14 (59%)	NS	22 (65%)	16 (47%)	NS
Male	18 (53%)	20 (41%)		12 (35%)	18 (53%)	
Smoking status						
Never smoked	10 (29%)	7 (21%)	NS	7 (21%)	10 (29%)	NS
Former or current	24 (71%)	27 (79%)		27 (79%)	24 (71%)	
Bronchorrhea	6 (19%)	9 (30%)	NS	2 (6%)	6 (41%)	0.001
Rales	7 (23%)	22 (73%)	<0.001	8 (27%)	20 (67%)	0.002
Performans Status						
0	22 (69%)	17 (50%)	NS	20 (61%)	20 (61%)	NS
≥1	10 (30%)	17 (50%)		13(39%)	13 (39%)	
Bilateral lesions	15 (44%)	22 (64%)	NS	12 (35%)	24 (70%)	0.004
Stage						
I-III	20(59%)	8 (23.5%)	0.003	22(65%)	7 (21%)	<0.001
IV	14 (41%)	26 (76.5%)		12 (35%)	27 (79%)	
Surgery	20 (59%)	11 (32%)	0.025	22 (65%)	9 (26.5%)	0.002
LPA						
Mucinous subtype	16 (48%)	20 (71%)	NS	15 (50%)	21 (68%)	NS
Positive cytology	12 (39%)	17 (55%)	NS	10 (30%)	18 (62%)	0.012
BAL (mean+/-SEM)						
Cell count/mm3	505 000 ±165 180	587 931 ±96 745	0.01	502 666±151 813	566 666 ±128 251	NS
Macrophages (%)	72±3.5	48±5.2	<0.001	73±4	48±5.0	<0.001
Neutrophils (%)	14±3.4	32±6.0	0.018	13.8±3.7	32.5±5.8	0.006
Lymphocytes (%)	12±1.7	17±3.4	NS	12±1.8	16.9±3.3	NS
Mutations (n=37)						
EGFR	2 (10.5%)	1 (6%)	NS	2 (9%)	1(6%)	NS
RAS	3 (16%)	1 (6%)		4 (23%)	0 (0%)	0.041
ALK	0	0		0	0	

Table 1. Clinical characteristics of patients according median extracellular calpain 1 and soluble fragment of TLR2 concentrations in BALF supernatant of patients with LPA

Figure 1. Extracellular calpain 1. **A.** The concentration was assessed by ELISA in 68 BALF supernatants from LPA and controls (Mann Whitney Test). Each sample was assessed in duplicate. Line, median; Column, Q25-Q75; Bars, min, max. **B.** Source of calpains: Calpain 1staining (brown) in LPA with high or low extracellular calpain 1 BALF supernatant concentrations and isotopic control. **C.** Relative value of neutrophil (%) in BALF supernatant in patients with LPA according extracellular calpain 1concentration $\leq$ or $>$ median (Mann Whitney test). Line, median; Column, Q25-Q75; Bars, min, max. **D.** Survival curve (Kaplain Meier) of patients with $>$ median (---) vs $<$ median (---) calpain 1 concentration in BALF supernatant (log rank test) **E.** , CXCL10 and CXCR3 staining (brown) in IMA and LPA. **D.** Correlation between CXCL10 and CXCR3 staining scores (Rho Spearman test).

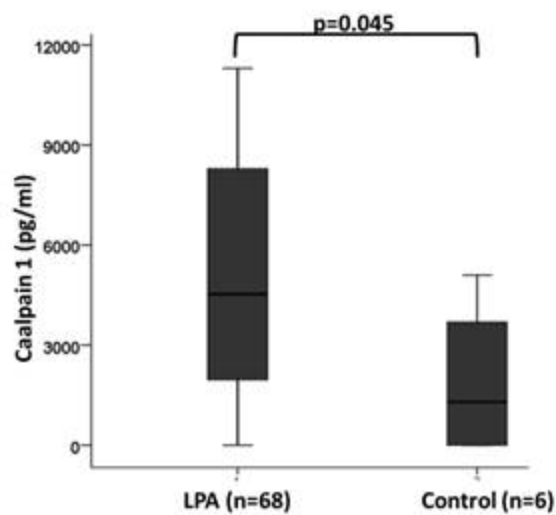
Figure 2. Membranous TLR2 target of extracellular calpain 1. **A.** TLR2 expression by flow cytometry analysis using APC conjugated TLR2 antibody on PMN or controls **B.** TLR2 expression by flow cytometry analysis using APC conjugated TLR2 antibody on epithelial tumor cell lines or controls . **C.** Calpain 1 cleaves TLR2 on PMN: flow cytometric analysis using APC conjugated anti-TLR2 antibody with a basic condition, treatment for 1h by calpain (4 ug / ml) or calpain inhibitor calpastatin (10 ug / ml) **D.** . Calpain 1 cleaves TLR2 on epithelial tumor cell lines: flow cytometric analysis using APC conjugated anti-TLR2 antibody with a basic condition and treatment for 1h by calpain (4 ug / ml). This figure shows the results of three different experiments. **E.** Correlation between the concentration of extracellular calpain 1 (pg / ml) and soluble fragment of TLR2s (pg / ml) in BALF supernatants of LPA (Rho Spearman test)

Figure 3. Soluble fragment of TLR2 is associated to tumor progression. **A.** Relative value of neutrophil (%) in BALF supernatant in patients with LPA according TLR2s concentration $\leq$ median (Mann Whitney test). Line, median; Column, Q25-Q75; Bars, min, max. **B.** Survival curve (Kaplain Meier) of patients with $>$ median (---) vs $<$ median (---) TLR2s concentration in BALF supernatant (log rank test) **C.** Correlation between TLR2s and HGF, CXCL10, IL-6, VCAM, CCL4, G-CSF, CCL2, GM-CSF, VEGF, IFN- γ (Rho Spearman test).

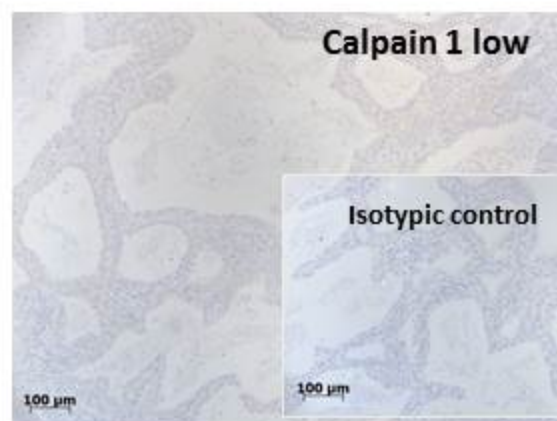
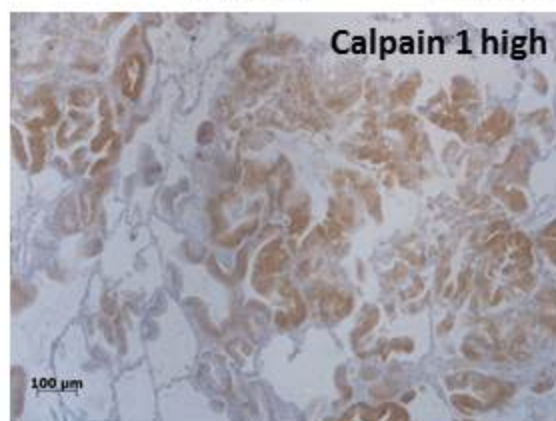
Table 1S: Clinical characteristics of the cohort

Table 2S: Uni and multivariate analyses of factors associated to reduced survival

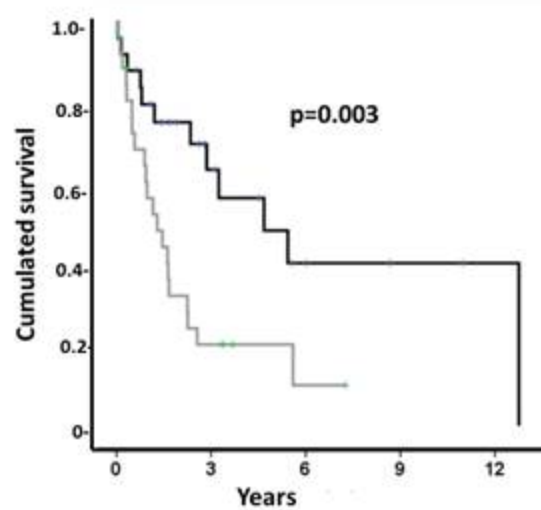
a)



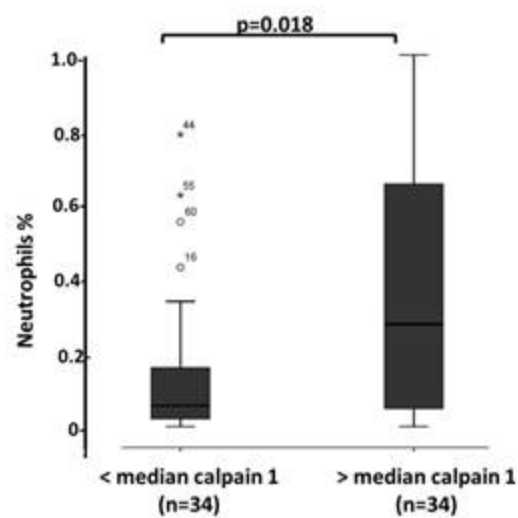
b)



c)

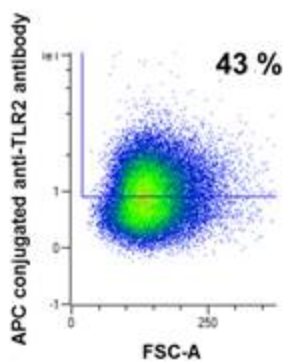
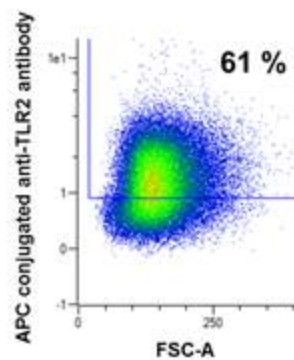
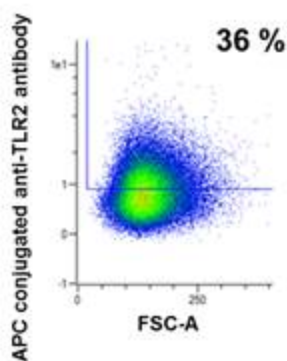


d)



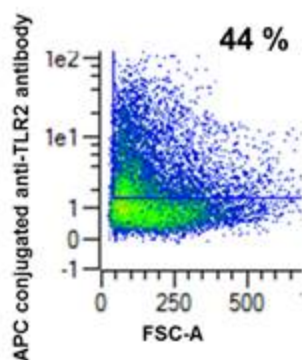
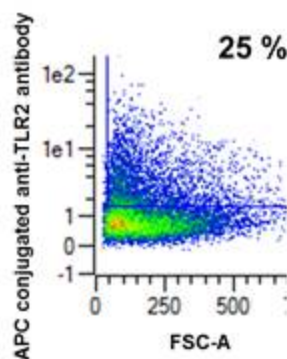
a)

Basal condition

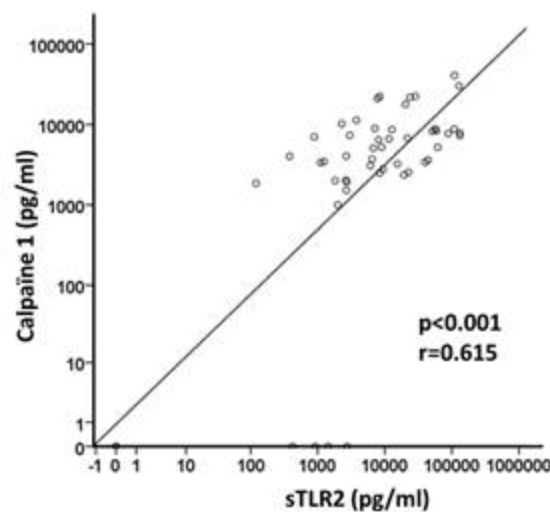
Calpastatin (10 $\mu\text{g/ml}$)Calpain (4 $\mu\text{g/ml}$)

b)

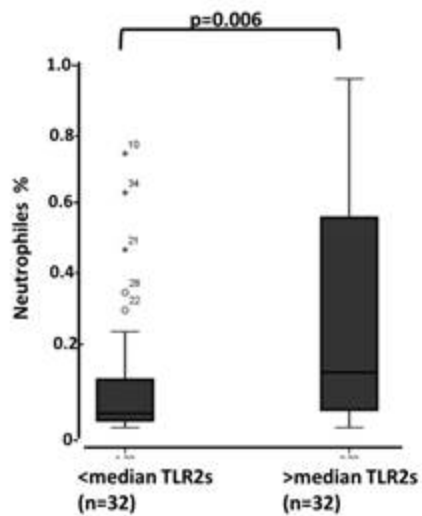
Basal condition

Calpain (4 $\mu\text{g/ml}$)

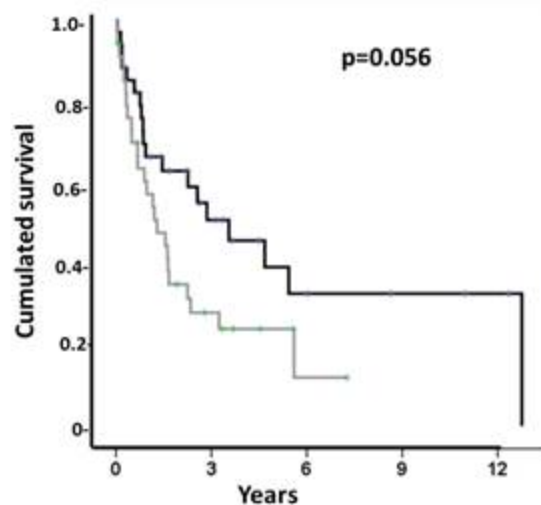
c)



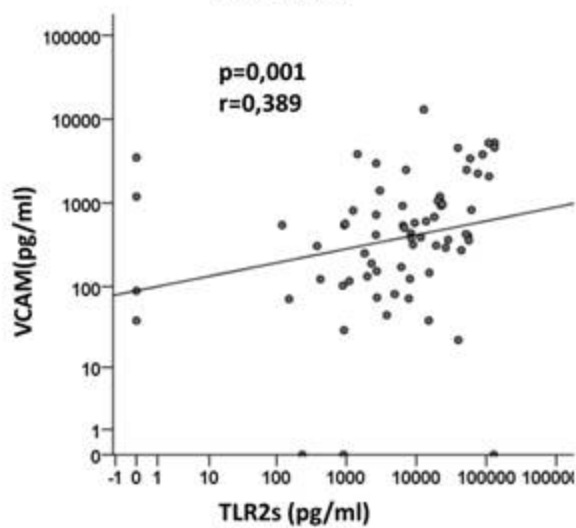
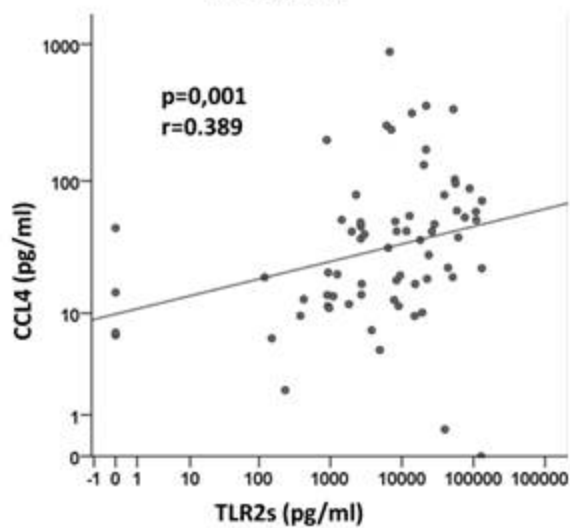
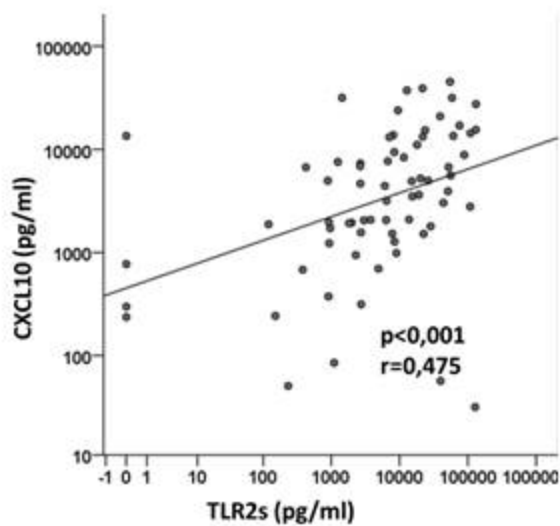
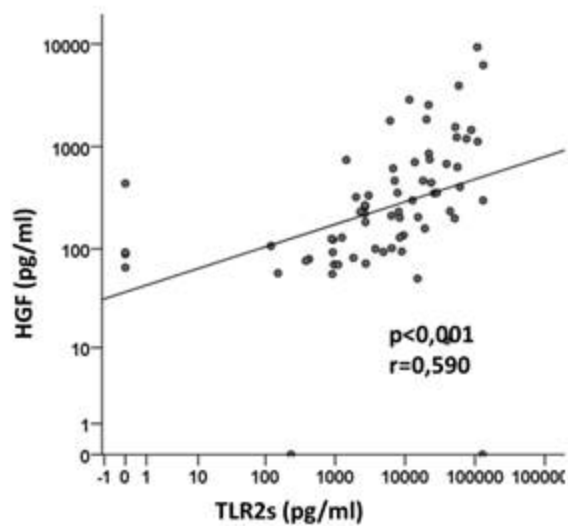
a)

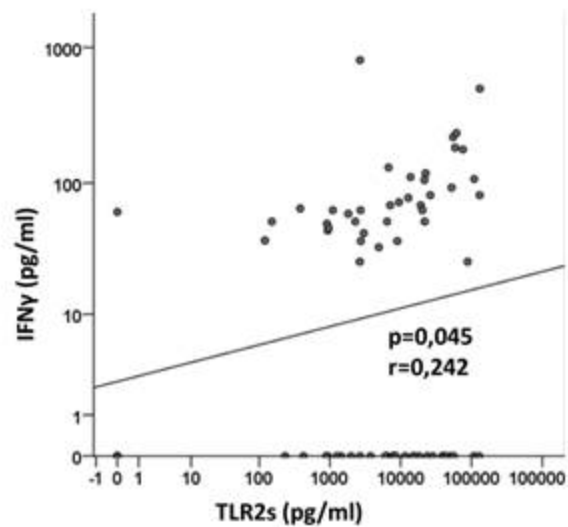
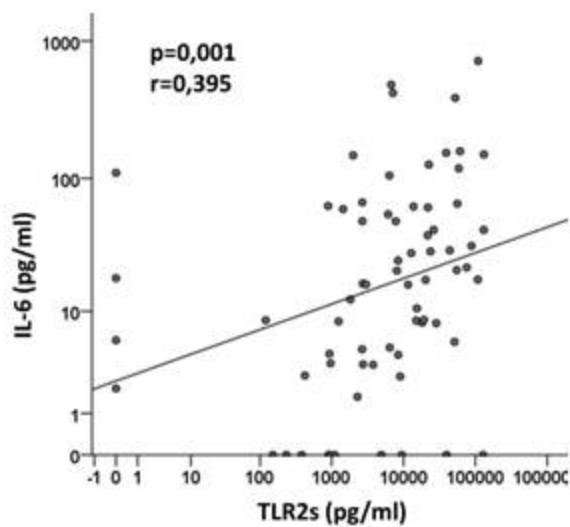
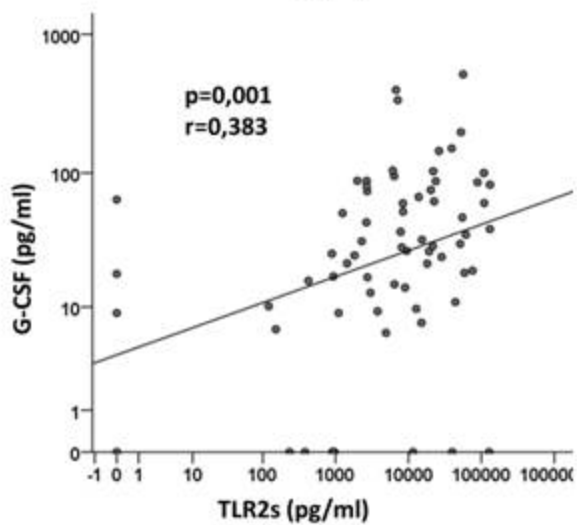
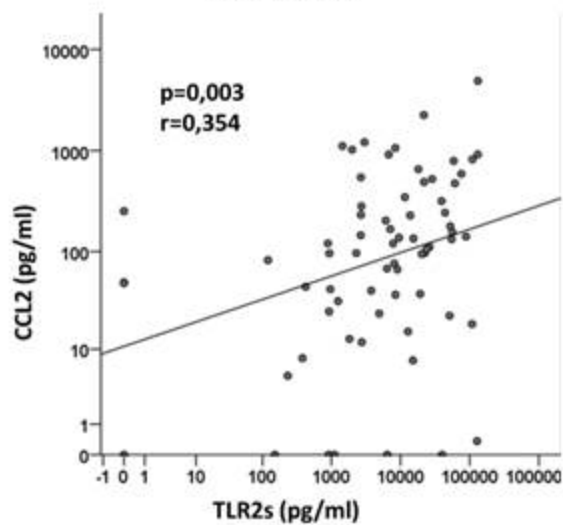
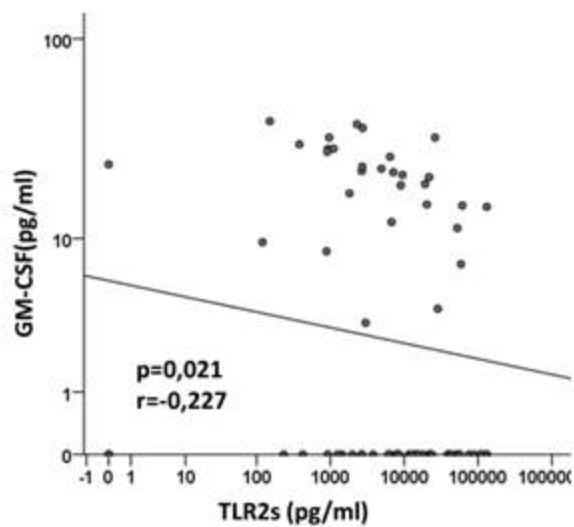
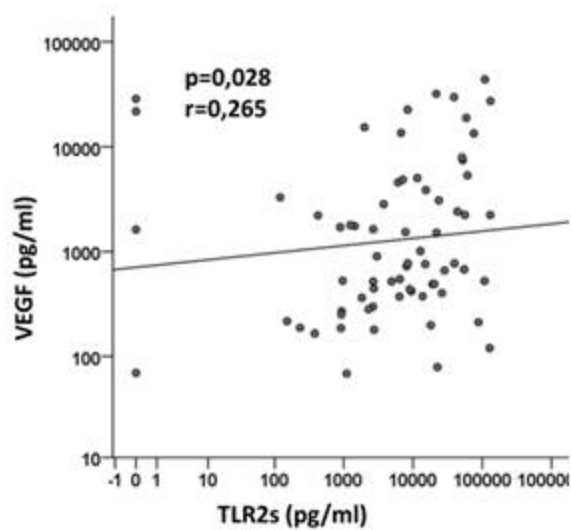


b)



c)





V. Versican, ligand de TLR2 associé à la progression tumorale dans les adénocarcinomes pulmonaires lépidiques

Rationnel

Nous avons montré précédemment le rôle de la calpaïne 1 extracellulaire dans le clivage du récepteur toll like (TLR)2 membranaire associé à la progression tumorale sur une cohorte de patients atteints d'adénocarcinomes lépidiques (ADL) (cf article 1). TLR2 membranaire, exprimé par les polynucléaires neutrophiles et les cellules issues de lignées de cancers bronchiques, était clivé par la calpaïne 1 extracellulaire. Chez ces patients, la concentration élevée de calpaïne extracellulaire était corrélée à la concentration de TLR2 soluble, à la présence d'une alvéolite à neutrophiles et au stade tumoral métastatique.

Le TLR2 est un récepteur membranaire dont les principaux ligands connus sont les lipopolysaccharides (bacille gram négatif), les lipoarabinomannanes (mycobactéries), diverses protéines dont les glycoprotéines, le zymosan (levures), et le peptidoglycane (bacille gram positif) (Rakoff-Nahoum et Medzhitov 2009). Nous nous sommes intéressés à un de ses ligands.

Dans un modèle murin de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC), le versican a été identifié comme un ligand de TLR2 (Kim et al. 2009a). Dans ce modèle, TLR2 joue un rôle clé dans la progression tumorale (Kim et al. 2009a). Le versican induit l'activation des macrophages via l'hétérodimère TLR2/TLR6 et stimule la sécrétion de TNF- α et d'autres cytokines pro-inflammatoires dont IL-6 via la voie de signalisation de NF- κ B et des MAP

kinases. *In vivo*, dans les tumeurs de LLC, le versican conduit à l'activation de TLR2, et à l'induction de multiples cytokines pro inflammatoires et chimiokines telles que TNF- α , IL-6, IL-1, CCL3 / MIP1 α , CCL4 / MIP1 β , CXCL1 / MIP2 et CXCL2 / KC(Kim et al. 2009a)(Kim et Karin 2011).

Le versican est un protéoglycane de la matrice extracellulaire (Dours-Zimmermann et Zimmermann 1994). Il favorise l'interaction de la cellule à des composants de la matrice extracellulaire tels que l'acide hyaluronique, le collagène de type I, la fibronectine et la laminine en se liant à des récepteurs non-intégrines et intégrines (Knudson, Biswas, et Toole 1984)(Wight, Kang, et Merrilees 2014). Des études récentes ont également montré que versican interagit avec les cellules myéloïdes et lymphoïdes en favorisant leur adhérence et la production de cytokines inflammatoires (Wight, Kang, et Merrilees 2014).

Au cours du cancer, tel que le mélanome, le cancer de l'ovaire, le cancer du sein et le cancer du poumon, le versican est exprimé à la fois par les cellules tumorales et stromales, (Pirinen et al. 2005). *In vitro*, il favorise la prolifération tumorale et la néo angiogenèse (Zheng et al. 2004).

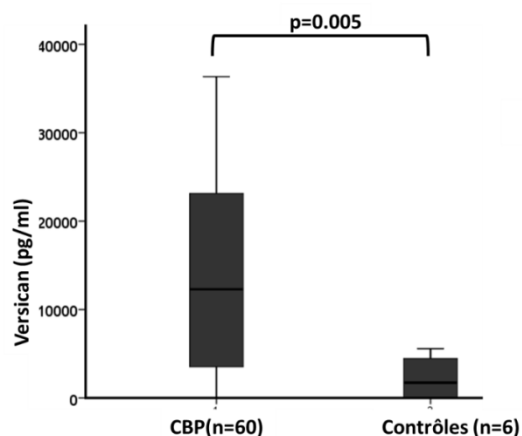
L'objectif de ce nouveau travail a été d'étudier l'expression et le rôle du versican dans la progression métastatique des ADL.

Résultats

1. La concentration de versican est significativement plus élevée dans les surnageants de LBA des ADL versus contrôles

La concentration médiane de versican dans le surnageant des LBA tumoraux (n=60) était de 1169 pg/ml [Q25-75 : 281-2344]. La concentration médiane de versican dans les surnageants de LBA contrôles (n=6) était de 173 pg/ [Q25-75 : 0-473]. La concentration de versican était significativement plus élevée dans les surnageants de LBA tumoraux par rapport aux LBA contrôles (p=0,005).

Figure 1

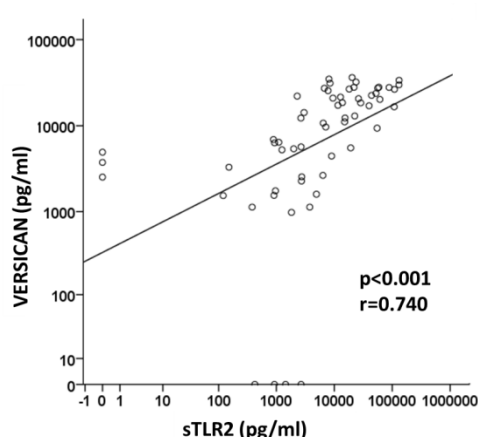


Concentration de versican dans le surnageant de LBA d'ADL et contrôles (Test de Mann Whitney). Trait, médiane; Colonne, Q25-Q75; Barres, min, max.

2. La concentration de versican était significativement corrélée à la forme soluble de TLR2

Dans un modèle murin de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC), le versican était identifié comme ligand de TLR2. Dans la cohorte de ADL, la concentration de versican était fortement corrélée à celle du fragment soluble de TLR2 ($r=0,740$, $p<0,001$), pouvant suggérer que le versican soit un ligand de TLR2.

Figure 2 :



Corrélation entre la concentration de Versican (pg/ml) et sTLR2 (pg/ml) dans les surnageants de LBA (test de Rho Spearman)

3. Versican et progression tumorale

3.1 Une concentration élevée de versican était associée à la progression tumorale

Les données cliniques étaient comparées en fonction de la concentration médiane de versican (1169 pg/ml) dans le surnageant de LBA: le groupe versican élevé correspond

aux patients présentant une concentration de versican au-dessus de la médiane et le groupe versican bas aux patients présentant une concentration en dessous de la médiane (**Tableau I**).

Une concentration élevée de versican était significativement associée à un stade métastatique. Ainsi, 76% (22/29) des patients du groupe versican élevé présentaient un stade métastatique contre 39% (12/31) du groupe versican bas ($p=0,004$). Il y avait plus de patients avec crépitants dans le groupe versican élevé comparé au groupe versican bas (67%, 16/29 vs 24%, 8/34; $p=0,001$) et plus de formes bilatérales (69%, 20/29 vs 39%, 12/31 ; $p=0,019$). Moins de patients étaient opérés dans le groupe versican élevé que le groupe versican bas (28%, 8/29 vs 61%, 19/31 ; $p=0,009$).

Il n'existait pas de différence significative selon le sexe, le statut tabagique, l'âge ou le Performans Status entre les deux groupes.

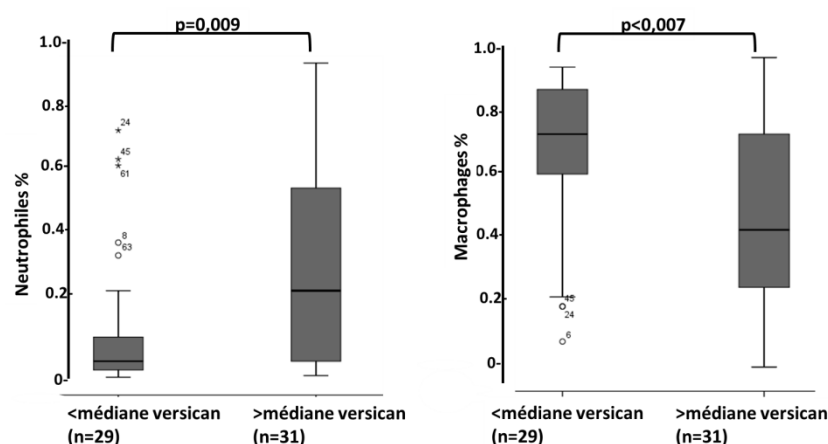
Tableau I : Caractéristiques des patients atteints d'ADL selon la concentration médiane de versican (1169 pg/ml)

	< médiane Versican(n=31)	≥ médiane Versican (n=29)	p
Age (années, moy±SEM)	66.1 ±2.1	67.1±2.6	NS
Sexe			
Femme	17 (55%)	14 (48%)	NS
Hommes	14 (45%)	15 (52%)	
Statut Tabac			
Non Fumeur	8 (26%)	7 (24%)	NS
Fumeur ou Ex-Fumeur	23 (74%)	22 (76%)	
Bronchorrhée	4 (14%)	7 (28%)	NS
Crépitants	8 (24%)	16 (67%)	0,008
Performans Status			
0	18 (60%)	17 (61%)	NS
≥1	12 (40%)	11 (39%)	
Lésions Bilatérales	12 (39%)	20 (69%)	0,019
Stade			
I-III	19 (61%)	7 (24%)	0,004
IV	12 (39%)	22 (76%)	
Chirurgie	19 (61%)	8 (28%)	0,009
Histologie			
Sous-type mucineux	17 (51.5%)	16 (48.5%)	NS
Cytologie Positive	8 (28%)	15 (58%)	0,024
LBA			
Cellules /mm3	270 000	290 000	NS
Macrophages (%)	76±24	50±29	0,007
Neutrophiles (%)	4.7±19	21.5±32	0,009
Lymphocytes (%)	13.5±15	10±14	NS
Mutations (n=34)			
EGFR	2 (11%)	1(6%)	NS
RAS	5 (17%)	2 (12.5%)	NS

3.2 La concentration élevée de versican était associée à l'inflammation à polynucléaires neutrophiles

Une concentration élevée de versican était significativement corrélée à la présence d'une inflammation à neutrophiles dans le LBA. Ainsi 21,5% de polynucléaires neutrophiles étaient présents dans le groupe versican élevé contre 4,7 % dans le groupe versican bas ($p=0,009$). Par ailleurs, le nombre de macrophages évoluait en miroir avec un taux plus élevé dans les prélèvements présentant une concentration de versican basse ($p=0,007$).

Figure 2 :



Neutrophiles (%) et de macrophages (%) dans le LBA d'ADL en fonction du taux de Versican < ou > médiane (Test de Mann Whitney). Trait, médiane; Colonne, Q25-Q75; Barres, min, max.

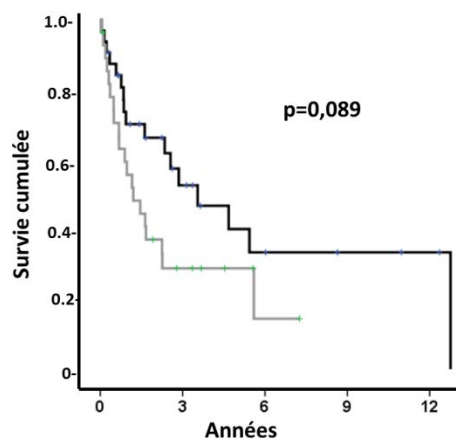
3.3 La concentration élevée de versican était associée à une cytologie tumorale positive

La cytologie tumorale était plus fréquemment positive dans le groupe versican élevé versus bas (58%, 15/29 vs 28%, 8/31 ; $p=0,024$). Il n'existait pas de différence selon le caractère mucineux ou non de la concentration de versican.

3.4 La concentration élevée de versican avait tendance à être un facteur de mauvais pronostic

Les patients présentant une concentration élevée de versican dans le LBA avaient tendance à avoir une survie plus courte que ceux présentant une concentration de versican basse: 1,2 ans (Q25-75 : 0,5 à 5,6) *versus* 3,5 ans (Q25-75 : 0,9 à 12,8) dans le groupe versican bas ($p=0,089$).

Figure 3 :



Courbe de survie selon Kaplan Meier des patients présentant dans le surnageant du LBA une concentration de versican > médiane (---) vs < médiane (---) (log rank test)

L'analyse multivariée de survie incluait toutes les variables avec un $p < 0.1$ en analyse univariée : le stade métastatique ($p < 0,001$), le performans status ($p = 0,003$), le taux de polynucléaires neutrophiles (0,003), le sexe (0,07) et versican ($p = 0,089$). En analyse multivariée, uniquement le stade métastatique ($p < 0,001$) et le sexe masculin (0,001) étaient associés à une diminution significative de la survie.

Tableau II. Analyses uni et multivariées des facteurs pronostiques sur la survie

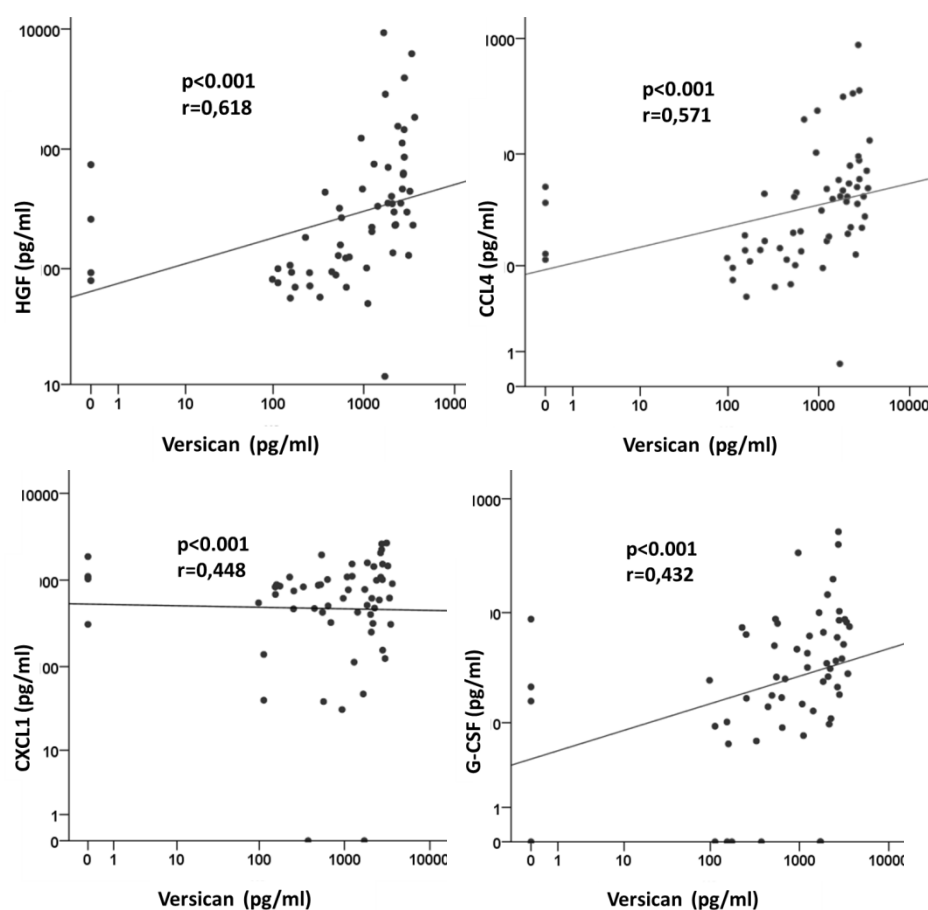
Variable	Nbre patients	Hazard ratio (95%CI) Univariée	p-value	Hazard ratio (95%CI) Multivariée	p-value
<i>Versican</i>					
≥ médiane	29	0.426 (0.367-2.038)	0,089	1,065 (0,462-5,133)	0,882
< médiane	31				
<i>Sexe</i>					
Hommes	40	1,753 (0,947-3,245)	0,074	2.630 (1,171-2,458)	0,019
Femmes	30				
Age	70	0,841 (0,482-1,467)	0,2		
<i>Statut Tabac</i>					
Fumeur	53	0,863 (0,444-1,678)	0,6		
Non Fumeur	17				
<i>Performance Status</i>					
>0	27	0,395 (0,213-0,733)	0,003	0,722 (0,293-1,781)	0,051
0	41				
<i>Stade</i>					
IV	41	0,304 (0,158-0,583)	<0,001	0,185 (0,075-0,456)	<0,001
I-III	29				
<i>Neutrophiles médiane</i>	65	5,280 (1,75-15,87)	0,003	0,816 (0,210-3,161)	0,767

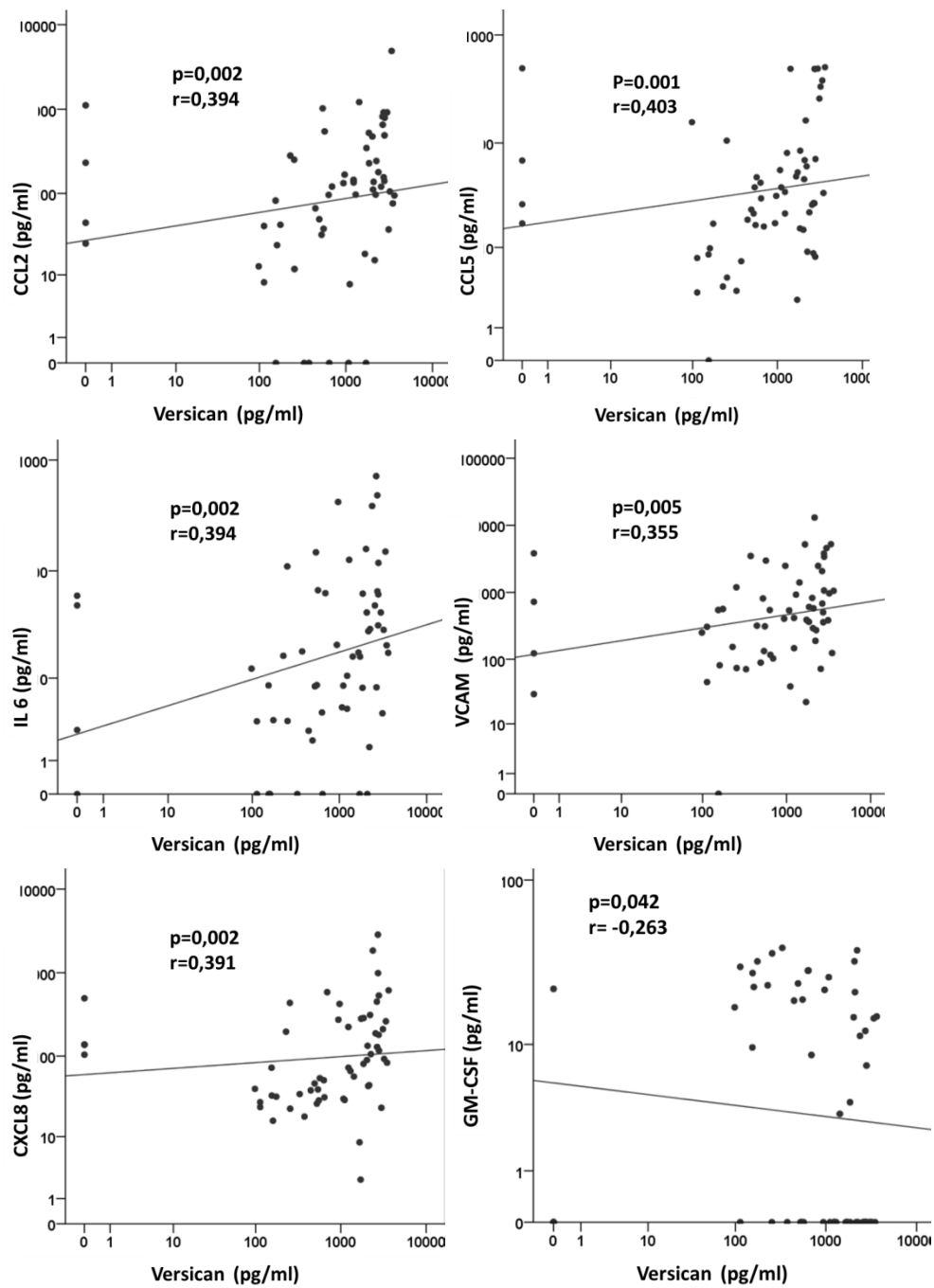
Variables avec un $p < 0,1$ en analyse univariée sont incluses dans l'analyse multivariés par la méthode de vraisemblance descendant, CI=95% intervalle de confiance

3.5. La concentration élevée de versican était significativement corrélée aux concentrations d'HGF, de CXCL4, de CCL2, de CCL5, de CXCL10, de GM-CSF, de G-CSF, de CXCL8, de G-CSF et d'Il6

Parmi les cytokines analysées, les concentrations d'HGF, de CCL4, de CXCL10, de G-CSF, de CCL5, d'IL-6, de CCL2, de CXCL8, de VCAM, de GM-CSF et de VEGF étaient significativement corrélées à la concentration de versican. Toutes ces cytokines, à l'exception de GM-CSF, présentent une concentration élevée en cas de concentration de versican élevé.

Figure 4





Corrélation entre la concentration de versican (pg/ml) et HGF, CCL4, CXCL10, G-CSF, CCL5, IL-6, CCL2, CXCL8, VCAM, GM-CSF et VEGF dans les surnageants de LBA (test de Rho Spearman)

3.6. Comparaisons des profils de cytokines selon la concentration de versican, et celle de TLR2 soluble dans les surnageants de LBA

Il existait une forte corrélation entre la concentration de versican et celle de la forme soluble de TLR2. Parmi les cytokines analysées, toutes étaient corrélées à TLR2s et versican sauf CXCL1 qui n'était ni corrélé à TLR2s, ni à versican.

Tableau III : corrélation entre cytokines et la forme soluble de TLR2 et versican

		CXCL1 0	CXCL8	HGF	VEGF	IL-6	G-CSF	GM- CSF	IFN γ	CCL4	CCL5	CCL2	CXCL1	VCAM
TLR2s	r	,475**	,169	,590**	,265*	,395**	,383**	-,277*	,242*	,389**	,226	,354**	-,110	,389**
	p	,000	,165	,000	,028	,001	,001	,021	,045	,001	,062	,003	,369	,001
	n	69	69	69	69	69	69	69	69	69	69	69	69	69
Versican	r	,448**	,391**	,618**	,256*	,394**	,432**	-,263*	,154	,571**	,403**	,394**	,135	,355**
	p	,000	,002	,000	,049	,002	,001	,042	,239	,000	,001	,002	,303	,005
	n	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60

** . La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).

* . La corrélation est significative au niveau 0,05 (bilatéral).

Discussion

Dans l'adénocarcinome lépidique, la concentration de versican mesurée dans le surnagent du LBA était significativement plus élevée dans les prélèvements tumoraux que normaux. La concentration de versican était associée de façon significative au stade métastatique, à l'inflammation alvéolaire à neutrophiles, aux cytokines pro-inflammatoires avec une tendance vers un pronostic défavorable.

Peu de données sont disponibles sur versican dans le cancer bronchopulmonaire. Dans une cohorte chirurgicale de 212 patients atteints de cancer bronchique, versican était exprimé essentiellement par les macrophages du stroma. Son score élevé, basé sur le nombre de cellules exprimant versican et leur intensité de marquage, était associé, à un stade tumoral plus avancé et à une diminution de la survie sans récurrence pour le sous-type adénocarcinome (Pirinen et al. 2005). L'analyse par immunohistochimie de versican devra être réalisée sur les prélèvements chirurgicaux de la cohorte d'ADL pour déterminer la source cellulaire de versican. L'expression de versican en immunohistochimie pourra être corrélée aux données cliniques, anatomopathologiques et pronostiques.

Dans un modèle murin de carcinome pulmonaire de Lewis (LLC), le versican a été identifié comme ligand de TLR2 (Kim et al. 2009a). Dans ce modèle, TLR2 jouait un rôle clé dans la progression tumorale (Kim et al. 2009a). Le versican induisait l'activation des macrophages par sa liaison à l'hétérodimère TLR2/TLR6 et stimulait la sécrétion de TNF- α et d'autres cytokines pro-inflammatoires.

Chez les patients atteints d'ADL, l'inflammation alvéolaire à neutrophiles favorise la progression tumorale par sécrétion d'HGF (Bellocq et al. 1998a)(Marie Wislez, Rabbe, et al.

2003). Le TLR2 était exprimé par les neutrophiles. Il est donc probable que le versican active les neutrophiles via TLR2. De façon intéressante, il existait une forte corrélation dans les surnageants de LBA entre la concentration de versican et celle de TLR2 clivé ($r=0,615$, $p<0,001$). Notre hypothèse est que le versican resterait fixé au fragment soluble de TLR2 après le clivage de TLR2.

La concentration de versican était également fortement corrélée à la concentration des calpaïne 1 extracellulaire (annexe 6). Le lien entre versican et calpaïne 1 extracellulaire reste à déterminer. Notre hypothèse est que la calpaïne 1 extracellulaire clive le complexe versican/TLR2.

Versican et TLR2 pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps bloquant TLR2 inhibait la croissance tumorale dans un modèle murin de mélanome (Yang, Cui, Liu, Mi, et al. 2009). De même, l'inhibition du versican par RhoGDI2 dans un modèle murin de cancer de la vessie métastatique entraîne une diminution de la croissance tumorale et de l'inflammation macrophagique au niveau des métastases pulmonaires (Said et al. 2012).

VI. Etude des calpaïnes dans un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire muté ras

Rationnel

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle des calpaïnes dans la progression tumorale dans un modèle murin d'ADC pulmonaire primitif muté pour KRAS (Kras^{LA1} sur fond génétique sv/129)(Johnson et al. 2001b). Dans ce modèle, un gène supplémentaire de KRAS ayant une mutation au niveau du codon 12 a été inséré. L'allèle ayant les 2 gènes, sauvage et muté, est inactivé. Au cours du développement de l'animal, il existe une recombinaison homologue entre ces 2 gènes conduisant à l'élimination de l'un d'entre eux et à l'activation du gène restant. Les expériences étaient réalisées sur des souris sauvages ou Kras^{LA1}, âgées de 3, 5, 7 et 9 mois. Avant sacrifice, un lavage broncho-alvéolaire (LBA) était effectué en injectant par voie trachéale de sérum physiologique.

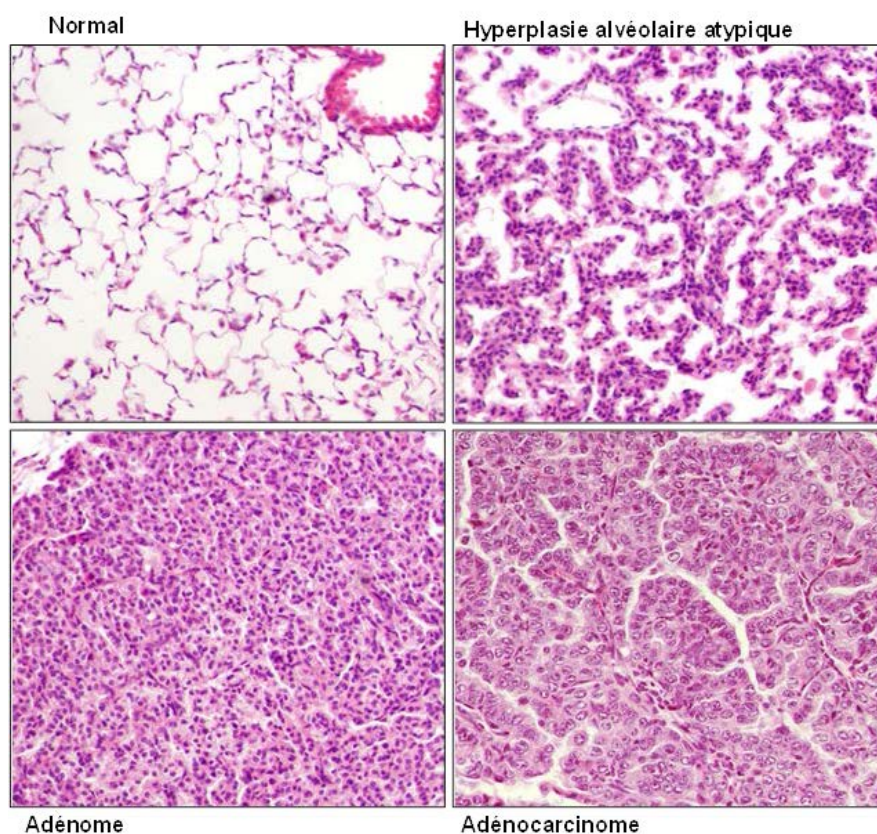
Les lignées LKR-10 et LKR-13, dérivées des tumeurs ADC de souris Kras^{LA1}, étaient utilisées pour les expériences in vitro.

Résultats

1. Analyse anatomopathologique

Dans le modèle murin muté KRAS, tous les animaux développaient des lésions d'ADC pulmonaires primitifs précédés d'hyperplasies alvéolaires atypiques et d'adénomes. Ces adénocarcinomes étaient responsables du décès par insuffisance respiratoire des animaux en 8 à 10 mois.

Figure 1 :

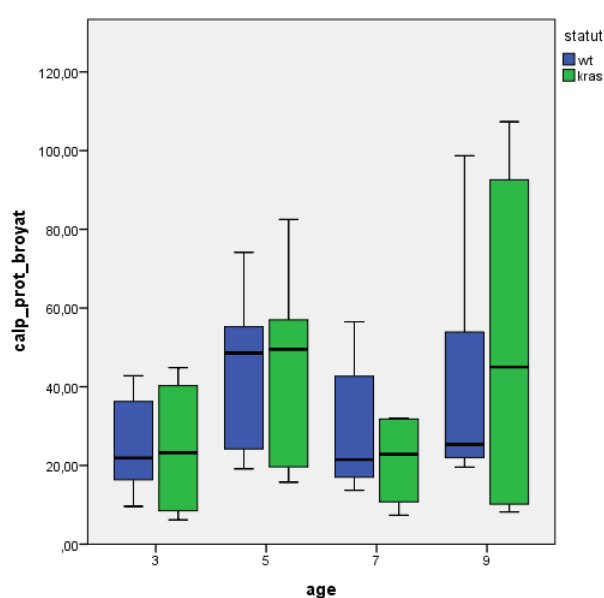


Souris Kras^{LA1}. Parenchyme pulmonaire normal, présence d'hyperplasie alvéolaire, adénome, puis d'adénocarcinome.

2. La concentration de calpaïne 1 intracellulaire était comparable dans le tissu sain et le tissu tumoral

La concentration de calpaïne 1 était mesurée par ELISA dans le broyat pulmonaire des souris sauvages et Kras^{LA1} de 3, 5, 7 et 9 mois. Le rapport des concentrations calpaïne 1/ protéines était comparable dans le poumon des souris Kras^{LA1} (n = 5) et des souris sauvages (n = 5) quel que soit leur âge.

Figure 2 :

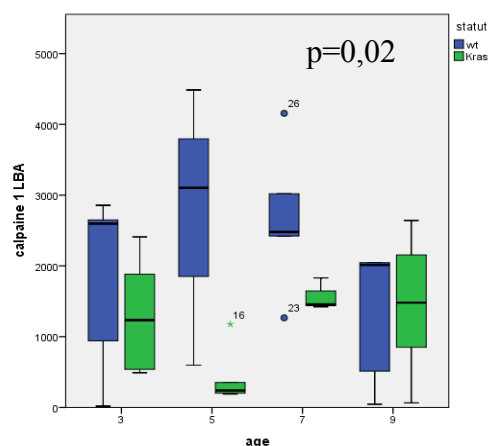


Rapport de la concentration de calpaïne 1 (pg/ml)/concentration de protéine totale (pg/ml) dans le broyat de poumon des souris sauvages (bleu) et Kras^{LA1} (vert) âgées de 3, 5, 7 et 9 mois.

3. La concentration de calpaïnes extracellulaires était significativement plus élevée dans le surnageant du LBA des souris sauvages comparée aux souris KRAS.

La concentration de calpaïne 1 était mesurée par ELISA dans le surnageant du LBA des souris $Kras^{LA1}$ et sauvages de 3, 5, 7 et 9 mois. La concentration de calpaïne 1 dans le surnageant du LBA était significativement moins élevée chez les souris $Kras^{LA1}$ comparées aux souris sauvages de 3, 5 et 7 mois (317 ± 164 vs 803 ± 401 ; $p=0,02$).

Figure 3 :

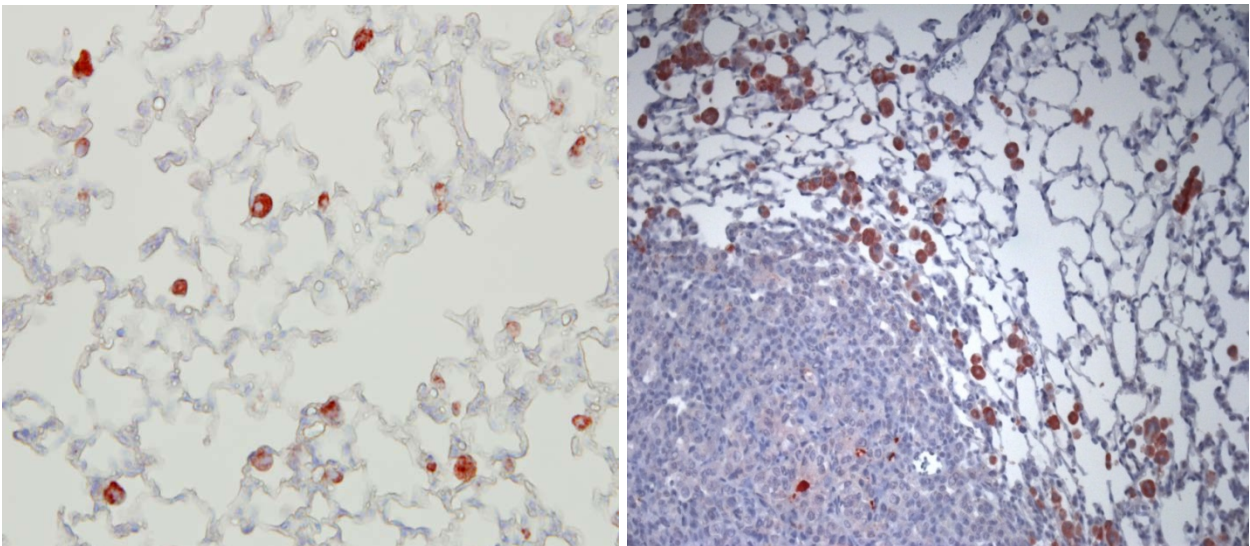


Concentration de calpaïne 1 (pg/ml) dans le surnageant de LBA de souris sauvages (WT, bleu) ou $Kras^{LA1}$ (vert) âgées de 3, 5, 7 et 9 mois

4. Etude de la calpaïne 1 intracellulaire par immunohistochimie dans le modèle murin

L'expression de la calpaïne 1 était intense au niveau des macrophages alvéolaires. Ces macrophages étaient rares au niveau du parenchyme pulmonaire sain et abondants au niveau du stroma péri-tumoral. Il n'y avait pas d'expression significative au niveau de l'épithélium bronchique ou des pneumocytes. Néanmoins, cette étude était réalisée avec un anticorps polyclonal de lapin. Aucun contrôle isotypique n'a pu être effectué. Le contrôle était effectué par omission de l'anticorps. Il n'y avait pas d'autres anticorps primaires disponibles pour étude sur modèle murin. Nous remettons en question ce résultat du fait de l'absence de contrôle isotypique.

Figure 4 :

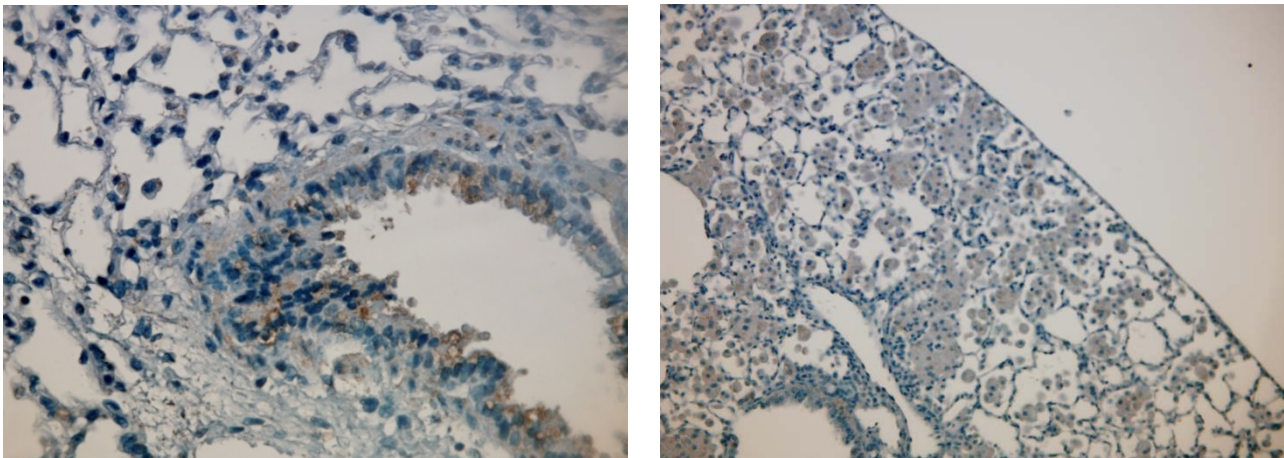


Immunohistochimie de la calpaïne 1 sur poumon de souris sauvage à gauche et Kras^{LA1} à droite

5. Etude de l'expression d'ABCA1 par immunohistochimie : transporteur de calpaïne ?

Pour étudier le mécanisme de sécrétion des calpaïnes 1, l'expression d'ABCA1 était réalisée par étude en immunohistochimie. L'expression était intense au niveau de la membrane des cellules épithéliales bronchiques et discret au niveau des pneumocytes. Au niveau des macrophages, un faible marquage cytoplasmique était trouvé. Néanmoins, cette étude était réalisée avec un anticorps polyclonal de lapin. Aucun contrôle isotypique n'a pu être effectué. Le contrôle était effectué par omission de l'anticorps. Il n'y avait pas d'autres anticorps primaires disponibles pour étude sur modèle murin.

Figure 5 :

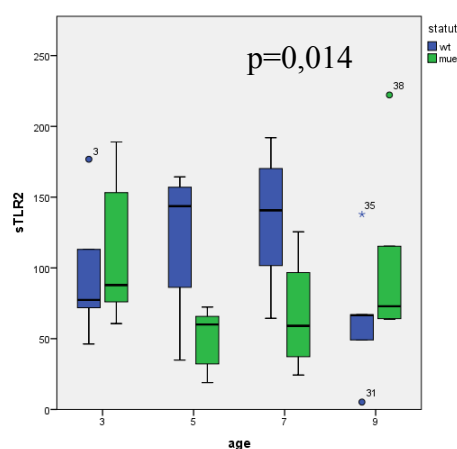


Immunohistochimie d'ABCA1 sur poumon de souris sauvage à droite et Kras^{LA1} à gauche

6. La concentration de TLR2 soluble était significativement plus élevée dans le surnageant du LBA de souris sauvages comparée aux souris KRAS.

Récemment l'équipe du Pr Baud a identifié dans les lymphocytes humains et murins le récepteur TLR2 comme cible des calpaïnes extracellulaires (Perez et al. 2015). La concentration de TLR2s était mesurée par ELISA dans le surnageant du LBA des souris sauvages et Kras^{LA1} de 3, 5, 7 et 9 mois. La concentration de TLR2s dans le surnageant du LBA était significativement moins élevée dans les souris Kras^{LA1} comparées aux souris sauvages de 3, 5 et 7 mois (67 +/-42 vs 123 +/-46 ; p=0,014).

Figure 6:

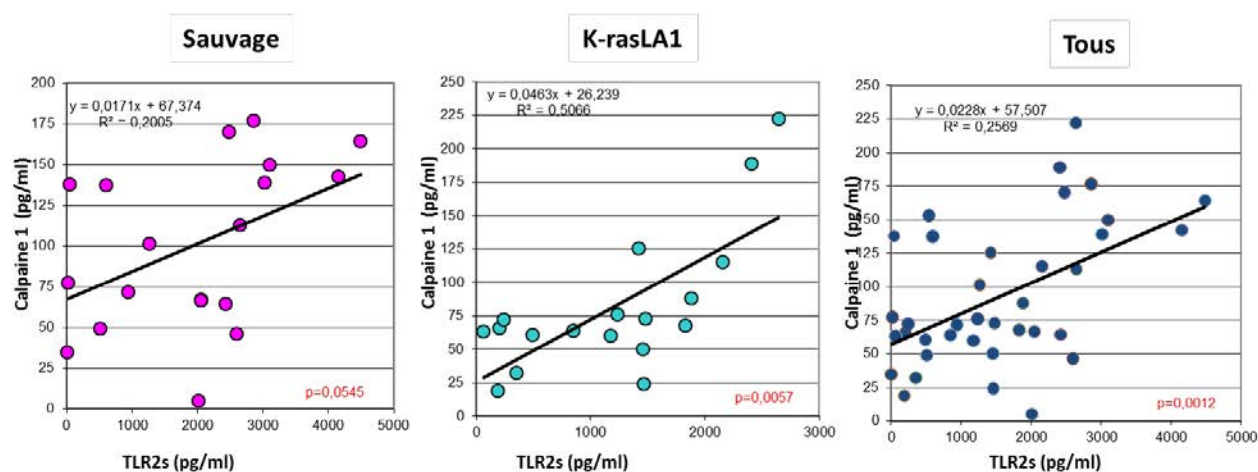


Concentration de TLR2s (pg/ml) dans le surnageant de LBA de souris sauvages (WT, bleu) ou Kras^{LA1} (vert) âgées de 3, 5, 7 et 9 mois

7. La concentration de calpaïne 1 était corrélée à la concentration de la forme soluble de TLR2 dans le surnageant du LBA de souris sauvages et de souris KRAS.

La corrélation des concentrations de calpaïne 1 et de TLR2s était très significative dans le surnageant du LBA des souris sauvages et Kras^{LA1} (p=0,001). Ceci suggère que le TLR2 est une cible pour les calpaïnes extracellulaires.

Figure 7 :



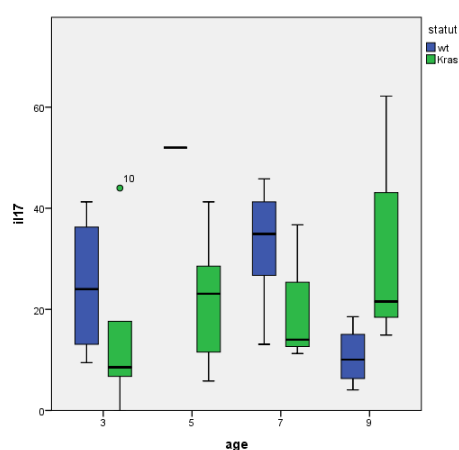
Corrélation entre la concentration de Calpaïne 1 (pg/ml) et TLR2s (pg/ml) dans les surnageants de LBA de souris sauvages (WT), Kras et tous (test de Rho Spearman)

8. La concentration d'IL 17 était comparable dans les surnageants du LBA des souris sauvages et KRAS

L'équipe du Pr Baud a montré dans les lymphocytes humains et murins que les calpaïnes extériorisées clivent le domaine extracellulaire de TLR2, limitant l'expression de cytokines, principalement l'interleukine-17 (Perez et al. 2015).

La concentration d'IL-17 n'était pas significativement différente dans les surnageants de LBA des souris $Kras^{LA1}$ comparées aux souris sauvages.

Figure 8:



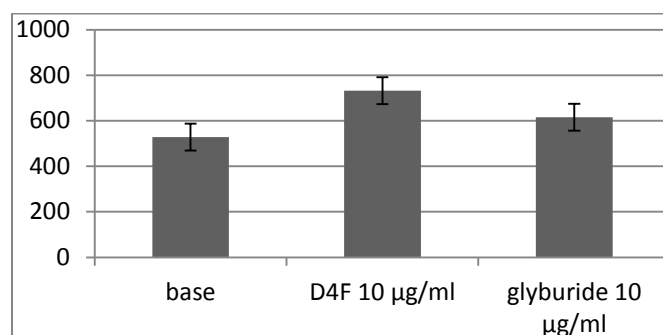
Concentration d'IL-17(pg/ml) dans le surnageant de LBA de souris sauvages (WT, bleu) ou $Kras^{LA1}$ (vert) âgées de 3, 5, 7 et 9 mois

9. Mesure de l'activité calpaïne *in vitro* sur les lignées cellulaires LKR10 et LKR13

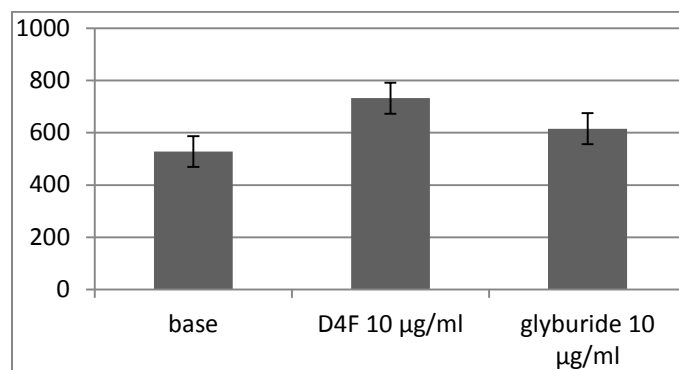
L'équipe du Pr Baud a montré dans les lymphocytes humains et murins que les calpaïnes étaient sécrétées par le transporteur ABCA1. Pour analyser les mécanismes d'extériorisation des calpaïnes dans les cellules dérivées d'ADC pulmonaire, des expériences étaient réalisées sur des cellules issues des lignées LKR10 et LKR13. Ces lignées étaient issues du modèle murin *Kras*^{LA1}. L'activité calpaïne était présente à la fois au niveau des cellules (intracellulaire) et de leur surnageant (extracellulaire). Aucune modulation pharmacologique par D4F (10 µg/ml), agoniste d'ABCA1, ou glibenclamide (100 µM), antagoniste d'ABCA1, n'était retrouvée.

Figure 9 : Mesure de l'activité calpaïne sur la lignée LKR-10

A. Activité calpaïne intracellulaire



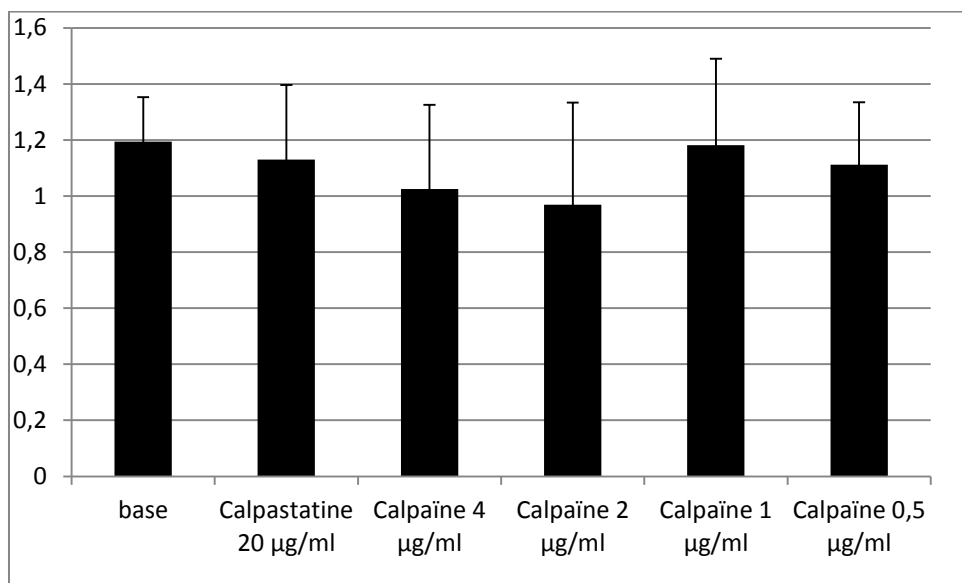
B. Activité calpaïne extracellulaire



10. Prolifération des lignées cellulaires LKR10 et LKR13

L'effet des calpaïnes sur la prolifération cellulaire reste controversé. Le traitement des cellules issues des lignées LKR10 et LKR13 par calpaïne 1 (0,5, 1, 2, 4 $\mu\text{g/ml}$) ou calpastatine (20 $\mu\text{g/ml}$), inhibiteur des calpaïnes, ne modifiait pas significativement la prolifération de ces cellules.

Figure 10 : Test de prolifération par incorporation du BRDU sur la lignée LKR-10



Discussion

L'expression intracellulaire de la calpaïne1 dans le poumon des souris sauvages et Kras^{LA1} était analysée par ELISA et était comparable entre les deux groupes de souris. La source des calpaïnes n'a pu être identifiée sur les prélèvements murins. En effet, l'anticorps utilisé en immunohistochimie était un anticorps polyclonal de lapin. Aucun contrôle isotypique n'était disponible. Il existait un doute sur un marquage macrophagique identifié sur les prélèvements tumoraux non spécifique. Ce marquage était beaucoup plus intense sur les prélèvements tumoraux, fortement inflammatoires, que les prélèvements de poumons normaux. Ce résultat obtenu en immunohistochimie était discordant avec le dosage ELISA sur les broyats pulmonaires qui ne montrait pas de différence de concentration de calpaïne 1 entre les prélèvements tumoraux et normaux. Une nouvelle analyse de calpaïne 1 sera réalisée en immunohistochimie avec un nouvel anticorps pour identifier la source cellulaire.

La concentration de calpaïne 1 et de TLR2s était moindre dans le LBA des souris Kras^{LA1} comparées aux souris sauvages. Ces résultats sont opposés à ceux rapportés dans la cohorte clinique (cf article 1). En effet dans l'ADL, la concentration de calpaïne 1 extracellulaire dosée dans le surnageant du LBA était significativement plus élevée dans les prélèvements tumoraux que normaux.

Enfin, se pose la question de savoir pourquoi nos observations faites sur un modèle murin diffèrent des résultats obtenus chez l'homme. Deux types d'arguments peuvent se discuter.

D'abord l'inflammation dans les modèles murins diffère de l'inflammation chez l'homme (Seok et al. 2013)(Hao et al. 2012a). Les modèles murins sont largement utilisés

pour identifier et tester des molécules inhibant la croissance tumorale. Cependant, peu de molécules ciblant l'inflammation ainsi identifiées ont montré par la suite une efficacité chez l'homme. La réaction inflammatoire aiguë entraîne des réponses génomiques similaires chez l'homme, cependant les réponses dans les modèles murins sont peu corrélées (Seok et al. 2013). Néanmoins une réaction inflammatoire à neutrophiles est rapporté dans le modèle murin d'ADL (Marie Wislez et al. 2006b).

Peut-être le modèle KRAS n'est pas adapté à l'étude de la progression tumorale due aux calpaïnes et TLR2 membranaire. En effet dans la cohorte humaine, les 5 tumeurs mutés *KRAS* se trouvent dans le groupe TLR2 bas, sans aucune dans le groupe TLR2 élevé ($p=0,041$) (cf article 1). La concentration de TLR2 est plus faible dans les ADL muté *KRAS* *versus* ADL non mutés, même si cette différence n'est pas statistiquement significative.

VII. DISCUSSION GENERALE

Dans notre étude portant sur une cohorte d'adénocarcinome lésionnel (ADL), la concentration de calpaïne 1 extracellulaire est associée de façon significative au stade tumoral métastatique, et au pronostic défavorable.

Ces données complètent les données publiées. Les calpaïnes extracellulaires ont été associées à la résolution de l'inflammation et la réparation des tissus (Frangié et al. 2006)(Xu et Deng 2004)(Perez et al. 2015). Aucune donnée portant sur les calpaïnes extracellulaires n'est disponible en cancérologie.

Notre hypothèse est que l'effet pronostique des calpaïnes 1 extracellulaires est médié par le clivage du récepteur membranaire TLR2 sur les neutrophiles, libérant des cytokines pro-inflammatoires associées à une progression tumorale des ADL. Néanmoins, la relation entre la forme soluble, qui présente souvent un rôle de rétrocontrôle négatif, et la forme membranaire de TLR2 reste à déterminer. Ces mécanismes doivent être confirmés par les tests *in vitro*.

Dans l'ADL, la concentration de versican était associée de façon significative au stade tumoral métastatique, à la réaction alvéolaire à neutrophiles, aux cytokines pro-inflammatoires avec une tendance vers un pronostic défavorable. Il est probable que le versican active les neutrophiles via TLR2. Ceci reste à démontrer.

De façon intéressante, il existe une forte corrélation dans les surnageants de LBA entre la concentration de versican et TLR2 clivé de même qu'entre la concentration de versican et celle des calpaïne 1 extracellulaire. Le mécanisme exact du lien entre les calpaïnes extracellulaires, versican et le récepteur membranaire TLR2 reste à étudier.

TLR2, une cible thérapeutique ?

Les données sont contradictoires. Dans un modèle murin de cancer bronchique ou de mélanome, TLR2 aurait un rôle dans la progression tumorale (Kim et al. 2009a) (Yang, Cui, Liu, Mi, et al. 2009). L'utilisation d'un anticorps bloquant TLR2 inhiberait la croissance tumorale (Yang, Cui, Liu, Mi, et al. 2009). TLR2 activé favoriserait l'apparition de cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes (myeloid derived suppressor cells, MDSC) qui sont des progéniteurs myéloïdes, précurseurs de macrophages (Srivastava et al. 2012). Les MDSC inhiberaient les lymphocytes T cytotoxiques, auraient un effet protumoral et seraient associées à un pronostic défavorable (Gabrilovich et Nagaraj 2009)(Ostrand-Rosenberg et Sinha 2009)(P.-H. Feng et al. 2012)(Liu et al. 2010).

D'autres équipes rapportent un rôle anti-tumoral de TLR2. TLR2 inhiberait la croissance tumorale en activant des lymphocytes T effecteurs, des cellules dendritiques ou les cellules naturelles tueuses NK(Zhang et al. 2011)(Asprodites et al. 2008). La présence de cellules NK, des lymphocytes effecteurs et des cellules dendritiques serait associée à un pronostic favorable dans le cancer bronchique.

Ainsi l'impact pronostique de TLR2 pourrait varier selon le type cellulaire. Il se pourrait que l'activation de TLR2 conduise à des effets tumoraux opposés, protumoral dans les macrophages, les cellules myéloïdes MDSC ou les polynucléaires neutrophiles et antitumoral dans les lymphocytes effecteurs (Maruyama et al. 2015)(Li et al. 2015)(Kim et al. 2009b)

Il reste à démontrer que le mécanisme calpaïne extracellulaire/TLR2 soit également impliqué dans la progression tumorale des CBNPC non lépidiques. Les macrophages associés aux tumeurs (TAM, tumor associated macrophages) peuvent composer jusqu'à 60 % du

stroma du cancer bronchique (Lievense et al. 2013). Au sein de ces TAM, deux types de population sont distinguées, M1 ou M2, du fait de fonctions opposées (Allavena et al. 2008)(Hao et al. 2012b). Ainsi les macrophages M1 sont des effecteurs immunologiques puissants ; schématiquement ils défendent l'hôte contre les infections virales, les infections microbiennes, ou les cellules transformées et seraient anti tumoraux, tandis que les macrophages M2 inhibent la réaction immunitaire, favorisent le remodelage tissulaire et l'angiogenèse et seraient protumoraux. Le rôle de l'activation de TLR2 sur les différents phénotypes de macrophages n'a pas encore été étudié.

L'inflammation à polynucléaires neutrophiles est réaction fréquente au cours des pathologies respiratoires chroniques, dont la bronchite chronique obstructive et la fibrose pulmonaire. La fibrose pulmonaire semble un modèle particulièrement intéressant pour l'étude calpaïne 1 extracellulaire, TLR2 et versican. La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie grave caractérisée par des lésions pulmonaires chroniques de pathogenèse indéterminée (Tabata, Tabata, et Nakano 2010)(Yang, Cui, Liu, Chen, et al. 2009). Dans un modèle de fibrose, la bléomycine, chimiothérapie pro-fibrogène et agoniste de TLR2, induit la maturation des cellules dendritiques et la libération de cytokines responsables de lésions inflammatoires puis de fibrose. Cette fibrose présente des dépôts abondants de protéoglycanes dont versican (Venkatesan et al. 2000). La calpeptine, inhibiteur de calpaïne intracellulaire, ou l'anticorps bloquant TLR2 semblent être prometteurs en protégeant les animaux contre la fibrose pulmonaire (Tabata, Tabata, et Nakano 2010)(Tabata, Tabata, et Nakano 2010)(Yang, Cui, Liu, Chen, et al. 2009). Il n'existe pas de données sur les calpaïnes extracellulaires et la fibrose pulmonaire.

VIII. Références

- « Afsset, INSERM. Expertise collective. Cancer et environnement. 2008. » 2008.
- Allavena, Paola, Antonio Sica, Graziella Solinas, Chiara Porta, et Alberto Mantovani. 2008. « The Inflammatory Micro-Environment in Tumor Progression: The Role of Tumor-Associated Macrophages ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 66 (1): 1-9. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.07.004.
- Arthur, J. S., J. S. Elce, C. Hegadorn, K. Williams, et P. A. Greer. 2000. « Disruption of the Murine Calpain Small Subunit Gene, Capn4: Calpain Is Essential for Embryonic Development but Not for Cell Growth and Division ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (12): 4474-81.
- Asprodites, Nicole, Liqin Zheng, Degui Geng, Cruz Velasco-Gonzalez, Luis Sanchez-Perez, et Eduardo Davila. 2008. « Engagement of Toll-like Receptor-2 on Cytotoxic T-Lymphocytes Occurs in Vivo and Augments Antitumor Activity ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (10): 3628-37. doi:10.1096/fj.08-108274.
- Baghdiguian, S., M. Martin, I. Richard, F. Pons, C. Astier, N. Bourg, R. T. Hay, et al. 1999. « Calpain 3 Deficiency Is Associated with Myonuclear Apoptosis and Profound Perturbation of the I κ B α /NF- κ B Pathway in Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A ». *Nature Medicine* 5 (5): 503-11. doi:10.1038/8385.
- Balkwill, F., et A. Mantovani. 2001. « Inflammation and Cancer: Back to Virchow? ». *Lancet* 357 (9255): 539-45. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
- Beau-Faller, Michèle, Hélène Blons, Caroline Domerg, Dorota Gajda, Nicolas Richard, Fabienne Escande, Jérôme Solassol, et al. 2014. « A Multicenter Blinded Study Evaluating EGFR and KRAS Mutation Testing Methods in the Clinical Non-Small Cell Lung Cancer Setting--IFCT/ERMETIC2 Project Part 1: Comparison of Testing Methods in 20 French Molecular Genetic National Cancer Institute Platforms ». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 16 (1): 45-55. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.07.009.
- Bellocq, A., M. Antoine, A. Flahault, C. Philippe, B. Crestani, J. F. Bernaudin, C. Mayaud, B. Milleron, L. Baud, et J. Cadranel. 1998a. « Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome ». *The American Journal of Pathology* 152 (1): 83-92.
- Bellocq, A., M. Antoine, A. Flahault, C. Philippe, B. Crestani, J. F. Bernaudin, C. Mayaud, B. Milleron, L. Baud, et J. Cadranel. 1998b. « Neutrophil Alveolitis in Bronchioloalveolar Carcinoma: Induction by Tumor-Derived Interleukin-8 and Relation to Clinical Outcome ». *The American Journal of Pathology* 152 (1): 83-92.
- Bellocq, A., S. Doublier, S. Suberville, J. Perez, B. Escoubet, B. Fouqueray, D. R. Puyol, et L. Baud. 1999. « Somatostatin Increases Glucocorticoid Binding and Signaling in

- Macrophages by Blocking the Calpain-Specific Cleavage of Hsp 90 ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (52): 36891-96.
- Boffetta, Paolo. 2004. « Epidemiology of Environmental and Occupational Cancer ». *Oncogene* 23 (38): 6392-6403. doi:10.1038/sj.onc.1207715.
- Boffetta, P, M Tubiana, C Hill, M Boniol, A Aurengo, R Masse, A-J Valleron, et al. 2009. « The causes of cancer in France ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20 (3): 550-55. doi:10.1093/annonc/mdn597.
- Bremnes, Roy M., Khalid Al-Shibli, Tom Donnem, Rafael Sirera, Samer Al-Saad, Sigve Andersen, Helge Stenvold, Carlos Camps, et Lill-Tove Busund. 2011. « The Role of Tumor-Infiltrating Immune Cells and Chronic Inflammation at the Tumor Site on Cancer Development, Progression, and Prognosis: Emphasis on Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (4): 824-33. doi:10.1097/JTO.0b013e3182037b76.
- Butler, Jonathan T., Supriti Samantaray, Craig C. Beeson, Swapan K. Ray, et Naren L. Banik. 2009. « Involvement of Calpain in the Process of Jurkat T Cell Chemotaxis ». *Journal of Neuroscience Research* 87 (3): 626-35. doi:10.1002/jnr.21882.
- Cadranel, Jacques, Anne-Marie Ruppert, Michèle Beau-Faller, et Marie Wislez. 2013. « Therapeutic Strategy for Advanced EGFR Mutant Non-Small-Cell Lung Carcinoma ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 88 (3): 477-93. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.06.009.
- Chen, F., L. M. Demers, V. Vallyathan, Y. Lu, V. Castranova, et X. Shi. 2000. « Impairment of NF-kappaB Activation and Modulation of Gene Expression by Calpastatin ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279 (3): C709-16.
- C Hill, Jouglu E, et Beck F. 2010. « Le point sur l'épidémie de cancer du poumon dû au tabagisme ». *Bulletin Epidémiologique hebdomadaire*, Le point sur l'épidémie de cancer du poumon dû au tabagisme, , n° 19-20 (mai): 210-13.
- Deshpande, R. V., J. M. Goust, A. K. Chakrabarti, E. Barbosa, E. L. Hogan, et N. L. Banik. 1995. « Calpain Expression in Lymphoid Cells. Increased mRNA and Protein Levels after Cell Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (6): 2497-2505.
- De Visser, Karin E., Alexandra Eichten, et Lisa M. Coussens. 2006. « Paradoxical Roles of the Immune System during Cancer Development ». *Nature Reviews. Cancer* 6 (1): 24-37. doi:10.1038/nrc1782.
- DOLL, R, et A B HILL. 1950. « Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report ». *British medical journal* 2 (4682): 739-48.
- Dourdin, N., A. K. Bhatt, P. Dutt, P. A. Greer, J. S. Arthur, J. S. Elce, et A. Huttenlocher. 2001. « Reduced Cell Migration and Disruption of the Actin Cytoskeleton in Calpain-Deficient Embryonic Fibroblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 48382-88. doi:10.1074/jbc.M108893200.

- Dourdin, N., J. J. Brustis, D. Balcerzak, N. Elamrani, S. Poussard, P. Cottin, et A. Ducastaing. 1997. « Myoblast Fusion Requires Fibronectin Degradation by Exteriorized M-Calpain ». *Experimental Cell Research* 235 (2): 385-94. doi:10.1006/excr.1997.3684.
- Dours-Zimmermann, M. T., et D. R. Zimmermann. 1994. « A Novel Glycosaminoglycan Attachment Domain Identified in Two Alternative Splice Variants of Human Versican ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (52): 32992-98.
- Dulay, Antonette T., Catalin S. Buhimschi, Guomao Zhao, Emily A. Oliver, Ayanda Mbele, Shichu Jing, et Irina A. Buhimschi. 2009. « Soluble TLR2 Is Present in Human Amniotic Fluid and Modulates the Intraamniotic Inflammatory Response to Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (11): 7244-53. doi:10.4049/jimmunol.0803517.
- Duruiseaux, Michael, Martine Antoine, Nathalie Rabbe, Virginie Poulot, Jocelyne Fleury-Feith, Thibault Vieira, Armelle Lavalé, Jacques Cadranel, et Marie Wislez. 2014. « The Impact of Intracytoplasmic Mucin in Lung Adenocarcinoma with Pneumonic Radiological Presentation ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 83 (3): 334-40. doi:10.1016/j.lungcan.2013.12.016.
- Dutt, Previn, Dorothy E. Croall, J. Simon C. Arthur, Teresa De Veyra, Karen Williams, John S. Elce, et Peter A. Greer. 2006. « M-Calpain Is Required for Preimplantation Embryonic Development in Mice ». *BMC Developmental Biology* 6: 3. doi:10.1186/1471-213X-6-3.
- Fallet, Vincent, Jacques Cadranel, Hélène Doubre, Cécile Toper, Isabelle Monnet, Thierry Chinet, Gérard Oliviero, et al. 2014. « Prospective Screening for ALK: Clinical Features and Outcome according to ALK Status ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 50 (7): 1239-46. doi:10.1016/j.ejca.2014.02.001.
- Feng, Po-Hao, Kang-Yun Lee, Ya-Ling Chang, Yao-Fei Chan, Lu-Wei Kuo, Ting-Yu Lin, Fu-Tsai Chung, et al. 2012. « CD14(+)S100A9(+) Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells and Their Clinical Relevance in Non-Small Cell Lung Cancer ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (10): 1025-36. doi:10.1164/rccm.201204-0636OC.
- Feng, Yan, Praveena S Thiagarajan, et Patrick C Ma. 2012. « MET Signaling: Novel Targeted Inhibition and Its Clinical Development in Lung Cancer ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 7 (2): 459-67. doi:10.1097/JTO.0b013e3182417e44.
- Franco, Santos J., et Anna Huttenlocher. 2005. « Regulating Cell Migration: Calpains Make the Cut ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 17): 3829-38. doi:10.1242/jcs.02562.
- Frangié, Carlos, Wenhui Zhang, Joëlle Perez, Yi-Chun Xu Dubois, Jean-Philippe Haymann, et Laurent Baud. 2006. « Extracellular Calpains Increase Tubular Epithelial Cell Mobility. Implications for Kidney Repair after Ischemia ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (36): 26624-32. doi:10.1074/jbc.M603007200.

- Gabrilovich, Dmitry I., et Srinivas Nagaraj. 2009. « Myeloid-Derived Suppressor Cells as Regulators of the Immune System ». *Nature Reviews. Immunology* 9 (3): 162-74. doi:10.1038/nri2506.
- Gardiner, Natasha, Sanjay Jogai, et Adam Wallis. 2014. « The Revised Lung Adenocarcinoma Classification-an Imaging Guide ». *Journal of Thoracic Disease* 6 (Suppl 5): S537-46. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.04.05.
- Garfield, David H., Jacques L. Cadranel, Marie Wislez, Wilbur A. Franklin, et Fred R. Hirsch. 2006. « The Bronchioloalveolar Carcinoma and Peripheral Adenocarcinoma Spectrum of Diseases ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 1 (4): 344-59.
- Goldstraw, Peter, John Crowley, Kari Chansky, Dorothy J Giroux, Patti A Groome, Ramon Rami-Porta, Pieter E Postmus, Valerie Rusch, et Leslie Sobin. 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 ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2 (8): 706-14. doi:10.1097/JTO.0b013e31812f3c1a.
- Goll, Darrell E., Valery Y F. Thompson, Hongqi Li, Wei Wei, et Jinyang Cong. 2003. « The Calpain System ». *Physiological Reviews* 83 (3): 731-801. doi:10.1152/physrev.00029.2002.
- Gonen, H., D. Shkedy, S. Barnoy, N. S. Kosower, et A. Ciechanover. 1997. « On the Involvement of Calpains in the Degradation of the Tumor Suppressor Protein p53 ». *FEBS Letters* 406 (1-2): 17-22.
- Gu, Jie, Feng-kai Xu, Guang-yin Zhao, Chun-lai Lu, Zong-wu Lin, Jian-yong Ding, et Di Ge. 2015. « Capn4 Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Progression via Upregulation of Matrix Metalloproteinase 2 ». *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 32 (3): 51. doi:10.1007/s12032-015-0500-7.
- Guroff, G. 1964. « A NEUTRAL, CALCIUM-ACTIVATED PROTEINASE FROM THE SOLUBLE FRACTION OF RAT BRAIN ». *The Journal of Biological Chemistry* 239 (janvier): 149-55.
- Han, Y., S. Weinman, I. Boldogh, R. K. Walker, et A. R. Brasier. 1999. « Tumor Necrosis Factor-Alpha-Inducible IkappaBalpha Proteolysis Mediated by Cytosolic M-Calpain. A Mechanism Parallel to the Ubiquitin-Proteasome Pathway for Nuclear Factor-Kappab Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 787-94.
- Hao, Ning-Bo, Mu-Han Lü, Ya-Han Fan, Ya-Ling Cao, Zhi-Ren Zhang, et Shi-Ming Yang. 2012a. « Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors ». *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1-11. doi:10.1155/2012/948098.
- Henrick, Bethany M., Xiao-Dan Yao, Anna G. Drannik, Alash'le Abimiku, Kenneth L. Rosenthal, et INFANT Study Team. 2014. « Soluble Toll-like Receptor 2 Is Significantly Elevated in HIV-1 Infected Breast Milk and Inhibits HIV-1 Induced

- Cellular Activation, Inflammation and Infection ». *AIDS (London, England)* 28 (14): 2023-32. doi:10.1097/QAD.0000000000000381.
- Hill, Catherine. 2012. « [Tobacco epidemiology] ». *La Revue du praticien* 62 (3): 325, 327-29.
- Imam, Sarah A., Mary K. Guyton, Azizul Haque, Arthur Vandembark, William R. Tyor, Swapan K. Ray, et Naren L. Banik. 2007. « Increased Calpain Correlates with Th1 Cytokine Profile in PBMCs from MS Patients ». *Journal of Neuroimmunology* 190 (1-2): 139-45. doi:10.1016/j.jneuroim.2007.07.016.
- Johnson, L, K Mercer, D Greenbaum, R T Bronson, D Crowley, D A Tuveson, et T Jacks. 2001a. « Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice ». *Nature* 410 (6832): 1111-16. doi:10.1038/35074129.
- Khuder, S A. 2001. « Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis ». *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 31 (2-3): 139-48.
- Kim, Sunhwa, et Michael Karin. 2011. « Role of TLR2-Dependent Inflammation in Metastatic Progression ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1217 (janvier): 191-206. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05882.x.
- Kim, Sunhwa, Hiroyuki Takahashi, Wan-Wan Lin, Pascal Descargues, Sergei Grivennikov, Youngjun Kim, Jun-Li Luo, et Michael Karin. 2009a. « Carcinoma-Produced Factors Activate Myeloid Cells through TLR2 to Stimulate Metastasis ». *Nature* 457 (7225): 102-6. doi:10.1038/nature07623.
- Kimura, Y., H. Koga, N. Araki, N. Mugita, N. Fujita, H. Takeshima, T. Nishi, et al. 1998. « The Involvement of Calpain-Dependent Proteolysis of the Tumor Suppressor NF2 (merlin) in Schwannomas and Meningiomas ». *Nature Medicine* 4 (8): 915-22.
- Knepper-Nicolai, B., J. Savill, et S. B. Brown. 1998. « Constitutive Apoptosis in Human Neutrophils Requires Synergy between Calpains and the Proteasome Downstream of Caspases ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30530-36.
- Knudson, W., C. Biswas, et B. P. Toole. 1984. « Interactions between Human Tumor Cells and Fibroblasts Stimulate Hyaluronate Synthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (21): 6767-71.
- Koller, B., R. Bals, D. Roos, H. C. Korting, M. Griesse, et D. Hartl. 2009. « Innate Immune Receptors on Neutrophils and Their Role in Chronic Lung Disease ». *European Journal of Clinical Investigation* 39 (7): 535-47. doi:10.1111/j.1365-2362.2009.02145.x.
- LeBouder, Emmanuel, Julia E. Rey-Nores, Neil K. Rushmere, Martin Grigorov, Stephen D. Lawn, Michael Affolter, George E. Griffin, et al. 2003. « Soluble Forms of Toll-like Receptor (TLR)2 Capable of Modulating TLR2 Signaling Are Present in Human Plasma and Breast Milk ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (12): 6680-89.

- « Les données - Institut National Du cancer ». 2011. Consulté le décembre 6.
<http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-indicateurs/21-epidemiologie/30-survie-prevalence/33-epidemiologie-du-cancer-du-poumon-en-france-metropolitaine-prevalence-et-survie/82-survie-relative-a-5-ans-des-patients-atteints-dun-cancer-de.html>.
- Letavernier, Emmanuel, Boris Dansou, Matthias Lochner, Joëlle Perez, Agnès Bellocq, Maja T Lindenmeyer, Clemens D Cohen, Jean-Philippe Haymann, Gérard Eberl, et Laurent Baud. 2011a. « Critical Role of the Calpain/calpastatin Balance in Acute Allograft Rejection ». *European Journal of Immunology* 41 (2): 473-84. doi:10.1002/eji.201040437.
- Letavernier, Emmanuel, Lara Zafrani, Joëlle Perez, Béatrice Letavernier, Jean-Philippe Haymann, et Laurent Baud. 2012. « The Role of Calpains in Myocardial Remodelling and Heart Failure ». *Cardiovascular Research* 96 (1): 38-45. doi:10.1093/cvr/cvs099.
- Lievens, L A, K Bezemer, J G J V Aerts, et J P J J Hegmans. 2013. « Tumor-Associated Macrophages in Thoracic Malignancies ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 80 (3): 256-62. doi:10.1016/j.lungcan.2013.02.017.
- Liew, Foo Y., Damo Xu, Elizabeth K. Brint, et Luke A. J. O'Neill. 2005. « Negative Regulation of Toll-like Receptor-Mediated Immune Responses ». *Nature Reviews. Immunology* 5 (6): 446-58. doi:10.1038/nri1630.
- Linardou, Helena, Issa J Dahabreh, Dimitra Kanakloupiti, Fotios Siannis, Dimitrios Bafaloukos, Paris Kosmidis, Christos A Papadimitriou, et Samuel Murray. 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 ». *The Lancet Oncology* 9 (10): 962-72. doi:10.1016/S1470-2045(08)70206-7.
- Li, Shinan, Rui Sun, Yongyan Chen, Haiming Wei, et Zhigang Tian. 2015. « TLR2 Limits Development of Hepatocellular Carcinoma by Reducing IL18-Mediated Immunosuppression ». *Cancer Research* 75 (6): 986-95. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2371.
- Liu, Chien-Ying, Yu-Min Wang, Chih-Liang Wang, Po-Hao Feng, How-Wen Ko, Yun-Hen Liu, Yi-Cheng Wu, et al. 2010. « Population Alterations of L-Arginase- and Inducible Nitric Oxide Synthase-Expressed CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/CD33⁺ Myeloid-Derived Suppressor Cells and CD8⁺ T Lymphocytes in Patients with Advanced-Stage Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 136 (1): 35-45. doi:10.1007/s00432-009-0634-0.
- Mantovani, Alberto, Paola Allavena, Antonio Sica, et Frances Balkwill. 2008. « Cancer-Related Inflammation ». *Nature* 454 (7203): 436-44. doi:10.1038/nature07205.
- Maruyama, Akira, Hiroaki Shime, Yohei Takeda, Masahiro Azuma, Misako Matsumoto, et Tsukasa Seya. 2015. « Pam2 Lipopeptides Systemically Increase Myeloid-Derived Suppressor Cells through TLR2 Signaling ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457 (3): 445-50. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.011.

- Mascaux, C, N Iannino, B Martin, M Paesmans, T Berghmans, M Dusart, A Haller, et al. 2005. « The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis ». *British Journal of Cancer* 92 (1): 131-39. doi:10.1038/sj.bjc.6602258.
- McGowan, E. B., K. T. Yeo, et T. C. Detwiler. 1983. « The Action of Calcium-Dependent Protease on Platelet Surface Glycoproteins ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 227 (1): 287-301.
- McLeer-Florin, Anne, Denis Moro-Sibilot, Adrien Melis, Dimitri Salameire, Christine Lefebvre, Françoise Ceccaldi, Florence de Fraipont, Elisabeth Brambilla, et Sylvie Lantuejoul. 2011. « Dual IHC and FISH Testing for ALK Gene Rearrangement in Lung Adenocarcinomas in a Routine Practice: A French Study ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, novembre. doi:10.1097/JTO.0b013e3182381535.
- Mellgren, R. L., E. Shaw, et M. T. Mericle. 1994. « Inhibition of Growth of Human TE2 and C-33A Cells by the Cell-Permeant Calpain Inhibitor Benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr Diazomethyl Ketone ». *Experimental Cell Research* 215 (1): 164-71. doi:10.1006/excr.1994.1328.
- Mok, Tony S, Yi-Long Wu, Sumitra Thongprasert, Chih-Hsin Yang, Da-Tong Chu, Nagahiro Saijo, Patrapim Sunpaweravong, et al. 2009. « Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma ». *The New England Journal of Medicine* 361 (10): 947-57. doi:10.1056/NEJMoa0810699.
- Murphy, Catherine, Maryalice McGurk, Johanna Pettigrew, Alfredo Santinelli, Roberta Mazzucchelli, Patrick G. Johnston, Rodolfo Montironi, et David J. J. Waugh. 2005. « Nonapical and Cytoplasmic Expression of Interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 Correlates with Cell Proliferation and Microvessel Density in Prostate Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (11): 4117-27. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1518.
- Ostrand-Rosenberg, Suzanne, et Pratima Sinha. 2009. « Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (8): 4499-4506. doi:10.4049/jimmunol.0802740.
- Peltier, Julie, Agnès Bellocq, Joëlle Perez, Sophie Doublier, Yi-Chun Xu Dubois, Jean-Philippe Haymann, Giovanni Camussi, et Laurent Baud. 2006. « Calpain Activation and Secretion Promote Glomerular Injury in Experimental Glomerulonephritis: Evidence from Calpastatin-Transgenic Mice ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17 (12): 3415-23. doi:10.1681/ASN.2006050542.
- Perez, Joelle, Boris Dansou, Roxane Herve, Charlene Levi, Tamouza Houda, et Laurent Baud. 2015. « Calpains released by T Lymphocytes cleave TLR2 to control IL-17 expression. » in review.
- Peto, R, S Darby, H Deo, P Silcocks, E Whitley, et R Doll. 2000. « Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies ». *BMJ (Clinical research ed.)* 321 (7257): 323-29.

- Pirinen, Risto, Tero Leinonen, Jan Böhm, Risto Johansson, Kirsi Ropponen, Eero Kumpulainen, et Veli-Matti Kosma. 2005. « Versican in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis ». *Human Pathology* 36 (1): 44-50. doi:10.1016/j.humpath.2004.10.010.
- Pontremoli, S., E. Melloni, G. Damiani, F. Salamino, B. Sparatore, M. Michetti, et B. L. Horecker. 1988. « Effects of a Monoclonal Anti-Calpain Antibody on Responses of Stimulated Human Neutrophils. Evidence for a Role for Proteolytically Modified Protein Kinase C ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (4): 1915-19.
- Raaschou-Nielsen, Ole, Zorana J. Andersen, Rob Beelen, Evangelia Samoli, Massimo Stafoggia, Gudrun Weinmayr, Barbara Hoffmann, et al. 2013. « Air Pollution and Lung Cancer Incidence in 17 European Cohorts: Prospective Analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE) ». *The Lancet. Oncology* 14 (9): 813-22. doi:10.1016/S1470-2045(13)70279-1.
- Raimbourg, Quentin, Joëlle Perez, Sophie Vandermeersch, Aurélie Prignon, Guillaume Hanouna, Jean-Philippe Haymann, Laurent Baud, et Emmanuel Letavernier. 2013. « The Calpain/calpastatin System Has Opposing Roles in Growth and Metastatic Dissemination of Melanoma ». *PloS One* 8 (4): e60469. doi:10.1371/journal.pone.0060469.
- Rakoff-Nahoum, Seth, et Ruslan Medzhitov. 2009. « Toll-like Receptors and Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 9 (1): 57-63. doi:10.1038/nrc2541.
- Remark, Romain, Christian Becker, Jorge E. Gomez, Diane Damotte, Marie-Caroline Dieu-Nosjean, Catherine Sautès-Fridman, Wolf-Herman Fridman, et al. 2014. « The Non-Small Cell Lung Cancer Immune Contexture. A Major Determinant of Tumor Characteristics and Patient Outcome ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (4): 377-90. doi:10.1164/rccm.201409-1671PP.
- Rizzo, Stefania, Francesco Petrella, Valentina Buscarino, Federica De Maria, Sara Raimondi, Massimo Barberis, Caterina Fumagalli, et al. 2015. « CT Radiogenomic Characterization of EGFR, K-RAS, and ALK Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer ». *European Radiology*, mai. doi:10.1007/s00330-015-3814-0.
- Robinson, Lary A., John C. Ruckdeschel, Henry Wagner, et Craig W. Stevens. 2007. « Treatment of Non-small Cell Lung Cancer-Stage IIIA* ». *Chest* 132 (3 suppl): 243S - 265S. doi:10.1378/chest.07-1379.
- Rosell, Rafael, Enric Carcereny, Radj Gervais, Alain Vergnenegre, Bartomeu Massuti, Enriqueta Felip, Ramon Palmero, et al. 2012. « Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial ». *The Lancet Oncology*, janvier. doi:10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
- Ruppert, A-M, M Beau-Faller, L Belmont, A Lavolé, V Gounant, J Cadranet, et M Wislez. 2011. « [A simple view on lung cancer biology: the MET pathway] ». *Revue des maladies respiratoires* 28 (10): 1241-49. doi:10.1016/j.rmr.2011.05.014.

- Ruppert, A-M, M Wislez, V Poulot, R Lacave, M Antoine, et J Cadranel. 2011. « [A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway] ». *Revue des maladies respiratoires* 28 (4): 565-77. doi:10.1016/j.rmr.2011.03.005.
- Ruppert, Anne-Marie, Martine Antoine, Michèle Beau-Faller, Jacques Cadranel, et Marie Wislez. 2012. « [Which platform to support a personalized lung cancer treatment?] ». *Bulletin du cancer* 99 (5): 529-34. doi:10.1684/bdc.2012.1582.
- Said, Neveen, Marta Sanchez-Carbayo, Steven C. Smith, et Dan Theodorescu. 2012. « RhoGDI2 Suppresses Lung Metastasis in Mice by Reducing Tumor Versican Expression and Macrophage Infiltration ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (4): 1503-18. doi:10.1172/JCI61392.
- Scagliotti, Giorgio Vittorio, Purvish Parikh, Joachim von Pawel, Bonne Biesma, Johan Vansteenkiste, Christian Manegold, Piotr Serwatowski, et al. 2008. « Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer ». *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (21): 3543-51. doi:10.1200/JCO.2007.15.0375.
- Schád, Eva, Attila Farkas, Gáspár Jékely, Peter Tompa, et Peter Friedrich. 2002. « A Novel Human Small Subunit of Calpains ». *The Biochemical Journal* 362 (Pt 2): 383-88.
- Schaecher, K. E., J. M. Goust, et N. L. Banik. 2001. « The Effects of Calpain Inhibition upon IL-2 and CD25 Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells ». *Journal of Neuroimmunology* 119 (2): 333-42.
- Schiller, Joan H., David Harrington, Chandra P. Belani, Corey Langer, Alan Sandler, James Krook, Junming Zhu, David H. Johnson, et Eastern Cooperative Oncology Group. 2002. « Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 346 (2): 92-98. doi:10.1056/NEJMoa011954.
- Schollmeyer, J. E. 1988. « Calpain II Involvement in Mitosis ». *Science (New York, N.Y.)* 240 (4854): 911-13.
- Seok, Junhee, H. Shaw Warren, Alex G. Cuenca, Michael N. Mindrinos, Henry V. Baker, Weihong Xu, Daniel R. Richards, et al. 2013. « Genomic Responses in Mouse Models Poorly Mimic Human Inflammatory Diseases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (9): 3507-12. doi:10.1073/pnas.1222878110.
- Sequist, L V, R S Heist, A T Shaw, P Fidias, R Rosovsky, J S Temel, I T Lennes, et al. 2011. « Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22 (12): 2616-24. doi:10.1093/annonc/mdr489.
- Shaw, Alice T., Dong-Wan Kim, Kazuhiko Nakagawa, Takashi Seto, Lucio Crinó, Myung-Ju Ahn, Tommaso De Pas, et al. 2013. « Crizotinib versus Chemotherapy in Advanced ALK-Positive Lung Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 368 (25): 2385-94. doi:10.1056/NEJMoa1214886.

- Shiels, Meredith S., Hormuzd A. Katki, Neal D. Freedman, Mark P. Purdue, Nicolas Wentzensen, Britton Trabert, Cari M. Kitahara, et al. 2014. « Cigarette Smoking and Variations in Systemic Immune and Inflammation Markers ». *Journal of the National Cancer Institute* 106 (11). doi:10.1093/jnci/dju294.
- Shumway, S. D., M. Maki, et S. Miyamoto. 1999. « The PEST Domain of IkappaBalpha Is Necessary and Sufficient for in Vitro Degradation by Mu-Calpain ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (43): 30874-81.
- Smith, C. J., T. A. Perfetti, R. Garg, et C. Hansch. 2003. « IARC Carcinogens Reported in Cigarette Mainstream Smoke and Their Calculated Log P Values ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 41 (6): 807-17.
- Soda, Manabu, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Shuji Takada, Yoshihiro Yamashita, Shunpei Ishikawa, Shin-ichiro Fujiwara, et al. 2007. « Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer ». *Nature* 448 (7153): 561-66. doi:10.1038/nature05945.
- Soria, J.-C., A. Mauguen, M. Reck, A. B. Sandler, N. Saijo, D. H. Johnson, D. Burcoveanu, et al. 2013. « Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised, Phase II/III Trials Adding Bevacizumab to Platinum-Based Chemotherapy as First-Line Treatment in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 24 (1): 20-30. doi:10.1093/annonc/mds590.
- Sorimachi, H., et K. Suzuki. 2001. « The Structure of Calpain ». *Journal of Biochemistry* 129 (5): 653-64.
- Srivastava, Minu K., Åsa Andersson, Li Zhu, Marni Harris-White, Jay M. Lee, Steven Dubinett, et Sherven Sharma. 2012. « Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer ». *Immunotherapy* 4 (3): 291-304. doi:10.2217/imt.11.178.
- Storr, Sarah J., Neil O. Carragher, Margaret C. Frame, Tim Parr, et Stewart G. Martin. 2011. « The Calpain System and Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 11 (5): 364-74. doi:10.1038/nrc3050.
- Storr, Sarah J., Xuan Pu, Jillian Davis, Dileep Lobo, Alex M Reece-Smith, Simon L Parsons, Srinivasan Madhusudan, et Stewart G Martin. 2013. « Expression of the Calpain System Is Associated with Poor Clinical Outcome in Gastro-Oesophageal Adenocarcinomas ». *Journal of Gastroenterology* 48 (11): 1213-21. doi:10.1007/s00535-012-0743-4.
- Storr, Sarah J., Sabreena Safuan, Caroline M. Woolston, Tarek Abdel-Fatah, Suha Deen, Stephen Y. Chan, et Stewart G. Martin. 2012. « Calpain-2 Expression Is Associated with Response to Platinum Based Chemotherapy, Progression-Free and Overall Survival in Ovarian Cancer ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16 (10): 2422-28. doi:10.1111/j.1582-4934.2012.01559.x.
- Storr, Sarah J., Caroline M. Woolston, Fabricio F. T. Barros, Andrew R. Green, Mohamed Shehata, Stephen Y. Chan, Ian O. Ellis, et Stewart G. Martin. 2011. « Calpain-1

- Expression Is Associated with Relapse-Free Survival in Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab Following Adjuvant Chemotherapy ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 129 (7): 1773-80. doi:10.1002/ijc.25832.
- Storr, Sarah J, Abed M Zaitoun, Arvind Arora, Lindy G Durrant, Dileep N Lobo, Srinivasan Madhusudan, et Stewart G Martin. 2012. « Calpain System Protein Expression in Carcinomas of the Pancreas, Bile Duct and Ampulla ». *BMC Cancer* 12: 511. doi:10.1186/1471-2407-12-511.
- Storr, S J, K W Lee, C M Woolston, S Safuan, A R Green, R D Macmillan, A Benhasouna, T Parr, I O Ellis, et S G Martin. 2012. « Calpain System Protein Expression in Basal-like and Triple-Negative Invasive Breast Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23 (9): 2289-96. doi:10.1093/annonc/mds176.
- Su, Yunchao, Zhaoqiang Cui, Zhaozhong Li, et Edward R. Block. 2006. « Calpain-2 Regulation of VEGF-Mediated Angiogenesis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (9): 1443-51. doi:10.1096/fj.05-5354com.
- Suzuki, K., K. Shimizu, T. Hamamoto, Y. Nakagawa, T. Murachi, et T. Yamamuro. 1992. « Characterization of Proteoglycan Degradation by Calpain ». *The Biochemical Journal* 285 (Pt 3) (août): 857-62.
- Tabata, C., R. Tabata, et T. Nakano. 2010. « The Calpain Inhibitor Calpeptin Prevents Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice ». *Clinical and Experimental Immunology* 162 (3): 560-67. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04257.x.
- Tomassetti, Sara, Christian Gurioli, Jay H. Ryu, Paul A. Decker, Claudia Ravaglia, Paola Tantalocco, Matteo Buccioli, et al. 2015. « The Impact of Lung Cancer on Survival of Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Chest* 147 (1): 157-64. doi:10.1378/chest.14-0359.
- Travis, William D, Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G Nicholson, Kim R Geisinger, Yasushi Yatabe, David G Beer, et al. 2011. « International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 6 (2): 244-85. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221.
- Travis, William D., et International Agency for Research on Cancer. 2004. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC.
- Travis, William D., Kavita Garg, Wilbur A. Franklin, Ignacio I. Wistuba, Bradley Sabloff, Masayuki Noguchi, Ryutaro Kakinuma, et al. 2005. « Evolving Concepts in the Pathology and Computed Tomography Imaging of Lung Adenocarcinoma and Bronchioloalveolar Carcinoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (14): 3279-87. doi:10.1200/JCO.2005.15.776.

- Tsuta, K., T. Kohno, A. Yoshida, Y. Shimada, H. Asamura, K. Furuta, et R. Kushima. 2014. « RET-Rearranged Non-Small-Cell Lung Carcinoma: A Clinicopathological and Molecular Analysis ». *British Journal of Cancer* 110 (6): 1571-78. doi:10.1038/bjc.2014.36.
- Van der Deen, Margaretha, Elisabeth G. E. de Vries, Wim Timens, Rik J. Scheper, Hetty Timmer-Bosscha, et Dirkje S. Postma. 2005. « ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Normal and Pathological Lung ». *Respiratory Research* 6: 59. doi:10.1186/1465-9921-6-59.
- Venkatesan, N., T. Ebihara, P. J. Roughley, et M. S. Ludwig. 2000. « Alterations in Large and Small Proteoglycans in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 (6): 2066-73. doi:10.1164/ajrccm.161.6.9909098.
- Warth, Arne, Thomas Muley, Hendrik Dienemann, Benjamin Goeppert, Albrecht Stenzinger, Philipp A. Schnabel, Peter Schirmacher, Roland Penzel, et Wilko Weichert. 2014. « ROS1 Expression and Translocations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Clinicopathological Analysis of 1478 Cases ». *Histopathology* 65 (2): 187-94. doi:10.1111/his.12379.
- Wight, Thomas N., Inkyung Kang, et Mervyn J. Merrilees. 2014. « Versican and the Control of Inflammation ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 35 (avril): 152-61. doi:10.1016/j.matbio.2014.01.015.
- Wislez, Marie, Martine Antoine, Laurence Baudrin, Virginie Poulot, Agnes Neuville, Maryvonne Pradere, Elisabeth Longchamp, Sylvie Isaac-Sibille, Marie-Paule Lebitasy, et Jacques Cadranel. 2010. « Non-Mucinous and Mucinous Subtypes of Adenocarcinoma with Bronchioloalveolar Carcinoma Features Differ by Biomarker Expression and in the Response to Gefitinib ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 68 (2): 185-91. doi:10.1016/j.lungcan.2009.05.021.
- Wislez, Marie, Martine Antoine, Nathalie Rabbe, Valérie Gounant, Virginie Poulot, Armelle Lavolé, Jocelyne Fleury-Feith, et Jacques Cadranel. 2007. « Neutrophils promote aerogenous spread of lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features ». *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (12): 3518-27. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2558.
- Wislez, Marie, Nobukazu Fujimoto, Julie G Izzo, Amy E Hanna, Dianna D Cody, Robert R Langley, Hongli Tang, et al. 2006a. « High expression of ligands for chemokine receptor CXCR2 in alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic kras ». *Cancer research* 66 (8): 4198-4207. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3842.
- Wislez, Marie, Marie-Ange Massiani, Bernard Milleron, Abdelkader Souidi, Marie-France Carette, Martine Antoine, et Jacques Cadranel. 2003a. « Clinical characteristics of pneumonic-type adenocarcinoma of the lung ». *Chest* 123 (6): 1868-77.
- Wislez, Marie, Nathalie Rabbe, Joëlle Marchal, Bernard Milleron, Bruno Crestani, Charles Mayaud, Martine Antoine, Paul Soler, et Jacques Cadranel. 2003. « Hepatocyte Growth Factor Production by Neutrophils Infiltrating Bronchioloalveolar Subtype

- Pulmonary Adenocarcinoma: Role in Tumor Progression and Death ». *Cancer Research* 63 (6): 1405-12.
- Wislez, M., J. Fleury-Feith, N. Rabbe, J. Moreau, D. Cesari, B. Milleron, C. Mayaud, M. Antoine, P. Soler, et J. Cadranet. 2001. « Tumor-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Prolong the Survival of Neutrophils Infiltrating Bronchoalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma ». *The American Journal of Pathology* 159 (4): 1423-33. doi:10.1016/S0002-9440(10)62529-1.
- Wu, Yi-Long, Caicun Zhou, Cheng-Ping Hu, Jifeng Feng, Shun Lu, Yunchao Huang, Wei Li, et al. 2014. « Afatinib versus Cisplatin plus Gemcitabine for First-Line Treatment of Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring EGFR Mutations (LUX-Lung 6): An Open-Label, Randomised Phase 3 Trial ». *The Lancet Oncology* 15 (2): 213-22. doi:10.1016/S1470-2045(13)70604-1.
- Xu, Lijun, et Xingming Deng. 2004. « Tobacco-Specific Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanone Induces Phosphorylation of Mu- and M-Calpain in Association with Increased Secretion, Cell Migration, and Invasion ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 53683-90. doi:10.1074/jbc.M409889200.
- Yang, Hong-Zhen, Bing Cui, Han-Zhi Liu, Zhi-Rong Chen, Hui-Min Yan, Fang Hua, et Zhuo-Wei Hu. 2009. « Targeting TLR2 Attenuates Pulmonary Inflammation and Fibrosis by Reversion of Suppressive Immune Microenvironment ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (1): 692-702.
- Yang, Hong-Zhen, Bing Cui, Han-Zhi Liu, Su Mi, Jun Yan, Hui-Min Yan, Fang Hua, et al. 2009. « Blocking TLR2 Activity Attenuates Pulmonary Metastases of Tumor ». *PloS One* 4 (8): e6520. doi:10.1371/journal.pone.0006520.
- Zafrani, Lara, Grigoris Gerotziafas, Colleen Byrnes, Xuzhen Hu, Joelle Perez, Charlene Lévi, Sandrine Placier, et al. 2012. « Calpastatin Controls Polymicrobial Sepsis by Limiting Procoagulant Microparticle Release ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185 (7): 744-55. doi:10.1164/rccm.201109-1686OC.
- Zatz, Mayana, et Alessandra Starling. 2005. « Calpains and Disease ». *The New England Journal of Medicine* 352 (23): 2413-23. doi:10.1056/NEJMra043361.
- Zell, Jason A., S.-H. Ignatius Ou, Argyrios Ziogas, et Hoda Anton-Culver. 2005. « Epidemiology of Bronchioloalveolar Carcinoma: Improvement in Survival after Release of the 1999 WHO Classification of Lung Tumors ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (33): 8396-8405. doi:10.1200/JCO.2005.03.0312.
- Zhang, Yi, Feifei Luo, Yuchan Cai, Nan Liu, Luman Wang, Damo Xu, et Yiwei Chu. 2011. « TLR1/TLR2 Agonist Induces Tumor Regression by Reciprocal Modulation of Effector and Regulatory T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186 (4): 1963-69. doi:10.4049/jimmunol.1002320.
- Zheng, Peng-Sheng, Jianping Wen, Lee Cyn Ang, Wang Sheng, Alicia Vilorio-Petit, Yelina Wang, Yaojiong Wu, Robert S. Kerbel, et Burton B. Yang. 2004. « Versican/Pg-M

G3 Domain Promotes Tumor Growth and Angiogenesis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (6): 754-56. doi:10.1096/fj.03-0545fje.

IX. Annexes

Annexe 1: Therapeutic strategy for advanced EGFR mutant non-small-cell lung carcinoma.

(Cadranel et al. 2013)

Annexe 2: A simple view on lung cancer biology: the MET pathway

(A-M Ruppert, Wislez, et al. 2011)

Annexe 3: A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway

(Anne-Marie Ruppert et al. 2012)

Annexe 4 : Which platform to support a personalized lung cancer treatment?

(A-M Ruppert, Beau-Faller, et al. 2011)

Annexe 5 : Cancer bronchique et inflammation (A-M Ruppert et al. 2015, en soumission)

Annexe 6 : résultats complémentaires kras et calpaïnes 1 extracellulaire

Annexe 7 : corrélation calpaine 1 extracellulaire et TLR2s

Therapeutic strategy for advanced EGFR mutant non-small-cell lung carcinoma

Jacques Cadranel^{a,b,*}, Anne-Marie Ruppert^{a,b}, Michèle Beau-Faller^{c,d}, Marie Wislez^{a,b}

^a Service de Pneumologie, Hôpital Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France

^b Equipe de Recherche 2 et GRC-UPMC 04 Theranoscan, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France

^c Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

^d EA 4438, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, France

Accepted 26 June 2013

Contents

1. Introduction	478
2. EGFR and the HER family	478
2.1. Epidemiology and characteristics of EGFR-mutated NSCLC	478
2.2. EGFR-activating mutation and sensitivity to EGFR-TKIs	479
2.2.1. Classic EGFR mutations and sensitivity to EGFR-TKIs	479
2.2.2. Rare, very rare, and complex EGFR mutations	480
3. First-line treatment of NSCLC harboring EGFR-activating mutations	480
3.1. Phase III trial results	480
3.2. What else can we learn from EGFR-TKI trials?	480
3.2.1. Are EGFR-mutated tumors more sensitive to chemotherapy?	480
3.2.2. Does TKI efficacy vary according to ethnicity and mutation type?	481
3.2.3. Is there a difference between the EGFR-TKIs?	481
3.2.4. Is there a specific management of EGFR mutated tumors with CNS metastases?	482
3.3. EGFR-TKIs vs. platinum-based chemotherapy?	483
3.4. Managing NSCLCs harboring TKI-resistant EGFR-activating mutations	484
3.4.1. Primary and secondary resistances	484
3.4.2. Secondary EGFR-TKI resistance and therapeutic implications	485
3.4.3. Practical management of secondary TKI resistances	486
4. Conclusion	488
Conflict of interest statement	488
Reviewers	489
Acknowledgments	489
References	489
Biographies	493

Abstract

Activating mutation in exons 19 or 21 of epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-small-cell lung cancers (NSCLC) are associated with increased sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs), such as gefitinib and erlotinib. Cancer patients harboring activating EGFR mutations benefit from first-line TKI therapy. Yet 10% of patients present a primary TKI resistance, while 50% of the others develop a secondary resistance within 9–12 months after starting TKI. The RECIST's definition of progression appears flawed when applied to EGFR-mutated NSCLC patients. Most often, tumor volume shrinking widely exceeds 30% during TKI response and kinetics of growth is

* Corresponding author at: Service de Pneumologie, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, F-75970 Paris Cedex 20, France. Tel.: +33 01 56 01 65 31.

E-mail address: jacques.cadranel@tnn.aphp.fr (J. Cadranel).

low during relapse. At present, secondary resistance mechanisms associated with progression are better known: clonal selection of EGFR resistance mutation (T790M mutation in exon 20), amplification of transmembrane receptors for other growth factors (c-met, HER family, IGF1R, or AXL), downstream molecular alterations in EGFR signaling pathway (PI3K or PTEN), and epithelial–mesenchymal transition or transdifferentiation to small-cell cancer. The best strategy for secondary resistance is not well-defined: maintaining TKI therapy, switching to chemotherapy, combining both treatments, or using new therapies targeting other signaling pathways.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: EGFR mutations; Secondary resistance; Gefitinib; Erlotinib; Afatinib; Dacomitinib; Tyrosine kinase inhibitors; Non-small-cell lung cancer

1. Introduction

In 2008, 12.7 million people worldwide suffered from cancer [1]. Lung cancer was the leading cause of cancer death, as well as second most common cancer in men after prostate cancer and third in women after breast and colorectal cancer. About 80% of lung cancers are non-small-cell lung carcinomas (NSCLC) [2,3], with 5-year survival rates <15%, due to late diagnosis at locally advanced or metastatic stages [2,3]. Until recently, first-line therapy in metastatic NSCLC was based on platinum-based doublet chemotherapy [3]. The development of inhibitors targeting the HER family, particularly HER1 or epidermal growth factor receptor (EGFR), has revolutionized therapy [4,5]. These agents are particularly effective in NSCLC patients harboring sensitizing EGFR mutations [4,5]. Two EGFR tyrosine kinase activity (EGFR-TKIs) inhibitors were granted marketing authorization for locally advanced or metastatic NSCLC, namely gefitinib and erlotinib, but their first-line use is restricted to patients with activating EGFR mutations (complete information in Supplemental Table 1). Second-generation TKIs, such as afatinib and dacomitinib, with *in vitro* activity on HER2 and HER3, are under development [4] (Supplemental Table 1). Cetuximab, an EGFR monoclonal antibody, has been granted marketing authorization for the United States only [4].

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.06.009>.

This review aimed to describe: (1) different EGFR mutation types in NSCLCs; (2) EGFR-TKI Phase III results in first-line treatment and current treatment recommendations; and (3) TKI resistance mechanisms and potential therapeutic options.

2. EGFR and the HER family

The HER family, one of the 20 transmembrane peptide receptor families with tyrosine-kinase activity, comprises four members: HER1 or EGFR, HER2, HER3, and HER4 [5,6]. EGFR is strongly expressed on the surface of bronchial epithelial cells, with moderate expression on alveolar epithelial cells [7]. HER2, 3, and 4 are also expressed on normal lung epithelial cells [8].

EGFR activation requires EGFR to be dimerized after the ligand has bound to the extracellular domain, enabling

transactivation and phosphorylation of the intracellular domains' tyrosine radicals [6]. The activated receptor is composed of a homo- or heterodimer between the EGFR and another HER family receptor. The activated cell likely acquires antiapoptotic, proliferative, or migratory phenotypes. HER2 is the preferred coreceptor for EGFR. HER3 does not display any TK activity but possesses six phosphorylation sites, enabling activation signal amplification when EGFR/HER3 heterodimerization occurs. EGFR activation brings into play the MAP kinase signaling pathway involving K-Ras, and the PI3-kinase signaling pathway.

EGFR expression is detected by immunochemistry (IHC) in 60% of squamous-cell carcinomas and 40% of adenocarcinomas and large-cell carcinomas [7], with no EGFR expression in small-cell lung cancers. Its prognostic value in NSCLC is unclear [7,9]. EGFR overexpression had no therapeutic impact so far, as expression intensity was not linked to EGFR-TKI responses [4,5]. However, a semi-quantitative assessment of EGFR protein expression based on a histo-score (H-score) of 200 or more predicted treatment outcomes in the FLEX trial comparing cetuximab added to cisplatin and vinorelbine with chemotherapy alone in patients with EGFR-IHC positive tumor [10].

2.1. Epidemiology and characteristics of EGFR-mutated NSCLC

EGFR mutations were reported, in the first years after EGFR-TKI introduction, in patients with initial good EGFR-TKI responses [11,12]. The originally used sequencing technique allowed researchers to establish a precise molecular epidemiology of the mutations concerned [5,13–16]. Presently, more sensitive techniques have been developed enabling a faster diagnosis, even with poorly cellular, less well-preserved samples [17]. Mutations were detected in exons 18–21 of the EGFR gene, encoding the TK-domain (Fig. 1) [16], and particularly the binding sites of adenosine triphosphate (ATP) and EGFR-TKI. In NSCLC, EGFR mutations and other oncogenic molecular alterations, such as K-Ras and HER2 mutations or ALK-gene rearrangements, are considered almost always mutually exclusive [18].

In NSCLC, EGFR mutations were reported in 5–10% of Caucasians but 30% of Caucasian non-smokers and >60% of Asian non-smokers [19,20]. In 2010, *L'Institut National du Cancer* (INCa) implemented free EGFR mutation testing for metastatic adenocarcinomas, allowing

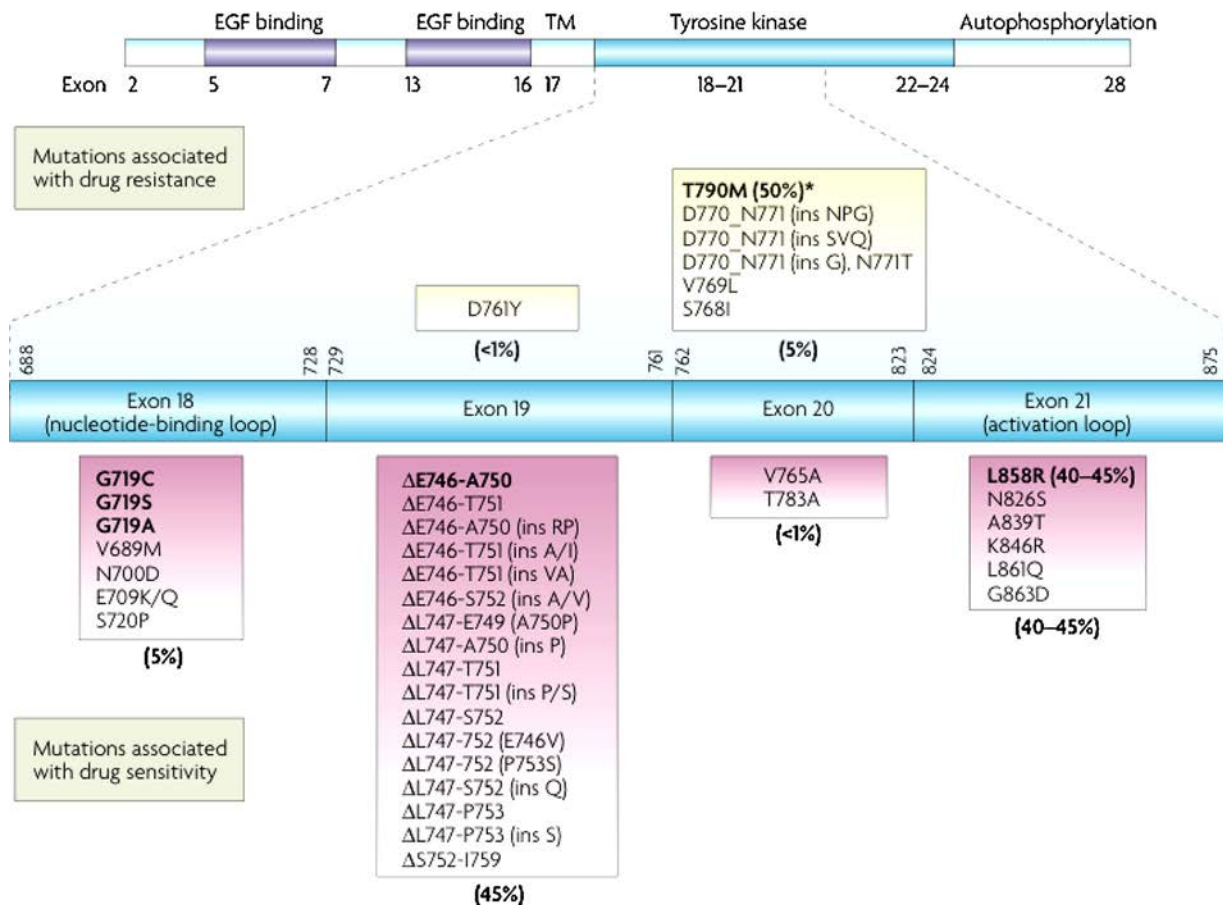


Fig. 1. EGFR oncogenic mutations in lung cancer from Sharma SV. Nature Reviews Cancer 2007;7:169–181 (18).

French epidemiological data to be generated annually [21]. Based on >15,000 NSCLCs, EGFR mutation prevalence in France is estimated at 10.5%, varying from 6.5 to 20.6% [22]. In >85% of cases, EGFR mutations are exon 19 deletions or the L858R point mutation in exon 21 [13,18,23], almost exclusively found in non-squamous NSCLCs [24], particularly the papillary and lepidic subtypes [25]. Their occurrence in other histological types, such as squamous and neuroendocrine carcinomas (0–4%) [24], testifies for composite tumors [25]. EGFR mutations are more common in non-smokers (14–56%) than smokers (3–14%) [24], and even more common in non-smokers not exposed to secondhand smoke [26]. Nevertheless, 50% of patients exhibiting EGFR mutations were smokers, with former smokers representing 90% of cases [27]. EGFR mutation probability in NSCLCs increases in line with the time length since quitting smoking [28]. Finally, EGFR mutations were more common in women (20–62%) than men (1–19%) and in Asians (27–34%) than non-Asians (7–8%) [24].

Despite this, first-line EGFR-TKI can only be prescribed if EGFR-activating mutations are detected in patients' tumor samples, as the probability of such mutations in a population selected using the aforementioned clinical characteristics is only 60% [29]. Moreover, in the absence of EGFR

mutations, prescribing first-line EGFR-TKI therapy exhibits adverse effects on progression-free survival (PFS) in Asians and Caucasians [29,30], and on overall survival (OS) in Caucasians [30]. Systematic EGFR mutation testing in a prospective cohort of >500 unselected NSCLCs proved to be cost-effective in France [23,31].

2.2. EGFR-activating mutation and sensitivity to EGFR-TKIs

The EGFR gene becomes oncogenic by mutation, and activating mutations render tumor cells highly dependent on the EGFR signaling pathway, resulting in an oncogene addiction state [18]. The signaling pathway's sudden interruption, by administering EGFR-TKIs, leads to massive apoptosis of mutant tumor cells.

2.2.1. Classic EGFR mutations and sensitivity to EGFR-TKIs

The "classic" EGFR mutations, involving exon 19 deletions and the L858R point mutation in exon 21 (Fig. 1), are present in >90% of NSCLCs, rendering them highly sensitive to EGFR-TKIs [18], exon 19 deletions being more common than L858R mutations. Classic mutations were associated

with improved prognosis in Phase III placebo-controlled EGFR-TKI trials [4].

2.2.2. Rare, very rare, and complex EGFR mutations

The other EGFR mutations, known as “rare” mutations, represent <10% of cases, but the list is growing longer [12,14,18]. The most frequent are exon 20 duplications/insertions ($\approx 4\%$), the most common being D770_N771insSVD, V769_D770insASV, and A767_V769dupASV insertions, followed by G719X point mutations in exon 18 ($\approx 3\%$) and the L861Q point mutation in exon 21 ($\approx 2\%$) (Fig. 1) [32].

T790M substitution in exon 20 is one of the “very rare” mutations ($\approx 0.1\%$), and the others include point mutations in exon 18 (G709X, etc.), exon 19 (L747X; D761Y), exon 20 (S768I), and exon 21 (T854A) [18], as well as insertions or insertions/deletions in exons 18 or 19 [33–35]. Very rare germinal mutations like T790M in exon 20 [36,37] and V843I in exon 21 were reported in familial NSCLCs [38,39].

“Complex” EGFR mutations, namely double EGFR mutations within a single tumor, are relatively frequent (3–7%) [40,41], involving either two classic mutations, a classic mutation and a rarer or even very rare mutation, two rare mutations, or two very rare mutations. On diagnosis, T790M mutation is often accompanied by a non-germinal, EGFR-sensitizing mutation.

Cohort studies and case series reporting TKI sensitivity in NSCLC harboring rare, very rare, and complex mutations demonstrated: (1) EGFR-TKI resistance of tumors presenting exon 20 insertion/deletion (response rate <15%), not offset by irreversible TKIs. These insertions correspond to different variants, depending on size (3–12 bp), insertion type, or localization within exon 20. The “frequent” localized exon 20 insertions that confer TKI resistance must be distinguished from the rarer, more proximal exon 20 insertions in the C-helix that confer a certain TKI sensitivity [14,36,42]; (2) less sensitivity in rare substitutions compared with classic substitutions in exons 18, 19, and 21 [14,32,34,42]; (3) resistance in familial NSCLCs with germinal mutation, even when accompanied by a classic mutation [36,39]; (4) intact sensitivity of tumors harboring a complex mutation if the latter involves two classic mutations but less sensitivity if the complex mutation only involves one classic mutation, and statistic less sensitivity if it involves two rare mutations [43].

Rare mutations like exon 20 insertions, representing 4–9% of EGFR mutations, should be sought for to enable us to distinguish those that are sensitive to EGFR-TKI from those that are resistant, which may respond to specific therapy. New technology like next-generation sequencing (NGS) will permit the identification of new mutations or several associated mutations corresponding to different mutant subpopulations within a single tumor, with novel interpretation hypotheses [44].

3. First-line treatment of NSCLC harboring EGFR-activating mutations

3.1. Phase III trial results

The classic EGFR mutations’ impact was evaluated in six Phase III trials (Table 1). Five out of these six trials, conducted in a first-line setting, compared gefitinib [45–47], erlotinib [48,49], or afatinib [50] with several platinum-based doublets in Asian [45,46,50] and Caucasian [48,50] populations selected by the presence of either a classic mutation [46,48,49] or a classic and rare activating mutation [45,50] (Table 1). The IPASS trial compared first-line gefitinib with paclitaxel and carboplatin in 1217 never or light Asian smokers, with adenocarcinoma [29]. The analysis for the patients tested with EGFR-mutation (classic and rare) positive tumors was pre-planned ($n = 208$). Finally, another phase III trial had also selected patients by clinical parameters and a subgroup analysis was performed however retrospectively and in only 42 patients with EGFR-mutation tumors [51].

The trials’ results were concordant (Table 1). In the EGFR-TKI arm, response rates were >60%, with disease progression probability lowered by >50%, and similar hazard ratios and matching confidence intervals across trials excepting the OPTIMAL trial [49]. In the latter, the carboplatin–gemcitabine arm was probably suboptimal, and the frequency and modality of response evaluations might have led to efficacy overestimation in the TKI arm [49]. The tolerance profile (Table 2) and quality of life [29,49,52] favored the TKI arm. Phase II trial dacomitinib results in first- or second-line setting were concordant [53].

While these results clearly favored the TKI arm, the chemotherapy schedule was not optimal: (1) pemetrexed was only used in the LUX-Lung 3 trial [50]; (2) treatment was interrupted after three or four cycles in certain trials [45,48,49]; (3) maintenance was not proposed, although disease control rates with chemotherapy exceeded 80%; and (4) bevacizumab was not used. Moreover, none of the trials revealed OS benefits in the EGFR-TKI arm (Table 2), which may be explained by: (1) better prognosis for EGFR-mutated NSCLCs; (2) possibility of second-line EGFR-TKI in the chemotherapy arm; (3) absence of cross-resistance between TKI and chemotherapy, enabling second-line EGFR-TKI efficacy to be preserved; and (4) greater sensitivity to chemotherapy in this population.

3.2. What else can we learn from EGFR-TKI trials?

3.2.1. Are EGFR-mutated tumors more sensitive to chemotherapy?

The IPASS trial compared the platinum-based doublet’s effects in a population of EGFR-mutated and non-EGFR-mutated NSCLCs, with results suggesting that EGFR-mutated NSCLC may be more sensitive to chemotherapy [29]. In this trial, the response, disease control, and disease progression rates of EGFR-mutated and

Table 1
Phase III studies of first-line TKI vs. chemotherapies in EGFR-mutant NSCLC.

Author	Population	Mutation	n	TKI	CT	Response (%)	PFS (months)	HR (95% CI)	OS (months)	HR (95% CI)
Mok [29]	Asia	Common/rare*	261	G	CaP	71/47	9.5/6.3	0.48 (0.36–0.64)	21.6/21.9	1.00 (0.76–1.33)
Mitsudomi [45]	Asia	Common	172	G	CD	62/32	9.6/6.6	0.52 (0.38–0.72)	35.5/38.8	1.18 (0.77–1.83)
Maemondo [46,47]	Asia	Common/rare**	228	G	CaP	74/31	10.8/5.4	0.32 (0.24–0.44)	27.7/26.6	0.88 (0.63–1.24)
Zhou [48]	Asia	Common	154	E	CaGm	83/36	13.1/4.6	0.16 (0.11–0.26)	22.7/28.9	1.04 (0.69–1.58)
Rosell [49]	Europe	Common	173	E	C/Ca	58/15	9.7/5.2	0.37 (0.25–0.54)	19.3/19.5	1.04 (0.65–1.68)
Yang [50]	Asia/Europe	Common/rare***	345	A	C/Pm	56/23	11.1/6.9	0.58 (0.43–0.78)	NYR	NR
		Common	308			61/22	13.6/6.9	0.47 (0.35–0.69)		

Common mutations: del19 exon 19 and L858R exon 21; rare mutations: *G719X exon 18, L861Q exon 21, T790M, and S768I exon 20; **G719X exon 18, L861Q exon 21, ***G719X exon 18, 3 insertions, S768I and T790M exon 20, L861Q exon 21. TKI: tyrosine kinase inhibitors; G: gefitinib; E: erlotinib; A: afatinib; C: cisplatin; Ca: carboplatin; P: paclitaxel; D: docetaxel; Gm: gemcitabine; Pm: pemetrexed; C/Ca: platinum-doublet, *i.e.* cisplatin plus docetaxel or gemcitabine; carboplatin plus docetaxel or gemcitabine; PFS: progression-free survival; HR: hazard ratio; CI: confidence interval; OS: overall survival; NYR: not yet reached; NR: non-reported.

non-EGFR-mutated patients in the chemotherapy arm were 47.3 vs. 23.5%, 87.6 vs. 83.5% and 10.9 vs. 11.8%, respectively. However, this conclusion needs qualifying. In the other trials, objective response rates to chemotherapy of mutant NSCLC patients varied between 15–36% (Table 1) [45,46,48–50]. These rates were not different from those reported (16–22%) when using the same platinum-based doublets in unselected NSCLC populations, with probably low proportions of EGFR-mutated tumors (<10%) [54]. Similar response rates to combined cisplatin–pemetrexed (44% vs. 46%) were observed in the LUX-Lung 3 trial [50] and the PARAMOUNT trial's induction phase [55].

3.2.2. Does TKI efficacy vary according to ethnicity and mutation type?

Whether EGFR-TKI and chemotherapy efficacy differs between Caucasians and Asians is unclear. In two trials using erlotinib, with one conducted in Caucasian Europeans [48] and the other in Asians [49], PFS (9.7 vs. 13.1 months) and response rates were inferior with chemotherapy (15 vs. 36%) in the European trial, with the same trend observed in the Lux-Lung 3 trial: PFS was 11.8 months in Caucasians and 13.6 in Asians [56].

Not all Phase III trials confirmed EGFR-TKIs to be more efficacious in tumors with exon 19 deletions vs. those with the L858R mutation in exon 21. Efficacy was better in three trials [48–50] and similar in the two others [45,46]. Regarding EGFR-TKI efficacy in rare mutations, the LUX-Lung 3 trial revealed a 2.5-month difference in PFS between the overall study population (including 11% rare mutations) and classic-mutation population (11.1 vs. 13.6 months) [50]. However, in the LUX-Lung 2 trial, a Phase II study with afatinib, PFS was 4.5 months for patients with rare mutations vs. 12 months for those with exon 19 deletions, and 13.7 months for those with the L858R mutation [57].

3.2.3. Is there a difference between the EGFR-TKIs?

No evidence-based data indicates that any TKI may be more efficacious than the others [58,59]. A recent meta-analysis suggested that response rates were better and PFS longer with erlotinib vs. gefitinib [60]. A trial comparing gefitinib with afatinib is ongoing in Asia (Table 3). A Phase II trial comparing dacomitinib with erlotinib in an unselected population generated interesting results in favor of dacomitinib [61], with two other Phase II trials comparing erlotinib with gefitinib still ongoing (Table 3). In an Asian population, afatinib was associated with longer PFS (13.6 months) [56] than gefitinib (9.2–10.4 months) [29,45,46].

TKIs differ pharmacokinetically (Table 4). Gefitinib and erlotinib are reversible inhibitors of HER1 TK, and afatinib and dacomitinib irreversible inhibitors of HER1, 2, and 4 TK (efficacious *in vitro* in cell lines with T790M mutation). However, clonal selection of a T790M mutation was also observed with afatinib [62], and the Phase III afatinib trial in gefitinib- and erlotinib-resistant patients suggested that afatinib displayed no major clinical effects in T790M mutants [63].

Table 2

Phase III studies of TKI vs. chemotherapy – comparison of the safety profiles.

Author	Population	n	TKI	CT	Skin		Diarrhea		Neutropenia		Anemia	
					Any grade	Grade ≥ 3	Any grade	Grade ≥ 3	Any grade	Grade ≥ 3	Any grade	Grade ≥ 3
Mok [29]	Asia	261	G	CaP	66/22%	3/1%	46/22%	4/1%	–	4/67%	–	11/2%
Mitsudomi [45]	Asia	172	G	CD	74/7%	2/0%	47/35%	1/0%	7/81%	0/74%	33/79%	0/15%
Maemondo [46]	Asia	228	G	CaP	71/22%	5/3%	34/6%	1/0%	5/77%	1/66%	18/65%	0/5%
Zhou [48]	Asia	154	E	CaGm	73/19%	2/0%	25/6%	1/0%	6/69%	0/42%	5/72%	0/13%
Rosell [49]	Europe	173	E	C/Ca	80/5%	13/0%	57/18%	5/0%	0/40%	0/22%	49/12%	4/1%
Yang [50]	Asia/Europe	345	A	C/Pm	89/6%	16/0%	95/15%	14/0%	1/32%	0/15%	3/28%	0/5%

TKI: tyrosine kinase inhibitors; C: cisplatin; G: gefitinib; E: erlotinib; A: afatinib; CT: chemotherapy; Ca: carboplatin; P: paclitaxel; D: docetaxel; Gm: gemcitabine; Pm: pemetrexed; C/Ca: platinum-doublet, *i.e.* cisplatin plus docetaxel or gemcitabine; carboplatin plus docetaxel or gemcitabine.

Gefitinib caused Grade 3 toxicity less often [29,45,46] than erlotinib [48,49] or afatinib [50] (Table 2), but the latter two allowed for dose adjustments to be made. The frequency of Grade 3 mucositis (8.1%) and paronychia (11.4%) with afatinib [50] must be stressed. Food intake did not alter the absorption of gefitinib, but lowered that of afatinib by 40–50% [64]. Erlotinib absorption was increased by food intake, with between-meal administration recommended due

to its variability depending on the food ingested [65], by rise in pH [66], and by cigarette smoke [67,68].

3.2.4. Is there a specific management of EGFR mutated tumors with CNS metastases?

CNS metastases are common in EGFR mutated NSCLCs, and EGFR mutations could be a risk factor for CNS metastases [69]. EGFR mutation detection in the brain is complex,

Table 3

Main ongoing studies on EGFR-mutant NSCLC (source nci.gov, 30/01/2013).

Phase	Molecule	Study plan	Comments
<i>First line</i>			
Phase I/II NCT01513174	Olaparib PARP1-inhibitor (Astra-Zeneca)	Gefitinib $\pm$ olaparib	
Phase II NCT01562028	Erlotinib bevacizumab Academic trial	Erlotinib $\pm$ bevacizumab	
Phase II NCT01024413 (two trials)	Erlotinib gefitinib Academic trial	Erlotinib vs. gefitinib in EGFR exon 21 mutation	
Phase II NCT01556191	Fulvestrant anti-estrogen (Astra-Zeneca)	Gefitinib $\pm$ fulvestrant in women	
Phase II NCT01469000	Pemetrexed (Lilly)	Gefitinib $\pm$ pemetrexed	
Phase II NCT01763385	Erlotinib Academic trial	Erlotinib + concurrent vs. secondary brain radiotherapy at progression	Patients with asymptomatic brain metastasis at diagnosis
Phase IIb NCT01466660	Afatinib pan-HER1,2,4 inhibitor (Boehringer-Ingelheim)	Afatinib vs. gefitinib	
Phase II NCT01131429	Erlotinib cisplatin/docetaxel Academic trial	Erlotinib vs. cisplatin/docetaxel with cross-over at progression	
Phase III NCT01774721	Dacomitinib Pan-HER1,2,4 inhibitor (Pfizer)	Dacomitinib vs. gefitinib	
Phase III NCT01360554	Dacomitinib Pan-HER1,2,4 inhibitor (Pfizer)	Dacomitinib vs. erlotinib	
<i>Second/third-line</i>			
Phase I/II NCT01487265	BKM120 PI3K inhibitor (Novartis)	BKM120 + erlotinib	After failure of no more than 3 prior treatments including one EGFR-TKI
Phase I/II NCT01259089	AUY922 HSP90 inhibitor (Novartis)	AUY922 + erlotinib	After progression on EGFR-TKI
Phase II NCT01746277	EGFR-TKI chemotherapy Academic trial	Chemotherapy then EGFR TKI vs. chemotherapy with EGFR-TKI	After progression on EGFR-TKI
Phase II NCT01573702	Erlotinib Academic trial	Erlotinib + “ablative therapy”	Continue erlotinib after progression on erlotinib
Phase II NCT01530334	Gefitinib (Astra-Zeneca)	Gefitinib	Third line, after progression on gefitinib then chemotherapy
Phase II NCT01580735	ARQ197/tivantinib c-met inhibitor (ArQule Incorporation)	Erlotinib + ARQ197	After progression on erlotinib
Phase III NCT01544179	Gefitinib (Astra-Zeneca)	Gefitinib + cis/pemetrexed vs cis/pemetrexed	After progression on gefitinib
Phase III NCT01456325	Onartuzumab anti-c-met antibody (Genentech)	Erlotinib $\pm$ onartuzumab	Two prior treatments by chemotherapy and with c-met surexpression; stratification by EGFR mutation status

Table 4
Comparison of the main erlotinib and gefitinib characteristics.

Characteristics	Erlotinib	Gefitinib
Maximum tolerated dose	150 mg	800–1000 mg
Presentation	150, 100, and 25 mg	250 mg
Bioavailability	60%, Increased by food	59%, Unaffected by food
Gastric pH effect	Reduces absorption	No
Protein binding	95%	>85%
Interaction with cytochromes (CY)	CYP3A4 ≫ CYP1A2	CYP3A4
Effect of tobacco smoke	Decrease two thirds of the area under the curve	No
Elimination half-life	36 h	41 h
Hepatic elimination	90%	96%
Cutaneous rash (any grade)	75%	35%
Diarrheas (any grade)	55%	25–35%

From Cataldo VD, et al. N Engl J Med 2011;364:947 [59]; Rukazenkov Y, et al. Anticancer Drugs 2009;20:856 [58].

except in cerebrospinal fluid (CSF) in case of leptomeningeal metastases [70]. In EGFR-mutated NSCLCs, brain metastases usually present the same mutation than the primary tumor [71]. Preclinical data and case series confirmed EGFR-TKIs' (gefitinib, erlotinib and afatinib) efficacy on EGFR-mutated CNS metastases, even following chemotherapy or radiotherapy [72–78]. Objective response rates were 43–89%, with PFS >6 months and OS >12 months (Table 5) [72–78]. As EGFR-TKIs' CNS penetration is limited, dose escalation may be attempted when CNS metastases are detected in patients whose primary tumor is controlled by TKI [79,80]. The higher erlotinib vs. gefitinib serum levels may lead to higher cerebrospinal fluid concentrations, and erlotinib may thus be effective in CNS metastases following gefitinib treatment [81,82]. TKI are good radio-sensitizers [69,83]. Several ongoing trials assess TKIs' efficacy during whole brain radiation therapy in NSCLC brain metastases (Table 3).

In single brain metastasis cases, surgery or stereotactic radiosurgery may be proposed, with whole brain radiation therapy required in multiple symptomatic metastasis cases. Yet patients' long survival must be considered and the risk of radiation encephalopathy be maximally reduced.

3.3. EGFR-TKIs vs. platinum-based chemotherapy?

As Phase III trials failed to report any OS differences, some teams suggested starting with platinum-based doublet chemotherapy while keeping TKIs for second-line treatment (Fig. 2). This was mainly justified by a fear of not being able to use platinum-based doublets as second-line therapy. However, in published Phase III trials, 76–88% of patients received platinum-based doublets as second-line therapy following TKI [29,46,48]. Another fear was that the disease might progress while awaiting mutation test results. A molecular French testing center needs 10 days on average to deliver EGFR-mutation results, with some extreme cases requiring >21 days [22]. In a prospective cohort of 500 advanced NSCLCs, good-quality tumor samples enabling mutation testing were only obtained in 70–80% of cases [23]. Lastly, the approach favoring TKIs as second-line treatment may be impacted by the hypothesis that TKI efficacy is maintained regardless of treatment line [84,85]. This, however, was not supported by recent meta-analysis results, with response rates being 67.6% for first-line treatment and 47.6% for second-line [60].

Another issue is to decide on the action to be taken when chemotherapy has been started though molecular analysis results subsequently reveal EGFR-TKI-sensitive mutations [85] (Fig. 2). When tolerance is poor, chemotherapy may be discontinued in favor of TKI. When tolerance is good and the disease under control, we, like others [85], recommend continuing chemotherapy for four to six cycles before TKI initiation as a “switch” maintenance therapy to ensure definite TKI exposure (Fig. 2). Other possible options are: (1) introduce TKI in the event of second-line progression, as in the published trials; (2) immediately stop chemotherapy in favor of TKI; and (3) initiate TKI in addition to chemotherapy (Fig. 2) [85].

Most guidelines [86–88] recommend starting with EGFR-TKI (Fig. 2) when the mutation status is obtained within a reasonable time: 7–15 days for patients with a performance status (PS) 0–1. All published Phase III trials revealed benefits in terms of PFS, objective response, and disease control (Table 2), along with improved quality of life [29,49,52]. TKI's toxicity profile (Table 4) permits long treatment. These results hold for all the subgroups

Table 5
TKI efficacy in EGFR-mutant NSCLC with CNS metastases or patients selected on clinical characteristics associated with EGFR mutations in NSCLC with CNS metastases.

Author	EGFR status	Type	n	TKI	Response (%)	PFS (months)	OS (months)
Hotta [72]	Selected Pts	BM	14	G	43	–	–
Porta [73]	EGFR mutated	BM	17	E	82	11.7	12.9
Park [74]	Selected Pts	LM	14	G/E	–	+	19.2
Li [75]	EGFR mutated (9/14)	BM	14	G	89	–	–
Wu [76]	EGFR mutated or selected pts after 2–6 cycles of chemotherapy	BM	48	E	56	10.1	–
Yi [77]	EGFR mutated or selected Pts	LM	11	G/E	82	–	Not reached >6 months in 8 pts
Kim [78]	Selected Pts	BM	23	G/E	74	7.1	18.8

Pts: patients; BM: brain metastases; LM: leptomeningeal metastases; G: gefitinib; E: erlotinib; PFS: progression free survival; OS: overall survival.

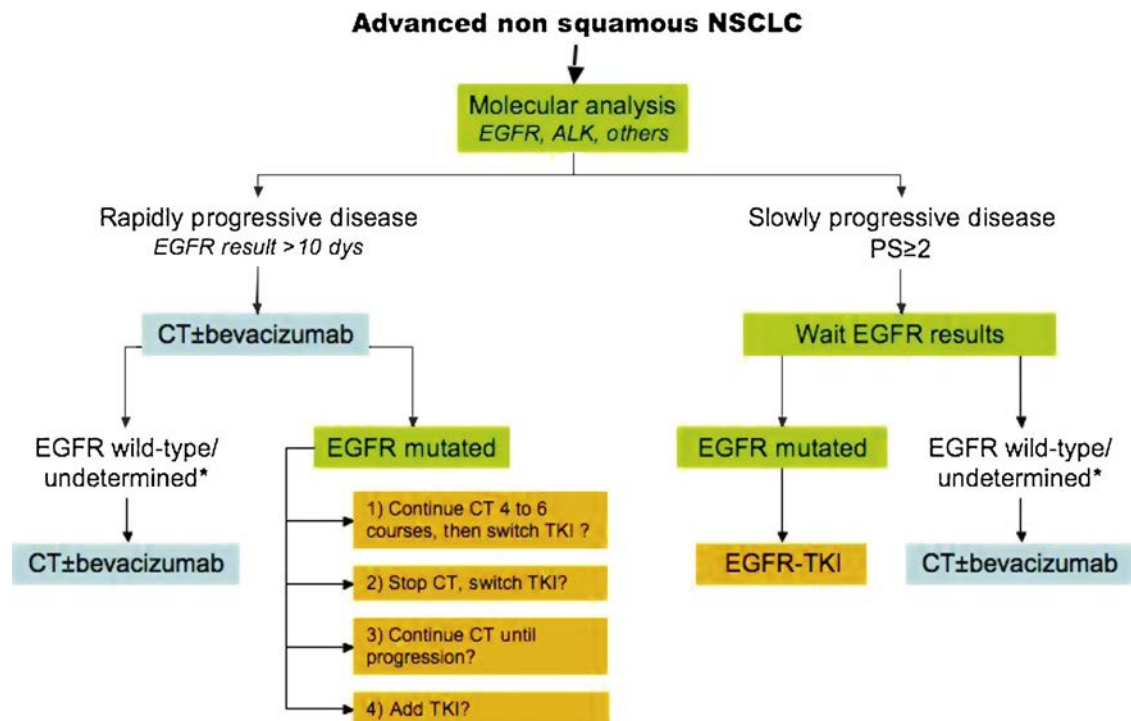


Fig. 2. Management of advanced EGFR-mutant NSCLC.

based on age, sex, smoking status, PS, type of mutations [45,48,50], and even ethnic origin in the Lux-Lung 3 trial [57]. Other arguments support the TKI first-line use. Starting with chemotherapy may result in patients' not being able to receive a TKI in the event of rapid disease progression during chemotherapy or high grade toxicity, as reported in 5–42% of cases [29,45,46,48,49]. Using a TKI in the first-line setting allows it to be reused as third-line therapy (see below). Some situations impose this approach: mutant NSCLC patients with a PS ≥ 2 , ineligible for platinum-based doublet chemotherapy, may quickly improve their PS and lengthen their survival with EGFR-TKIs [89]. Similarly, cerebral metastasis patients benefit from EGFR-TKIs, and TKIs may be more efficacious than chemotherapy given in these conditions [68,79].

According to published recommendations, patients with metastatic NSCLC harboring an EGFR-activating mutation should be treated with first-line EGFR-TKI, regardless of PS or cerebral metastases [86–88] (Fig. 2), whereas prescribing first-line EGFR-TKI in patients with unconfirmed EGFR mutation status is not recommended.

3.4. Managing NSCLCs harboring TKI-resistant EGFR-activating mutations

3.4.1. Primary and secondary resistances

Jackman et al. [90] proposed that clinical resistance to TKIs be defined as follows: patients receiving a TKI as monotherapy for a NSCLC harboring an EGFR-activating mutation or having shown an objective response to a TKI or stability for >6 months of TKI treatment, while mutation

status was unknown. Progression evaluated according to RECIST can only be considered if the patient has received at least 1-month treatment. The appearance of, or increase in, osteosclerotic lesions must not be taken into account, as this appears to be a TKI-induced bone response [91].

There are two resistance types: primary resistance, occurring before the third month of treatment, and secondary resistance occurring later, after an initial response to EGFR-TKIs. Jackman et al. [90] estimated primary resistance frequency before Month 3 at <10%. In published Phase III trials, the primary resistance frequency was estimated at 4–9.6% based on progressive disease rates at first tumor evaluation (6–8 weeks) or at 10–20% by Month 3 using graphic PFS curve analyses [29,45,46,48,49]. Overall median to progression was between 9 and 13 months in relation with the occurrence in relation with the occurrence of secondary resistance.

Primary resistance mechanisms are not well-known [92,93]. A false-positive test result for EGFR mutation may be responsible, to be minimized using optimal quality assurance procedures [15]. In some cases, it may be due to resistant mutations on initial diagnosis (insertion in exon 20 or rare T790M germline mutations) [92,93]. In addition to a sensitive mutation and rare or very rare mutation (see complex mutation), the most probable mechanisms involve a resistant mutation of EGFR (T790M) or other downstream or parallel molecular abnormalities in the EGFR signaling pathway (K-Ras or PI3K mutation, ALK rearrangement, or PTEN loss) [92,93]. Mixed tumors containing a component of small-cell lung cancer were reported [92,93]. An intrinsic

resistance mechanism common to different TKIs was described, involving an intronic deletion polymorphism in the BCL2-Like 11 (BIM) gene encoding a pro-apoptotic protein of the BCL2 family [94]. No evidence-based data pertains to primary resistance patients' management.

Secondary resistance mechanisms [92,91,94–101] are better understood, allowing for suitable therapeutic strategies to be developed and perhaps for preventing their occurrence. Clonal selection of resistant T790M mutation in exon 20 made up for 63% (95% CI 55–70%) of genetic alterations observed in rebiopsy of a large and recent series of patients ($n = 155$) at progression (Fig. 3) [99]. Other alterations such as c-met (5%, 95% CI 1–13%) or HER2 (13%, 95% CI 3–32%) amplification and transdifferentiation from adenocarcinoma to small-cell cancer (3%, 95% CI 0–6%) were very rare. Acquired mutations in PIK3CA, AKT1, BRAF, HER2, KRAS, MEK1, or NRAS were not detected. Furthermore, these mechanisms may combine in a single patient in 4% of cases [99] (Fig. 3). Finally, these findings might justify a rebiopsy to guide decision-making and enroll patients into therapeutic trials [95].

3.4.2. Secondary EGFR-TKI resistance and therapeutic implications

3.4.2.1. Secondary selection of resistance mutation: the T790M example. Selection of a doubly mutated clone, such as T790M in exon 20, is involved in >50% of secondary resistance cases, but has rarely been described in the central nervous system [96,102–104]. Clinically, patients exhibiting T790M mutant clones seem to progress more slowly, and progression is more confined to the initially affected sites, in comparison with other resistance mechanisms. The molecular mechanism consists of a conformational change of the ATP pocket, which increases receptor affinity for ATP while decreasing its affinity for TKI [105]. Patients harboring this resistance mutation maintain some sensitivity to signaling pathway's inhibitors, resulting in improved prognosis.

Specific molecules have been developed (afatinib, dacomitinib, neratinib, and XL647). These irreversible EGFR-TKIs exhibited *in vitro* activity in T790M mutant cell lines and other cell lines (HER2 and 4). In the Lux-Lung 1 trial, afatinib was superior to placebo in reducing progression risk, without improving OS [63]. The neratinib results proved disappointing, whereas dacomitinib data appeared more promising: dacomitinib elicited a 15% response rate in patients with erlotinib resistance or confirmed T790M mutation [85]. Other studies are ongoing [95]. The afatinib–cetuximab combination appeared efficacious, with acceptable toxicity [106].

3.4.2.2. Secondary amplification of another transmembrane growth factor receptor: the c-met example. C-met amplification is the second-most-common secondary EGFR-TKI resistance mechanism [90,92,96,97,99,104,107], with a frequency estimated at 5–22% of cases, the variability of which may reflect the diversity of detection techniques used (ISH,

qPCR, or CGH) [104,107]. In 50% of cases, a T790M mutation coexists [96,104,107].

Several hypotheses have attempted to explain why c-met amplification induces EGFR-TKI resistance [92,93,107]. The c-met receptor permits EGFR-independent transphosphorylation of the HER3 receptor and preferential activation of the PI3K pathway [97]. The c-met receptor may homodimerize following the binding of its HGF ligand, secreted by tumor cells, stroma, or both. The tumor cell thereby becomes dependent on the HGF/c-met pathway and preferentially activates the PI3kinase pathway [97]. Strong HGF expression was observed in >60% of tumors with secondary EGFR-TKI resistance [108].

Additionally, amplification of other transmembrane growth factor receptors was detected in secondary resistance cases [92,93], such as wild-type HER1 or HER2 allele, rendering the cell less sensitive to first-generation EGFR-TKIs [109]. The overexpression of other membrane-bound TK receptors, such as IGF1R or AXL, were also deemed responsible for secondary resistance to reversible EGFR-TKIs [110,104,111]. Several mechanisms likely combine, complicating the therapeutic strategy, as EGFR blockage has to be maintained, while being extended to HER2 and HER3 family members, in addition to inhibiting c-met or IGF1R pathways [92,95,96,107,111].

3.4.2.3. Downstream molecular alterations involving the EGFR signaling pathway. EGFR-TKI-induced selection pressure on tumor cells may result in resistance mechanisms rendering the cells independent of extracellular proliferation signals [92,93]. Several molecular abnormalities in the PI3K pathway were reported, such as PTEN loss, which negatively regulates PI3K activity, in addition to PI3K mutations and AKT overexpression [112].

3.4.2.4. TEM phenotype and histological transdifferentiation. The successive accumulation of unique molecular abnormalities may force the tumor cell to modify its epithelial phenotype in favor of a more aggressive one. Hereby, tumor cells lose dependence on their environment by adopting a mesenchymal phenotype. The epithelial–mesenchymal transition is induced by epithelial tumor cell exposure to growth and motility factors, such as EGF, HGF, IGF, and GAS6 (AXL ligand). This phenotype, detected in 15% of biopsy samples from secondary EGFR-TKI resistance patients [95], is characterized by the association of tumor cells displaying morphological aspects of epithelial cells and mesenchymal cells, along with E-cadherin underexpression and vimentin overexpression.

Transdifferentiation from adenocarcinoma to small-cell cancer was reported in 6–14% of biopsy samples taken from secondary EGFR-TKI resistance patients [95]. In this case, the activating mutation persists in the small-cell component, and patients exhibit sensitivity to VP16 platinum chemotherapy, though with bleak prognosis.

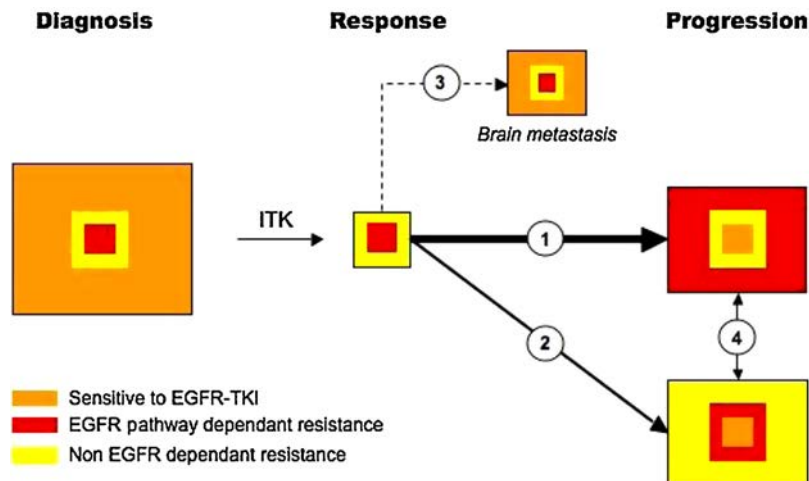


Fig. 3. Schematic representation of the different progression types. The square's surface area represents the overall tumor volume. The proportion of tumor volume sensitive to TKI (cells containing an activating mutation) is orange, the proportion of the tumor volume dependent on EGFR pathway but hardly resistance to TKI (EGFR-TKI resistance mutation, amplification of the EGFR wild allele, *etc.*) is red, and the proportion of the tumor non-EGFR-dependent (stromal reaction, primary resistance mechanism, *etc.*) volume is yellow. During progression, situation 1 is the most common. There is a clonal selection of tumor cell lines with EGFR-TKI resistance mutation (*e.g.* T790M mutation in exon 20). One potential therapeutic solution consists of TKI discontinuation and chemotherapy (CT) initiation to facilitate TKI resensitization. TKI maintenance along with CT initiation (therapeutic trials ongoing) is another potential option. A third solution calls for a molecule or a combination of molecules that affect the resistance mechanism (*e.g.* association of afatinib with cetuximab). Situation 2 is less common during initial progression. Resistance mechanisms that are non-EGFR-dependent are: transformation into small-cell lung cancer, loss of both epithelial phenotype and EGFR expression, downstream or parallel EGFR resistance mutations, amplification of parallel signaling pathways (c-met, IGF1R, *etc.*). Treatments that specifically target these different mechanisms would be ideal therapeutic options. Situation 3 is observed in brain/meningeal progression cases. Despite primary tumor control by TKI, brain metastases occur on account of insufficient TKI concentrations in the brain/meningeal area. In these cases, TKI maintenance is recommended along with brain radiotherapy, which ensures maximum healthy tissue preservation (radiosurgery). Some authors recommend carrying out a permanent or pulsating TKI dose increase with or without chemotherapy, especially in cases where the meningeal progression cannot be irradiated. Situation 4 is probably the most frequent, occurring over successive relapses during which several resistance mechanisms develop in the different relapse sites.

3.4.3. Practical management of secondary TKI resistances

To optimally treat patients with a secondary EGFR-TKI resistance as defined by Jackman et al. [90], certain questions should be addressed:

3.4.3.1. What type of progression is it? Patients with multisite progression, requiring systemic treatment, must be distinguished from those with mono- or oligosite progression, benefiting from locoregional treatment (surgery, cementoplasty, radiotherapy, or radiofrequency ablation) (Fig. 4). Brain MRI must be performed during follow-up to detect exclusive brain metastasis progression [69]. These brain metastases tend to remain TKI-sensitive and be amenable to cranial radiotherapy, without requiring TKI discontinuation [69].

3.4.3.2. What are the underlying progression mechanisms? It is essential to ensure patient medication adherence and rule out factors that could interfere with drug efficacy: digestive problems, concomitant food intake for gefitinib, resuming smoking, intake of proton pump inhibitors for erlotinib, or interaction with medications or foods metabolized by the same cytochrome system (Fig. 4) (Table 4) [95].

In the case of slow progression in the initial tumor sites, a resistance mechanism involving EGFR is probable (resistant

mutation like T790M) [95,113] (Fig. 3). However, in the case of rapid progression involving the initial sites, as well as other metastatic sites, resistance mechanisms independent of the EGFR signaling pathway (Fig. 3) should be considered. Very rapid progression accompanied by large mediastinal lymphadenopathies may suggest a “transformation” into small-cell carcinoma.

FDG-PET may be indicated to assess the tumor progression's molecular heterogeneity, as this technique allows the intensity of uptake (SUV) of progressive lesions to be measured and compared with that of stable lesions. This approach facilitates the distinction between multisite and oligosite progression, and helps guide the biopsy needle into a metabolically active site.

3.4.3.3. Should a rebiopsy be performed in tumor progression cases? If so, where? To rebiopsy has no impact on therapy in clinical today practice. However, obtaining a tumor specimen facilitates the understanding of the main resistance mechanism, while guiding the therapeutic strategy or allowing for patient enrollment into a therapeutic trial [95,104]. The biopsy sample must be large enough to permit full resistance mechanism analysis [114,25,115]. In this setting, a CT- or ultrasound-guided biopsy is preferable to cytological evaluation. However, cytology allows high-quality molecular analyses to be conducted and is better suited to

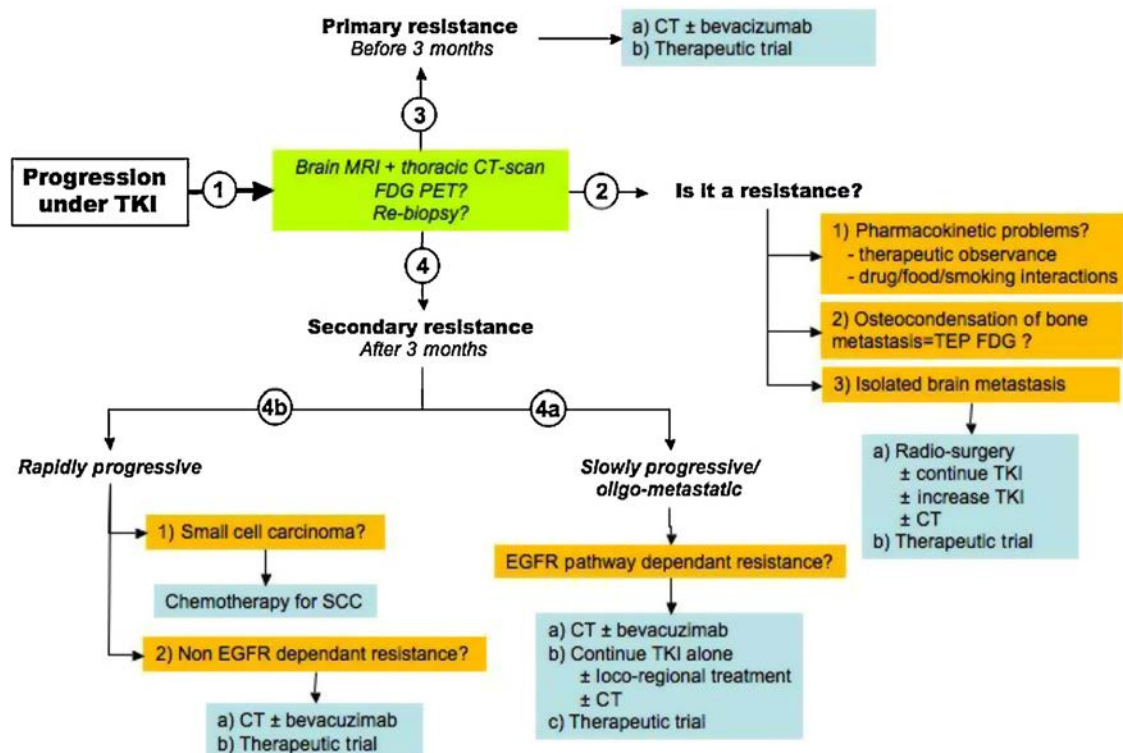


Fig. 4. Therapeutic management of EGFR-mutant NSCLC exhibiting progression under TKI. Therapeutic management of EGFR-mutant NSCLC exhibiting progression under TKI is not yet codified. In a first step, progression (1) must be characterized as well as possible by means of full imaging (brain MRI, thoracic-abdominal-pelvic CT scan, etc.). It may be useful to evaluate the heterogeneity of the progression lines according to the tumor targets, and to perform another biopsy or cytological evaluation, preferably in a recent progression site or a metabolically more active site. A false progression must be ruled out (2) (for pharmacokinetic reasons, or in bone metastasis occurrence or aggravation in relation with an osteocondensation response), as must be brain progression on account of insufficient local TKI concentrations. A progression within the first months indicates primary resistance (3) whose underlying mechanisms are still unclear. Progressions that occur later in time (4) are associated with secondary resistance mechanisms, which are better known. Slow and oligo-metastatic progressions are probably linked to mechanisms that still use the EGFR signaling pathway (4a). On the other hand, fast mediastinal and multimetastatic progressions are likely related to the transformation into small-cell cancer, or to mechanisms that are independent of the EGFR signaling pathway. Therapeutic management of these various situations is probably different, with priority given to the inclusion of patients into therapeutic trials.

in situ hybridization techniques [25,115,116]. Cytology is to be preferred to biopsy in bone metastases cases, as biopsies necessitate decalcification, rendering molecular analysis more difficult. It should also be preferred in cases of pleural effusion or extension to the peritoneum or meninges/brain. Certain authors resort to minimally invasive surgery techniques like mediastinoscopy and thoracoscopy or standard surgical techniques (39% of rebiopsies). Molecular testing conducted on plasma/serum or circulating cells is less sensitive [84,117].

Testing for the persistence of sensitizing mutations – its absence is indicative of a potential second cancer – and for clonal selection of T790M resistant mutation remains a priority. A specific technique, more sensitive than sequencing, should be used [43,95].

3.4.3.4. What are the currently available therapeutic options?. If the patient has undergone first-line TKI therapy, platinum-double chemotherapy with or without bevacizumab is recommended [86–88]. However, other strategies are emerging to be sometimes implemented from the start of first-line therapy, and necessary for subsequent treatment

lines. These strategies should allow for enrolling patients into therapeutic trials (Fig. 4 and Table 3).

3.4.3.4.1. Should TKI therapy be maintained and can it be combined with chemotherapy?. The main question is whether TKI therapy should be continued in the event of progression. TKI discontinuation is associated with explosive tumor progression, or “flare-up”, in 25% of cases [118]. Flare-up appears to be more common in cases of early progression, pleural progression, and brain progression, without being dependent on clonal selection of T790M mutation [118]. Demonstrating early flare-up by conducting two successive PET scans at an 8-day interval after stopping and then restarting TKI therapy indicates that TKI sensitivity is preserved [119]. However, this approach cannot be considered as a standard of care and should be evaluated especially as PET is an expansive procedure not widely reimbursed.

According to retrospective cohort studies, patients with a resistance mechanism likely based on clonal selection of T790M mutation benefited in terms of OS from TKI maintenance therapy in addition to chemotherapy [120–123]. Several therapeutic trials evaluating this approach are ongoing (Table 3) or being implemented [95].

Yet several issues must be addressed: (1) What are the risks of antagonistic effects between TKIs and platinum-based chemotherapy or other agents like vinorelbine, gemcitabine, taxane, or pemetrexed? (2) What are the toxicity risks? Of note, four Phase III trials revealed no toxic effects, but were restricted to adding gefitinib or erlotinib to carboplatin/paclitaxel or cisplatin/gemcitabine doublets [124–127], with data concerning pemetrexed less-well established [120,128–130]. (3) What is the optimal administration method, concurrent or sequential?

3.4.3.4.2. Should TKI therapy be maintained without initiating chemotherapy? This was intensively debated at the 2012 ASCO congress [131]. The RECIST's definition of progression appears poorly suited to NSCLC patients exhibiting EGFR-activating mutations [95,132,133]. Most often, tumor volume shrinking widely exceeds 30% during TKI response and kinetic of growth is usually low during relapse. Opting for chemotherapy in the event of RECIST progression reduces the duration of TKI benefits for patients, while exposing them to chemotherapy toxicity at an earlier stage.

A recent study showed that in 88% of patients undergoing TKI first-line therapy, TKIs were maintained when RECIST progression occurred, with treatment continued for a median duration of 10.1 months [134]. Several teams have proposed this approach in cases of slow local or oligometastatic progression amenable to highly aggressive locoregional treatment, such as radiotherapy, radiofrequency, cementoplasty, surgical excision, or pleurodesis, in patients with prolonged initial TKI responses [95,132–134]. The median time until initiating systemic therapy changes was 13.8 and 22 months in two recent retrospective cohorts [135,136]. Maintaining EGFR-TKI therapy may be justified on condition that imaging, including brain MRI, is performed on a regular basis. A pragmatic therapeutic trial exploring this approach is ongoing in Asia (Table 3).

3.4.3.4.3. Is increasing TKI dosage, switching to another TKI, or reinitiating TKI after a period of chemotherapy useful? The question whether TKI dosage should be increased must be addressed in the event of brain/meningeal progression (see above). While brain/meningeal progression is common, it is rarely accompanied by clonal selection of a secondary resistance mutation like T790M (Fig. 3). The proposed hypothesis holds that progression may be linked to insufficient TKI penetration into brain/meninges (<5% of plasma concentrations) [69]. In certain cases, increasing gefitinib dosage was associated with successive repeated responses, with good clinical tolerance [79,137]. Other experts have successfully proposed switching from gefitinib to erlotinib to increase effective TKI concentrations, or increasing erlotinib dosage either continuously or discontinuously [81,82]. Finally, “pulsatile” administration of high-dose erlotinib has been proposed, with a certain efficacy level [138]. However, increasing the doses above the dose approved by regulatory authorities cannot be recommended except in the context of a clinical trial.

When progression is linked to an acquired secondary resistance mutation in the EGFR or a mechanism independent of the EGFR signaling pathway, increasing first-generation TKI dosage (gefitinib and erlotinib) or switching from one TKI to another is unlikely to produce significant benefits. In two short series involving EGFR-mutated NSCLC patients with disease progression under gefitinib, a switch to erlotinib was proposed [139,140]. The disease control rates were 9 and 22%, respectively, with a 2-month PFS on erlotinib achieved in one series. Similarly, switching from a first-generation TKI to afatinib in the event of secondary resistance did not yield the expected results in the LUX-Lung 1 trial, objective response being only 7%, with no OS benefit [63].

However, renewed sensitivity of EGFR-mutated tumors to TKIs following a TKI-free period, though with chemotherapy, was reported in retrospective series. In a small EGFR-mutated NSCLC patient series, restarting a TKI after a TKI “holiday” on chemotherapy permitted disease control in 12/14 patients (86%), with a PFS of 6.5 months following TKI re-initiation vs. 12.5 months following initial therapy [141].

4. Conclusion

EGFR-TKI prescription as first-line NSCLC therapy requires that EGFR-activating mutation testing be conducted. These mutations are found in 10% of Caucasian and 30% of Asian NSCLCs, with tumors being mostly adenocarcinomas or large-cell carcinomas. Most academic societies recommend this testing to be conducted from the start in all NSCLC patients with predominantly non-squamous metastatic tumors. In 90% of cases, the activating mutations are exon 19 deletions or the L858R point mutation in exon 21. Targeted mutation testing is performed using specific and sensitive methods, with test results obtained in <8 days.

Tumor progression will occur within 9–12 months of therapy, indicative of acquired secondary resistance. The underlying molecular abnormalities are increasingly understood due to widespread re-biopsy use. Only little data is available as to which therapeutic strategy would be best suited: maintaining TKI therapy, switching to chemotherapy, combining the two treatments, or using new therapies targeting other signaling pathways (Table 3) [142].

Conflict of interest statement

Jacques Cadranet has received financial support from Astra-Zeneca, Boehringer-Ingelheim, GSK, Lilly, Pfizer, and Roche to attend pharmaceutical advisory board meetings and speak at educational meetings. He has received travel grants from Boehringer-Ingelheim, Pfizer, and Roche. He was principal investigator or investigator of numerous clinical

research trials for Boehringer-Ingelheim, GSK, Lilly, Pfizer, as well as Roche, without receiving fees.

Reviewers

Oliver Gautschi, M.D., Luzerner Kantonsspital, Department of Medicine, CH-6000 Lucern 15, Switzerland.

Robert Pirker, M.D., Medical University Vienna, Department of Medicine I, Währinger Gürtel 18, Vienna, Austria.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Gabrielle Cremer (www.cremerconsulting.com) for her great help with the translation and help in editing the manuscript. Her work has been paid by research funds from the GRC-04.

References

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 2010;127:2893–917.
- [2] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2008;359:1367–80.
- [3] Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2004;350:379–92.
- [4] Hirsch FR, Jänne PA, Eberhardt WE, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8:373–84.
- [5] Cadranet J, Zalcman G, Sequist L. Genetic profiling and epidermal growth factor receptor-directed therapy in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal* 2011;37:183–93.
- [6] Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2005;5:341–54.
- [7] Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax* 2006;61:140–5.
- [8] <http://www.proteinatlas.org>
- [9] Meert AP, Martin B, Delmotte P, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *European Respiratory Journal* 2002;20:975–81.
- [10] O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncology* 2011;12:795–805.
- [11] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine* 2004;350:2129–39.
- [12] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:13306–11.
- [13] <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>
- [14] Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in 10,117 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) evaluated by the French ERMETIC IFCT network: clinical, molecular, and survival data. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(Suppl.) [abstr 10507].
- [15] Beau-Faller M, Degeorges A, Rolland E, et al. Cross-validation study for epidermal growth factor receptor and KRAS mutation detection in 74 blinded non-small cell lung carcinoma samples: a total of 5550 exons sequenced by 15 molecular French laboratories (evaluation of the EGFR mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non-small cell lung carcinoma [ERMETIC] project – part 1). *Journal of Thoracic Oncology* 2011;6:1006–15.
- [16] Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Science* 2007;98:1817–24.
- [17] Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *Journal of Clinical Pathology* 2013;66:79–89.
- [18] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:169–81.
- [19] Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers – a different disease. *Nature Reviews Cancer* 2007;7:778–90.
- [20] Couraud S, Zalcman G, Milleron B, Morin F, Souquet PJ. Lung cancer in never smokers – a review. *European Journal of Cancer* 2012;48:1299–311.
- [21] Nowak F, Soria JC, Calvo F. Tumour molecular profiling for deciding therapy – the French initiative. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2012;9:479–86.
- [22] Synthèse de l'activité des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers en 2010. Collection Rapports & synthèses. Boulogne Billancourt: INCa; 2011.
- [23] Cadranet J, Mauguen A, Faller M, et al. Impact of systematic EGFR and KRAS mutation evaluation on progression-free survival and overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated by erlotinib in a French prospective cohort (ERMETIC project – part 2). *Journal of Thoracic Oncology* 2012;7:1490–502.
- [24] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:339–46.
- [25] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 2011;6:244–85.
- [26] Lee YJ, Cho BC, Jee SH, et al. Impact of environmental tobacco smoke on the incidence of mutations in epidermal growth factor receptor gene in never-smoker patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:487–92.
- [27] D'Angelo SP, Pietanza MC, Johnson ML, et al. Incidence of EGFR exon 19 deletions and L858R in tumor specimens from men and cigarette smokers with lung adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:2066–70.
- [28] Pham D, Kris MG, Riely GJ, et al. Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:1700–4.
- [29] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* 2009;361:947–57.
- [30] Gridelli C, Ciardiello F, Gallo C, et al. First-line erlotinib followed by second-line cisplatin–gemcitabine chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: the TORCH randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:3002–11.
- [31] Borget I, Cadranet J, Pignon JP, et al. Cost-effectiveness of three strategies for second-line erlotinib initiation in nonsmall-cell lung cancer: the ERMETIC study part 3. *European Respiratory Journal* 2012;39:172–9.
- [32] Wu JY, Yu CJ, Chang YC, Yang CH, Shih JY, Yang PC. Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on “uncommon” epidermal growth factor

- receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2011;17:3812–21.
- [33] Ackerman A, Goldstein MA, Kobayashi S, Costa DB. EGFR delE709-T710insD: a rare but potentially EGFR inhibitor responsive mutation in non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2012;7:e19–20.
 - [34] De Pas T, Toffalorio F, Manzotti M, et al. Activity of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer harboring rare epidermal growth factor receptor mutations. *Journal of Thoracic Oncology* 2011;6:1895–901.
 - [35] He M, Capelletti M, Nafa K, et al. EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 2012;18:1790–7.
 - [36] Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nature Genetics* 2005;37:1315–6.
 - [37] Oxnard GR, Lo PC, Nishino M, et al. Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR Exon 20 insertions. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8:179–84.
 - [38] Ikeda K, Nomori H, Mori T, Sasaki J, Kobayashi T. Novel germline mutation: EGFR V843I in patient with multiple lung adenocarcinomas and family members with lung cancer. *Annals of Thoracic Surgery* 2008;85:1430–2.
 - [39] Ohtsuka K, Ohnishi H, Kurai D, et al. Familial lung adenocarcinoma caused by the EGFR V843I germ-line mutation. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:e191–2.
 - [40] Hata A, Yoshioka H, Fujita S, et al. Complex mutations in the epidermal growth factor receptor gene in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2010;5:1524–8.
 - [41] Wu SG, Chang YL, Hsu YC, et al. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma of complex epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations with the classical mutation pattern. *Oncologist* 2008;13:1276–84.
 - [42] Yasuda H, Kobayashi S, Costa DB. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncology* 2012;13:e23–31.
 - [43] Su KY, Chen HY, Li KC, et al. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:433–40.
 - [44] Marchetti A, Del Grammasio M, Filice G, et al. Complex mutations & subpopulations of deletions at exon 19 of EGFR in NSCLC revealed by next generation sequencing: potential clinical implications. *PLoS ONE* 2012;7:e42164.
 - [45] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncology* 2010;11:121–8.
 - [46] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *New England Journal of Medicine* 2010;362:2380–8.
 - [47] Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, et al. Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin–paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Annals of Oncology* 2013;24:54–9.
 - [48] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EUR-TAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncology* 2012;13:239–46.
 - [49] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncology* 2011;12:735–42.
 - [50] Yang CH, Schuler MH, Yamamoto N, et al. LUX-Lung 3: a randomized, open-label, phase III study of afatinib versus pemetrexed and cisplatin as first-line treatment for patients with advanced adenocarcinoma of the lung harboring EGFR-activating mutations. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(Suppl.) [abstr LBA7500].
 - [51] Han JY, Park K, Kim SW, et al. First-SIGNAL: First-line single-agent Iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *Journal of Clinical Oncology* 2012;10:1122–8.
 - [52] Hirsh V, Cadranet J, Cong XJ, et al. Symptom and quality of life benefit of afatinib in advanced non-small-cell lung cancer patients previously treated with erlotinib or gefitinib: results of a randomized phase IIb/III trial (LUX-Lung 1). *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8(February (2)):229–37.
 - [53] Kris MG, Mok T, Ignatius Ou SH. First-line dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-HER tyrosine kinase inhibitor, for patients with EGFR-mutant lung cancers. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30(Suppl.) [abstr 7530].
 - [54] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2002;346:92–8.
 - [55] Paz-Ares L, de Marinis F, Dediu M, et al. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Oncology* 2012;13:247–55.
 - [56] Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *Journal of Clinical Oncology* 2013. PMID: 23816960 [Epub ahead of print].
 - [57] Yang JCH, Shih JY, Su WC, et al. Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *Lancet Oncology* 2012;13:539–48.
 - [58] Rukazenkov Y, Speake G, Marshall G, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: similar but different? *Anti-Cancer Drugs* 2009;20:856–66.
 - [59] Cataldo VD, Gibbons DL, Pérez-Soler R, Quintás-Cardama A. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib. *New England Journal of Medicine* 2011;364:947–55.
 - [60] Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Barni S. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Clinical Lung Cancer* 2012;13:107–14.
 - [61] Ramalingam SS, Blackhall F, Krzakowski M, et al. Randomized phase II study of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-human epidermal growth factor receptor inhibitor, versus erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:3337–44.
 - [62] Kim Y, Ko J, Cui Z, et al. The EGFR T790M mutation in acquired resistance to an irreversible second-generation EGFR inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* 2012;11:784–91.
 - [63] Miller VA, Hirsh V, Cadranet J, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncology* 2012;13:528–38.
 - [64] Yap TA, Vidal L, Adam J, et al. Phase I trial of the irreversible EGFR and HER2 kinase inhibitor BIBW 2992 in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:3965–72.
 - [65] Ling J, Fettner S, Lum BL, Riek M, Rakhit A. Effect of food on the pharmacokinetics of erlotinib, an orally active epidermal growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitor, in healthy individuals. *Anti-Cancer Drugs* 2008;19:209–16.
 - [66] Duong S, Leung M. Should the concomitant use of erlotinib and acid-reducing agents be avoided? The drug interaction between

- erlotinib and acid-reducing agents. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* 2011;17:448–52.
- [67] Hamilton M, Wolf JL, Rusk J, et al. Effects of smoking on the pharmacokinetics of erlotinib. *Clinical Cancer Research* 2006;12:2166–71.
- [68] Hughes AN, O'Brien MER, Petty WJ, et al. Overcoming CYP1A1/IA2 mediated induction of metabolism by escalating erlotinib dose in current smokers. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:1220–6.
- [69] Jamal-Hanjani M, Spicer J. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of epidermal growth factor receptor-mutant non-small cell lung cancer metastatic to the brain. *Clinical Cancer Research* 2012;18:938–44.
- [70] He C, Liu M, Zhou C, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 2009;125:2393–9.
- [71] Matsumoto S, Takahashi K, Iwakawa R, et al. Frequent EGFR, mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 2006;119:1491–4.
- [72] Hotta K, Kiura K, Ueoka H, et al. Effect of gefitinib ('Iressa', ZD1839) on brain metastases in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46:255–61.
- [73] Porta R, Sánchez-Torres JM, Paz-Ares L, et al. Brain metastases from lung cancer responding to erlotinib: the importance of EGFR mutation. *European Respiratory Journal* 2011;37:624–31.
- [74] Park SJ, Kim HT, Lee DH, et al. Efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for brain metastasis in non-small cell lung cancer patients harboring either exon 19 or 21 mutation. *Lung cancer* 2012;77:556–60.
- [75] Li Z, Lu Y, Zhao H. The retrospective analysis of the frequency of EGFR mutations and the efficacy of gefitinib in NSCLC patients with brain metastasis. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(Suppl.) [abstr e18065].
- [76] Wu Y, Zhou C, Cheng Y, et al. A phase II study (CTONG0803) of erlotinib as second-line treatment in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts) with asymptomatic brain metastases (BM) after first-line chemotherapy (CT). *Journal of Clinical Oncology* 2011;(Suppl.) [abstract 7605].
- [77] Yi HG, Kim HJ, Kim YJ, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are effective for leptomeningeal metastasis from non-small cell lung cancer patients with sensitive EGFR mutation or other predictive factors of good response for EGFR TKI. *Lung Cancer* 2009;65:80–4.
- [78] Kim JE, Lee DH, Choi Y, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as a first-line therapy for never-smokers with adenocarcinoma of the lung having asymptomatic synchronous brain metastasis. *Lung Cancer* 2009;65:351–4.
- [79] Jackman DM, Holmes AJ, Lindeman N, et al. 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. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:4517–20.
- [80] Grommes C, Oxnard GR, Kris MG, et al. "Pulsatile" high-dose weekly erlotinib for CNS metastases from EGFR mutant non-small cell lung cancer. *Neuro-oncology* 2011;13:1364–9.
- [81] Hata A, Katakami N, Kaji R, Fujita S, Imai Y. Erlotinib for whole-brain-radiotherapy-refractory leptomeningeal metastases after gefitinib failure in a lung adenocarcinoma patient. *Journal of Thoracic Oncology* 2012;7:770–1.
- [82] Katayama T, Shimizu J, Suda K, et al. Efficacy of erlotinib for brain and leptomeningeal metastases in patients with lung adenocarcinoma who showed initial good response to gefitinib. *Journal of Thoracic Oncology* 2009;4:1415–9.
- [83] Gow CH, Chien CR, Chang YL, et al. Radiotherapy in lung adenocarcinoma with brain metastases: effects of activating epidermal growth factor receptor mutations on clinical response. *Clinical Cancer Research* 2008;14:162–8.
- [84] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *New England Journal of Medicine* 2009;361:958–67.
- [85] Moran T, Sequist LV. Timing of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with lung cancer with EGFR mutations. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:3330–6.
- [86] Peters S, Adjei AA, Gridelli C, Reck M, Kerr K, Felip E, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2012;23(Suppl. 7):vii56–64.
- [87] Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29:2121–7.
- [88] Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, et al. Non-small cell lung cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2012;10:1236–71.
- [89] Inoue A, Kobayashi K, Usui K, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:1394–400.
- [90] Jackman D, Pao W, Riely GJ, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:357–60.
- [91] Pluquet E, Cadranet J, Legendre A, et al. Osteoblastic reaction in non-small cell lung carcinoma and its association to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors response and prolonged survival. *Journal of Thoracic Oncology* 2010;5:491–6.
- [92] Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncology* 2011;12:175–80.
- [93] Pallis A, Briasoulis E, Linardou H, et al. Mechanisms of resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small-cell lung cancer: clinical and molecular considerations. *Current Medicinal Chemistry* 2011;18:1613–28.
- [94] Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nature Medicine* 2012;18:521–8.
- [95] Oxnard GR, Arcila ME, Chmielecki J, Ladanyi M, Miller VA, Pao W. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2011;17:5530–7.
- [96] Bean J, Brennan C, Shih JY, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:20932–7.
- [97] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039–43.
- [98] Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clinical Cancer Research* 2011;17:1616–22.
- [99] Yu H, Arcila ME, Rekhymen N, et al. Analysis of Mechanisms of acquired resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clinical Cancer Research* 2013 [published Online First March 7].
- [100] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science Translational Medicine* 2011;3(75):75ra26.
- [101] Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, et al. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Science Translational Medicine* 2011;3:90ra59.

- [102] Ruppert AM, Beau-Faller M, Neuville A, et al. EGFR-TKI and lung adenocarcinoma with CNS relapse: interest of molecular follow-up. *European Respiratory Journal* 2009;33:436–40.
- [103] Gounant V, Wislez M, Poulot V, et al. Subsequent brain metastasis responses to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in a patient with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;58:425–8.
- [104] Zhang Z, Lee JC, Lin L, et al. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nature Genetics* 2012;44:852–60.
- [105] Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:2070–5.
- [106] Janjigian YY, Groen HJM, Horn LM. Activity and tolerability of afatinib (BIBW 2992) and cetuximab in NSCLC patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib. *Journal of Clinical Oncology* 2010;29(Suppl.) [abstr 7525].
- [107] Suda K, Murakami I, Katayama T, et al. Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2010;16:5489–98.
- [108] Yano S, Yamada T, Takeuchi S, et al. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *Journal of Thoracic Oncology* 2011;6:2011–7.
- [109] Takezawa K, Pirazzoli V, Arcila ME, et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discovery* 2012;2:922–33.
- [110] Hurbini A, Wislez M, Busser B, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma. *Journal of Pathology* 2011;225:83–95.
- [111] Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, et al. Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway. *Cancer Research* 2013;73:834–43.
- [112] Sos ML, Koker M, Weir BA, et al. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Research* 2009;69:3256–61.
- [113] Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *Journal of Thoracic Disease* 2011;3:10–8.
- [114] Ilie M, Hofman P. Pitfalls in lung cancer molecular pathology: how to limit them in routine practice? *Current Medicinal Chemistry* 2012;19:2638–51.
- [115] Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012;76:1–18.
- [116] Fleury-Feith J, Gounant V, Lacave R, Cadranet J, Bernaudin JF. Multi-gene mutation analysis on cytologic samples. *Chest* 2011;140:1664 [author reply 1664–5].
- [117] Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2012;7: 115–21.
- [118] Chaft JE, Oxnard GR, Sima CS, Kris MG, Miller VA, Riely GJ. Disease flare after tyrosine kinase inhibitor discontinuation in patients with EGFR-mutant lung cancer and acquired resistance to erlotinib or gefitinib: implications for clinical trial design. *Clinical Cancer Research* 2011;17:6298–303.
- [119] Riely GJ, Kris MG, Zhao B, et al. Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. *Clinical Cancer Research* 2007;13: 5150–5.
- [120] Kim YH, Fukuhara A, Mishima M. Should epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor be continued beyond progressive disease? *Case Reports in Oncology* 2011;4:470–4.
- [121] Shukuya T, Takahashi T, Tamiya A, et al. Gefitinib plus paclitaxel after failure of gefitinib in non-small cell lung cancer initially responding to gefitinib. *Anticancer Research* 2009;29:2747–51.
- [122] Maruyama R, Wataya H, Seto T, Ichinose Y. Treatment after the failure of gefitinib in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* 2009;29:4217–21.
- [123] Jänne PA, Wang X, Socinski MA, et al. Randomized Phase II trial of erlotinib alone or with carboplatin and paclitaxel in patients who were never or light former smokers with advanced lung adenocarcinoma: CALGB 30406 trial. *Journal of Clinical Oncology* 2012;30:2063–9.
- [124] Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial – INTACT 1. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22:777–84.
- [125] Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial – INTACT 2. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22:785–94.
- [126] Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23:5892–9.
- [127] Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:1545–52.
- [128] Davies AM, Ho C, Beckett L, et al. Intermittent erlotinib in combination with pemetrexed: phase I schedules designed to achieve pharmacodynamic separation. *Journal of Thoracic Oncology* 2009;4:862–8.
- [129] Ranson M, Reck M, Anthoney A, et al. Erlotinib in combination with pemetrexed for patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): a phase I dose-finding study. *Annals of Oncology* 2010;21:2233–9.
- [130] Yoshimura N, Okishio K, Mitsuoka S, et al. Prospective assessment of continuation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of pemetrexed. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8:96–101.
- [131] www.asco.org
- [132] Mok TSK. Living with imperfection. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28:191–2.
- [133] Oxnard GR, Morris MJ, Hodi FS, et al. When progressive disease does not mean treatment failure: reconsidering the criteria for progression. *Journal of the National Cancer Institute* 2012;104:1534–41.
- [134] Nishino M, Cardarella S, Dahlberg SE, et al. Radiographic assessment and therapeutic decisions at RECIST progression in EGFR-mutant NSCLC treated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* 2013;79:283–8.
- [135] Yu HA, Sima CS, Huang J, et al. Local therapy with continued EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy as a treatment strategy in EGFR-mutant advanced lung cancers that have developed acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8:346–51.
- [136] Weickhardt AJ, Aisner DL, Franklin WA, Varella-Garcia M, Doebele RC, Camidge DR. Diagnostic assays for identification of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer. *Cancer* 2012, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.27913>.
- [137] Dhruva N, Socinski MA. Carcinomatous meningitis in non-small-cell lung cancer: response to high-dose erlotinib. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:e31–2.
- [138] Riely GJ, Rizvi NA, Kris MG, et al. Randomized phase II study of pulse erlotinib before or after carboplatin and paclitaxel in current or former smokers with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:264–70.

- [139] Costa DB, Nguyen KSH, Cho BC, et al. Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancers with resistance to gefitinib. *Clinical Cancer Research* 2008;14:7060–7.
- [140] Kaira K, Naito T, Takahashi T, et al. Pooled analysis of the reports of erlotinib after failure of gefitinib for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;68:99–104.
- [141] Becker A, Crombag L, Heideman DAM, et al. Retreatment with erlotinib: regain of TKI sensitivity following a drug holiday for patients with NSCLC who initially responded to EGFR-TKI treatment. *European Journal of Cancer* 2011;47:2603–6.
- [142] Somaiah N, Simon NG, Simon GR. A tabulated summary of targeted and biologic therapies for non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2012;7(16 Suppl. 5):S342–68.

Biographies

Jacques Cadranet MD, PhD is Professor of Pneumology and Head of Chest Department at Hôpital Tenon and Pierre & Marie Curie, Paris 6 University. He is also director of a clinical research group named Therascan. He has coordinated the national ERMETIC project funded by the French National Cancer Institute whose objective was the implementation in France of the EGFR mutation analysis in routine practice. He is involved as principal investigator or co-investigator in therapeutic trials on targeted therapies. His research at the laboratory was to better characterize the molecular aspects of bronchioloalveolar carcinoma.

Anne-Marie Ruppert MD is an onco-pneumologist working in the Chest Department at Hôpital Tenon and Pierre & Marie Curie, Paris 6 University. She is also doctorant in the

Therascan research group under the supervision of Professor Marie Wislez. She also worked with Dr. Michel Faller to better understand the interaction between the c-met and oestrogen pathways.

Michèle Beau-Faller MD, PhD is onco-pneumologist and molecular biologist. Working for the molecular platform at the Strasbourg University Hospital, she is responsible for the identification in routine practice of several oncogenic mutations in lung cancer. She was the molecular expert for the national ERMETIC project. Her research at the laboratory was to identify rare EGFR mutations and their sensitivity to EGFR-TKI and to better understand the mechanisms of primary and secondary resistance to EGFR-TKI.

Marie Wislez MD, PhD is Professor of Pneumology in the Chest Department at Hôpital Tenon and Pierre & Marie Curie, Paris 6 University. She is also team leader in the Therascan research group and supervisor of doctorant and post-doctorant students. Her research at the laboratory was to conduct on human and animal models aiming to better understand mechanisms of primary resistance to platinum and EGFR-TKI. She also have developed a very intensive laboratory program to better characterize the molecular aspects of bronchioloalveolar carcinoma and sarcomatoid carcinoma. Finally, she was co-principal investigator of the IFCT-0801 TASTE trial that was randomizing patients with a resected lung adenocarcinoma to either standard chemotherapy or an adjuvant therapy approach customized by molecular characteristics of the tumor.



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



SÉRIE « BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DU CANCER BRONCHIQUE »

Coordonnée par F. Barlési.

Un regard simple sur la biologie du cancer bronchique : EGFR

A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway

A.-M. Ruppert^a, M. Wislez^{a,b}, V. Poulot^{b,c,d},
R. Lacave^{b,c,d}, M. Antoine^{b,c,e}, J. Cadranel^{a,*,b,c}

^a Service de pneumologie et réanimation, hôpital Tenon, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 4, rue de la Chine, 75970 Paris cedex 20, France

^b Équipe de recherche 2, service de pneumologie, université Pierre et Marie Curie, université Paris VI, 75970 Paris, France

^c Service d'histologie et de biologie tumorale, hôpital Tenon, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75970 Paris, France

^d Plateforme d'oncologie pathologie moléculaire, hôpital Tenon, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75970 Paris, France

^e Service d'anatomie-pathologique, hôpital Tenon, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75970 Paris, France

Reçu le 4 mars 2011 ; accepté le 7 mars 2011

Disponible sur Internet le 13 avril 2011

MOTS CLÉS

Cancer bronchique ;
Pronostic ;
Prédictif ;
Biomarqueur ;
Récepteur tyrosine
kinase ;
Inhibiteur tyrosine
kinase ;
Gefitinib ;
Erlotinib

Résumé Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Il devient un oncogène par acquisition d'une mutation activatrice, située essentiellement dans les exons 19 ou 21 du gène. Il joue un rôle clé dans l'apparition et le développement des adénocarcinomes pulmonaires mutés pour l'EGFR. La présence d'une mutation activatrice de l'exon 19 ou 21 est associée à une sensibilité accrue aux inhibiteurs de la fonction tyrosine kinase de l'EGFR ou EGFR-TKis, mais est également un facteur de bon pronostic dans le cancer bronchique. La technique de référence pour la détection de ces mutations est le séquençage, mais des techniques plus sensibles sont en cours d'évaluation. Les patients dont la tumeur exprime une mutation de sensibilité de l'EGFR peuvent bénéficier d'un traitement par gefitinib dès la première ligne de traitement. Les indications de l'erlotinib ne sont pas liées au statut EGFR de la tumeur et l'erlotinib peut être proposé en deuxième ou troisième ligne et en maintenance après stabilisation par une chimiothérapie à base de platine. Après une réponse clinique initiale sous EGFR-TKis, les patients dont la tumeur est mutée pour l'EGFR développent une résistance secondaire au traitement. À ce jour, deux mécanismes de

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jacques.cadranel@tnn.aphp.fr (J. Cadranel).

KEYWORDS

EGFR;
Prognosis;
Predictive;
Biomarker;
Tyrosine kinase
receptor;
Tyrosine kinase
inhibitor;
Gefitinib;
Erlotinib

résistance secondaire sont identifiés, la sélection de la mutation T790M de l'exon 20 de l'EGFR et l'amplification de MET. D'autres anomalies moléculaires comme les mutations de *ras* ou la présence d'un gène de fusion *MLA4/ALK* seraient mutuellement exclusives avec les mutations de l'EGFR et sont associées à une résistance primaire aux EGFR-TKis.

© 2011 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a cell membrane tyrosine kinase receptor. Activating mutations at exon 19 and 21 of the EGFR gene are associated with the occurrence and development of lung adenocarcinoma. These gain of function mutations predict responsiveness to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs), erlotinib or gefitinib and are also a favorable prognostic factor in lung cancer. Sequencing is the recommended technique to detect the mutations, but other more sensitive techniques are under evaluation. Treatment as first line therapy by gefitinib is limited to lung cancer patients harboring an EGFR mutation. Erlotinib can be given regardless of the EGFR status as second or third line therapy, as well as maintenance therapy in patients with a stable disease after platinum based chemotherapy. In EGFR mutated tumors, most patients present a recurrence of the disease, despite an initial response on EGFR TKIs. Two mechanisms of secondary resistance have been identified, the selection of the T790M mutation in EGFR exon 20 and the MET amplification. Other molecular anomalies as the *ras* mutations or the *MLA-ALK* protein fusion are mutually exclusive with the EGFR mutations and are associated with primary resistance to EGFR TKIs.

© 2011 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Le récepteur du facteur de croissance épidermique ou *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) des anglosaxons est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Il joue un rôle clé dans l'apparition et le développement du cancer bronchique. Il est à ce jour le seul biomarqueur dont le résultat est déterminant dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). La présence d'une mutation activatrice dans les exons 19 ou 21 du gène de l'EGFR au sein de la tumeur est associée à une sensibilité accrue aux inhibiteurs de la fonction tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKIs), gefitinib ou erlotinib. Seuls les patients dont la tumeur exprime une mutation de sensibilité de l'EGFR bénéficient d'un traitement par EGFR-TKIs en première ligne de traitement par rapport à une chimiothérapie par un doublet de platine. En raison de l'abondance de la littérature sur l'EGFR, cet article se limite volontairement aux seules études effectuées dans le CBNPC de stade avancé (IIIb ou IV), ainsi qu'aux études qui ont permis d'aboutir aux autorisations de mise sur le marché des EGFR-TKIs, erlotinib puis gefitinib.

La biologie de l'*Epidermal Growth Factor Receptor*

Structure

Le gène du récepteur de l'EGF est situé au niveau du bras court du chromosome 7 en 7p12.13 [1]. Il est constitué de 28 exons (200 kb) et code une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 170 kDa [2]. La protéine EGFR (ou erbB1, HER1) appartient à la famille des facteurs de croissance épidermiques ErbB/HER, tout comme erbB2/HER2/neu, erbB3/HER3 et erbB4/HER4. Elle est impliquée dans les

mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration ainsi que la différenciation cellulaire. L'EGFR correspond au prototype des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase et présente trois domaines fonctionnels [3] (Fig. 1a) :

- un domaine extracellulaire NH₂-terminal situé dans le milieu extérieur qui contient le site de liaison capable de fixer ses ligands spécifiques ;
- un domaine transmembranaire, hydrophobe, qui permet au récepteur de rester ancré dans la membrane plasmique ;
- un domaine intracellulaire COOH-terminal, présentant une activité enzymatique tyrosine kinase. Ce domaine comporte un petit lobe qui contient un site de liaison de l'ATP et un grand lobe qui contient le site catalytique de l'enzyme et une extrémité riche en résidus tyrosine qui vont subir une phosphorylation.

Différents ligands de l'EGFR sont connus. L'EGF a été un des premiers facteurs de croissance découvert et fait partie d'une grande famille de facteurs de croissance comprenant le TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), l'amphiréguline, l' α -celluline, l'épitréguline et l'*heparine-binding EGF*. Le TGF- α et l'EGF sont des ligands spécifiques de l'EGFR qui jouent un rôle clé dans la modulation de la biologie cellulaire.

Expression et rôle physiologique de l'*Epidermal Growth Factor Receptor*

La protéine EGFR est exprimée dans la plupart des types cellulaires à un taux de 2×10^4 à 2×10^5 récepteurs par cellule (Fig. 2). Au niveau de l'appareil respiratoire, l'expression de l'EGFR est forte dans les cellules épithéliales bronchiques et modérée dans les cellules épithéliales alvéolaires [4]. Les souris génétiquement modifiées n'exprimant pas l'EGFR ne sont pas viables. Elles présentent des anomalies

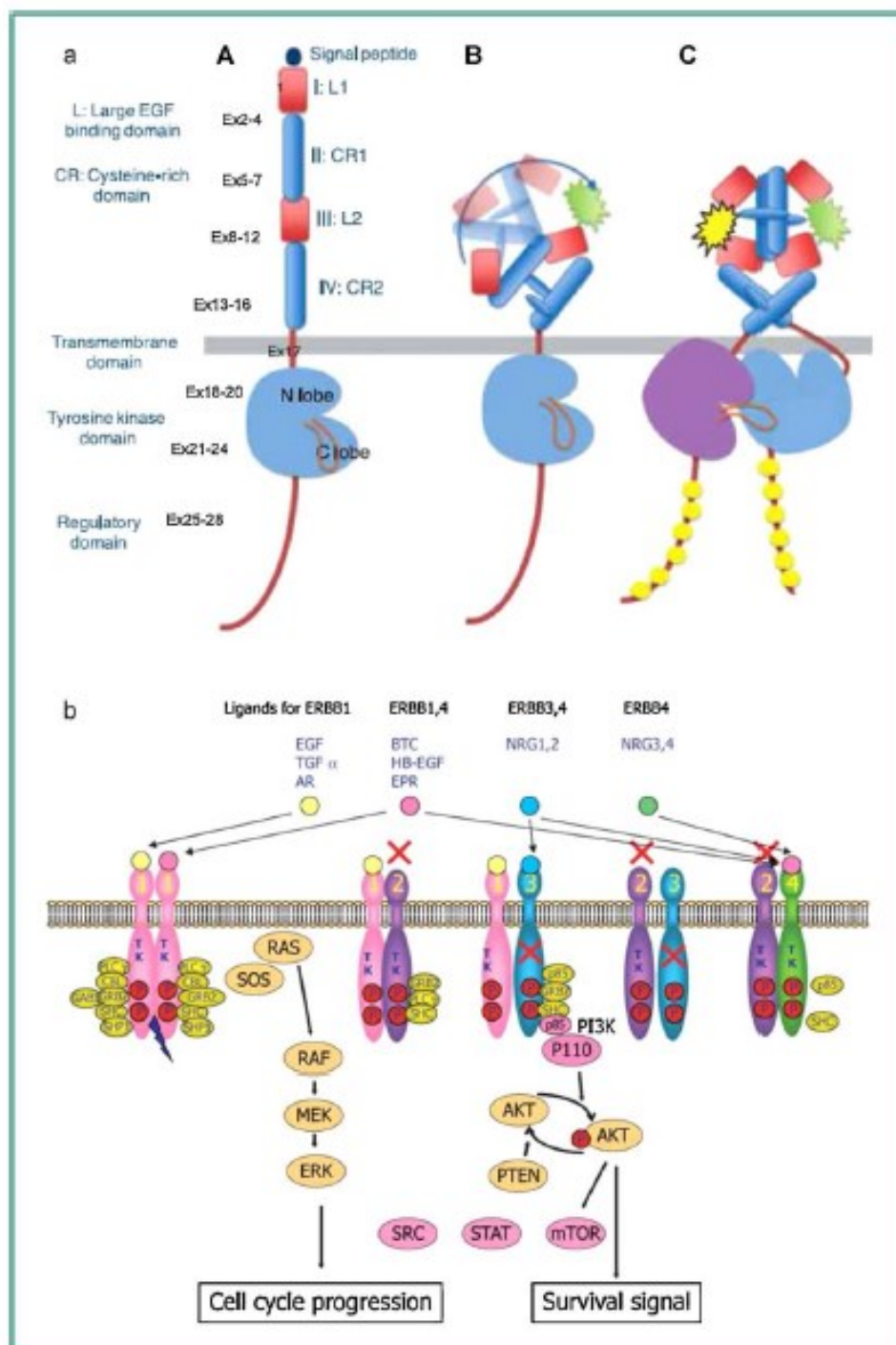


Figure 1. a : Structure du récepteur de l'Epidermal Growth Factor Receptor, fixation du ligand et activation du récepteur par dimérisation (d'après Mitsudomi T in *FEBS J* 2010;277(2):301–30 [36]); b : La famille Epidermal Growth Factor Receptor et ses voies de signalisation (d'après Mitsudomi T in *Cancer Science* 2007;98(12):1817–1824 [22]).

du développement liées à une immaturité épithéliale touchant plusieurs organes, dont la peau, le tube digestif et le système nerveux [5]. Au niveau pulmonaire, ces souris présentent des poumons immatures. Il n'est pas connu si cette hypoplasie est uniquement en rapport avec un retard de croissance ou bien est liée à un défaut de différenciation tissulaire [5,6].

L'importance physiologique de l'EGFR aux niveaux digestif et cutané est confirmée par l'analyse des principaux effets secondaires des EGFR-TKIs, erlotinib ou gefitinib. Les effets indésirables à type de diarrhées, d'acné ou de rash sont fréquents et retrouvés chez plus de 20% des patients traités [7–9] ; leur fréquence et leur intensité sont fonction de la dose. Les biopsies cutanées sous gefitinib

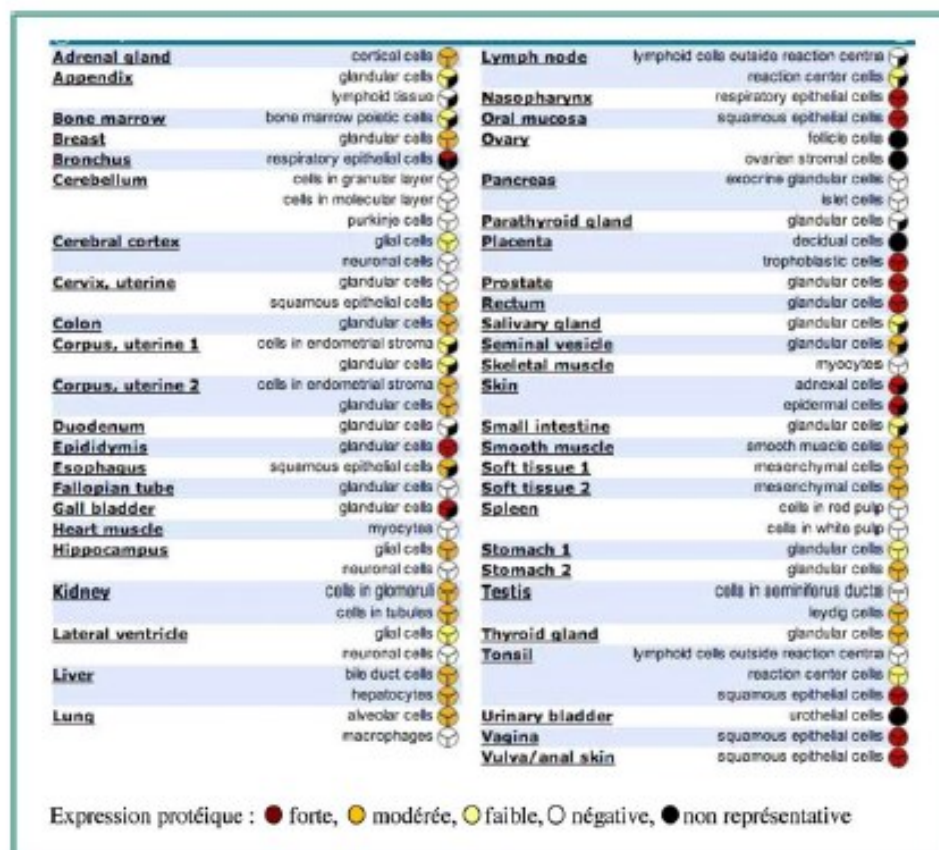


Figure 2. Expression de l'Epidermal Growth Factor Receptor dans le tissu normal d'après <http://www.proteinatlas.org>. Expression protéique : forte, modérée, faible, négative, non représentative.

rèvent une réduction de l'épaisseur de la couche cornée avec une accumulation de kératine au niveau des follicules pileux.[10].

Activation de l'Epidermal Growth Factor Receptor

Le récepteur est inactif sous sa forme de monomère. La fixation du ligand au domaine extracellulaire entraîne un changement de conformation qui favorise le rapprochement de deux monomères (Fig. 1a). Le récepteur activé est formé d'un homo- ou d'un hétéro-dimère, entre l'EGFR et un autre récepteur de la famille Erb. Le rapprochement des deux domaines tyrosine-kinases aboutit à l'activation de la fonction tyrosine kinase et permet l'auto- ou la trans-phosphorylation des différents résidus tyrosine situés à l'extrémité COOH-terminale intracellulaire du récepteur [11]. Le récepteur activé va pouvoir s'associer à différentes protéines adaptatrices intracellulaires permettant la transduction du signal de la surface cellulaire à son noyau. Les récepteurs HER2 et HER3 ont une structure apparentée à celle de l'EGFR. Cependant, aucun ligand n'est connu pour HER2 et ce récepteur est considéré comme « sourd ». HER2 est l'hétérodimère privilégié de l'EGFR. HER3 est un récepteur unique dans le sens où il ne présente pas d'activité tyrosine kinase, il est considéré comme « muet ». Il exprime cependant six sites de phosphorylation et permet d'être activé en cas d'hétérodimérisation avec l'EGFR ou HER2[12].

Après activation du récepteur, la transduction du signal implique essentiellement trois types de molécules : les protéines à domaines SH2/SH3, les protéines G monomériques et les protéines kinases avant d'emprunter différentes voies de signalisations (Fig. 1b).

Les protéines à domaine src homology region 2 et 3

Les protéines à domaine src homology region 2 et 3 (SH2/SH3) sont le premier relais de l'action des récepteurs à tyrosine kinase. Ces domaines ont été initialement identifiés dans la protéine p60^{src}. Comme ils ont été retrouvés par la suite dans d'autres protéines, avec une bonne conservation, ils ont été appelés SH2/SH3 pour src homology region 2 et 3. Les domaines SH2 comportent deux poches : une première poche qui reconnaît spécifiquement une tyrosine kinase, uniquement lorsqu'elle est phosphorylée, une deuxième poche qui reconnaît un résidu tyrosine phosphorylée.

La voie Growth Factor Receptor Bound-son of sevenless-ras

La protéine cytoplasmique Grb2 (Growth Factor Receptor Bound) possède un domaine SH2 situé entre deux domaines SH3. Les domaines SH3 permettent la liaison de Grb2 à la protéine sos (son of sevenless). Lorsque l'EGFR s'autophosphoryle, la tyrosine phosphorylée est reconnue par le domaine SH2 de Grb2, d'où l'interaction EGFR/Grb2/sos. La protéine se trouve positionnée à proximité du substrat, la protéine p21 codée par ras. La protéine

sos est un facteur d'échange qui agit sur ras-GDP pour faciliter le remplacement du GDP par le GTP.

La protéine ras ou (p21^{ras})

La protéine ras (ou p21^{ras}) a la propriété de lier le GTP, puis dans un second temps d'hydrolyser ce GTP en GDP. Un signal cellulaire est transmis à l'intérieur de la cellule durant le temps où ras est lié au GTP.

La cascade des *Mitogen Activated Protein* kinases

La protéine ras, activée par sa liaison à GTP grâce à sos, agit sur la kinase raf-1 en provoquant un changement de localisation de cette kinase [3]. La kinase raf-1 activée induit une phosphorylation en cascade de deux autres MAP-kinases (*Mitogen Activated Protein*), MEK (*MAP-Extracellular signal Regulated Kinase*) puis ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*). Cette dernière, après activation, est transloquée dans le noyau et phosphoryle à son tour différents facteurs de transcription comme fos, jun ou myc. Cette voie de signalisation permet de contrôler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'invasion tissulaire et l'angiogenèse.

La voie de la phosphatidylinositol 3 kinase

Les membranes lipidiques contiennent des phospholipides, dont certains sont des phosphoinositides. Le phosphoinositol peut être clivé par les phospholipases C et exercer un rôle de médiateur intracellulaire. Dans certains cas, les carbones du cycle inositol vont subir une phosphorylation spécifique, par la phosphatidylinositol 3 kinase (PI-3 K). Cette molécule sert de point d'ancrage à de nombreuses protéines et permet d'initier des voies de signalisation. La protéine kinase B (PKB ou Akt) est une sérine/ thréonine kinase qui va être activée par PI-3 K et qui va phosphoryler de nombreux substrats cytosoliques, dont mTOR. Cette voie de signalisation aboutit à l'inhibition de l'apoptose et à la prolifération cellulaire.

La voie Janus kinase—*Signal Transducer and Activator of Transcription*

Une autre voie de signalisation intracellulaire peut être mise en jeu par EGFR. Jak (Janus kinase) s'autophosphoryle sur les tyrosines de l'EGFR qui vont recruter des protéines cytosoliques spécifiques à domaine SH2, qui sont appelées STAT. Les STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) sont à la fois des médiateurs de signaux membranaires et des facteurs de transcription. Cette voie de signalisation est essentiellement impliquée dans l'inhibition de l'apoptose.

Modulation de l'activité de l'*Epidermal Growth Factor Receptor*

La modulation de l'activité de l'EGFR peut schématiquement se faire à différents niveaux et de manière non exclusive :

- sécrétion par la cellule de son propre ligand, EGF ou TGF- α , aboutissant à une activation autocrine du récepteur ;
- surexpression de l'EGFR par régulation transcriptionnelle [13]. Par exemple, la transcription d'EGFR est modulée par un polymorphisme de séquence de l'intron 1 d'EGFR. La variation du nombre de dinucléotides CA (entre 14 et

21 CA) dans cet intron aboutit à des niveaux d'expression d'ARNm différents [14]. In vitro, la transcription d'EGFR diminue en cas d'augmentation du nombre de dinucléotides CA, alors que la diminution de répétition de dinucléotides CA entraîne une augmentation de la transcription d'EGFR. L'effet constaté sur la transcription in vitro se traduit sur l'expression protéique observée in vivo ;

- modulation de l'activité d'EGFR en fonction du type d'hétérodimère formé et ainsi des voies de signalisation activées. Un homodimère EGFR-EGFR induit une prolifération faible et active préférentiellement la voie des MAP kinases, impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Les hétérodimères comprenant HER2 ou HER3, comme par exemple EGFR-HER2 et HER2-HER3 induisent une prolifération plus élevée. Ces hétérodimères activent préférentiellement les voies Jak/STAT et PI-3 K/Akt également impliquées dans l'inhibition de l'apoptose ;
- surexpression pathologique de l'EGFR par augmentation du nombre de copies du gène sur le même chromosome (amplification) ou par augmentation du nombre de chromosomes 7 (polysomie) ;
- apparition de mutations oncogéniques activatrices. L'homologue de l'EGFR a été identifié comme un oncogène viral responsable de la leucémie chez le poulet. La protéine v-Erb induit une activation permanente de l'EGFR sur les érythroblastes aviaires et induit une prolifération tumorale des cellules. Dans plusieurs cancers dont le CBNPC, l'EGFR devient un oncogène par acquisition d'une mutation activatrice. Le récepteur est activé de façon constitutive et cela en l'absence de ligand [15–17]. Des modèles animaux ont été développés permettant l'expression restreinte et conditionnelle d'une mutation activatrice de l'EGFR dans les pneumocytes de type II. Dans le poumon de ces animaux, on observe successivement une hyperplasie alvéolaire atypique, un adénome et finalement un adénocarcinome [18,19]. L'arrêt de la transcription d'EGFR ou le traitement par EGFR-TKI entraîne une régression tumorale complète. Ces adénocarcinomes mutés présentent une addiction oncogénique vis-à-vis de l'EGFR. La mutation d'EGFR est mutuellement exclusive d'autres mutations impliquées dans le cancer bronchique, en particulier celle du gène ras ou de la protéine de fusion EML4-ALK.

- La recherche dans la tumeur d'une mutation activatrice de l'EGFR est le seul biomarqueur connu modifiant le traitement des CBNPC.
- Le TGF- α et l'EGF sont des ligands spécifiques de l'EGFR et jouent un rôle clé dans la modulation de la biologie cellulaire.
- L'expression de l'EGFR est forte dans les cellules épithéliales bronchiques et modérée dans les cellules épithéliales alvéolaires.
- L'activation de l'EGFR passe par la formation d'un homo- ou d'un hétéro-dimère, entre l'EGFR et un autre récepteur de la famille Erb.

- La transduction du signal fait intervenir trois types de molécules : les protéines à domaines SH2/SH3, les protéines G monomériques et les protéines kinases.
- Les mutants de l'EGFR ont un effet oncogénique sur les cancers bronchiques.

Les outils d'analyse de l'*Epidermal Growth Factor Receptor*

L'EGFR peut être étudié au niveau de son expression protéique à la surface de la cellule ou au niveau de son ADN par plusieurs techniques (Fig. 3).

L'expression protéique est étudiée par la technique d'immunohistochimie. L'anticorps marqué peut être dirigé contre la protéine EGFR totale (Fig. 3a) ou sa forme phosphorylée active (Fig. 3b). La surexpression d'EGFR est retrouvée dans environ 60 % des carcinomes épidermoïdes et 40 % des adénocarcinomes et carcinomes indifférenciés à grandes cellules. En revanche, aucune expression d'EGFR n'est notée dans le cancer bronchique à petites cellules. La valeur pronostique de la simple expression de l'EGFR dans le CBNPC n'est pas clairement démontrée [20]. Le résultat de l'immunohistochimie n'a pas d'impact sur la décision thérapeutique.

Le nombre de copies du gène (ADN) est quantifié par les techniques d'hybridation *in situ* (ISH), réalisées sur des cellules isolées ou des coupes de tissus (Fig. 3c et d). L'ISH se décline en trois techniques : FISH (hybridation *in situ* en fluorescence), CISH ou SISH (hybridation *in situ* par sonde chromogène ou argentique/*silver*). L'augmentation du nombre de copies du gène, mise en évidence par ISH, est associée à la réponse thérapeutique aux EGFR-TKIs [21]. Cependant l'intérêt de cette technique est limité puisque l'augmentation des copies d'EGFR accompagne le plus souvent la présence d'une mutation activatrice du récepteur [8] (Tableau 1).

Les mutations du gène peuvent être caractérisées après extraction de l'ADN des cellules tumorales, amplification de la région d'intérêt et séquençage du gène (Fig. 3e et f). Le séquençage étudie de façon exhaustive l'ADN à la recherche d'une altération du gène. Différentes modifications du génome peuvent être décrites, délétion (plusieurs nucléotides sont perdus dans la séquence du gène), insertion (un ou plusieurs nucléotides s'intercalent) dans la séquence du gène, ou mutation ponctuelle (un seul nucléotide est substitué).

Les mutations de l'*Epidermal Growth Factor Receptor*

Principales mutations oncogéniques et sensibilité accrue de l'*Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase inhibitors*

Dans le CBNPC, les mutations oncogéniques sont retrouvées au sein des exons 18 à 21 codant le domaine tyrosine kinase du récepteur (Fig. 4) [22]. Elles se situent au niveau du

site de fixation de l'ATP qui est aussi le site de fixation des EGFR-TKIs. Quatre-vingt-cinq pour cent des mutations de l'EGFR retrouvées dans les CBNPC sont des délétions dans l'exon 19 et la mutation ponctuelle L858R, située dans l'exon 21. Ces mutations oncogéniques dans les exons 19 ou 21 confèrent une sensibilité accrue aux EGFR-TKIs, dont elles prédisent la réponse. Elles sont également associées à un meilleur pronostic dans trois essais de phase III ayant comparé un EGFR-TKI à un placebo [7,23,24]. Dans le bras placebo, la survie sans progression des malades dont la tumeur était mutée pour l'EGFR était significativement plus longue que celle des tumeurs non mutées.

Les mutations de l'EGFR sont associées à des caractéristiques cliniques et histologiques particulières. Dans le dossier d'enregistrement du gefitinib à l'agence européenne du médicament (EMA), la fréquence des mutations de l'EGFR était de 40 % chez les non fumeurs et de 7 % chez les fumeurs (Tableau 2) [25]. De même, elle était de 17 % chez les femmes et de 6 % chez les hommes. Enfin, elle était de 16 % dans les adénocarcinomes et de 3 % dans les autres formes histologiques. Néanmoins, ces critères ne suffisent pas à prédire de manière satisfaisante, ni la présence d'une mutation de sensibilité de l'EGFR, ni la réponse aux EGFR-TKIs. En effet, dans l'essai IPASS, la présence de ces caractéristiques dans une population de plus de 1000 malades asiatiques n'était associée à la présence d'une mutation de l'EGFR que chez 60 % d'entre eux [8]. De plus, les malades dont la tumeur ne présentait pas de mutation de l'EGFR et recevant en première ligne de traitement du gefitinib avaient une survie sans progression très inférieure à ceux recevant une chimiothérapie par carboplatine–paclitaxel (Tableau 3).

Mutations oncogéniques rares et résistance à l'*Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase inhibitors*

Certaines mutations de l'EGFR confèrent une résistance aux EGFR-TKIs (Fig. 4). Elles sont rarement retrouvées d'emblée, mais le plus souvent sélectionnées au cours du traitement par un EGFR-TKI.

Les résistances primaires sont associées à plusieurs types de mutations ponctuelles ou des insertions rares de l'EGFR, situées au niveau de l'exon 18 ou 20 [26]. Les résistances secondaires apparaissent environ six à neuf mois après observation d'une réponse clinique initiale, sous traitement par EGFR-TKI. Elles correspondent à la sélection d'un clone tumoral qui a développé un mécanisme de résistance. À ce jour, deux mécanismes de résistance ont été identifiés. Environ 50 % des patients sélectionnent un clone tumoral résistant en rapport avec une mutation T790M, située au niveau de l'exon 20 de l'EGFR [27]. Chez quelques patients, elle peut être diagnostiquée sur le prélèvement initial par des techniques très sensibles. La mutation T790M se caractérise par un remplacement d'une thréonine par une méthionine au niveau du codon 790 et aboutit à un changement de conformation de la protéine, empêchant la fixation des inhibiteurs d'EGFR-TKIs de première génération (erlotinib, gefitinib). Plusieurs inhibiteurs irréversibles d'EGFR de deuxième génération, comme le BIBW2992, permettraient de passer outre cette résistance secondaire [28]. Des essais

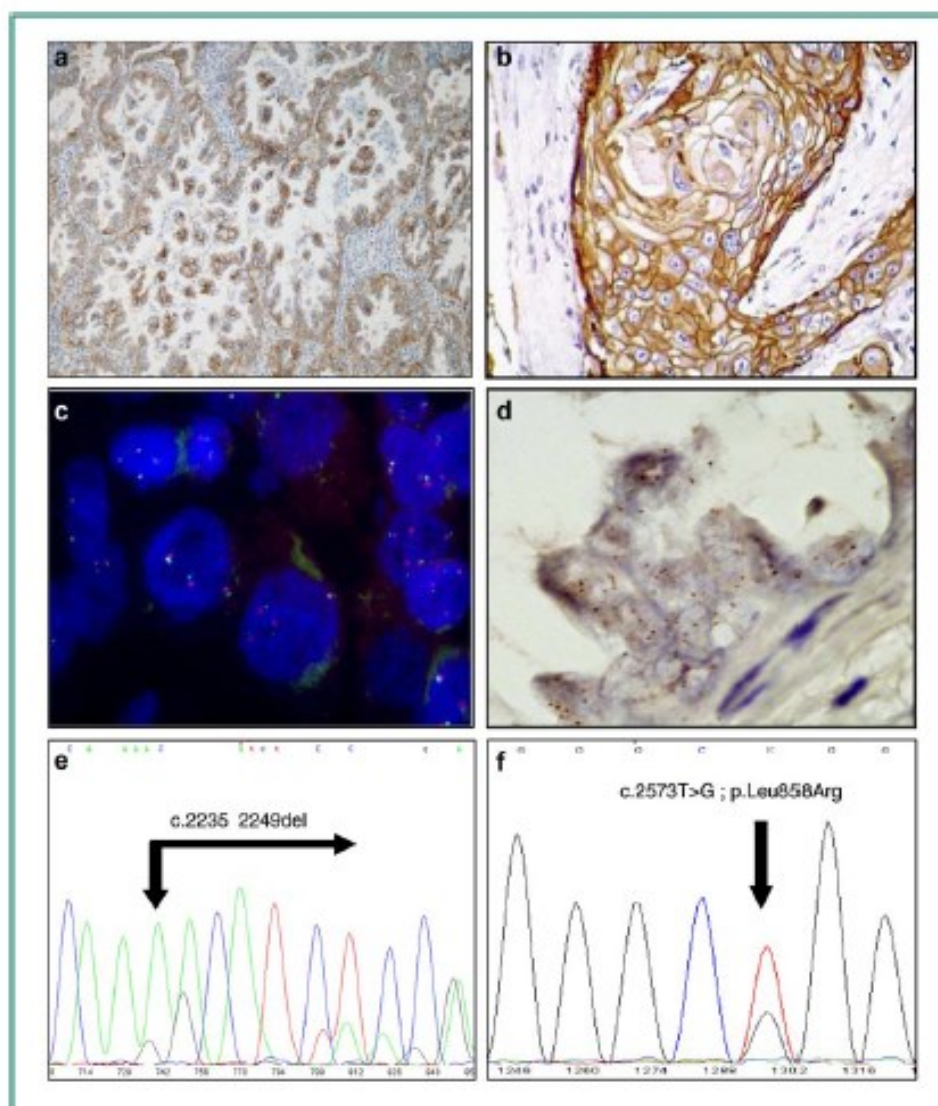


Figure 3. Les outils d'analyse de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). a et b : L'immunohistochimie étudie l'expression protéique par un anticorps marqué dirigé contre la protéine EGFR totale (Fig 3a) ou contre la forme phosphorylée active de l'EGFR (Fig 3b) (Dr Martine Antoine) ; c et d : L'hybridation in situ évalue le nombre de copies du gène (ADN) sur des cellules isolées ou des coupes de tissus. Différentes techniques sont disponibles, soit par des sondes fluorescentes FISH (hybridation in-situ en fluorescence) (Fig 3c) ou par sondes chromogéniques CISH (hybridation in-situ par sonde chromogène) (Fig 3d) (Dr Martine Antoine) ; e et f : Le séquençage analyse les altérations de la séquence des bases codant le gène de l'EGFR (Pr Roger Lacave).

Tableau 1 Intérêts des différentes techniques de recherche du récepteur du facteur de croissance épidermique.			
	Immunohistochimie Surexpression de l' <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	Hybridation in-situ en fluorescence / Hybridation in-situ par sonde chromogène Polysomie/amplification	Séquençage Mutation
Effet pronostique	?	OUI ^a	OUI
Effet prédictif de la réponse aux <i>Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors</i>	NON	OUI ^a	OUI
^a Intérêt limité car l'augmentation du nombre de copies du gène accompagne le plus souvent la présence d'une mutation activatrice du récepteur.			

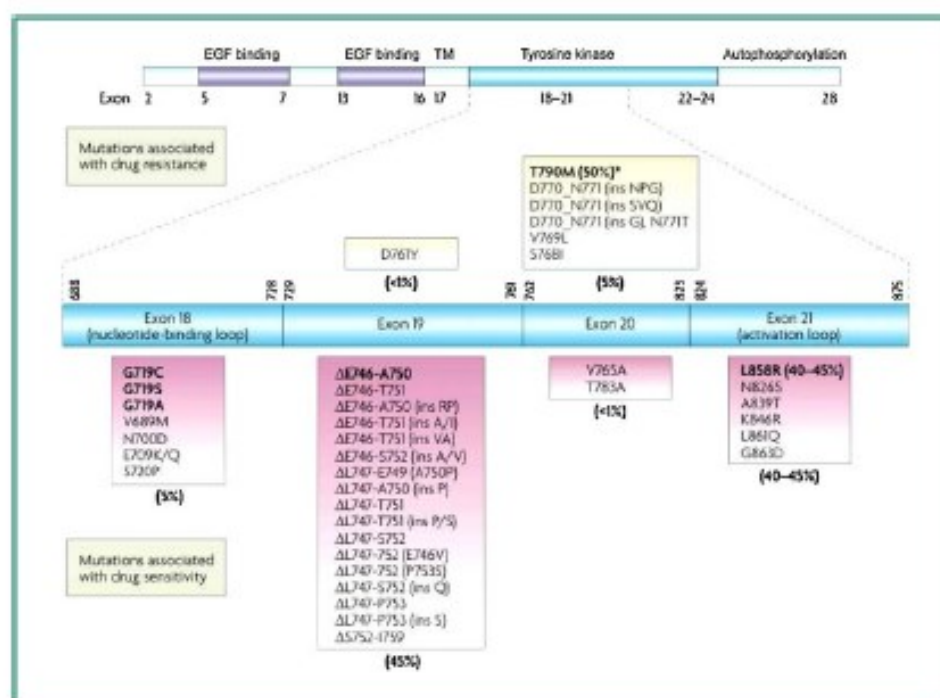


Figure 4. Les mutations oncogéniques de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* dans le cancer bronchique. D'après Sharma SV, *Nature Reviews Cancer* 2007;7:169–181 [36].

cliniques sont en cours dans cette indication. Une autre mutation de résistance, la mutation D761Y dans l'exon 19, est retrouvée de façon beaucoup plus rare. L'amplification de MET est un autre mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs [29]. L'association d'un inhibiteur de MET avec la poursuite de l'EGFR-TKI pourrait constituer une approche thérapeutique chez ces malades.

Enfin, dans les études de phase III du gefitinib réalisées chez des patients présentant un CBNPC avec une mutation de sensibilité de l'EGFR, 30 à 40 % des patients progressent d'emblée sous EGFR-TKIs. Les raisons de cette résistance primaire ne sont pas établies à ce jour [8,9,30].

Recherche des mutations de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* en pratique

La technique du séquençage est la technique de référence, car elle étudie de façon exhaustive l'ADN à la recherche d'une altération du gène. Cette analyse peut être effectuée sur une pièce opératoire, des biopsies ou un prélèvement cytologique (ponction ganglionnaire ou pleurale, lavage bronchoalvéolaire ou liquide céphalorachidien). Néanmoins, la recherche de mutations de l'EGFR se fait actuellement en France sur une biopsie chez la majorité des patients (> 70 %) diagnostiqués à un stade avancé (résultats

Tableau 2 Caractéristiques cliniques associées aux mutations du récepteur du facteur de croissance épidermique chez les caucasiens, selon le dépôt de dossier d'AMM du gefitinib à l'agence européenne du médicament.

	p	Probabilité d'être <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> muté	
Fumeurs vs non-fumeurs	<0,0001	x 6,5	Une mutation de l' <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> est retrouvée dans la tumeur de 28/70 (40 %) malades non-fumeurs et 47/716 (7 %) des malades fumeurs
ADC vs non-ADC	<0,0001	x 4,4	Une mutation de l' <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> est retrouvée dans 63/396 (16 %) des ADC et 12/390 (3 %) des non-ADC
Femmes vs hommes	0,0397	x 1,7	Une mutation de l' <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> est retrouvée dans la tumeur de 40/235 (17 %) femmes et 12/390 (3 %) hommes
ADC : adénocarcinomes.			

Tableau 3 Études de phase III du gefitinib vs chimiothérapie en première ligne dans les cancers bronchiques non à petites cellules mutés pour le récepteur du facteur de croissance épidermique.

Étude			Mok 2009 [8]	Mitsudomi 2009 [31]	Maemondo 2010 [9]
			Gefitinib vs carboplatine-paclitaxel ^a	Gefitinib vs cisplatine-docetaxel	Gefitinib vs carboplatine-paclitaxel
Patients <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> muté	Taux de réponse	Gefitinib	71 %	62 %	73 %
		Chimiothérapie	43 %	32 %	31 %
	Survie sans progression (médiane)	Gefitinib	9,5 mois	9,2 mois	10,8 mois
		Chimiothérapie	6,3 mois	6,3 mois	5,4 mois
	HR pour la progression		0,48 [95 % IC : 0,36–0,64] ($p < 0,001$)	0,49 [95 % IC : 0,34–0,71] ($p < 0,0001$)	0,3 [95 % IC : 0,22–0,41] ($p < 0,001$)
Patients <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> sauvage	Taux de réponse	Gefitinib	1,1 %		
		Chimiothérapie	23,5 %		
	Durée médiane de survie sans progression	Gefitinib	1,5 mois		
		Chimiothérapie	5,5 mois		
	HR pour la progression		2,85 [95 % IC : 2,05–3,98] ($p < 0,001$)		

HR : hazard ratio ; IC95 % : intervalle de confiance à 95 %.

^a 60 % de malades ayant une tumeur mutée pour l'*Epidermal Growth Factor Receptor*.

du STIC ERMETIC). La sensibilité moyenne des techniques de séquençages justifie la présence d'au moins 30 % de cellules tumorales pour pouvoir interpréter un résultat négatif [17]. Si le pourcentage de cellules tumorales est trop faible, une macrodissection permet d'éliminer du prélèvement les cellules stromales et ainsi d'enrichir le prélèvement en cellules tumorales. Par ailleurs, le taux d'échantillons où l'ADN est non amplifiable dépend de la qualité de conservation des prélèvements. Le STIC (Soutien aux techniques innovantes et coûteuses) ERMETIC réalisé en France entre 2006 et 2008 par 15 plateformes régionales d'oncologie moléculaire a montré qu'il était possible de travailler sur des blocs inclus en paraffine et pas nécessairement sur du matériel congelé. Néanmoins, les conditions de fixation du tissu constituent un élément déterminant du résultat. Par exemple, les prélèvements anciens ou inclus dans le liquide de Bouin ne permettent souvent pas d'extraire des ADN de bonne qualité.

Des techniques alternatives au séquençage sont en cours de développement. Elles permettent soit de rechercher les mutations de manière exhaustive, soit de rechercher les mutations les plus fréquentes. Les analyses basées sur les techniques de PCR d'amplification d'allèles spécifiques sont des techniques plus sensibles, plus rapides, moins coûteuses que le séquençage et donc plus facilement réalisables en routine. Elles reposent sur l'identification d'un variant génétique par une sonde spécifique. Des tests maisons et commerciaux sont utilisés dans les différentes plateformes moléculaires régionales soutenues par l'INCa. Cependant, ces analyses ne permettent que de détecter des mutations prédéfinies. Le développement d'anticorps spécifiques des mutants les plus fréquents d'EGFR est en cours et pourrait

faciliter à l'avenir un dépistage de certaines des mutations les plus fréquentes de l'EGFR par immunohistochimie [31]. Une autre voie d'investigation est la recherche de mutations à partir du plasma par l'amplification de l'ADN tumoral circulant [32].

La recherche de mutations doit être réalisée dans les CBNPC de stade IIb/IV avant tout traitement par gefitinib en première ligne, selon l'AMM. Cette recherche est effectuée en priorité chez :

- les non/anciens fumeurs, les adénocarcinomes, les femmes et les asiatiques et ;
- les malades non éligibles pour une chimiothérapie (PS > 2, comorbidités).

L'analyse est recommandée dans les CBNPC de stade IIb/IV avant traitement par erlotinib ou gefitinib en deuxième ligne ou plus. La recherche de mutations de résistance au diagnostic et lors de la rechute à l'occasion d'une nouvelle biopsie est en cours d'évaluation.

L'interprétation des résultats de l'analyse

En présence d'une mutation de l'EGFR, il faut en déterminer son type. Les mutations de l'exon 19 et 21 sont les plus fréquentes et associées à une réponse aux EGFR-TKIs, alors que les mutations rares de l'exon 18 ou 20 sont quant à elles plus souvent associées à une résistance.

En absence de mutation retrouvée, se pose la question d'un résultat faux-négatif surtout chez des malades présentant des caractéristiques suggérant leur sensibilité aux EGFR-TKIs. La technique utilisée peut ne pas être exhaustive (certains laboratoires ne recherchent pas les mutations

de sensibilités rares de l'exon 18) ; la technique peut ne pas être assez sensible (c'est le cas du séquençage) et/ou le prélèvement pas assez riche en cellules tumorales ; enfin, la qualité du prélèvement peut ne pas avoir permis l'extraction et/ou l'amplification d'un ADN analysable (c'est le cas des prélèvements anciens ou fixés en Bouin).

Mutations de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* et autorisation de mise sur le marché (AMM)

Les cancers bronchiques non à petites cellules mutés pour l'*Epidermal Growth Factor Receptor*

Suite aux études rétrospectives rapportant l'impact des mutations de l'EGFR sur la réponse, la survie sans progression et la survie des patients traités par erlotinib ou gefitinib, trois études prospectives de phase III avec le gefitinib ont été réalisées chez des patients présentant des tumeurs mutées pour l'EGFR (Tableau 3).

Ces études ont comparé le traitement par gefitinib à une chimiothérapie standard en première ligne chez des patients atteints de CBNPC de stade IIIb/IV mutés pour l'EGFR [8,9,30] (Tableau 3). L'essai IPASS a été mené en Asie dans une population de patients présentant des critères cliniques associés aux mutations de l'EGFR (femmes, non fumeurs et adénocarcinomes). Il comparait un traitement par gefitinib au doublet carboplatine–paclitaxel [8]. Quarante pour cent des patients présentaient un CBNPC non muté. L'analyse en sous-groupes a montré que les malades présentant une tumeur mutée pour l'EGFR avaient un taux de réponse de 71,2 % sous gefitinib et de 47,3 % sous chimiothérapie. Par ailleurs, la durée de survie sans progression était significativement plus longue sous gefitinib avec une réduction de plus de 50 % du risque de progression sous traitement par rapport aux malades traités par chimiothérapie.

Deux essais de phase III ont comparé au Japon le gefitinib à une chimiothérapie par cisplatine–docetaxel ou carboplatine–paclitaxel en première ligne chez des patients porteurs d'un CBNPC muté pour l'EGFR [9,30]. Le taux de réponse sous gefitinib était de 62,1 % et 73,3 % dans les deux études, respectivement ; il était de 32,2 % et 30,7 % pour la chimiothérapie. La durée de survie sans progression était également significativement plus longue chez les patients traités par gefitinib (Tableau 3) avec une réduction de 50 % et 70 % du risque de progression sous traitement par rapport aux malades traités par chimiothérapie dans les deux études, respectivement (Tableau 3). Deux autres essais de phase III sont en cours avec l'erlotinib et le BIBW2992.

L'ensemble de ces essais montre de manière reproductible une efficacité supérieure d'un traitement par EGFR-TKI par rapport à une chimiothérapie standard par un doublet de platine chez les patients porteurs d'un CBNPC avec mutation de l'EGFR. Néanmoins, ce gain en efficacité ne se traduit pas par un gain en survie globale. Cela peut s'expliquer par l'impact des lignes de traitement ultérieures, notamment par EGFR-TKIs chez les patients initialement traités par chimiothérapie. Cependant dans l'étude de Maemondo et col, le taux de réponse au gefitinib était plus important en

première qu'en deuxième ligne (73,7 % vs 58,5 %, $p=0,36$). La survie était également plus longue dans le bras EGFR-TKI suivi de chimiothérapie (30,5 mois vs 23,6 mois), même si cette différence n'était pas statistiquement significative. La meilleure séquence de traitement doit encore être déterminée. Cependant beaucoup d'équipes plaident en faveur de l'exposition à un EGFR-TKI dès la première ligne de traitement du plus grand nombre des malades dont la tumeur est mutée pour l'EGFR.

Un essai de phase II en première ligne de traitement s'est intéressé spécifiquement aux patients non éligibles à une chimiothérapie en raison d'un mauvais *performance status* [33]. Vingt-neuf patients avec un CBNPC muté pour l'EGFR ont été traités par gefitinib. Le taux de réponse a été de 66 % avec une survie sans progression de 6,5 mois et une survie globale de 17,8 mois. Les EGFR-TKIs sont un vrai progrès pour ces patients qui sont dans une impasse thérapeutique et dont l'espérance de vie est généralement inférieure à quatre mois.

À ce jour, le gefitinib est le seul EGFR-TKI ayant une AMM restreinte à la présence d'une mutation activatrice de l'EGFR dans la tumeur et pouvant être utilisé dès la première ligne dans le traitement des CBNPC de stades étendus.

Les cancers bronchiques non à petites cellules non mutés ou de statut inconnu pour l'*Epidermal Growth Factor Receptor*

En première ligne

Il n'y a pas d'indication à traiter les CBNPC non mutés par des EGFR-TKIs en première ligne (Fig. 5). L'étude IPASS montre l'effet délétère du gefitinib sur le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale dans les CBNPC non mutés en comparaison à un doublet de platine (Tableau 3) [8]. Les essais de phase III associant le gefitinib ou l'erlotinib à une chimiothérapie de première ligne ne montrent pas de différence significative de survie globale entre le bras expérimental et le bras contrôle. L'absence de bénéfice de l'association EGFR-TKI et chimiothérapie n'a pas d'explication claire.

En maintenance

L'étude SATURNE a évalué l'intérêt de l'erlotinib en maintenance chez les patients répondeurs ou stabilisés après quatre cycles de chimiothérapie comportant un doublet de platine [7] (Fig. 5). La survie sans progression est significativement augmentée dans le bras erlotinib par rapport au bras placebo (12,3 vs 11,2 semaines ; $p<0,0001$), de même que la survie globale (12 mois vs 11 mois ; $p=0,009$). En analyse de sous-groupes, la maintenance ne semble bénéficier qu'aux malades stabilisés (11,9 vs 9,6 mois sous placebo ; $p=0,0019$), et non aux malades répondeurs (12,5 vs 12,0 mois sous placebo). Cette étude a permis d'obtenir l'AMM pour l'erlotinib en maintenance dans le CBNPC toutes histologies confondues stabilisé après chimiothérapie par un doublet de platine.

En deuxième ou troisième ligne

Seul l'erlotinib a une AMM en deuxième ou troisième ligne dans le CBNPC (Fig. 5). Dans l'étude BR21 de phase III,

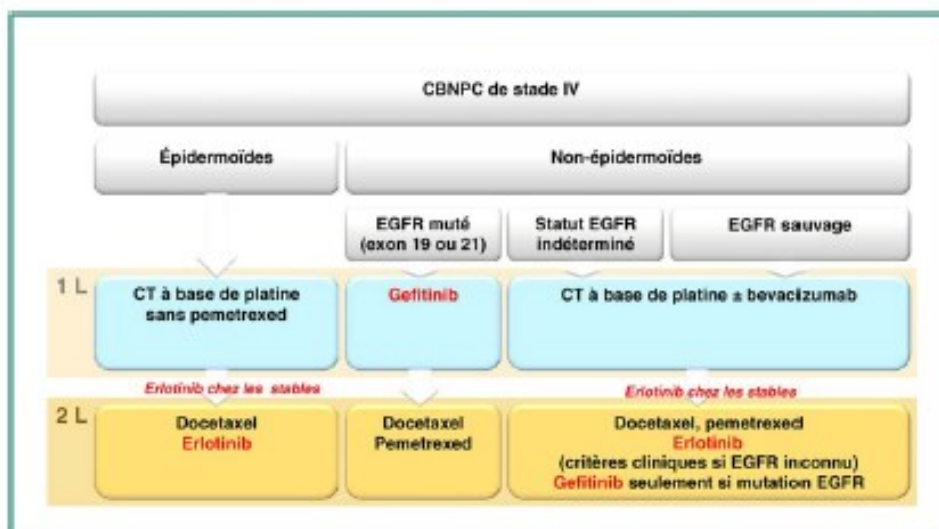


Figure 5. Place des *Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase inhibitors* dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules avancés. D'après M. Pérol, par courtoisie.

L'erlotinib a été comparé au placebo en traitement de deuxième ou troisième ligne chez des patients atteints de CBNPC stade IIIB ou IV ne pouvant plus recevoir de traitement, sans exigence sur le statut EGFR [23] et des critères d'inclusion peu restrictifs (tout type histologique, PS 0 à 3). Le taux de réponse était de 8,9 % sous erlotinib contre moins de 1 % sous placebo ($p < 0,001$). La survie sans progression était modestement bien que significativement améliorée sous erlotinib (2,2 mois vs 1,8 mois; $p < 0,001$), de même que la survie globale (6,7 mois vs 4,7 mois sous placebo; $p < 0,001$). Dans une analyse en sous-groupes, l'efficacité de l'erlotinib était meilleure pour les adénocarcinomes ainsi que pour les femmes, les patients asiatiques et les non fumeurs. Néanmoins, seul ce sous-groupe de malades avait une amplitude du bénéfice supérieure par rapport aux autres en analyse multivariée.

L'étude ISEL de phase III a comparé le gefitinib au placebo chez des patients ayant un CBNPC préalablement traités par une ou plusieurs lignes de chimiothérapie [34]. Le gefitinib n'a pas prolongé la survie dans la population globale, mais l'effet sur la survie était significatif pour les non fumeurs. La principale raison expliquant les différences d'efficacité entre les deux études semble liée à la différence dans le choix de la dose optimale à administrée. L'erlotinib est administrée à la dose maximale tolérée alors que la posologie du gefitinib a été déterminée à 50 % de la concentration inhibitrice maximale (IC50%) [35]. Par ailleurs, le taux de patients réfractaires à la chimiothérapie était plus important dans l'étude ISEL que dans l'étude BR.21.

Conclusion

Le statut EGFR est à ce jour le seul biomarqueur impliqué dans la stratégie thérapeutique du CBNPC [37]. La présence d'une mutation activatrice au sein de la tumeur est associée à une sensibilité accrue aux EGFR-TKIs, gefitinib ou erlotinib. Seuls les patients dont la tumeur exprime ce type de mutation peuvent bénéficier d'un traitement par gefitinib en

- Les mutations oncogéniques dans les exons 19 ou 21 majoraient la sensibilité aux EGFR-TKIs.
- Certaines mutations de l'EGFR, souvent sélectionnées au cours du traitement par un EGFR-TKI, confèrent une résistance aux EGFR-TKIs.
- Des inhibiteurs irréversibles d'EGFR permettaient de passer outre la résistance secondaire à EGFR-TKI.
- La recherche des mutations d'EGFR se fait actuellement essentiellement par séquençage.
- Les mutations de l'exon 19 et 21 sont associées à une réponse aux EGFR-TKIs, alors que les mutations rares de l'exon 18 ou 20 le sont plus souvent à une résistance.
- L'association d'un inhibiteur de MET avec la poursuite de l'EGFR-TKI pourrait lever des résistances.
- Un traitement par EGFR-TKI est plus efficace qu'une chimiothérapie standard par un doublet de platine chez les patients porteurs d'un CBNPC avec mutation de l'EGFR.
- Il ne faut pas traiter les CBNPC non mutés par des EGFR-TKIs en première ligne.
- En maintenance, la survie sans progression est significativement augmentée avec l'erlotinib.
- L'erlotinib a l'AMM pour le traitement de deuxième et troisième ligne.

première ligne de traitement. Bien que ces mutations soient associées à certaines caractéristiques épidémiologiques et histologiques, leur présence ne suffit pas à prescrire un EGFR-TKI en première ligne. La meilleure compréhension moléculaire du cancer bronchique permet de mieux guider le traitement. Le développement de nouvelles molécules telles que les inhibiteurs irréversibles de l'EGFR ou les inhibiteurs de MET pourraient permettre de vaincre les principaux mécanismes de résistance secondaire sous EGFR-TKI.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

POINTS ESSENTIELS

- Seule la présence d'une mutation activatrice de l'EGFR est un facteur prédictif de la réponse aux EGFR-TKIs. Il s'agit également d'un facteur de bon pronostic sur la survie.
- La recherche de mutations se fait par séquençage (considéré comme la technique de référence) ou technique alternative sur la lésion primitive ou métastatique. Elle peut être effectuée sur une pièce opératoire, des biopsies ou un prélèvement cytologique.
- Les principales limites du séquençage sont liées au pourcentage de cellules tumorales du prélèvement (résultats interprétables si supérieur à 30%) et à la qualité du prélèvement.
- L'analyse doit être réalisée avant le début du traitement dans les CBNPC avancés :
 - en priorité : chez les non/anciens fumeurs, les adénocarcinomes, les femmes et les asiatiques,
 - les malades non éligibles pour une chimiothérapie ;
- les malades dont la tumeur présente une mutation activatrice de l'EGFR peuvent bénéficier du gefitinib en première ligne de traitement ;
- L'intérêt de rechercher des mutations de résistance lors de la biopsie diagnostique ou après progression sous EGFR-TKI est en cours d'évaluation.

Références

- [1] EGFR epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian) [Homo sapiens] - Gene Result [Internet]. OMIM website. 2010 Jun 10 [cité 2010 Jun 17]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full&report=lists-uids=1956>.
- [2] Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD, et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 2001;71:1–20.
- [3] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34.
- [4] Human Protein Atlas [Internet]. [cité 2010 Jul 15]; Available from: http://www.proteinatlas.org/tissue_profile.php?antibody_id=35&g_no=ENSG00000146648&normal.
- [5] Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995;269:230–4.
- [6] Sibińska M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995;269:234–8.
- [7] Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2010;11:521–9.
- [8] Mok TS, Wu Y, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947–57.
- [9] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380–8.
- [10] Albanell J, Rojo F, Averbuch S, et al. Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol* 2002;20:110–24.
- [11] Zhang X, Gureasko J, Shen K, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006;125:1137–49.
- [12] Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res* 2006;12:7242–51.
- [13] Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F21–59.
- [14] Brandt B, Meyer-Staeckling S, Schmidt H, et al. Mechanisms of egfr gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response. *Clin Cancer Res* 2006;12:7252–60.
- [15] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129–39.
- [16] Okamoto I, Kenyon LC, Emlet DR, et al. Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2003;94:50–6.
- [17] 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 USA* 2004;101:13306–11.
- [18] Ji H, Li D, Chen L, et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell* 2006;9:485–95.
- [19] Ohashi K, Rai K, Fujiwara Y, et al. Induction of lung adenocarcinoma in transgenic mice expressing activated EGFR driven by the SP-C promoter. *Cancer Sci* 2008;99:1747–53.
- [20] Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, et al. Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax* 2006;61:140–5.
- [21] Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2005;23:6838–45.
- [22] Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007;98:1817–24.
- [23] Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123–32.
- [24] Bell DW, Lynch TJ, Haslerat SM, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol* 2005;23:8081–92.
- [25] European Medicines Agency - Human medicines - Iressa [Internet]. [cité 2010 Jul 20]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/human/medicines/001016/human_med_000857.jsp&url=menus/medicines/medicines.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

- [26] Wu J, Wu S, Yang C, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res* 2008;14:4877–82.
- [27] Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009;28:S24–31.
- [28] Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008;27:4702–11.
- [29] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039–43.
- [30] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121–8.
- [31] Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn* 2010;12:169–76.
- [32] He C, Liu M, Zhou C, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by mutant-enriched PCR assay for prediction of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 2009;125:2393–9.
- [33] Inoue A, Kobayashi K, Usui K, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009;27:1394–400.
- [34] Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005;366:1527–37.
- [35] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169–81.
- [36] Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: E.G.F.R. gene cancer. *FEBS J* 2010;277:301–8.
- [37] Cadranet J, Zalcman G, Sequist L. Genetic profiling and EGFR-directed therapy: evidence and clinical implications. *Eur Respir J* 2011;37:183–93.

Quelle plateforme pour prendre en charge de façon personnalisée le cancer bronchique ?

Which platform to support a personalized lung cancer treatment?

Anne-Marie Ruppert^{1,2}, Martine Antoine^{2,3}, Michèle Beau-Faller^{4,5}, Jacques Cadranel^{1,2}, Marie Wislez^{1,2}

¹ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, hôpital Tenon, service de pneumologie et réanimation, 4, rue de la Chine, 75970 Paris Cedex 20, France

<marie.wislez@tnn.aphp.fr>

² Université Pierre-et-Marie-Curie, université Paris-VI, équipe de recherche 2, groupe de recherche clinique-Theranoscan, 75950 Paris Cedex 20, France

³ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, hôpital Tenon, service d'anatomie pathologique, 75950 Paris Cedex 20, France

⁴ Hôpitaux universitaires de Strasbourg, hôpital de Hautepierre, service de biochimie et biologie moléculaire, 67200 Strasbourg, France

⁵ Université de Strasbourg, faculté de médecine, EA 4438, 67200 Strasbourg, France

Article reçu le 27 février 2012,

accepté le 19 mars 2012

Tirés à part : M. Wislez

Pour citer cet article : Ruppert AM, Antoine M, Beau-Faller M, Cadranel J, Wislez M. Quelle plateforme pour prendre en charge de façon personnalisée le cancer bronchique ? *Bull Cancer* 2012 ; 99 : 529-34.
doi : 10.1684/bdc.2012.1582.

Résumé. Des progrès indéniables ont été réalisés au cours de cette décennie concernant la compréhension de l'oncogenèse du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) avec identification de nouvelles cibles et développement de nouveaux traitements ciblés. Ainsi la gestion d'un prélèvement biopsique de petite taille est primordial et nécessite une étroite collaboration entre les différents partenaires : préleveur, anatomopathologiste, biologiste moléculaire, thérapeute. Le but est de permettre au patient de bénéficier des avancées diagnostiques et thérapeutiques. La mise en place des plateformes financées par l'INCa est un important progrès dans ce sens. Actuellement, la recherche en routine des mutations du gène *EGFR* permet de traiter les CBNPC métastatiques mutés *EGFR* par un inhibiteur tyrosine kinase (ITK) d'*EGFR* dès la première ligne. De façon plus récente, le réarrangement d'*ALK* est recherché. Le crizotinib, un ITK d'*ALK* représente le nouveau standard thérapeutique dans le CBNPC avec réarrangement d'*ALK*. D'autres biomarqueurs émergents sont en cours d'évaluation, en particulier, *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et *HER2*, et seront discutés dans cet article. Le projet BIOMARQUEURS France permettra de valoriser les données obtenues par les différentes plateformes de plus de 15 000 malades en France. ▲

Abstract. Considerable progress has been achieved in the understanding of lung cancer biology. Molecular driver mutations have been identified and different targeted therapies have been developed. Thus, the management of small size biopsies is essential and needs a strong collaboration between the different medical partners, particularly pulmonologist, pathologist, molecular biologist and oncologist. The aim is to optimise histological and molecular analyses allowing patients access to novel biotherapies. The French National Cancer Institute set up platforms for molecular genetics at university hospitals with expertise in molecular and pathological analysis. Mutational status of *EGFR* is analyzed routinely in non-small lung cancer. Treatment with *EGFR* inhibitors as first line therapy is limited to lung cancer patients harboring an *EGFR* mutation. More recently, *ALK* rearrangements have been identified as a rare driver mutation in lung cancer. Crizotinib, an *ALK* inhibitor is a new therapeutic standard in *ALK* rearranged tumors. Other biomarkers as *RAS*, *BRAF*, *HER2* or *PIK3CA* have potential clinical relevance with possible approval of novel tailored treatment and will be discussed in this report. The project "BIOMARQUEURS France" will underscore the results of the French platform of more than 15 000 French patients. ▲

Mots clés : cancer bronchique non à petites cellules, mutations, *EGFR*, *ALK*, *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2*

Keywords: non small cell lung cancer, mutations, *EGFR*, *ALK*, *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2*

Introduction

Le cancer bronchique est la première cause de mortalité par cancer en France avec plus de 20 000 décès par an [1, 2]. La survie à cinq ans des cancers bronchiques est faible autour de 15 % tous stades confondus et inférieur à 5 % dans les stades métastatiques [3, 4]. La chimiothérapie est le principal traitement du cancer bronchique métastatique associée aux soins de confort. Les progrès effectués dans la meilleure compréhension de l'oncogenèse des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) ont permis de développer des thérapeutiques ciblant des voies de signalisation anormalement activées dans les cellules tumorales. Ces thérapeutiques ont actuellement une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou une autorisation transitoire d'utilisation (ATU) et font ainsi partie de l'arsenal thérapeutique du CBNPC. Néanmoins, la prescription de ces médicaments est conditionnée par la présence ou non de l'anomalie moléculaire cible qu'il est nécessaire de rechercher en routine.

Dès 2006, l'Institut national du cancer (INCa) a mis en place un programme national pour soutenir la structuration de la génétique moléculaire par la mise en place de soutiens aux technologies innovantes et coûteuses (STIC) et le développement de 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire. Le STIC ERMETIC a été le prototype des STIC dans le domaine des tumeurs solides et a permis d'accompagner la diffusion de la recherche des mutations activatrices de l'*EGFR*. Dans une première étape, une assurance qualité impliquant 16 des plateformes de l'INCa a été réalisée pour le séquençage des exons 18 à 21 de l'*EGFR* [5] ; dans une deuxième étape, le séquençage a été appliqué à plus de 500 malades consécutifs recevant de l'erlotinib et a permis de confirmer la place majeure de ce test pour sélectionner les malades répondeurs aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'*EGFR* [6] ; une troisième étape a permis de démontrer le caractère coût-efficace d'une sélection préthérapeutique basée sur le séquençage, plutôt que sur des critères cliniques ou à l'absence de sélection [7]. Depuis 2010, les tests moléculaires sont gratuits pour les patients et les établissements de santé et permettent de déterminer les patients qui relèvent d'une thérapie ciblée. Cette démarche innovatrice a été saluée dans un éditorial de Nature Medicine [8]. La recherche des mutations du gène *EGFR* permet de traiter les CBNPC métastatiques mutés pour l'*EGFR* par un ITK d'*EGFR* dès la première ligne. En 2011, 20 403 patients ont ainsi bénéficié d'une recherche de mutation permettant d'identifier 1 958 patients éligibles aux ITK d'*EGFR* dès la première ligne. À cet effet, l'INCa a alloué un budget exceptionnel de 1,7 millions d'euros aux plateformes pour la réalisation des recherches des mutations d'*EGFR*. En plus de l'intérêt médical pour les patients, cette stratégie est efficace d'un point de vue financier. En effet, le traitement par ITK d'*EGFR*

des patients sans mutation activatrice de l'*EGFR* aurait représenté un coût important sans bénéfice thérapeutique [8, 9].

De façon plus récente, le réarrangement d'*ALK* est recherché dans le CBNPC. Il s'agit d'un oncogène présent chez environ 3 % des CBNPC pour lequel le crizotinib, un inhibiteur d'*ALK* représente un nouveau standard thérapeutique dans cette population de CBNPC *ALK+*.

D'autres biomarqueurs émergents sont en cours d'évaluation du fait du développement de thérapeutiques ciblées, en particulier *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* et seront discutés dans cet article.

Les biomarqueurs réalisés en routine sur les plateformes

EGFR

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (*EGFR*) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, situé au niveau du chromosome 7 (7p12). Dans environ 10 % des CBNPC de la population française, des mutations activatrices sont retrouvées au sein des exons 18 à 21 codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur [10, 11]. La majorité des mutations retrouvées sont des délétions situées dans l'exon 19 ou une mutation ponctuelle située dans l'exon 21 (L858R) d'*EGFR*. Ces mutations activatrices confèrent un meilleur pronostic et une sensibilité accrue aux ITK d'*EGFR*, dont elles prédisent la réponse. À ce jour, deux ITK d'*EGFR*, erlotinib et géfitinib ont obtenu une AMM pour un traitement en première ligne dans cette situation : le géfitinib en 2009 et l'erlotinib en 2011 [12, 13]. Il est bien démontré pour les malades n'ayant pas de mutation de l'*EGFR* que le traitement de référence de première ligne est un doublet de chimiothérapie à base de platine. L'erlotinib a aussi une AMM dans le cancer bronchique quel que soit le statut mutationnel, mais seulement en deuxième ou troisième ligne et après échec d'au moins une ligne de chimiothérapie [14].

En pratique : la recherche de mutations de l'*EGFR* doit être réalisée dans les CBNPC de type non épidermoïde de stade IIIb/IV avant tout traitement par ITK-*EGFR*-TKI en première ligne. La technique du séquençage est la technique de référence, car elle étudie de façon exhaustive l'ADN à la recherche d'une mutation du gène. Cette analyse peut être effectuée sur une pièce opératoire, des biopsies ou un prélèvement cytologique congelés ou inclus en paraffine [11]. Actuellement, en France, la recherche de mutations de l'*EGFR* se fait sur une biopsie chez la majorité des patients (> 70 %) diagnostiqués à un stade avancé [6]. La sensibilité du séquençage nécessite usuellement la présence d'au moins 25 % de cellules tumorales dans l'échantillon pour considérer valide un résultat négatif [11]. Si le pourcentage

de cellules tumorales est trop faible, une macrodissection sur lame permet d'éliminer du prélèvement des cellules non tumorales et ainsi d'enrichir le prélèvement en cellules tumorales. Néanmoins, ce chiffre de 25 % est assez arbitraire car en présence d'une amplification/polysomie du gène muté, la sensibilité augmente. Des techniques alternatives au séquençage ont été développées [15]. Les analyses basées sur les techniques de PCR spécifiques d'allèles sont des techniques plus sensibles et plus rapides que le séquençage direct. Elles reposent sur l'identification d'un variant génétique par une sonde spécifique et donc ne permettent que de détecter des mutations prédéfinies. Le développement d'anticorps spécifiques des mutants les plus fréquents des mutations de l'*EGFR* est en cours et pourrait faciliter à l'avenir un dépistage de certaines des mutations les plus fréquentes par immunohistochimie (IHC) [16]. Une autre voie d'investigation est la recherche de mutations de l'*EGFR* à partir du plasma par amplification de l'ADN tumoral circulant [17].

ALK

Découvert en 2007, la protéine de fusion EML4-ALK est un oncogène impliqué dans environ 4 % des cancers bronchiques de type adénocarcinome. Le crizotinib (PF-02341066) est un ITK d'ALK. Les résultats de l'étude de phase I-II et ceux d'une étude de phase II ouverte évaluant le crizotinib dans les cancers bronchiques ALK mutés chez des patients lourdement prétraités étaient impressionnants avec un contrôle tumoral dans 90 % des patients et une survie sans progression à six mois de 72 %. [18, 19]. Le crizotinib représente un nouveau standard thérapeutique dans cette population de CBNPC ALK+. Il est obtenu en France sur ATU, alors qu'aux États-Unis, la Food and Drug Administration a accordé à partir de ces résultats de phase II dès 08/2011 une AMM [19].

En pratique : la technique diagnostique par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur tissu tumoral par une sonde « break apart », permettant de visualiser les différents types de réarrangements ou translocations du gène *ALK*, est actuellement la technique de référence. Il s'agit d'une technique morphologique délicate et coûteuse, qui nécessite une interprétation spécialisée par un pathologiste ou cytogénéticien. Cette technique est également tributaire de la richesse tumorale présente sur la biopsie. La protéine ALK est très peu exprimée dans les tissus normaux. Des études sont en cours pour déterminer si l'IHC est sensible et spécifique et permettrait une sélection des patients ; seuls ceux avec IHC positive auraient une confirmation par FISH [20]. Il est nécessaire, comme pour tous les marqueurs prédictifs de thérapies ciblées, que les pathologistes mettent en place une assurance qualité de cette technique IHC et de FISH assurant sa reproductibilité (technique et interprétation).

Les biomarqueurs émergents

La mutation T790 M de l'*EGFR*

Certaines mutations d'*EGFR* confèrent une résistance d'emblée aux ITK d'*EGFR*. Elles sont rarement retrouvées d'emblée, mais souvent sélectionnées au cours du traitement par ITK d'*EGFR*. Les résistances primaires sont associées à plusieurs types de mutations ponctuelles ou insertion rares de l'*EGFR*, située au niveau de l'exon 18 et 20. Les résistances secondaires apparaissent environ six à neuf mois après observation d'une réponse clinique initiale sous ITK d'*EGFR* [21]. À ce jour, plusieurs mécanismes de résistance secondaire sont décrits. Environ 50 % des patients sélectionnent un clone tumoral résistant, en rapport avec une mutation T790 M de l'exon 20 de l'*EGFR* [22]. Chez quelques patients, elle peut être diagnostiquée sur le prélèvement initial par des techniques très sensibles. La mutation T790 M se caractérise par un remplacement d'une thréonine par une méthionine au niveau du codon 790 et aboutit à un changement de conformation de la protéine, empêchant la fixation des ITK d'*EGFR* de première génération. Plusieurs ITK de deuxième génération telles que l'afatinib permettaient de passer outre cette résistance secondaire. Des essais cliniques de phase II sont en cours avec l'afatinib chez les patients initialement répondeurs, puis progresseurs sous ITK de première génération, erlotinib ou géfitinib.

En pratique : la recherche de la mutation T790 M fait partie des biomarqueurs émergents demandés par l'INCa [23].

KRAS

KRAS est une protéine à activité GTPasique qui joue un rôle important dans la signalisation des récepteurs membranaires, en particulier EGFR [24]. La présence d'une mutation dans l'exon 2 aboutit à une protéine mutée qui reste en permanence sous forme activée [24]. La prévalence des mutations du gène *KRAS* au cours du cancer bronchique est d'environ 15 à 30 %. Ces mutations sont retrouvées de façon plus fréquente au sein des adénocarcinomes, de l'homme fumeur, d'origine caucasienne (30 %) [25]. La valeur pronostique des mutations de *KRAS* reste controversée. Une méta-analyse basée sur 2163 patients atteints d'un CBNPC métastatique montrait que la présence d'une mutation de *KRAS* était associée à un risque accru de mortalité [26]. Les mutations de *KRAS* seraient associées à une résistance primaire aux ITK d'*EGFR*. Une méta-analyse, reprenant 1008 patients ayant un cancer du poumon dont 165 mutés, montrait que les répondeurs aux anti-EGFR étaient dans 94 % des cas non mutés pour *KRAS* alors que les non répondeurs, étaient dans 20 % des cas mutés pour *KRAS* [27].

En pratique : les recherches de mutation de *KRAS* sont effectuées en routine dans le cancer colorectal avant tout traitement par anticorps monoclonal anti-EGFR afin de réserver ce traitement aux cancers coliques non mutés *KRAS*. Dans le CBNPC, la recherche de mutation *KRAS* fait partie des biomarqueurs émergents demandés par l'INCa [23]. Ainsi, 16 579 CBNPC ont été testés en 2011, avec un taux de mutation de 25,6 %. Ces analyses se justifient :

- afin de mieux choisir la deuxième ligne après progression sous sel de platine, en contre-indiquant un TKI d'EGFR en cas de présence de mutation de *KRAS* ;
 - mais aussi du fait de l'inclusion possible des patients dans des essais thérapeutiques dédiés tels que les essais de phase II par inhibiteurs de MAP kinases seuls ou associés aux inhibiteurs de mTOR [28].
- La détermination simultanée de cette mutation permet de valider l'interprétation des résultats des autres mutations en particulier *EGFR* du fait de leur exclusion respective.

BRAF

BRAF est un élément de la voie de signalisation de RAS et a un rôle possible d'addiction oncogénique dans d'environ 5 % des adénocarcinomes bronchiques [29, 30]. Parmi les mutations de *BRAF* décrites, la mutation V600E, principalement retrouvée dans le mélanome, est la plus fréquente (50 %). Elle est observée davantage chez les femmes, les non-fumeurs et les adénocarcinomes avec une différenciation micropapillaire. Les autres mutations G469A et D594G sont surtout décrites chez les fumeurs.

En pratique : la recherche de mutation est réalisée sur les plateformes dans le mélanome où les inhibiteurs de *BRAF* sont largement utilisés en cas de mutation V600E. Dans le CBNPC, les mutations de *BRAF* délimitent une entité à part ; la recherche des mutations de *BRAF* (V600E) fait partie des biomarqueurs émergents définis par l'INCa [23]. Des données supplémentaires sont nécessaires pour caractériser ce groupe de patients et pour tester l'efficacité des inhibiteurs de *BRAF* en cours de développement dans cette indication.

HER2

Comme EGFR, HER2 est une protéine de la famille des récepteurs membranaires HER. Dans le CBNPC, des amplifications de *HER2* sont retrouvées dans environ 20 % des cas, mais les mutations uniquement dans 2 % des cas [31]. Ces mutations oncogéniques sont, en particulier, davantage décrites chez les non-fumeurs, les femmes, présentant un adénocarcinome et d'origine asiatique.

En pratique : la recherche des mutations d'*HER2* fait partie des biomarqueurs émergents demandés par l'INCa [23]. Ces tumeurs semblent sensibles aux thérapies ciblant *HER2*, tels que le lapatinib, l'afatinib

ou le trastuzumab en association avec une chimiothérapie. Différentes études sont en cours dans cette indication.

PIK3CA

Les phosphatidylinositol 3-kinases sont des kinases qui régénèrent le phosphatidylinositol-3 phosphate, un effecteur clé des récepteurs de facteurs de croissance. Le gène *PI3KCA* peut être amplifié ou muté. Les mutations de *PI3KCA* sont fréquentes dans le glioblastome et le cancer gastrique, mais rares dans le CBNPC autour de 2 %. Ces mutations semblent aussi fréquentes dans les carcinomes épidermoïdes que les adénocarcinomes [32].

Pour la pratique : la recherche des mutations de *PI3KCA* fait partie des biomarqueurs émergents demandés par l'INCa [23]. Des petites molécules ciblant PI3K et mTOR ont montré une activité antitumorale encourageante dans des modèles murins. Des phases cliniques précoces sont en cours dans le cancer bronchique.

Conséquences sur la gestion des petits prélèvements

Il est nécessaire d'avoir une réflexion sur les petits prélèvements dans le diagnostic et la prise en charge du cancer bronchique. Pour les prélèvements de petite taille tels que ceux obtenus chez les patients métastatiques (biopsie ou cytologie bronchique, transbronchique, transthoracique), la gestion du matériel est primordiale. Ces mêmes prélèvements servent à la réalisation de différentes techniques. Celles-ci sont :

- morphologiques et immunohistochimiques permettant de poser le diagnostic de cancer bronchique, de préciser son type histologique CBPC versus CBNPC, son sous-type histologique (épidermoïde versus non-épidermoïde) ;

- de biologie moléculaire pour rechercher des mutations oncogéniques (mutations *EGFR*, FISH ALK) ainsi que les autres marqueurs émergents.

Une collaboration étroite entre le clinicien orientant la demande, le pneumologue réalisant la fibroscopie bronchique ou le radiologue réalisant la ponction sous-scanner de la lésion tumorale, et l'anatomopathologiste est essentielle. La première recommandation est de multiplier le nombre de prélèvements en cas d'anomalie endoscopique (sténose, bourgeon, épaississement des éperons bronchiques en faveur de lymphangite) et de pratiquer au minimum quatre biopsies bronchiques, voire six, et plusieurs carottes tissulaires de ponction transthoracique de façon à optimiser la quantité de matériel disponible. La deuxième recommandation est d'optimiser les ressources par la réalisation de culots d'inclusion en paraffine du matériel cytologique (lavage bronchioalvéolaire, liquide pleural, aspiration bronchique,

ponction sous échoendoscopie) et si possible la cryopréservation d'échantillons tissulaires ou cytologiques [33].

La deuxième recommandation est de fournir au pathologiste un compte rendu détaillé accompagnant le prélèvement. Les données cliniques telles que les antécédents carcinologiques permettent d'orienter et donc de limiter les analyses immunohistochimiques et moléculaires nécessaires.

Pour réaliser des économies de matériel, l'adoption d'un protocole de coupes adapté aux renseignements cliniques et endoscopiques pour les prélèvements de petite taille est une réflexion actuelle. Cette procédure permet d'économiser le matériel tumoral, en évitant une consommation du bloc de paraffine lors de la ré-entame dans un deuxième temps pour des coupes supplémentaires. Pour les biopsies en zone pathologique ou le matériel de ponction à très forte présomption de malignité (ponction transthoracique, ou échoendoscopie), un nombre de niveaux de coupes sériées définies sont colorées pour la morphologie, ou gardées en réserve sous forme de lames blanches non colorées ou de copeaux utilisables ultérieurement [34]. Le stockage au froid (4 °) de ce matériel (lames non colorées ou copeaux non étalés) permet leur utilisation pour les techniques complémentaires morphologiques ou de biologie moléculaire. L'homogénéisation des techniques de fixation reste fondamentale (formol tamponné) de façon à optimiser les analyses morphologique, immunohistochimique et moléculaire [35].

Exploitations des données de plateforme Projet « BIOMARQUEURS France »

Le but du projet est de créer un observatoire national des patients porteurs d'un CBNPC bénéficiant d'un test moléculaire sur les plateformes de génétique moléculaire. L'objectif de l'étude est d'avoir une cartographie moléculaire des CBNPC ainsi que la description des caractéristiques cliniques et de la sensibilité aux traitements. Le promoteur de l'étude est Intergroupe francophone de cancérologie thoracique (IFCT) avec le soutien de l'INCa. Depuis 2006, l'INCa a lancé un programme de soutien aux 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire pour rechercher en routine un panel de biomarqueurs déterminant la prescription des thérapies ciblées. Ainsi pour le CBNPC, les patients bénéficient d'une recherche d'une mutation activatrice de l'*EGFR*, afin d'être traités par ITK d'*EGFR*. Les tumeurs de ces patients feront également l'objet de recherche de biomarqueurs émergents tels que les mutations des gènes *KRAS*, *BRAF*, *HER2* et *PI3KCA* ainsi que les réarrangements impliquant le gène *ALK*. En 2012, on estime que plus de

17000 CBNPC seront analysés par ces plateformes, ce qui constitue une cohorte unique à l'échelle internationale.

Conclusion

Des progrès indéniables ont été réalisés au cours de cette décennie concernant la compréhension de l'oncogenèse des CBNPC avec identification de nouvelles cibles et de traitements ciblés spécifiques. Ainsi la gestion d'un prélèvement biopsique de petite taille est primordial et nécessite une étroite collaboration entre les différents partenaires : préleveur, pathologiste, biologiste moléculaire, thérapeute. Le but est de faire bénéficier le patient des avancées diagnostiques et thérapeutiques les plus récentes. La mise en place des plateformes financées par l'INCa est un important progrès. Le projet BIOMARQUEURS France permettra de valoriser ces données sur une cohorte de plus de 15000 malades en France. ▼

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

1. Boffetta P, Tubiana M, Hill C, et al. The causes of cancer in France. *Ann Oncol* 2009 ; 20 : 550-5.
2. Molinié F, Velten M, Remontet L, Bercelli P, Réseau Francim. The progression of lung cancer incidence in France (1978-2000). *Rev Mal Respir* 2006 ; 23 : 127-34.
3. 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.
4. Les données - Institut national du cancer [Internet], [cité 2011 déc 6]. Consulté de : <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-indicateurs/21-epidemiologie/30-survie-prevalence/33-epidemiologie-du-cancer-du-poumon-en-france-metropolitaine-prevalence-et-survie/82-survie-relative-a-5-ans-des-patients-atteints-dun-cancer-de.html>.
5. Beau-Faller M, Degeorges A, Rolland E, et al. Cross-validation study for epidermal growth factor receptor and KRAS mutation detection in 74 blinded non-small cell lung carcinoma samples: a total of 5550 exons sequenced by 15 molecular French laboratories (evaluation of the EGFR mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non-small cell lung carcinoma [ERMETIC] project-part 1). *J Thorac Oncol* 2011 ; 6 : 1006-15.
6. Cadranet J, Coudert B, Manguen A, Friard S, Quoix E. Clinical and biological predictors of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients (pts) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) treated by erlotinib in the ERMETIC cohort. *Eur Respir J* 2010 ; A1942.
7. Borget I, Cadranet J, Pignon JP, et al. Cost-effectiveness of three strategies for second-line erlotinib initiation in nonsmall-cell lung cancer: the ERMETIC study part 3. *Eur Respir J* 2012 ; 39 : 172-9.
8. Getting personal. *Nature* 2011 ; 473 : 253-4.
9. Amir E, Seruga B, Martinez-Lopez J, et al. Oncogenic targets, magnitude of benefit, and market pricing of antineoplastic drugs. *J Clin Oncol* 2011 ; 29 : 2543-9.
10. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci* 2007 ; 98 : 1817-24.
11. 5774-recherche-a-visée-theranostique.pdf [Internet], [cité 2012 févr 17]. Consulté de : http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/5774-recherche-a-visée-theranostique.

12. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361 : 947-57.
13. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EUR-TAC) : a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* [Internet], 2012 janv 25 [cité 2012 févr 17] ; Consulté de : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285168>.
14. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 : 123-32.
15. Leary AF, Castro DG, de Nicholson AG, et al. Establishing an EGFR mutation screening service for non-small cell lung cancer - sample quality criteria and candidate histological predictors. *Eur J Cancer* 2012; 48 : 61-7.
16. Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn* 2010; 12 : 169-76.
17. Goto K, Ichinose Y, Ohe Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7 : 115-21.
18. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363 : 1693-703.
19. Drugs@FDA [Internet]. [cité 2012 janv 2]. Consulté de : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=SearchDrugDetails>.
20. McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, et al. Dual IHC and FISH testing for *ALK* gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a french study. *J Thorac Oncol* [Internet], 2011 nov 8 [cité 2012 janv 2] ; Consulté de : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071784>.
21. Wu JY, Wu SG, Yang CH, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res* 2008; 14 : 4877-82.
22. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; 28 : S24-31.
23. 5119-programme-inca-biomarqueurs-emergents.pdf [Internet], [cité 2012 févr 17]. Consulté de : http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/5119-programme-inca-biomarqueurs-emergents.
24. Jancík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010 : 150960.
25. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol* 2011; 22 : 2616-24.
26. Mascaux C, Iannino N, Martin B, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2005; 92 : 131-9.
27. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaklopiti D, et al. 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* 2008; 9 : 962-72.
28. Suda K, Tomizawa K, Mitsudomi T. Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29 : 49-60.
29. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 août 8 [cité 2011 sept 4] ; Consulté de : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21825258>.
30. Ji H, Wang Z, Perera SA, et al. Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models. *Cancer Res* 2007; 67 : 4933-9.
31. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2005; 65 : 1642-6.
32. Kawano O, Sasaki H, Endo K, et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer* 2006; 54 : 209-15.
33. Nigro K, Tynski Z, Wasman J, Abdul-Karim F, Wang N. Comparison of cell block preparation methods for nongynecologic ThinPrep specimens. *Diagn Cytopathol* 2007; 35 : 640-3.
34. Antoine M, Poulot V, Colombat M, Fleury J, Lacave R, Cadranet J. Pretreatment molecular biology analysis on small size biopsies. *Ann Pathol* 2010; 30 : 67-72.
35. Hofman V, Ilie M, Gavric-Tanga V, et al. Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques. *Ann Pathol* 2010; 30 : 85-93.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



SÉRIE « BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DU CANCER BRONCHIQUE »

Coordonnée par F. Barlési

Un regard simple sur la biologie du cancer bronchique : MET

A simple view on lung cancer biology: The MET pathway

A.-M. Ruppert^a, M. Beau-Faller^b, L. Belmont^a,
A. Lavolé^a, V. Gounant^a, J. Cadranel^{a,c}, M. Wislez^{a,c,*}

^a Service de pneumologie et réanimation, hôpital Tenon, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 4, rue de La-Chine, 75970 Paris cedex 20, France

^b Service de biochimie et biologie moléculaire, hôpital de Hautepierre, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 67200 Strasbourg, France

^c Équipe de recherche-2, université Pierre-et-Marie-Curie, université Paris-VI, 75970 Paris cedex 20, France

Reçu le 10 mai 2011 ; accepté le 12 mai 2011

Disponible sur Internet le 22 novembre 2011

MOTS CLÉS

MET ;
HGF ;
Cancer bronchique ;
Pronostic ;
Biomarqueur ;
Récepteur tyrosine
kinase ;
Inhibiteur tyrosine
kinase

Résumé MET est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, dont le ligand est le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), également appelé *scatter factor*. La voie HGF-MET présente des propriétés mitogènes, motogènes et proangiogéniques essentielles au cours du développement embryonnaire, mais est également impliquée dans le cancer. Son activation au cours du cancer bronchique serait associée à un mauvais pronostic. Différentes anomalies de la voie peuvent être décrites : surexpression du ligand HGF, surexpression du récepteur, amplification génomique ou mutations de MET. En fonction du type d'altération, MET pourrait jouer un rôle différent. Dans les tumeurs MET amplifiées ou mutées, MET pourrait correspondre à un oncogène. Dans les autres cancers bronchiques, MET serait impliqué dans la progression tumorale par invasion tissulaire et formation de métastases. Par ailleurs, l'amplification de MET est un mécanisme de résistance secondaire connu, retrouvé dans environ 20% des patients présentant un cancer bronchique muté pour EGFR et traité par inhibiteur tyrosine kinase d'EGFR. Différentes stratégies d'inhibition de MET sont en cours de développement dans le cancer bronchique, en particulier chez les patients en progression après une réponse initiale sous inhibiteur d'EGFR. Dans cette revue, nous présentons la structure de ce récepteur, ses voies de signalisation, les principales anomalies génomiques décrites dans les cancers bronchiques ainsi que les perspectives thérapeutiques.

© 2011 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : marie.wislez@tnn.aphp.fr (M. Wislez).

KEYWORDS

MET;
Non small lung
cancer;
Prognosis;
Biomarker;
Tyrosine kinase
receptor;
Tyrosine kinase
inhibitor

Summary MET is a cell membrane tyrosine kinase receptor for its ligand the hepatocyte growth factor (HGF), also called scatter factor (SF). MET conveys mitogenic, motogenic and proangiogenic signals, important during embryonic development and during the development of cancer. Activation of the HGF-MET pathway seems to be associated with a poor prognosis in lung cancer. Activation in lung cancer may be related to several molecular anomalies: ligand overexpression, receptor overexpression, genomic amplification or MET mutation. In MET amplified or mutated lung cancer, MET may be an important oncogene, as the tumor appears "MET addicted". In other lung cancers, MET may be implicated in tumour progression by tissue invasion and formation of metastases. MET amplification is also a mechanism known to be implicated in 20% of secondary resistance to EGFR inhibitors in patients presenting EGFR mutated lung cancer. Different strategies of MET inhibition in lung cancer are being studied, particularly in EGFR mutated lung cancer. In this review we discuss the structure of the MET receptor, the activated pathways, the main genomic anomalies in lung cancer and the development of MET inhibitors. © 2011 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Le récepteur *mesenchymal-epithelial transition factor* (MET) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Son unique ligand est le facteur de croissance hépatocytaire *hepatocyte growth factor* (HGF), également appelé *scatter factor* (SF). La voie MET-HGF joue un rôle clé au cours de l'embryogenèse. Elle présente à la fois une activité mitogénique (prolifération cellulaire), motogénique (migration cellulaire), morphogénique (différenciation cellulaire) et antiapoptique. Ces différentes activités biologiques définissant la « croissance invasive », qui est quiescente chez les adultes. Elle peut être réactivée en cas d'agression tissulaire, lorsque les cellules « résiduelles » doivent proliférer et migrer pour restituer l'intégrité du tissu. Elle est également impliquée dans le développement et la progression tumorale. MET devient un oncogène. Il joue un rôle clé au cours de certains cancers, comme le cancer papillaire héréditaire du rein. Dans le cancer bronchique primitif, différentes altérations de MET sont décrites : mutation, amplification génique ou sur-expression du récepteur. MET pourrait jouer, en fonction de l'altération, un rôle distinct dans le cancer bronchique. Différentes stratégies d'inhibition de MET sont en développement dans le cancer bronchique, en particulier chez les patients en progression après une réponse initiale sous inhibiteur d'EGFR.

Biologie de MET

Structure

Le gène du récepteur MET est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) et est constitué de 21 exons. Le récepteur MET fait partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase et correspond à une glycoprotéine de 120 kb, issue d'un précurseur de 170 kb [1]. Il comprend une sous-unité α extra-cellulaire et une sous-unité β composée de trois parties différentes (Fig. 1a) :

- extracellulaire avec une extrémité N-terminale contenant des sémaphorines (SEMA) ;

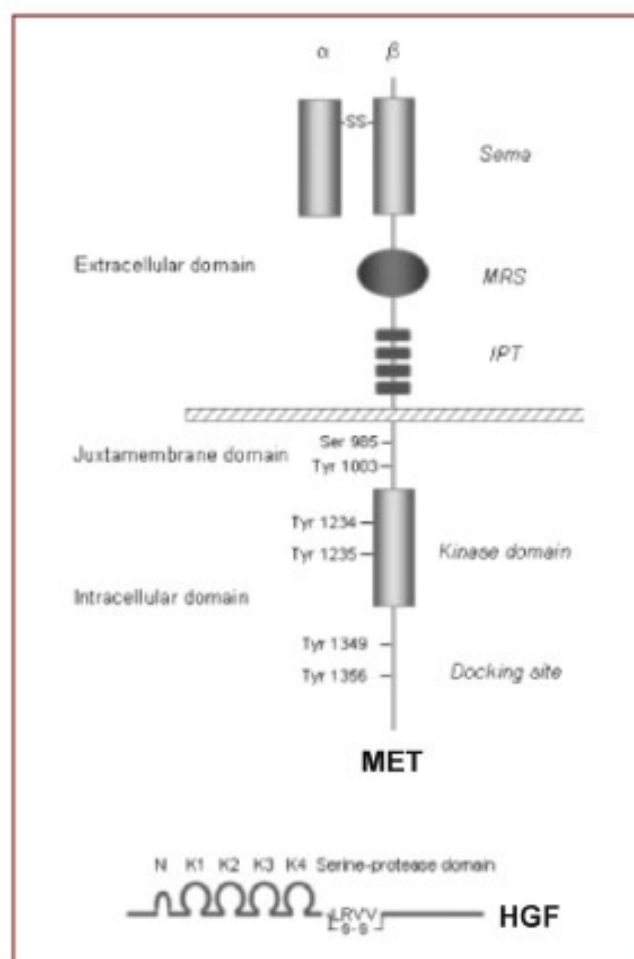


Figure 1. a: structure de MET ; b: structure de HGF. D'après [41].

- transmembranaire ;
- intracellulaire avec un domaine juxtamembranaire et au niveau de la partie C-terminale le domaine catalytique tyrosine kinase.

Les deux sous-unités α et β sont reliées par un pont disulfure.

L'*hepatocyte growth factor* (HGF) ou SF est le ligand de MET. Il s'agit d'un facteur de croissance qui se fixe exclusivement sur le récepteur épithélial MET au niveau du domaine SEMA. HGF est une protéine hétérodimérique, composée de deux sous-unités α et β dérivées d'un précurseur commun, le pro-HGF (Fig. 1b). Son gène est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q25) [1]. HGF est sécrété majoritairement par les cellules mésenchymateuses du stroma et les polynucléaires neutrophiles.

Activation de MET et ses voies de signalisation

Le récepteur est inactif sous sa forme de monomère (Fig. 2). Après liaison à son ligand HGF, MET forme soit des homodimères soit des hétérodimères avec d'autres récepteurs tyrosine kinase pouvant alors activer plusieurs voies de signalisation [2]. La cascade Ras-MAP kinases permet de contrôler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'invasion tissulaire et l'angiogenèse [2]. La voie PI-3K-AKT-mTOR favorise l'inhibition de l'apoptose et la motilité cellulaire [2].

La voie JAK (Janus Kinase) – STAT (*signal transducer and activator of transcription*) est essentiellement impliquée dans la morphogenèse, bronchique en particulier [2].

Expression et rôle physiologique de HGF-MET

La voie MET-HGF joue un rôle clé dans la « croissance invasive » [3]. Il s'agit d'un programme physiologique complexe impliqué essentiellement au cours de l'embryogenèse lors de la gastrulation. La croissance invasive résulte de l'intégration de plusieurs activités biologiques dont la migration, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Cette croissance invasive impliquerait une « transition épithéliomésenchymateuse [EMT] » des cellules. L'activation de MET par HGF favorise cette transition par la rupture des contacts intercellulaires, le détachement, puis la migration des cellules. Lorsque les cellules ne sont plus liées aux protéines de la matrice extracellulaire, elles meurent d'apoptose, appelée « anoïks ». L'activation de MET prévient l'« anoïks » par des signaux antiapoptiques puissants. MET est également impliquée dans la prolifération cellulaire permettant à ces cellules en migration de se fixer à des sites distants (transition mésenchymateuse-épithéliale), puis de se multiplier [3].

Cette croissance invasive est quiescente chez l'adulte. Elle peut être réactivée en cas de lésions tissulaires, lorsque les cellules résiduelles doivent proliférer et migrer pour restituer l'intégrité du tissu. Ainsi, le taux plasmatique d'HGF augmente après une lésion hépatique, rénale ou cardiaque. Dans le parenchyme pulmonaire, le taux d'HGF augmente en cas de syndrome de détresse respiratoire aiguë, témoignant de son implication dans le processus de cicatrisation [4]. En plus, dans les maladies dégénératives telles que la cirrhose hépatique ou la fibrose pulmonaire, le rôle protecteur d'HGF est bien démontré [5].

MET est exprimé à l'état physiologique par de nombreux tissus épithéliaux (Fig. 3) [6]. Au niveau de l'appareil respiratoire, l'expression de MET est modérée dans les cellules épithéliales bronchiques et plus forte dans les macrophages

[6]. Les souris génétiquement modifiées n'exprimant pas MET et/ou HGF ne sont pas viables. Elles présentent des anomalies du développement liées à une immaturité épithéliale touchant plusieurs organes avec au niveau pulmonaire une morphogenèse pulmonaire incomplète et une absence de branchement des bronchioles [7].

- Le récepteur MET fait partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase.
- La voie a une activité mitogénique (prolifération cellulaire), motogénique (migration cellulaire), morphogénique (différenciation cellulaire) et anti-apoptique.
- MET est exprimé à l'état physiologique par de nombreux tissus épithéliaux. Au niveau de l'appareil respiratoire, l'expression est modérée dans les cellules épithéliales et forte dans les macrophages.

Outils d'analyse de MET-HGF

MET/HGF peuvent être étudiés par différentes techniques au niveau de leur expression protéique et au niveau de leur ADN.

L'expression protéique est étudiée en immunohistochimie sur un prélèvement tissulaire ou en immunocytochimie sur un culot cellulaire. L'anticorps marqué peut être dirigé contre la protéine HGF (Fig. 4a), la protéine MET totale (Fig. 4b) ou sa forme phosphorylée active phospho-MET.

Le nombre de copies du gène (ADN) peut être quantifié par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Cette technique se réalise sur des cellules isolées ou des coupes de tissus fixés. Cette technique permet de différencier une amplification du gène, d'une trisomie du chromosome 7 fréquente dans les cancers bronchiques [8]. L'amplification du gène peut aussi être étudiée par PCR quantitative (polymerase chain reaction). Elle est plus aisée sur tissu congelé mais ne permet pas de différencier facilement une amplification du gène d'une trisomie du chromosome 7.

Les mutations du gène (21 exons) peuvent être identifiées par séquençage après extraction de l'ADN des cellules tumorales.

- MET-HGF peuvent être étudiés par différentes techniques au niveau de leur expression protéique (immuno-histochimie ou immuno-cytochimie) et au niveau de leur ADN (copies de gènes dont le nombre est estimé par hybridation *in situ* en fluorescence ou PCR quantitative).
- Les mutations du gène MET peuvent être identifiées par séquençage.

MET-HGF et cancer

La voie MET-HGF est impliquée dans l'oncogenèse de différentes tumeurs solides. MET peut jouer un rôle clé dans

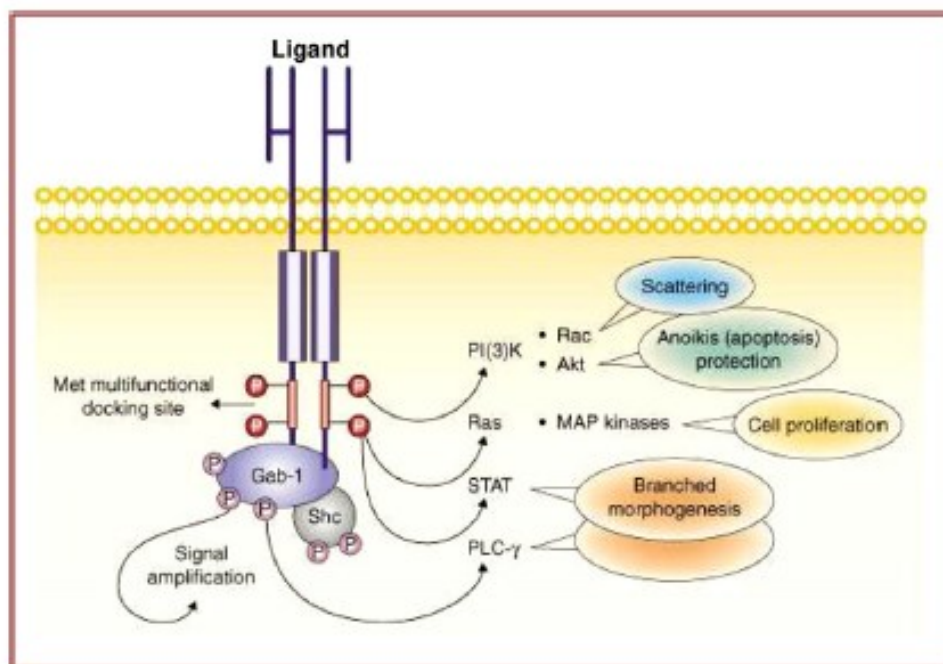


Figure 2. Les voies de signalisation du complexe HGF/MET. D'après [2].

certaines cancers, comme le cancer papillaire du rein. Des mutations ponctuelles dans le domaine tyrosine kinase de MET y sont retrouvées, que ce soit dans les formes sporadiques ou héréditaires. Ces mutations aboutissent à une activation constitutive du récepteur et favorisent le développement de cancers du rein souvent multiples et bilatéraux. Ces cancers mutés présentent une addiction oncogénique vis-à-vis de MET [9]. Le réarrangement génique de la protéine de fusion TPR-MET constitutionnellement active est un oncogène puissant *in vivo*/*in vitro*. Ce gène chimérique a été mis en évidence dans une lignée d'ostéosarcome, mais jamais dans le cancer bronchique [10,11].

L'hyperexpression protéique de MET est associée à un pronostic défavorable dans de multiples cancers. MET est impliqué dans la progression tumorale au cours des cancers du côlon, du sein ou de l'ovaire [12]. Dans le cancer colique, MET jouerait un rôle dans l'invasion tissulaire, la formation de métastases et correspondrait à un facteur pronostique important [13]. Le site <http://www.val.org/met> rapporte les principales références des publications concernant MET dans les différents cancers.

Des données récentes indiquent aussi un rôle de MET au cours des thromboses et hémorragies associées aux cancers. Ainsi les souris transfectées au niveau hépatique par un lentivirus contenant l'oncogène MET développent à la fois un processus tumoral et une perturbation de l'hémostase avec initialement des thromboses, puis des troubles de l'hémostase jusqu'à la coagulation intravasculaire disséminée. Le mécanisme à la base de ces manifestations d'hypercoagulation et d'hémorragie est une dérégulation transcriptionnelle de facteurs procoagulants tels que la cyclo-oxygénase-2 et l'inhibiteur du plasminogène activé de type 1 (PAI-1) [14].

MET-HGF et cancer bronchique

Plusieurs mécanismes de dérégulation de la voie HGF-MET peuvent être impliqués dans le cancer bronchique : mutation, amplification génomique ou surexpression du récepteur [10].

Caractéristiques cliniques/histologiques des cancers bronchiques présentant une altération de la voie MET-HGF

La surexpression de MET dans le cancer bronchique est fréquente. Elle est retrouvée davantage dans les adénocarcinomes (67 %), que les carcinomes indifférenciés à grandes cellules (57 %), les carcinomes épidermoïdes (57 %) et les cancers bronchiques à petites cellules (25 %) [15]. Afin d'évaluer si la surexpression de MET est associée à une activation du récepteur, la forme phosphorylée active de MET (p-MET) est étudiée. Elle montre une surexpression de p-MET surtout dans les CBNPC exprimant intensément MET et HGF [16]. L'implication de MET dans la différenciation des cancers bronchiques vers les adénocarcinomes a été évoquée par Tsao et al. [17]. Leur étude montre une surexpression de MET dans les adénocarcinomes par rapport à l'épithélium bronchique normal et une sous expression dans la grande majorité des carcinomes épidermoïdes. MET aurait un rôle différent selon les types histologiques de cancers bronchiques : il serait impliqué dans la différenciation glandulaire des adénocarcinomes et aurait, par contre, un rôle anti-prolifératif dans les carcinomes épidermoïdes. Cet effet antiprolifératif dans le carcinome épidermoïde a été récemment démontré par cette même équipe [18].

La surexpression de MET et p-MET seraient impliquées dans le développement des adénocarcinomes pulmonaires de type papillaire [16,17]. Dans l'étude de Nakamura et

Tissue		Antibody staining	Selected staining	Tissue		Antibody staining	Selected staining	Level of antibody staining
Central nervous system (Brain)				Respiratory system (Lung)				Strong Moderate Weak Negative
	Cerebral cortex	Neuronal cells			Nasopharynx	Respiratory epithelial cells		
	Hippocampus	Neuronal cells			Bronchus	Respiratory epithelial cells		
	Lateral ventricle	Neuronal cells			Lung	Pneumocytes		
	Cerebral cortex	Glial cells			Lung	Macrophages		
	Hippocampus	Glial cells		Cardiovascular system (Heart and blood vessels)				
	Lateral ventricle	Glial cells			Heart muscle	Myocytes		
	Cerebellum	Purkinje cells		Breast and female reproductive system (Female tissues)				
	Cerebellum	Cells in granular layer			Breast	Glandular cells		
	Cerebellum	Cells in molecular layer			Vagina	Squamous epithelial cells		
Blood and immune system (Hematopoietic)					Cervix, uterine	Squamous epithelial cells		
	Bone marrow	Hematopoietic cells			Cervix, uterine	Glandular cells		
	Lymph node	Germinal center cells			Uterus, post-menopause	Glandular cells		
	Lymph node	Non-germinal center cells			Uterus, pre-menopause	Glandular cells		
	Tonsil	Germinal center cells			Uterus, post-menopause	Cells in endometrial stroma		
	Tonsil	Non-germinal center cells			Uterus, pre-menopause	Cells in endometrial stroma		
	Spleen	Cells in white pulp			Ovary	Follicle cells		
	Spleen	Cells in red pulp			Ovary	Ovarian stroma cells		
Liver and pancreas				Placenta				
	Liver	Hepatocytes			Placenta	Trophoblastic cells		
	Liver	Bile duct cells			Placenta	Decidual cells		
	Gall bladder	Glandular cells		Male reproductive system (Male tissues)				
	Pancreas	Exocrine glandular cells			Testis	Cells in seminiferous ducts		
	Pancreas	Islets of Langerhans			Testis	Leydig cells		
Digestive tract (GI tract)					Epididymis	Glandular cells		
	Oral mucosa	Squamous epithelial cells			Prostate	Glandular cells		
	Salivary gland	Glandular cells			Seminal vesicle	Glandular cells		
	Esophagus	Squamous epithelial cells		Urinary tract (Kidney and bladder)				
	Stomach, upper	Glandular cells			Kidney	Cells in glomeruli		
	Stomach, lower	Glandular cells			Kidney	Cells in tubules		
	Duodenum	Glandular cells			Urinary bladder	Urothelial cells		
	Small intestine	Glandular cells		Skin and soft tissues				
	Appendix	Glandular cells			Skin	Epidermal cells		
	Appendix	Lymphoid tissue			Vulva/anal skin	Epidermal cells		
	Colon	Glandular cells			Skeletal muscle	Myocytes		
					Smooth muscle	Smooth muscle cells		

Figure 3. L'expression de MET dans le tissu normal d'après <http://www.proteinatlas.org>.

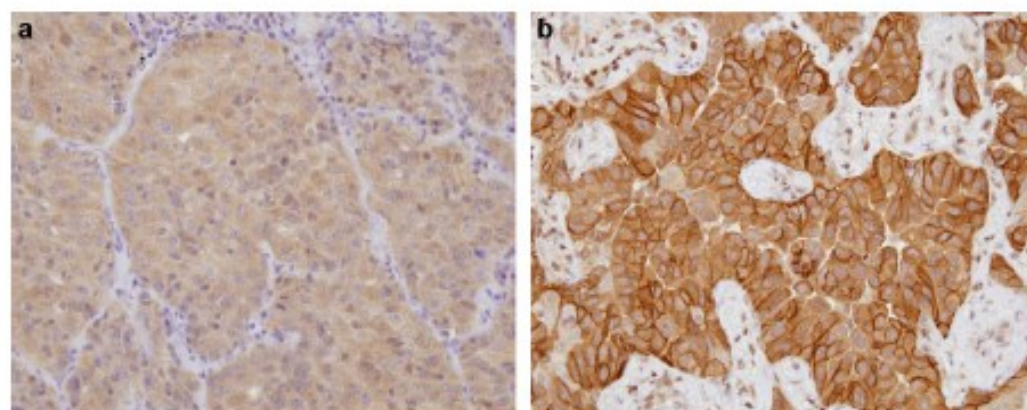


Figure 4. L'étude en immunohistochimie de MET et HGF. Elle étudie l'expression protéique par un anticorps dirigé contre HGF avec marquage cytoplasmique (a) ou contre MET (b) avec marquage cytoplasmique et membranaire.

col, p-MET est associé de façon significative aux adénocarcinomes papillaires ($p=0,001$), bien différenciés ($p=0,002$) et sans invasion vasculaire ($p=0,02$). MET est impliqué dans la morphogénèse pulmonaire au niveau de la formation des structures glandulaires [7]. Les mutations oncogéniques héréditaires de MET aboutissent au cancer papillaire rénal. Les auteurs suggèrent que MET serait impliqué dans la formation des structures papillaires de cancers de diverses origines [16].

Le nombre de copies de MET a été évalué par FISH sur 435 prélèvements de patients opérés pour un cancer bronchique [19]. Un nombre élevé de copies du gène MET (≥ 5 copies/cellule) est retrouvé dans 11,1% (48/435) des cancers bronchiques, dont 18 cas (4,1%) d'amplification du gène MET. L'augmentation du nombre de copies de MET n'est pas associée à un type histologique particulier.

Des mutations ponctuelles ont été recherchées sur des lignées cellulaires de cancer bronchique et 127 prélèvements d'adénocarcinomes bronchiques réséqués [15]. Les mutations R988C, T1010I et S1058P sont identifiées au niveau de séquences codantes pour le domaine juxta-membranaire, région régulatrice du récepteur tyrosine kinase. Ces mutations augmentent la prolifération et la motilité cellulaires [20] et diffèrent de celles décrites dans le cancer papillaire rénal qui sont situées au niveau du domaine SEMA (site de fixation d'HGF) et du domaine tyrosine kinase (activation constitutive du récepteur).

Caractère mutuellement exclusif : MET/EGFR–MET/RAS

Dans la cohorte de 447 prélèvements chirurgicaux de CBNPC analysées, aucun patient muté EGFR ne présentait d'amplification de MET par analyse FISH [19]. En revanche dans les cancers bronchiques mutés EGFR traités par inhibiteurs tyrosine kinase d'EGFR (EGFR-TKI), l'amplification de MET est un mécanisme de résistance acquise aux EGFR-TKIs reconnu [21]. L'amplification de MET est retrouvée dans environ 20% des cas [21]. De façon intéressante, l'inhibition de MET rétablit *in vitro* sur les lignées et dans les modèles animaux la sensibilité à l'erlotinib [22].

Des études récentes ont montré que le récepteur MET peut être activé par d'autres récepteurs, indépendamment d'HGF. Cette transactivation peut s'effectuer par l'intermédiaire des récepteurs tels que les intégrines (impliqués dans l'adhésion cellulaire) ou EGFR. Les récepteurs MET et EGFR sont fréquemment co-exprimés dans les tumeurs. La transactivation de MET est dépendante de l'expression d'EGFR [23].

Enfin, l'amplification de MET est mutuellement exclusive des mutations du gène RAS [24].

Pronostic

Un taux élevé d'HGF tumoral est un facteur pronostique défavorable indépendant des adénocarcinomes [25,26]. L'HGF est essentiellement sécrété par les cellules du stroma (sécrétion paracrine), mais peut être sécrété directement par la cellule tumorale (sécrétion autocrine). Dans l'étude de Siegfried et al., 22 sur 59 patients opérés pour un cancer bronchique de stade I à III présentaient un dosage protéique d'HGF élevé par Western Blot [25]. Le taux d'HGF élevé était associé à une diminution de la survie et ceci

indépendamment du stade tumoral (RR pour la survie globale de 2,2 et survie sans progression de 3,3). De même, Wislez et al. ont montré que le taux d'HGF élevé dans le lavage broncho-alvéolaire d'adénocarcinomes lépidiques était un facteur indépendant de mauvais pronostic sur la survie [26].

L'effet pronostique péjoratif de la surexpression de MET reste discuté [15,16,27,28]. Seules deux études ont montré que, la surexpression tumorale de MET était un facteur pronostique défavorable [27,28]. Dans l'étude de Masuya et al., chez 88 patients opérés d'un cancer bronchique de stade I à III, une surexpression de MET était retrouvée dans 41% des cas au niveau des cellules tumorales, d'HGF dans 25% au niveau des cellules tumorales et 15% au niveau des cellules stromales. La surexpression de MET était un facteur pronostique défavorable ($p=0,009$), en particulier s'il existait une surexpression stromale d'HGF associée ($p=0,001$) [27]. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus à partir de xéno-greffes de lignées cellulaires tumorales surexprimant MET et/ou HGF. En cas d'expression à la fois de MET et de son ligand, la tumorigénicité est accrue avec un risque élevé de développement de métastases [29,30].

Le nombre de copies de MET évalué par FISH est un facteur pronostique [19]. L'augmentation du nombre de copies de MET est associée à un stade plus avancé (stade 1-2 versus 3 ; $p=0,01$) et à un cancer peu différencié (grade 1-2 versus 3 ; $p=0,016$). L'analyse multivariée montre une survie moindre des patients MET amplifiés en FISH (RR 0,66, $p=0,04$) [19]. Ces résultats sont confirmés par PCR quantitative sur une autre cohorte de cancers bronchiques opérés. Parmi les tumeurs analysées, 5,6% (12/213) ont présenté une amplification génique et une survie significativement plus courte ($p=0,04$) [31].

MET comme cible thérapeutique

Pour MET, deux rationnels de traitement doivent être distingués.

D'une part, l'amplification de MET est une altération génomique rare, qui pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante [32]. Les lignées tumorales amplifiées pour MET sont dépendantes de MET et l'inhibition du récepteur aboutit à un arrêt de la prolifération, et une mort par apoptose. C'est le phénomène d'*addiction oncogénique* pour MET. Cependant aucun résultat d'inhibition de MET n'a été rapporté dans des modèles de ces tumeurs de lignées cellulaires tumorales xéno-greffées.

D'autre part, MET est impliqué dans les mécanismes de résistance acquise des cancers bronchiques mutés pour EGFR, et progressant après une réponse initiale aux inhibiteurs de la fonction tyrosine kinase de l'EGFR. Une amplification de MET est retrouvée dans environ 20% des tumeurs mutées EGFR [21]. Il existe dans ce cas une hétérodimérisation de MET et de HER3 permettant de déjouer les TKI d'EGFR, HER3 n'ayant pas de domaine tyrosine kinase. De façon intéressante, l'inhibition de MET rétablit dans les modèles animaux la sensibilité à l'erlotinib [22]. L'association d'un inhibiteur de MET avec la poursuite de l'EGFR-TKI constitue une approche thérapeutique chez ces malades. Des essais thérapeutiques de phase II et III sont en cours.

Les inhibiteurs de MET ont démontré une efficacité sur de nombreuses lignées cellulaires alors qu'aucune altération

- La voie HGF-MET est impliquée dans l'oncogenèse de différentes tumeurs solides. Elle joue un rôle dans les thromboses et hémorragies associées aux cancers.
- Dans le cancer bronchique, plusieurs mécanismes de dérégulation de la voie HGF-MET sont décrites : mutation, amplification génomique ou surexpression du récepteur.
- La surexpression de MET est fréquente. Elle prédomine dans les adénocarcinomes (67 %), puis les carcinomes indifférenciés à grandes cellules (57 %), les carcinomes épidermoïdes (57 %) et les cancers bronchiques à petites cellules (25 %).
- L'amplification de MET est retrouvée dans 5 à 10 % des cancers bronchiques.
- Des mutations ponctuelles situées au niveau de la région régulatrice de la fonction tyrosine kinase du récepteur MET sont décrites sur des lignées cellulaires de cancer bronchique et des prélèvements d'adénocarcinomes bronchiques réséqués.
- Dans les cancers bronchiques mutés EGFR traités par inhibiteurs tyrosine kinase d'EGFR, l'amplification de MET est un mécanisme de résistance secondaire connu, retrouvé chez environ 20 % des patients.
- Un taux élevé d'HGF est un facteur pronostique défavorable indépendant des adénocarcinomes bronchiques.
- L'effet pronostique péjoratif de la surexpression de MET reste discuté dans le cancer bronchique.
- L'augmentation du nombre de copies de MET est associée à un cancer de stade plus avancé et à une forme indifférenciée.

génomique, mutation ou amplification, n'a pu être mise en évidence. Dans une étude expérimentale, MET surexprimé dans les lignées cellulaires, puis dans des xénogreffes de cellules tumorales était inhibé par un brin d'ARN interférant [si-RNA] [33]. Ceci aboutissait à l'arrêt de la croissance invasive et l'arrêt de la prolifération *in vitro*, puis la régression des métastases *in vivo*.

Enfin les inhibiteurs de MET pourraient jouer un rôle anti-angiogénique. Dans un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire muté pour K-ras, les inhibiteurs de MET ont une efficacité antitumorale par leur action sur les cellules endothéliales [34].

Les différentes stratégies d'inhibition de la voie MET/HGF [35–41]

Elles sont comme suit :

- Inhibition du ligand HGF : par un anticorps anti-HGF humanisé (AMG 102) ; cet anticorps est actuellement évalué au cours d'une phase I/II en association avec l'erlotinib dans le cancer bronchique non à petites cellules pré-traités et en association avec Cisplatine-Etoposide dans le cancer bronchique à petites cellules (NCT00791154 et NCT01233687) ;
- Inhibition du récepteur MET : par un anticorps monoclonal humanisé anti-MET (MetMab, OA5D5 ; Genentech).

Dans une phase II comportant 128 patients présentant un cancer bronchique non à petites cellules de stade IIIB/IV, un traitement par erlotinib 150 mg associé à cet anticorps MetMab (15 mg/kg par semaine) ou un placebo a été administré en deuxième ou troisième ligne (NCT00854308) [38]. L'expression de MET a été recherchée systématiquement sur les prélèvements tumoraux par immunohistochimie ; elle était observée dans 56,5 % des tumeurs de patients du groupe MetMab et 50,8 % des tumeurs des patients du groupe placebo. La survie sans progression dans la cohorte en intention à traiter était comparable entre les deux groupes MetMab versus placebo. En revanche, l'analyse de la population présentant une hyperexpression de MET montre un effet bénéfique sur la survie sans progression (7,7 versus 7,4 mois ; HR = 0,55 ; IC 0,26–1,16) et la survie globale (12,4 versus 8,4 mois ; HR = 0,56 ; IC 0,31–1,02). Cette étude montre de façon intéressante, dans le bras placebo, l'impact pronostique défavorable de l'hyperexpression de MET ;

- Inhibition de MET par un inhibiteur tyrosine kinase sélectif. Différentes molécules (ARQ197, JNJ-38877605, PF-04217903) sont en cours d'évaluation. L'ARQ197 a montré un profil de tolérance et d'efficacité acceptable en phase I [39]. Son association *in vitro* avec l'erlotinib montre une efficacité supérieure à celle de chacune des molécules prise séparément. Les résultats d'une étude de phase II d'ARQ 197 a été présenté à l'ESMO en 2010 [40]. Dans cet essai incluant des CBNPC de stade avancé en 2^e ligne ou plus, 167 patients sont randomisés dans un groupe erlotinib (150 mg/j)–ARQ197 (360 mg deux fois par jour) versus erlotinib–placebo. La survie sans progression (objectif principal) est significativement allongée dans le bras ARQ : 3,7 versus 2,2 mois (HR = 0,68 ; IC 95 : 0,47–0,98 ; $p < 0,05$). L'amélioration de la survie sans progression semble meilleure pour l'histologie non épidermoïde, les tumeurs EGFR sauvage, les tumeurs avec amplification de MET et les mutations de RAS. Même si le bénéfice d'ARQ semble faible, l'efficacité de cette molécule mérite des études ultérieures, en particulier en cas de mutations de RAS. Une étude de phase III est actuellement en cours (NCT01251796) ;
- Inhibition de MET par un inhibiteur multikinase (PF-02341066) ; cette molécule cible à la fois ALK et MET. Une phase III est actuellement en cours dans les cancers bronchiques ayant une translocation ALK ;
- Inhibition de MET par des inhibiteurs kinases à large spectre (GSK1363089). Il s'agit d'un inhibiteur ciblant MET, VEGFR1-3, RET, KIT, FIT-3 qui a montré une efficacité dans des modèles précliniques de cancer bronchique. Des études de phase I-II sont en cours.

Conclusion

Des progrès indéniables ont été réalisés au cours de cette décennie concernant la compréhension de l'implication de l'oncogène MET au cours du cancer du poumon. La mise en évidence de son rôle dans l'apparition des résistances secondaires aux EGFR-TKIs lui confère une place privilégiée comme cible thérapeutique. Les résultats encourageants

- L'amplification de MET est une altération génomique rare dans le cancer bronchique. Elle pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante. Dans les lignées tumorales amplifiées pour MET, l'inhibition du récepteur aboutit à un arrêt de la prolifération et une mort par apoptose.
- Dans les cancers bronchiques mutés pour EGFR traités par inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR, l'amplification de MET est un mécanisme de résistance secondaire connu. L'inhibition de MET rétablit dans les modèles animaux la sensibilité aux EGFR-TKI. L'association d'un inhibiteur de MET avec la poursuite de l'EGFR-TKI pourrait constituer une approche thérapeutique.
- Les inhibiteurs de MET se sont avérés efficaces sur de nombreuses lignées cellulaires de cancer bronchique, sans qu'aucune altération génomique ne soit retrouvée.

Plusieurs stratégies d'inhibition de la voie MET/HGF sont étudiées:

- inhibition du ligand HGF par un anticorps anti-HGF ;
- inhibition du récepteur MET par un anticorps anti-MET ;
- inhibition de MET par un inhibiteur tyrosine kinase sélectif ou un inhibiteur multikinase.

des essais ciblant des populations de patients surexprimant le récepteur nous confortent dans la nécessité de développer des thérapeutiques ciblées et « à la carte ».

POINTS ESSENTIELS

- MET joue un rôle important dans la progression et l'invasion tumorale.
- Il existe une possible addiction oncogénique dans les cancers bronchiques amplifiés MET.
- Il existe un mécanisme de résistance acquise dans le cancer bronchique muté EGFR sous traitement par inhibiteur d'EGFR.
- MET est un facteur pronostique défavorable dans les stades précoces et tardifs.
- On retrouve une surexpression, en particulier dans les adénocarcinomes, et une sous-expression dans les carcinomes épidermoïdes.
- La thérapeutique anti-HGF et anti-MET est en cours d'évaluation.
- Les résultats de phase II sont intéressants dans les tumeurs surexprimant MET et traité par erlotinib-METmAb.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:834–48.
- [2] Comoglio PM. Pathway specificity for Met signalling. *Nat Cell Biol* 2001;3:E161–2.
- [3] Mazzone M, Comoglio PM. The Met pathway: master switch and drug target in cancer progression. *FASEB J* 2006;20:1611–21.
- [4] Quesnel C, Marchand-Adam S, Fabre A, et al. Regulation of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L334–43.
- [5] Panganiban RM, Day RM. Hepatocyte growth factor in lung repair and pulmonary fibrosis. *Acta Pharmacol*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/21131996> [cité 2010 déc 18].
- [6] The Human Protein Atlas [Internet]. Available from: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000105976/normal> [cité 2010 déc 19].
- [7] Ohmichi H, Koshimizu U, Matsumoto K, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchyme-derived morphogenic factor during fetal lung development. *Development* 1998;125:1315–24.
- [8] Varella-Garcia M. Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr* 2010;4:100–6.
- [9] Schmidt L, Duh FM, Chen F, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 1997;16:68–73.
- [10] Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J Clin Invest* 2002;109:863–7.
- [11] Park M, Dean M, Cooper CS, et al. Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 1986;45:895–904.
- [12] Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6:637–45.
- [13] Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, et al. c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 2003;9:1480–8.
- [14] Boccaccio C, Sabatino G, Medico E, et al. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005;434:396–400.
- [15] Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, et al. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:1479–88.
- [16] Nakamura Y, Niki T, Goto A, et al. c-Met activation in lung adenocarcinoma tissues: an immunohistochemical analysis. *Cancer Sci* 2007;98:1006–13.
- [17] Tsao MS, Liu N, Chen JR, et al. Differential expression of Met/hepatocyte growth factor receptor in subtypes of non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 1998;20:1–16.
- [18] To C, Seiden I, Liu N, et al. Tsao M-S. High expression of Met/hepatocyte growth factor receptor suppresses tumorigenicity in NCI-H1264 lung carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2002;273:45–53.
- [19] Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, et al. Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 2009;27:1667–74.
- [20] Ma PC, Kijima T, Maulik G, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res* 2003;63:6272–81.
- [21] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039–43.

- [22] Tang Z, Du R, Jiang S, et al. Dual MET-EGFR combinatorial inhibition against T790M-EGFR-mediated erlotinib-resistant lung cancer. *Br J Cancer* 2008;99:911–22.
- [23] Lai AZ, Abella JV, Park M. Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends Cell Biol* 2009;19:542–51.
- [24] Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, et al. MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *J Thorac Oncol* 2008;3:331–9.
- [25] Siegfried JM, Luketich JD, Stabile LP, et al. Elevated hepatocyte growth factor level correlates with poor outcome in early-stage and late-stage adenocarcinoma of the lung. *Chest* 2004;125:S116–9.
- [26] Wislez M, Rabbe N, Marchal J, et al. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* 2003;63:1405–12.
- [27] Masuya D, Huang C, Liu D, et al. The tumour-stromal interaction between intratumoral c-Met and stromal hepatocyte growth factor associated with tumour growth and prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2004;90:1555–62.
- [28] Takanami I, Tanana F, Hashizume T, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers. *Oncology* 1996;53:392–7.
- [29] Navab R, Liu J, Seiden-Long I, et al. Co-overexpression of Met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells. *Neoplasia* 2009;11:1292–300.
- [30] Yi S, Tsao MS. Activation of hepatocyte growth factor-met autocrine loop enhances tumorigenicity in a human lung adenocarcinoma cell line. *Neoplasia* 2000;2: 226–34.
- [31] Okuda K, Sasaki H, Yukiue H, et al. Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2008;99:2280–5.
- [32] Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, et al. Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res* 2007;67:2081–8.
- [33] Corso S, Migliore C, Ghiso E, et al. Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene* 2008;27:684–93.
- [34] Yang Y, Wislez M, Fujimoto N, et al. A selective small molecule inhibitor of c-Met. PHA-665752, reverses lung premalignancy induced by mutant K-ras. *Mol Cancer Ther* 2008;7:952–60.
- [35] Yap TA, de Bono JS. Targeting the HGF/c-Met axis: state of play. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1077–9.
- [36] Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, et al. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:2207–14.
- [37] Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:504–16.
- [38] Spigel D. Randomized multicenter double-blind placebo-controlled phase 2 study evaluating MetMAb, an antibody to met receptor, in combination with erlotinib, in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Program and abstracts of the 35th European Society of Medical Oncology Congress; October 8–12, 2010. Milan, Italy. [Abstract LBA15].
- [39] Yap TA, Olmos D, Brunetto AT, et al. Phase I: Trial of a Selective c-MET Inhibitor ARQ 197 Incorporating Proof of Mechanism Pharmacodynamic Studies. *J Clin Oncol*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/21383285> [cité 2011 mars 18].
- [40] Sequist L, Akerley W, Brugger W. Final results from ARQ 197-209: a global randomized, placebo-controlled phase 2 clinical trial of erlotinib plus ARQ 197 versus erlotinib plus placebo in previously treated EGFR-inhibitor naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). Program and abstracts of the 35th European Society of Medical Oncology Congress; October 8–12, 2010; Milan, Italy. Abstract 3630.
- [41] Benvenuti S, Comoglio PM. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* 2007;213:316–25.

Cancer bronchique et inflammation

Anne-Marie Ruppert^{1, 2}, Nathalie Rozensztajn¹, Thibault Viera^{1, 2}, Martine Antoine^{1, 2},
Armelle Lavolé^{1,2}, Jacques Cadranel^{1,2}, Marie Wislez^{1,2}

¹Service de Pneumologie, AP-HP, Hôpital Tenon, UFR Pierre et Marie Curie, Université
Paris VI, Paris, France;

²GRC N°4 Théranoscan, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

D'après la communication de Marie Wislez, Service de Pneumologie. Hôpital Tenon, 4 rue de
la Chine, 75970, Paris Cedex 20.

Tel : 01 56 01 68 38 – mail : marie.wislez@tnn.aphp.fr

Remerciements : Nathalie Mathiot pour son aide dans la rédaction de ce manuscrit

Résumé français 230 mots

Les cellules inflammatoires et immunitaires, les fibroblastes et les cellules endothéliales forment le microenvironnement de la tumeur. L'immunité innée favorise l'inflammation et constitue la première ligne de défense non spécifique contre les agents pathogènes ou les cellules « transformées ». Elle se compose principalement des mastocytes, des macrophages, des neutrophiles et des cellules naturelles tueuses (natural killer, NK). L'inflammation chronique est le lit du cancer. De nombreuses maladies inflammatoires chroniques sont associées à un surrisque de cancer. En ce qui concerne le cancer du poumon, l'inflammation chronique observée au cours de la BPCO, de l'emphysème ou de la fibrose pulmonaire idiopathique est associée au développement d'un cancer bronchique.

Dans cet article, nous présentons les effets pro et anti-tumoraux de l'inflammation liée au système immunitaire inné dans le cancer bronchique. La place du système immunitaire spécifique est décrite dans un autre chapitre. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses vont pouvoir utiliser et/ou contourner les signaux issus des cellules inflammatoires afin de favoriser la prolifération tumorale, l'invasion tissulaire et la formation de métastases.

Il n'y a pas d'agents thérapeutiques disponibles qui ciblent spécifiquement l'inflammation.

Mots clés : cancer bronchique non à petites cellules, inflammation, macrophages, mastocytes, polynucléaires neutrophiles

Title Lung cancer and inflammation

Summary 193 mots

Tumor microenvironment is formed by immune and inflammatory response cells, fibroblasts and endothelial cells. Innate immunity induces inflammation and is the first non-specific line of defense against pathogens or "transformed" cells. It consists mainly of mast cells, macrophages, neutrophils and natural killer cells (NK). Chronic inflammation is associated with cancer. Many chronic inflammatory diseases are associated with an increased risk of cancer. With regard to lung cancer, chronic inflammation seen in COPD, emphysema or idiopathic pulmonary fibrosis is associated with the development of lung cancer.

In this article, we will review the pro and anti-tumor effects of inflammation related to the innate immune system in lung cancer. The specific immune system is described in another chapter. During tumor progression, cancer cells will be able to use and/or bypass the signals from the inflammatory cells to promote tumor proliferation, tissue invasion and metastasis. No therapeutic agents that specifically target inflammation are available.

Several strategies are being studied to target innate immunity: 1 / stimulate the induction of cytotoxic M1 macrophages or natural killer cells NK, 2 / limit the induction of pro-tumor M2 macrophages or neutrophils, 3 / block growth factors or secreted cytokines.

Key Words: non-small cell lung cancer, inflammation, macrophages, mastocytes, neutrophils

La recherche en cancérologie s'est initialement portée sur la cellule tumorale. Cependant, les cellules tumorales sont entourées d'un microenvironnement contenant les cellules de la réaction inflammatoire et immunitaire, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les péricytes. Ce microenvironnement favorise la sécrétion de multiples facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines qui peuvent exercer un effet anti ou pro-tumoral sur la cellule cancéreuse. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses vont pouvoir utiliser et/ou contourner les signaux issus des cellules du microenvironnement afin de favoriser la prolifération tumorale, l'invasion tissulaire et la formation de métastases [1]. Dans cet article, nous présentons les effets pro et anti-tumoraux de l'inflammation dans le cancer bronchique. Les définitions essentielles des termes utilisés dans cet article sont rappelées dans le **Tableau I**.

Inflammation physiologique versus au cours du cancer

L'inflammation aigue se présente en plusieurs étapes ; le but est d'éliminer les agents pathogènes et de maintenir l'homéostasie (**Figure 1**). Dans ses phases initiales, l'inflammation est une réaction agressive qui peut détruire à la fois les agents pathogènes exogènes tout comme le tissu hôte. Cette opération est suivie par un état qui favorise la survie des cellules afin d'assurer la régénération tissulaire.

Contrairement à la série d'événements ordonnés observés au cours de l'inflammation aigüe, il existe au cours du cancer, des événements désorganisés conduisant à une inflammation chronique où l'homéostasie tissulaire n'est jamais atteinte. L'inflammatoire chronique, favorise la croissance tumorale via l'activation du stroma environnant et de la néovascularisation. L'inflammation et la croissance tumorale forment un cercle vicieux. Ainsi les lésions hyperplasiques ou dysplasiques vont finalement conduire à une lésion néoplasique invasive.

Inflammation chronique et cancer

Il y a 150 ans Virchow a postulé que l'inflammation était un facteur prédisposant à la carcinogenèse. Cette hypothèse est fondée sur l'observation que 1) les cancers se développaient au cours de maladies inflammatoires chroniques et au niveau des sites inflammatoires chroniques et que 2) les cellules inflammatoires étaient présentes sur les pièces d'exérèse chirurgicale des cancers [2]. De multiples études épidémiologiques ont décrits le risque accru de développer un cancer en cas de maladies inflammatoires chroniques [3]. Ainsi, les maladies inflammatoires du tube digestif, l'infection à *Helicobacter pylori*, les hépatites virales chroniques B et C, prédisposent au cancer du côlon, de l'estomac ou du foie.

Le risque de cancer bronchique est augmenté d'un facteur 10 suite à l'exposition à la fumée de cigarettes. Le tabac provoque une inflammation chronique qui est associée à la bronchite chronique obstructive et au développement d'un cancer bronchique [4]. La bronchite chronique obstructive comme la fibrose pulmonaire idiopathique ou le fibro-emphysème sont associées à une augmentation de risque de développer cancer bronchique [5][6]. Par ailleurs, certains cancers bronchiques se développent sur cicatrices telles que des cicatrices infectieuses comme celles de la tuberculose, sans relation avec les habitudes tabagiques.

Les cellules inflammatoires

Le développement tumoral est associé à une inflammation chronique. Les principaux acteurs cellulaires sont les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes, les cellules naturelles tueuses NK (natural killer), et les lymphocytes T et B (**Figure 2**) [7][8].

La valeur pronostique de ces infiltrations cellulaires a été longtemps controversée. En effet, ces cellules ont des propriétés à la fois pro et anti tumorale dont l'expression est dépendante du microenvironnement dans lequel elles se trouvent. Les données ont été initialement très descriptives à partir de l'étude de tissus tumoraux issus de pièce d'exérèse chirurgicale et de corrélation à la survie des patients. Le développement des modèles murins génétiquement modifiés ont ensuite permis des études plus mécanistiques et tenant compte du microenvironnement

Macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages sont dérivés des monocytes et se différencient en macrophages dans les tissus. Les macrophages sont des phagocytes qui participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique, mais sont capables de participer à l'immunité adaptative, en tant que cellule présentatrice d'antigène. Le macrophage est une cellule arrondie de grande taille présentant un noyau excentré et des vacuoles dans son cytoplasme.

Les macrophages dans les tumeurs sont dénommés macrophages associés aux tumeurs (TAM, tumor associated macrophages). Ils peuvent composer jusqu'à 60 % du stroma de la tumeur [10] (**Tableau II**). Au sein de ces TAM, deux types de population sont distinguées, M1 ou M2, de par des fonctions opposées [11][12] (**Tableau III**). Ainsi les macrophages M1 sont des effecteurs immunologiques puissants ; schématiquement ils défendent l'hôte contre les infections virales, les infections microbiennes, ou les cellules transformées et seraient anti-tumoraux, tandis que les macrophages M2 inhibent la réaction immunitaire, favorisent le remodelage tissulaire et l'angiogenèse et seraient protumoraux.

Les macrophages sont recrutés par une grande variété de facteurs chimiotactiques et activés par des facteurs de croissance qui diffèrent selon le sous-type étudié M1 ou M2. Les macrophages M1 produisent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, et activent le système immunitaire adaptatif [13]. L'exposition à l'interféron ou au lipopolysaccharide (LPS) peut induire la transformation du TAM en macrophages M1. Les macrophages M1 sécrètent de l'interleukine (IL)-12 et de l'IL-23, responsable d'une activation de la réponse des cellules T de type I polarisée, qui aboutit à une activité cytotoxique contre les micro-organismes et les cellules néoplasiques. Les macrophages M1 se caractérisent par une expression élevée d'espèces réactives de l'oxygène et une bonne capacité en tant que cellules présentatrices d'antigène [11][12].

Les macrophages M2 favorisent le remodelage tissulaire en phagocytant les débris cellulaires (par exemple par sécrétion de la matrice métalloprotéinase MMP9), en favorisant l'angiogenèse par la sécrétion de VEGF ou de PDGF et en inhibant la réaction inflammatoire M1 par l'intermédiaire d'IL-10 par exemple [11][12]. L'exposition à l'IL-4 et IL-10 ou à des glucocorticoïdes peut induire la transformation du TAM en macrophages M2. Les macrophages M2 se caractérisent par une expression élevée du récepteur du mannose (CD206), du récepteur scavenger (CD163) et récepteur de type galactose ainsi qu'une mauvaise capacité en tant que cellules présentatrices d'antigène [10] [11][12][13].

Plusieurs études ont étudié la valeur pronostique de l'infiltration des macrophages dans les CBNPC. Les résultats sont d'interprétation difficile liées aux différentes méthodes utilisées pour évaluer l'infiltration des macrophages, en particulier pour identifier les macrophages M1 et M2. Welsh et al. ont été les premiers à reconnaître l'importance de la localisation micro-anatomique des macrophages au sein des tumeurs [14]. Dans une cohorte de 178 CBNPC opérés de stade I à III, l'infiltration macrophagique analysée par immunohistochimie (CD68) était associée à un bon pronostic, si le marquage se situait au sein de la tumeur et de mauvais pronostic, si le marquage se situait en peri-tumoral. Les patients ayant une densité d'îlots de macrophages intratumoraux élevée ont une survie à 5 ans de 52,9% par rapport à 7,7% chez ceux ayant une densité faible ($p < 0,0001$) [14]. Ces résultats ont été confirmés par d'autres études [15].

Dans des études plus récentes, le phénotype M1 ou M2 a été pris en compte pour l'évaluation du pronostic. Plusieurs études ont montré que les macrophages situés dans les îlots intratumoraux sont principalement des macrophages M1 et sont associés à une survie prolongée [12][13]. Ils auraient donc un rôle dans la prévention de la progression tumorale au cours des CBNPC [15][16]. D'autre part, les TAM M2 (CD68+/CD204+), situés au pourtour de la tumeur, sont corrélés à une extension ganglionnaire ainsi qu'à un mauvais pronostic chez 170 patients ayant un CBNPC opéré [18]. L'IL-10 et le MCP1 (monocyte

chemoattractant protein 1, également nommé CCL2 pour chemokine ligand 2) sont impliqués dans la différenciation, l'accumulation et la migration des macrophages M2. Plusieurs études ont montré un rôle de l'IL-10 exprimé par les M2 dans la progression tumorale et le mauvais pronostic des CBNPC [18][19][21]. L'expression macrophagique d'IL-10 est stimulée par la prostaglandine E2 (PGE2), sécrétée par les cellules tumorales et régulée par la cyclo-oxygénase A2 [22].

L'expression de la métalloprotéinase 9 (MMP-9) par les TAM isolés à partir de prélèvements chirurgicaux de CBNPC était plus élevée chez les patients ayant un stade avancé par rapport à ceux ayant un stade précoce. Ceci illustre l'importance du phénotype macrophagique qui est probablement dynamique au cours du temps et de la progression tumorale. De nombreuses études montrent que les TAM, notamment M2 faciliteraient la progression tumorale [23].

Mastocytes

Les mastocytes sont dérivés de précurseurs hématopoïétiques libérés par la moelle osseuse et recrutés par les différents organes dont le poumon, où ils terminent leur différenciation [9]. Les mastocytes présentent un cytoplasme contenant de nombreuses granules. Ces granules contiennent plusieurs médiateurs chimiques, dont l'histamine, les protéoglycanes, les cytokines comme le TNF- α et IL-4, et les protéases dont la tryptase. En plus de ces médiateurs préformés, les mastocytes produisent des médiateurs lipidiques, des cytokines, des chimiokines, des peptides antimicrobiens ainsi que des facteurs angiogéniques tels que le VEGF[24]. Le rôle protumoral des mastocytes a été évoqué à partir de plusieurs études qui ont montré une association significative entre la densité des mastocytes mesurée par l'expression de la tryptase, l'angiogenèse mesurée par la densité de microvaisseaux, et le mauvais pronostic dans le CBNPC [24]–[27]. Les mastocytes étaient préférentiellement localisés à proximité des vaisseaux sanguins ou lymphatiques.

Polynucléaires Neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont les cellules clés du système immunitaire inné. Ils ont été décrits initialement au cours du processus de lutte contre les agents pathogènes. Pour accomplir cette fonction, les neutrophiles sont recrutés sur les sites infectés, détectent les agents pathogènes (endogènes ou exogènes) par des récepteurs de l'immunité innée, tels que les récepteurs Toll-like (TLR) et d'autres récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRR, pattern recognition receptor). Certaines maladies pulmonaires

chroniques sont caractérisées par une accumulation de neutrophiles, telles que la fibrose pulmonaire idiopathique au niveau des alvéoles ou la bronchite chronique obstructive au niveau des bronchioles [28].

L'infiltration des polynucléaires neutrophiles a été décrite au cours des CBNPC, en particulier dans le sous-type des adénocarcinomes lépidiques, anciennement appelé bronchioloalvéolaire [28][29]. L'activation de l'oncogène Ras pourrait favoriser le recrutement tumoral des polynucléaires neutrophiles via l'activation de la transcription d'une chimiokine, CXCL8 (ou IL-8). CXCL8 est aussi proangiogénique. Le rôle protumoral de CXCL8, via les neutrophiles et/ou l'angiogenèse a été démontré à partir de modèles murins ou de lignées génétiquement modifiées. [31]. Dans ces modèles, l'inhibition de CXCL8 n'affectait pas la prolifération des cellules tumorales, mais favorisait la mort cellulaire tumorale via la diminution de l'infiltration à polynucléaires neutrophiles et l'altération des microvaisseaux [31][32][33].

Chez l'homme, le recrutement intra tumoral des polynucléaires neutrophiles dans les adénocarcinomes lépidiques est associée à un mauvais pronostic [29][34]. La sécrétion de chimiokines (CXCL8) et de facteurs anti apoptotiques des neutrophiles (GM-CSF et G-CSF) par les cellules tumorales favoriseraient le recrutement et le maintien des polynucléaires neutrophiles au sein de la tumeur [35]. Les mécanismes protumoraux des polynucléaires neutrophiles sont multiples. Ils libèrent des radicaux libres qui sont mutagènes ; ils libèrent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'HGF (hepatocyte growth factor) qui est le ligand du récepteur membranaire Met. Met exprimé par la cellule tumorale favorise la prolifération et migration tumorale lorsqu'il est activé [36]. Met est aussi exprimé sur les cellules endothéliales et est proangiogénique. Des mécanismes plus inhabituels ont été décrits comme des interactions directes entre les cellules tumorales et les neutrophiles via des molécules membranaires telles que les couples ICAM-LFA1 et TNF récepteur-TNF [37]. Ces interactions favoriseraient la desquamation tumorale et la progression aérologène au cours des adénocarcinomes lépidiques [36][37].

Les cellules NK

Les cellules naturelles tueuses NK sont des lymphocytes très particuliers : non T (CD3-) non B (CD19-), exprimant le CD56 et le CD16 ; ils ont un effet cytotoxique puissant par sécrétion de cytokines et relargage de granules cytotoxiques, granzymes et perforines essentiellement.

Ils sont présents dans le stroma des tumeurs des cancers bronchiques ainsi que dans le sang périphérique [38]. Le potentiel cytotoxique du NK isolé à partir du tissu cancéreux est inférieur à celui du sang périphérique ou du tissu pulmonaire sain [39]. La présence de cellules NK, mesurée par immunohistochimie (CD56+, CD16-)

sur les pièces opératoires serait associée à un pronostic favorable dans le cancer bronchique quel que soit le stade [38][40][41].

Cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes

Les cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes (myeloid derived suppressor cells, MDSC) sont une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures constituées de progéniteurs myéloïdes, précurseurs de macrophages, de polynucléaires neutrophiles et de cellules dendritiques [42].

Chez les patients cancéreux, les MDSC sont identifiés par l'expression du marqueur myéloïde CD33 et l'absence d'expression de marqueur myéloïde mature ou de marqueur lymphoïde. Le phénotype CD11b+CD14-CD15+CD33+ a été identifié chez les patients atteints de CBNPC [43][44]. L'apparition des MDSC dans le microenvironnement tumoral est secondaire à l'exposition à des facteurs de croissance ou de cytokines comme le GM-CSF sécrété par les cellules inflammatoires qui favorise la survie et l'expansion de MDSC [45].

Les MDSC inhibent les lymphocytes T cytotoxiques via la sécrétion de métabolites de la L-arginine, arginase 1 et iNOS ou de réactifs oxygénés ROS [46]. Ils ont un effet protumoral via la sécrétion de VEGF, de FGF (facteur de croissance de fibroblaste) de métalloprotéinases (MMP) et du TGFb [47][46]. Les MDSC seraient associées à une résistance à la chimiothérapie et à un pronostic défavorable [48][49].

Polynucléaires éosinophiles

L'hyperéosinophilie est fréquemment observée dans le cancer et les éosinophiles sont attirés dans les tumeurs. Mais, peu de données sont disponibles pour savoir si les éosinophiles jouent une part active dans le rejet de la tumeur. Carretero et al. ont montré dans un modèle murin de mélanome que les éosinophiles sécrétaient des chimiokines qui vont recruter dans la tumeur des lymphocytes T CD8 spécifiques permettant une éradication de la tumeur et une augmentation de la survie des animaux [50].

Thérapeutiques

Les progrès effectués dans la compréhension de l'oncogenèse des cancers bronchiques ont permis de développer des thérapeutiques ciblant

- les voies de signalisation anormalement activées dans les cellules tumorales telles qu'EGFR ou ALK.

Ces thérapeutiques sont conditionnées par la présence de l'anomalie moléculaire cible.

- la néo-vascularisation de la tumeur. La neutralisation du VEGF par l'anticorps monoclonal humanisé Bevacizumab (Avastin®) favorise la régression des vaisseaux tumoraux, normalise les vaisseaux tumoraux restants, et inhibe la croissance tumorale. Le bevacizumab est indiqué dans le cancer bronchique non épidermoïde en première ligne en association à une chimiothérapie à base de platine. D'autres thérapies ciblées anti angiogeniques sont en cours de développement.
- l'immunité adaptative. Les espoirs récents reposent surtout sur les traitements ciblant l'immunité adaptative. Il s'agit d'une ligne de défense spécifique contre les cellules transformées, aboutissant à la production d'anticorps par les lymphocytes B et T après interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes. Cette interaction entre les lymphocytes B et T est une cible thérapeutique intéressante. Les premiers résultats prometteurs des inhibiteurs de PD-1, PD-L1 ou CTLA4 vont révolutionner la prise en charge des patients ayant un cancer bronchique [7]. Le développement des vaccins a du mal à aboutir avec plusieurs échecs, mais leur développement est loin d'être abandonné.
- l'immunité innée. Il n'y a pas d'agents thérapeutiques disponibles qui ciblent spécifiquement l'inflammation. Plusieurs stratégies sont actuellement étudiées pour cibler l'immunité innée à de différents niveaux :
 - stimuler l'induction de macrophages M1, de cellules NK
 - limiter l'induction de macrophages M2, de polynucléaires neutrophiles ou de MDSC
 - bloquer les facteurs de croissance ou des cytokines sécrétées

Le concept selon lequel la stimulation de l'immunité innée peut promouvoir des réponses de protection au cancer n'est pas nouveau. En 1972, Ruckdeschel et al. ont rapporté une réduction de la récurrence de cancers bronchiques après stimulation immunitaire, par empyème postopératoire sur une série de 18 cas [51]. De même, la stimulation immunitaire non spécifique par le BCG pourrait être associée à une diminution du risque de récurrence dans les cancers bronchiques opérés [52]. Actuellement la BCG thérapie est indiquée en traitement adjuvant des cancers de la vessie traité par résection transurétrale avec un risque élevé de récurrence. Plus récemment ont été étudiées le rôle des cytokines immunostimulantes non spécifiques telles que l'interleukine-2 ou l'interféron gamma. Ces cytokines ont montré une certaine efficacité dans la prise en charge du mélanome ou le cancer du rein. Les études cliniques dans le cancer bronchique sont négatives [8]. Par ailleurs, la prise régulière d'aspirine, un anti-inflammatoire non stéroïdien, réduit le risque de cancer colorectal de moitié chez des

personnes exprimant fortement la 15-PGDH, une enzyme impliquée dans la dégradation des prostaglandines et l'inflammation [53].

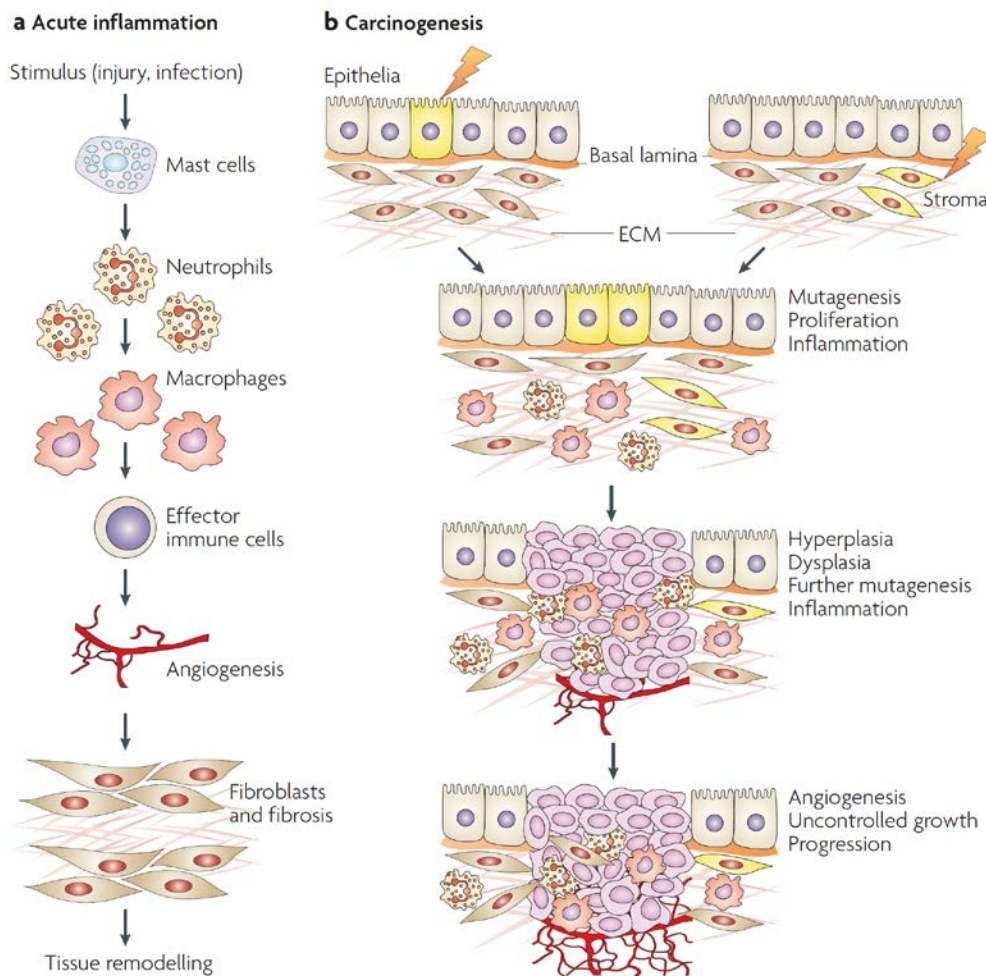
Aujourd'hui, plusieurs médicaments ciblent des médiateurs de l'inflammation. Néanmoins ceux-ci peuvent être produits par ou agir sur la cellule tumorale elle-même.

- Le denosumab (XGEVA®) est un anticorps humanisé inhibant le ligand RankL [54]. Ce ligand est sécrété par les ostéoclastes et favorise la résorption osseuse. Il a une AMM dans la prévention des complications osseuses chez des patients adultes atteints de tumeurs solides présentant des métastases osseuses [55]. RankL est également sécrété par les cellules dendritiques, épithéliales et tumorales et pourrait jouer un rôle direct dans la progression tumorale notamment au cours des CBNPC [56]. En effet à partir d'une étude de phase III comparant le denosumab à un biphosphonate au cours de tumeurs solides et de myélomes, l'analyse post hoc montrait un bénéfice de survie pour les patients atteints de CBNPC [54][55]. Des études de phase II randomisée et de phase III dont l'objectif principal est la survie, sont en cours dans le cancer bronchique métastatique en première ligne sous chimiothérapie avec ou sans denosumab (NCT01951586, NCT02129699).
- Les antagonistes de l'interleukine-6 ou du récepteur de l'interleukine-6 sont en cours d'essais de phase précoce. La métformine est un anti-diabétique oral de la famille des biguanides et est indiquée dans le traitement du diabète de type 2. La métformine pourrait réduire le taux de l'interleukine-6 [57]. Un effet des biguanides sur la production mitochondriale d'ATP (adénosine-5'-triphosphate), par activation de la kinase LKB1 et la voie de signalisation AMPK (activated protein kinase) serait un rationnel pour leur utilisation au cours du cancer [58].
- L'inhibiteur sélectif de métalloprotéinase 9 (MMP 9) prinomastat, n'a pas montré d'efficacité en association à une chimiothérapie dans le traitement des cancers bronchiques métastatiques en première ligne dans une phase III et une phase II arrêté prématurément [59][60].
- Dans des modèles *in vitro*, l'inhibiteur de Cox2, celecoxib, stimule la sécrétion d'IFN et favorise la transformation des macrophages M2 en macrophages M. Dans la polypose adénomateuse familiale, le celecoxib diminue le nombre d'adénomes coliques. La sécrétion de prostaglandines E2 est stimulé par le celecoxib et favorise la sécrétion d'IL-10 par un macrophage de phénotype M1 [61]. Cependant deux essais de phase III n'ont pas montré d'efficacité du celecoxib dans le cancer bronchique métastatique en première ligne associé à la chimiothérapie [62][63].

Conclusion

Dans le cancer bronchique, les cellules de la réaction inflammatoire, macrophages, neutrophiles, mastocytes ou cellules NK constituent le microenvironnement de la tumeur et jouent un rôle clé dans la progression tumorale. La caractérisation de ces cellules inflammatoires et leurs interactions avec les cellules tumorales restent un défi. Même si de nombreuses études démontrent le mauvais pronostic de cette infiltration inflammatoire, il est probable que leur rôle soit complexe et variable d'un patient à un autre. Des études personnalisées, selon la présence de certaines mutations par exemple sont nécessaires. Une des prochaines avancées thérapeutiques pourrait être leur ciblage thérapeutique.

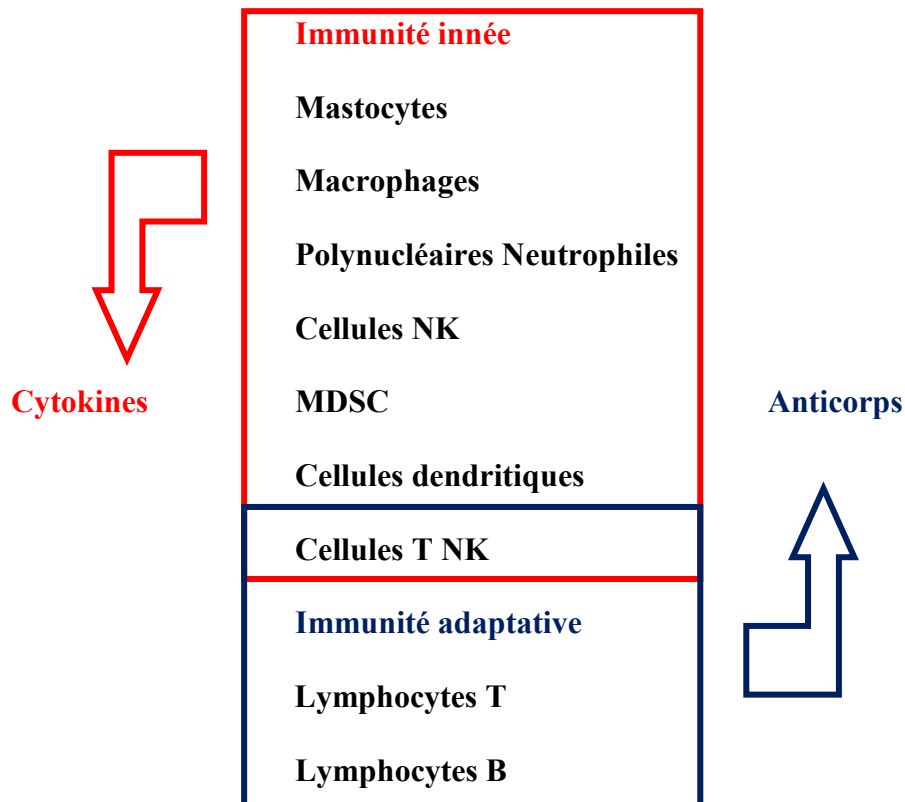
Figure 1: L'inflammation aigüe d'après Albini et al. [64]



- A. L'inflammation aigüe se présente en plusieurs étapes, dans un ordre défini afin d'éliminer les agents pathogènes ou liés à une agression et maintenir l'homéostasie. Tout d'abord les cellules résidentes, présentes dans le tissu lésé sont activées: mastocytes, macrophages résidents et cellules dendritiques, puis sont recrutés les neutrophiles. Puis, les cellules immunitaires effectrices (lymphocytes) permettent le développement d'une réponse immunitaire spécifique (immunité adaptative). Le recrutement et l'activation des cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales permet la formation de néovaisseaux sanguins et d'une matrice collagène. Au final, cette réaction aboutit à la réparation et au remodelage tissulaire. Dans ses phases initiales, l'inflammation est une réaction agressive qui peut détruire à la fois les agents pathogènes exogènes tout comme le tissu hôte. Cette opération est suivie par un état qui favorise la survie des cellules et la régénération tissulaire.
- B. Contrairement à la série d'événements ordonnés de l'inflammation aigüe, il existe au cours de **l'inflammation chronique** du cancer, des événements désorganisés et l'homéostasie tissulaire n'est jamais atteinte. Pendant la carcinogenèse, l'épithélium et le stroma subissent des altérations qui favorisent prolifération cellulaire et l'apparition de mutations. Ces altérations tissulaires conduisent à une réponse inflammatoire chronique, favorisant la croissance tumorale par l'activation du stroma environnant et la néovascularisation. L'inflammation et la croissance tumorale forment un cercle vicieux se pérennisant l'un et l'autre. Ainsi les lésions hyperplasiques ou dysplasiques vont finalement conduire à une lésion néoplasique invasive et à la progression tumorale.

Figure 2 : Les différents intervenants de l'immunité innée et de l'immunité adaptative

Adapté d'après [65]



La réaction immunitaire se compose des **réponses immunitaires innées et adaptatives**. Le système immunitaire inné se compose des phagocytes (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, mastocytes, MDSC (cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes) et cellules naturelles tueuses (cellules NK). Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre une agression tissulaire telle que des agents pathogènes ou des cellules transformées. La réponse immunitaire innée conduit à l'activation du système immunitaire adaptatif (cellules B et T), par interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes. La réponse adaptative est plus lente et aboutit à la production d'anticorps. Cette interaction entre cellules B et T est une cible thérapeutique intéressante avec des résultats prometteurs.

Tableau I : Définitions

Inflammation aigue : réaction de défense immunitaire stéréotypée suite à une agression. Elle comporte différentes étapes : 1/ vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire par libération de molécules préformées par les mastocytes et macrophages résidents, 2/ phase cellulaire avec recrutement de polynucléaires neutrophiles et macrophages, 3/ activation des cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales pour former des néovaisseaux sanguins et une matrice de collagène, 4/ régénération tissulaire.

Inflammation chronique : réaction de défense immunitaire désorganisée où l'homéostasie tissulaire n'est pas atteinte, favorisant la prolifération cellulaire, l'activation du stroma et la néovascularisation. Facteur reconnu dans le développement de certains cancers.

Immunité innée : première ligne de défense, non spécifique, contre les agents pathogènes et les cellules « transformées », **responsables de l'inflammation** ; elle se compose principalement des mastocytes, des macrophages, des neutrophiles et des cellules tueuses (cellules natural killers = cellules NK).

Immunité adaptative : deuxième ligne de défense, spécifique, contre les agents pathogènes et les cellules « transformées », aboutissant à la réaction humorale (production d'anticorps par les lymphocytes B) et cellulaire cytotoxique (maturation et activation de lymphocytes T CD8 cytotoxiques) après interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes. Cette interaction entre les lymphocytes B et T est une cible thérapeutique intéressante avec des résultats prometteurs avec les inhibiteurs de PD-1, PD-L1, CTLA4 dans le cancer bronchique.

Tableau II : Différents types cellulaires et leurs particularités au sein du microenvironnement tumoral

Type cellulaire	Fonctions	réf
TAM	M1 : cytotoxique situé en intra-tumoral bon pronostic M2 : favorise remodelage tissulaire et l'angiogenèse, inhibe la réaction inflammatoire M1 situé dans le stroma péri-tumoral mauvais pronostic	[10-23]
Mastocytes	angiogenèse situé en péri-vasculaire mauvais pronostic	[23-27]
PNN	Sécrétions de cytokines (HGF), favorise l'angiogenèse situé dans le stroma péri-tumoral mauvais pronostic	[28-37]
NK	Effet cytotoxique Situé dans le stroma Bon pronostic	[38-41]
MDSC	Inhibition du lymphocyte T cytotoxique Situé dans le sang et la tumeur Mauvais pronostic	[42-49]
PE	Recrutement du lymphocyte T cytotoxique Anti-tumoral Pas de données dans le cancer bronchique	[50]

TAM= macrophage associé aux tumeurs (tumor associated macrophages), PNN= polynucléaires neutrophiles, NK= cellules tueuses naturelles (natural killer), MDSC= cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes (myeloid derived suppressor cells), PE= polynucléaires éosinophiles

Tableau III. Caractéristiques des macrophages et leurs sous-types M1 et M2 d'après Hao et al 2012 [12]

		M2 Macrophages			
Phénotype Contexte	M1	M2a parasite	M2b bactérie	M2c inflammation	M2d tumoral
Activation par	IFN-gamma TNF-alpha LPS	IL4/IL13	Complexes immuns LPS LTR/IL-1R	IL-10 TGF-beta Récepteurs glucocorticoïdes	IL-6 LIF MCF
Expression des récepteurs	CD86 CD80 MHC II↑ IL-1R I TLR2 TLR4 iNOS	CD163 MHC II SR CD206↑ TGM2↑ MR (206) IL-1R II	CD86 MHC II	CD163 TLR1 TLR8	VEGF
Sécrétion de cytokines	TNF-alpha IL-1beta IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF-beta IL-1ra	IL-1 IL-6 IL-10 TNF-alpha	IL-10 TGF-beta	IL-10 IL-12 TNF-alpha TGF-beta
Sécrétions de Chimiokines	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCL17 CCL22 CCL24	CCL1	CCR2	CCL2 CCL5 CXCL10 CXCL16

MR (CD206), récepteur mannose; iNOS, oxyde nitrique synthase; SR, récepteur scavenger; VEGF, facteur de croissance vasculaire (vascular endothelial growth factor)

Références

- [1] K. E. de Visser, A. Eichten, et L. M. Coussens, « Paradoxical roles of the immune system during cancer development », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, n° 1, p. 24-37, janv. 2006.
- [2] F. Balkwill et A. Mantovani, « Inflammation and cancer: back to Virchow? », *Lancet*, vol. 357, n° 9255, p. 539-545, févr. 2001.
- [3] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, et F. Balkwill, « Cancer-related inflammation », *Nature*, vol. 454, n° 7203, p. 436-444, juill. 2008.
- [4] M. S. Shiels, H. A. Katki, N. D. Freedman, M. P. Purdue, N. Wentzensen, B. Trabert, C. M. Kitahara, M. Furr, Y. Li, T. J. Kemp, J. J. Goedert, C. M. Chang, E. A. Engels, N. E. Caporaso, L. A. Pinto, A. Hildesheim, et A. K. Chaturvedi, « Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 106, n° 11, nov. 2014.
- [5] S. Tomassetti, C. Gurioli, J. H. Ryu, P. A. Decker, C. Ravaglia, P. Tantalocco, M. Buccioli, S. Piciocchi, N. Sverzellati, A. Dubini, G. Gavelli, M. Chilosi, et V. Poletti, « The impact of lung cancer on survival of idiopathic pulmonary fibrosis », *Chest*, vol. 147, n° 1, p. 157-164, janv. 2015.
- [6] N. Girard, S. Marchand-Adam, J.-M. Naccache, R. Borie, T. Urban, S. Jouneau, E. Marchand, A.-C. Ravel, L. Kiakouama, B. Etienne-Mastroianni, J. Cadranet, V. Cottin, J.-F. Cordier, et Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies « Orphelines » Pulmonaires (GERM« O »P), « Lung cancer in combined pulmonary fibrosis and emphysema: a series of 47 Western patients », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 9, n° 8, p. 1162-1170, août 2014.
- [7] R. Remark, C. Becker, J. E. Gomez, D. Damotte, M.-C. Dieu-Nosjean, C. Sautès-Fridman, W.-H. Fridman, C. A. Powell, N. K. Altorki, M. Merad, et S. Gnjatic, « The Non-Small Cell Lung Cancer Immune Contexture. A Major Determinant of Tumor Characteristics and Patient Outcome », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 191, n° 4, p. 377-390, nov. 2014.
- [8] R. M. Bremnes, K. Al-Shibli, T. Donnem, R. Sirera, S. Al-Saad, S. Andersen, H. Stenvold, C. Camps, et L.-T. Busund, « The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 6, n° 4, p. 824-833, avr. 2011.
- [9] M. Campillo-Navarro, A. D. Chávez-Blanco, I. Wong-Baeza, J. Serafín-López, R. Flores-Mejía, S. Estrada-Parra, I. Estrada-García, et R. Chacón-Salinas, « Mast Cells in Lung Homeostasis: Beyond Type I Hypersensitivity », *Curr. Respir. Med. Rev.*, vol. 10, n° 2, p. 115-123, juin 2014.
- [10] L. A. Lievense, K. Bezemer, J. G. J. V. Aerts, et J. P. J. J. Hegmans, « Tumor-associated macrophages in thoracic malignancies », *Lung Cancer Amst. Neth.*, vol. 80, n° 3, p. 256-262, juin 2013.
- [11] P. Allavena, A. Sica, G. Solinas, C. Porta, et A. Mantovani, « The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 66, n° 1, p. 1-9, avr. 2008.
- [12] N.-B. Hao, M.-H. Lü, Y.-H. Fan, Y.-L. Cao, Z.-R. Zhang, et S.-M. Yang, « Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors », *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, p. 948098, 2012.
- [13] F. O. Martinez, L. Helming, et S. Gordon, « Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective », *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, p. 451-483, 2009.
- [14] T. J. Welsh, R. H. Green, D. Richardson, D. A. Waller, K. J. O'Byrne, et P. Bradding, « Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 23, n° 35, p. 8959-8967, déc. 2005.
- [15] F. Dai, L. Liu, G. Che, N. Yu, Q. Pu, S. Zhang, J. Ma, L. Ma, et Z. You, « The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer », *BMC Cancer*, vol. 10, p. 220, 2010.
- [16] C. M. Ohri, A. Shikotra, R. H. Green, D. A. Waller, et P. Bradding, « Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival », *Eur. Respir. J.*, vol. 33, n° 1, p. 118-126, janv. 2009.
- [17] J. Ma, L. Liu, G. Che, N. Yu, F. Dai, et Z. You, « The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time », *BMC Cancer*, vol. 10, p. 112, 2010.
- [18] Y. Ohtaki, G. Ishii, K. Nagai, S. Ashimine, T. Kuwata, T. Hishida, M. Nishimura, J. Yoshida, I. Takeyoshi, et A. Ochiai, « Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 5, n° 10, p. 1507-1515, oct. 2010.
- [19] R. Wang, M. Lu, J. Zhang, S. Chen, X. Luo, Y. Qin, et H. Chen, « Increased IL-10 mRNA expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer », *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 30, p. 62, 2011.
- [20] E. Zeni, L. Mazzetti, D. Miotto, N. Lo Cascio, P. Maestrelli, P. Querzoli, M. Pedriali, E. De Rosa, L. M. Fabbri, C. E. Mapp, et P. Boschetto, « Macrophage expression of interleukin-10 is a prognostic factor in nonsmall cell lung cancer », *Eur. Respir. J.*, vol. 30, n° 4, p. 627-632, oct. 2007.
- [21] H. Hatanaka, Y. Abe, T. Kamiya, F. Morino, J. Nagata, T. Tokunaga, Y. Oshika, H. Suemizu, H. Kijima, T. Tsuchida, H. Yamazaki, H. Inoue, M. Nakamura, et Y. Ueyama, « Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, vol. 11, n° 7, p. 815-819, juill. 2000.

- [22] M. Huang, M. Stolina, S. Sharma, J. T. Mao, L. Zhu, P. W. Miller, J. Wollman, H. Herschman, et S. M. Dubinett, « Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production », *Cancer Res.*, vol. 58, n° 6, p. 1208-1216, mars 1998.
- [23] R. Wang, J. Zhang, S. Chen, M. Lu, X. Luo, S. Yao, S. Liu, Y. Qin, et H. Chen, « Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression », *Lung Cancer Amst. Neth.*, vol. 74, n° 2, p. 188-196, nov. 2011.
- [24] A. Imada, N. Shijubo, H. Kojima, et S. Abe, « Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma », *Eur. Respir. J.*, vol. 15, n° 6, p. 1087-1093, juin 2000.
- [25] I. Takanami, K. Takeuchi, et M. Naruke, « Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma », *Cancer*, vol. 88, n° 12, p. 2686-2692, juin 2000.
- [26] T. Ibaraki, M. Muramatsu, S. Takai, D. Jin, H. Maruyama, T. Orino, T. Katsumata, et M. Miyazaki, « The relationship of tryptase- and chymase-positive mast cells to angiogenesis in stage I non-small cell lung cancer », *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.*, vol. 28, n° 4, p. 617-621, oct. 2005.
- [27] M. Tomita, Y. Matsuzaki, et T. Onitsuka, « Correlation between mast cells and survival rates in patients with pulmonary adenocarcinoma », *Lung Cancer Amst. Neth.*, vol. 26, n° 2, p. 103-108, nov. 1999.
- [28] B. Koller, R. Bals, D. Roos, H. C. Korting, M. Griesse, et D. Hartl, « Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 39, n° 7, p. 535-547, juill. 2009.
- [29] A. Bellocq, M. Antoine, A. Flahault, C. Philippe, B. Crestani, J. F. Bernaudin, C. Mayaud, B. Milleron, L. Baud, et J. Cadranet, « Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome », *Am. J. Pathol.*, vol. 152, n° 1, p. 83-92, janv. 1998.
- [30] M. Wislez, M.-A. Massiani, B. Milleron, A. Soudi, M.-F. Carette, M. Antoine, et J. Cadranet, « Clinical characteristics of pneumonic-type adenocarcinoma of the lung », *Chest*, vol. 123, n° 6, p. 1868-1877, juin 2003.
- [31] C. Murphy, M. McGurk, J. Pettigrew, A. Santinelli, R. Mazzucchelli, P. G. Johnston, R. Montironi, et D. J. J. Waugh, « Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 11, n° 11, p. 4117-4127, juin 2005.
- [32] M. Wislez, N. Fujimoto, J. G. Izzo, A. E. Hanna, D. D. Cody, R. R. Langley, H. Tang, M. D. Burdick, M. Sato, J. D. Minna, L. Mao, I. Wistuba, R. M. Strieter, et J. M. Kurie, « High expression of ligands for chemokine receptor CXCR2 in alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic kras », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 8, p. 4198-4207, avr. 2006.
- [33] L. Johnson, K. Mercer, D. Greenbaum, R. T. Bronson, D. Crowley, D. A. Tuveson, et T. Jacks, « Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice », *Nature*, vol. 410, n° 6832, p. 1111-1116, avr. 2001.
- [34] M. Duruisseaux, M. Antoine, N. Rabbe, V. Poulot, J. Fleury-Feith, T. Vieira, A. Lavolé, J. Cadranet, et M. Wislez, « The impact of intracytoplasmic mucin in lung adenocarcinoma with pneumonic radiological presentation », *Lung Cancer Amst. Neth.*, vol. 83, n° 3, p. 334-340, mars 2014.
- [35] M. Wislez, J. Fleury-Feith, N. Rabbe, J. Moreau, D. Cesari, B. Milleron, C. Mayaud, M. Antoine, P. Soler, et J. Cadranet, « Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor prolong the survival of neutrophils infiltrating bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma », *Am. J. Pathol.*, vol. 159, n° 4, p. 1423-1433, oct. 2001.
- [36] M. Wislez, N. Rabbe, J. Marchal, B. Milleron, B. Crestani, C. Mayaud, M. Antoine, P. Soler, et J. Cadranet, « Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 6, p. 1405-1412, mars 2003.
- [37] M. Wislez, M. Antoine, N. Rabbe, V. Gounant, V. Poulot, A. Lavolé, J. Fleury-Feith, et J. Cadranet, « Neutrophils promote aerogenous spread of lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 13, n° 12, p. 3518-3527, juin 2007.
- [38] K. Al-Shibli, S. Al-Saad, T. Donnem, M. Persson, R. M. Bremnes, et L.-T. Busund, « The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma », *Histopathology*, vol. 55, n° 3, p. 301-312, sept. 2009.
- [39] P. Carrega, B. Morandi, R. Costa, G. Frumento, G. Forte, G. Altavilla, G. B. Ratto, M. C. Mingari, L. Moretta, et G. Ferlazzo, « Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells », *Cancer*, vol. 112, n° 4, p. 863-875, févr. 2008.
- [40] F. R. Villegas, S. Coca, V. G. Villarrubia, R. Jiménez, M. J. Chillón, J. Jareño, M. Zuñil, et L. Callol, « Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer », *Lung Cancer Amst. Neth.*, vol. 35, n° 1, p. 23-28, janv. 2002.
- [41] I. Takanami, K. Takeuchi, et M. Naruke, « Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma », *Cancer*, vol. 88, n° 12, p. 2686-2692, juin 2000.
- [42] M. K. Srivastava, Å. Andersson, L. Zhu, M. Harris-White, J. M. Lee, S. Dubinett, et S. Sharma, « Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer », *Immunotherapy*, vol. 4, n° 3, p. 291-304, mars 2012.
- [43] M. K. Srivastava, J. J. Bosch, J. A. Thompson, B. R. Ksander, M. J. Edelman, et S. Ostrand-Rosenberg, « Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells », *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 57, n° 10, p. 1493-1504, oct. 2008.

- [44] B. Almand, J. I. Clark, E. Nikitina, J. van Beynen, N. R. English, S. C. Knight, D. P. Carbone, et D. I. Gabrilovich, « Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 166, n° 1, p. 678-689, janv. 2001.
- [45] P. Serafini, R. Carbley, K. A. Noonan, G. Tan, V. Bronte, et I. Borrello, « High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 17, p. 6337-6343, sept. 2004.
- [46] D. I. Gabrilovich et S. Nagaraj, « Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, n° 3, p. 162-174, mars 2009.
- [47] S. Ostrand-Rosenberg et P. Sinha, « Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 182, n° 8, p. 4499-4506, avr. 2009.
- [48] P.-H. Feng, K.-Y. Lee, Y.-L. Chang, Y.-F. Chan, L.-W. Kuo, T.-Y. Lin, F.-T. Chung, C.-S. Kuo, C.-T. Yu, S.-M. Lin, C.-H. Wang, C.-L. Chou, C.-D. Huang, et H.-P. Kuo, « CD14(+)S100A9(+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 186, n° 10, p. 1025-1036, nov. 2012.
- [49] C.-Y. Liu, Y.-M. Wang, C.-L. Wang, P.-H. Feng, H.-W. Ko, Y.-H. Liu, Y.-C. Wu, Y. Chu, F.-T. Chung, C.-H. Kuo, K.-Y. Lee, S.-M. Lin, H.-C. Lin, C.-H. Wang, C.-T. Yu, et H.-P. Kuo, « Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14⁻/CD15+/CD33⁺ myeloid-derived suppressor cells and CD8⁺ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer », *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 136, n° 1, p. 35-45, janv. 2010.
- [50] R. Carretero, I. M. Sektioglu, N. Garbi, O. C. Salgado, P. Beckhove, et G. J. Hammerling, « Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells », *Nat. Immunol.*, vol. 16, n° 6, p. 609-617, juin 2015.
- [51] J. C. Ruckdeschel, S. D. Codish, A. Stranahan, et M. F. McKneally, « Postoperative empyema improves survival in lung cancer. Documentation and analysis of a natural experiment », *N. Engl. J. Med.*, vol. 287, n° 20, p. 1013-1017, nov. 1972.
- [52] M. F. McKneally, C. Maver, et H. W. Kausel, « Regional immunotherapy of lung cancer with intrapleural B.C.G », *Lancet*, vol. 1, n° 7956, p. 377-379, févr. 1976.
- [53] S. P. Fink, M. Yamauchi, R. Nishihara, S. Jung, A. Kuchiba, K. Wu, E. Cho, E. Giovannucci, C. S. Fuchs, S. Ogino, S. D. Markowitz, et A. T. Chan, « Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD) », *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, n° 233, p. 233re2, avr. 2014.
- [54] D. L. Lacey, W. J. Boyle, W. S. Simonet, P. J. Kostenuik, W. C. Dougall, J. K. Sullivan, J. S. Martin, et R. Dansey, « Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab », *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 11, n° 5, p. 401-419, mai 2012.
- [55] D. H. Henry, L. Costa, F. Goldwasser, V. Hirsh, V. Hungria, J. Prausova, G. V. Scagliotti, H. Sleeboom, A. Spencer, S. Vadhan-Raj, R. von Moos, W. Willenbacher, P. J. Woll, J. Wang, Q. Jiang, S. Jun, R. Dansey, et H. Yeh, « Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, n° 9, p. 1125-1132, mars 2011.
- [56] A. Leibbrandt et J. M. Penninger, « RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1143, p. 123-150, nov. 2008.
- [57] N.-L. Huang, S.-H. Chiang, C.-H. Hsueh, Y.-J. Liang, Y.-J. Chen, et L.-P. Lai, « Metformin inhibits TNF- α -induced IkappaB kinase phosphorylation, IkappaB- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation », *Int. J. Cardiol.*, vol. 134, n° 2, p. 169-175, mai 2009.
- [58] M. Pollak, « Metformin and other biguanides in oncology: advancing the research agenda », *Cancer Prev. Res. Phila. Pa.*, vol. 3, n° 9, p. 1060-1065, sept. 2010.
- [59] N. B. Leighl, L. Paz-Ares, J.-Y. Douillard, C. Peschel, A. Arnold, A. Depierre, A. Santoro, D. C. Betticher, U. Gatzemeier, J. Jassem, J. Crawford, D. Tu, A. Bezjak, J. S. Humphrey, M. Voi, S. Galbraith, K. Hann, L. Seymour, et F. A. Shepherd, « Randomized phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor BMS-275291 in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group Study BR.18 », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 23, n° 12, p. 2831-2839, avr. 2005.
- [60] D. Bissett, K. J. O'Byrne, J. von Pawel, U. Gatzemeier, A. Price, M. Nicolson, R. Mercier, E. Mazabel, C. Penning, M. H. Zhang, M. A. Collier, et F. A. Shepherd, « Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 23, n° 4, p. 842-849, févr. 2005.
- [61] Y. Nakanishi, M. Nakatsuji, H. Seno, S. Ishizu, R. Akitake-Kawano, K. Kanda, T. Ueo, H. Komekado, M. Kawada, M. Minami, et T. Chiba, « COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps », *Carcinogenesis*, vol. 32, n° 9, p. 1333-1339, sept. 2011.
- [62] A. Koch, B. Bergman, E. Holmberg, C. Sederholm, L. Ek, J. Kosieradzki, K. Lamberg, L. Thaning, S.-O. Ydreborg, S. Sörenson, et Swedish Lung Cancer Study Group, « Effect of celecoxib on survival in patients with advanced non-small cell lung cancer: a double blind randomised clinical phase III trial (CYCLUS study) by the Swedish Lung Cancer Study Group », *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 47, n° 10, p. 1546-1555, juill. 2011.
- [63] H. J. M. Groen, H. Sietsma, A. Vincent, M. M. H. Hochstenbag, J. W. G. van Putten, A. van den Berg, O. Dalesio, B. Biesma, H. J. M. Smit, A. Termeer, T. J. N. Hiltermann, B. E. E. M. van den Borne, et F. M. N. H. Schramel, « Randomized, placebo-controlled phase III study of docetaxel plus carboplatin with celecoxib and

cyclooxygenase-2 expression as a biomarker for patients with advanced non-small-cell lung cancer: the NVALT-4 study », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, n° 32, p. 4320-4326, nov. 2011.

[64] A. Albini et M. B. Sporn, « The tumour microenvironment as a target for chemoprevention », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, n° 2, p. 139-147, févr. 2007.

[65] K. E. de Visser et L. M. Coussens, « The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development », *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 54, n° 11, p. 1143-1152, nov. 2005.

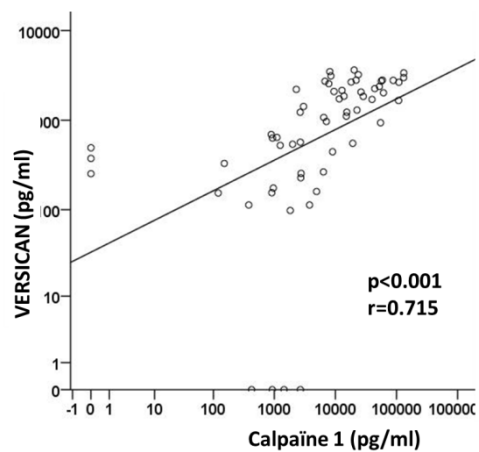
Annexe 6 : Résultats complémentaires

La concentration de TLR2s était plus faible dans les tumeurs mutées *KRAS*

Une concentration basse de TLR2s était significativement associée à la présence de mutation de *KRAS*. Tous les échantillons (n=5) provenant de patients ayant des ADL mutées *KRAS* avaient un TLR2s bas (5/34, 23% vs 0% ; $p=0,041$). La concentration de TLR2s était plus faible dans les ADL mutés *KRAS* *versus* non mutés, même si cette différence n'était pas statistiquement significative compte tenu du faible nombre d'échantillons avec mutations *KRAS* (concentration de 2651 pg/ml (Q25-75 : 530-7079) vs 6737 pg/ml (Q25-75 : 1958-36266 ; $p=NS$).

Annexe 7 : corrélation entre calpaïne 1 extracellulaire et versican

Dans la cohorte de ADL, la concentration de versican était fortement corrélée à celle de la calpaïne 1 extracellulaire ($r=0,715$, $p<0,001$).



Corrélation entre la concentration de Versican (pg/ml) et calpaïne 1 extracellulaire (pg/ml) dans les surnageants de LBA (test de Rho Spearman)

X. Table des Tableaux

Tableau I : Classification TNM des cancers bronchiques (7^{ième} édition), page 13

Tableau II : Regroupement par stades TNM et corrélation au pronostic page 14

XI. Table des Figures

Figure 1 : Consommation moyenne de cigarettes par jour et mortalité par cancer bronchique en France page 10

Figure 2 :
A et B : anatomopathologie (HES) de l'adénocarcinome lépidique
C et D : radiologie forme nodule et forme pneumonique de l'adénocarcinome lépidique
page 22

Figure 3: Nomenclature international des Calpaïnes (FASEB Summer Research Conferences, 2013) page 30

Figure 4 : Structure de la Calpaïnes 1 avec sa sous-unité régulatrice d'après Zatz et al. (Zatz et Starling 2005) page 31

Figure 5 : TLR2 est une cible des calpaïnes externalisées p37

RESUME

La calpaïne 1 est une protéase à cystéine qui est activée par le calcium et peut s'externaliser. Les calpaïnes extracellulaires favorisent la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire, par prolifération et migration cellulaire. Le récepteur Toll like (TLR) 2 a été identifié comme une cible des calpaïnes extracellulaires dans les lymphocytes. L'objectif est d'étudier le rôle de la calpaïne 1 extracellulaire dans la progression tumorale de l'adénocarcinome pulmonaire lépidique (ADL). La calpaïne 1 extracellulaire, le fragment soluble de TLR2, le versican et les cytokines étaient analysés par ELISA dans des surnageants de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients atteints d'ADL (n = 68). La source de calpaïne était analysée par immunohistochimie et TLR2 était étudiée par cytométrie de flux sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les cellules de lignées de cancer bronchiques. Calpaïne 1 extracellulaire, sécrété par les cellules tumorales, était associée à la progression tumorale, à l'inflammation à neutrophiles, avec un mauvais pronostic sur la survie (p = 0,003). TLR2 était exprimé sur les cellules tumorales et les PNN avec une diminution d'expression après traitement par calpaïne. Dans les surnageants de LBA, le fragment soluble de TLR2 était corrélée à la concentration de calpaïne 1 (r = 0,624; p <0,001). Le fragment soluble de TLR2 élevé était associé à la progression tumorale et un environnement pro-inflammatoire. La calpaïne 1 extracellulaire sécrétée par la cellule tumorale, pourrait favoriser un microenvironnement inflammatoire et la progression tumorale par l'intermédiaire de TLR2 dans l'ADL.

Mots-clés : cancer, poumon, calpaïne, toll like récepteur 2, versican, neutrophiles

SUMMARY

Calpain 1 is a pro inflammatory calcium-activated cysteine protease, which can be partly externalized. Extracellular calpains limit inflammatory processes and promote tissue repair, through cell proliferation and migration. Toll like receptor (TLR) 2 has been identified as a target of extracellular calpains in lymphocytes. The aim was to investigate the externalization of calpain 1 and the release of soluble TLR2 during tumor progression of lepidic pulmonary adenocarcinoma (LPA). Extracellular calpain 1, soluble fragment of TLR2, versican and cytokines were analyzed by ELISA in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) supernatants from patients with LPA (n=68). Source of calpain and soluble TLR2 was analyzed by immunohistochemistry and flow cytometry, respectively, on polymorphonuclear neutrophils (PMN) and human lung cancer cell lines. Extracellular calpain 1, secreted by tumor cells, was associated to tumor progression, neutrophilic inflammation, with a poor prognostic factor on survival (p=0,003). TLR2 was expressed on PMN or tumor cells and decreased after calpain exposure. Soluble fragment of TLR2 in BALF supernatants was correlated to the extracellular calpain 1 concentration (r=0.624; p<0.001), and its high level was associated with tumor progression and a pro-inflammatory environment. Extracellular calpain 1 secreted by tumor cells, could participate in inflammatory microenvironment and tumor progression through TLR2 in LPA.

Keys words: cancer, lung, calpain, toll like receptor 2, versican, neutrophils