



HAL
open science

Implication de p38 et p53 dans le mécanisme d'action du cetuximab dans le cancer colorectal

Laetitia Marzi

► **To cite this version:**

Laetitia Marzi. Implication de p38 et p53 dans le mécanisme d'action du cetuximab dans le cancer colorectal. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier I, 2014. Français. NNT : 2014MON13525 . tel-01513150

HAL Id: tel-01513150

<https://theses.hal.science/tel-01513150>

Submitted on 24 Apr 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE DE MONTPELLIER I**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques
et Biologiques pour la Santé
Et de l'unité de recherche U896

Spécialité : **Biologie-Santé**

Présentée par **Laetitia Marzi**

**Implication de p38 et p53 dans le
mécanisme d'action du cetuximab dans le
cancer colorectal**

Soutenue le 21 novembre 2014 devant le jury composé de

M. Hervé Watier, PUPH, Université de Tours

M. Alex Duval, DR1, Hôpital St Antoine

M. Jacques ROBERT, PUPH, Institut Bergonié

Mme Corinne Prévostel, CR1, CRBM

Mme Céline Gongora-Nativel, DR2, IRCM

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directrice de thèse

Résumé

Le cetuximab est une thérapie ciblée dirigée contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) utilisée dans le cancer colorectal (CCR) en combinaison avec des chimiothérapies (5-FU, irinotécan et oxaliplatine). Sa fixation inhibe les voies de signalisation en aval du récepteur conduisant à une diminution de la prolifération et de la survie des cellules ciblées. Cependant, chez les patients atteints de CCR présentant une protéine KRAS mutée, le cetuximab est inefficace, de plus, la moitié des patients présentant une protéine KRAS wild-type ne répond pas non plus au cetuximab. Afin de découvrir des nouveaux biomarqueurs de sélection des patients qui pourraient bénéficier de ce traitement ou d'améliorer la réponse des patients, une meilleure connaissance des mécanismes d'action du cetuximab est nécessaire. Par exemple récemment, des études ont montré que la protéine p53 participait à la réponse au cetuximab. Il serait intéressant de savoir si le statut de cette protéine peut constituer un bon marqueur de réponse.

Précédemment, nous avons montré que l'activation de la « mitogen activated protein kinase » p38 (MAPK p38) induit une résistance à l'irinotécan *in vitro* et *in vivo* et est un marqueur de non réponse à cette drogue. De plus, d'autres équipes ont montré que la MAPK p38 bloque également la réponse au 5-FU et participe à la cytotoxicité de l'oxaliplatine. Il semble alors que la MAPK p38 soit impliquée dans les mécanismes d'action des anti-tumoraux. Il est donc intéressant de savoir si la MAPK p38 participe également à la cytotoxicité des thérapies ciblées comme le cetuximab.

Pour répondre à ces questions nous avons choisi de comparer deux lignées cellulaires de CCR KRAS wild-type mais au statut *TP53* différent et qui répondent différemment au cetuximab: la lignée Caco2 (30% d'inhibition de la survie, *TP53* muté) et la lignée DiFi (80% d'inhibition de la survie, *TP53* sauvage). Nous avons effectué des tests de cytotoxicité combinant le cetuximab et l'inhibition transcriptionnelle ou pharmacologique de p38 ou l'inhibition transcriptionnelle de p53. Nous avons également testé l'apoptose et la prolifération induite par le cetuximab en l'absence de la MAPK p38 ou de p53. Enfin nous avons testé l'expression des gènes *BIM*, *p27* et *PUMA* impliqués dans l'apoptose et la prolifération.

Dans cette étude, nous avons démontré que la MAPK p38 et p53 participent à l'effet cytotoxique du cetuximab dans les cellules DiFi. En revanche, dans les cellules Caco2, la MAPK p38 bloque partiellement l'effet du cetuximab. Nous avons également montré l'implication de p38 et p53 dans l'apoptose induite par le cetuximab et l'implication de p38 dans l'inhibition de la prolifération. La protéine p38 est impliquée dans la régulation de ERK et dans la localisation nucléaire de FOXO3a responsable de l'expression des gènes *BIM* et *p27*. Enfin, nous avons montré que p38 a également un rôle dans le mécanisme d'action d'inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR (lapatinib et erlotinib).

Pour conclure, nous avons déterminé que p38 et p53 sont impliquées dans le mécanisme d'action du cetuximab. Nous avons décrit l'implication de la voie p38-FOXO3a dans le mécanisme d'action du cetuximab. Enfin, p38 et p53 semblent être de bons biomarqueurs de réponse au cetuximab.

**Implication de p38 et p53 dans le
mécanisme d'action du cetuximab
dans le cancer colorectal**

Sommaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. LE CANCER COLORECTAL.....	10
1.1. Général	10
1.1.1. Anatomie	10
1.1.2. Cancérogenèse	10
a. Les formes familiales.....	11
b. Les formes sporadiques.....	12
1.1.3. Anatomopathologie	15
1.1.4. Incidence	17
1.2. Traitements.....	17
1.2.1. Traitements des cancers non métastatiques	21
1.2.2. Traitements des cancers métastatiques	22
a. Les chimiothérapies.....	22
b. Les thérapies ciblées	23
Les anti-angiogéniques.....	23
II. CIBLER LA VOIE DU RECEPTEUR AU FACTEUR DE CROISSANCE EPIDERMIQUE.....	26
2.1. La voie de l'EGFR	26
2.2. Le ciblage de la voie EGFR	29
La lignée DiFi.....	30
2.2.1. Le cetuximab	30
Les résistances au cetuximab	32
Les mutations KRAS.....	33
Les autres modifications de la voie EGFR impliquées dans la réponse au cetuximab.	34
2.2.1. Les inhibiteurs de tyrosine kinase	36
III. LA MAP KINASE P38.....	38
3.1. Les MAPKs.....	38
3.2. La MAPK p38	39
3.2.1. Les mécanismes d'activation de la MAPK p38	40
3.2.2. L'inhibition de la voie MAPK p38	41

3.2.3.	Les substrats des MAPKs p38	43
a.	Les protéines kinases	43
b.	Les protéines cytoplasmiques	44
c.	Les protéines nucléaires	45
3.2.4.	Les rôles physiologiques et pathologiques de p38	46
a.	p38 et inflammation	47
b.	p38 et cycle cellulaire	48
c.	p38 et l'apoptose	49
d.	p38 et réponse aux agents chimiothérapeutiques	50
e.	p38 et cancer	51
IV.	LA PROTEINE P53	53
4.1.	La régulation de la voie p53	53
4.2.	Les rôles biologiques de p53	55
4.2.1.	p53 et cycle cellulaire	55
4.2.2.	p53 et réparation de l'ADN	56
4.2.3.	p53 et apoptose	57
4.2.4.	p53 et cancer	59
4.2.5.	p53 et traitement	60
	RESULTATS.....	64
	I PROJET DE RECHERCHE	65
	II ROLE DE LA MAPK P38 DANS LA REPONSE AU CETUXIMAB	68
1.1.	Introduction	68
1.2.	Article	70
1.3.	Commentaire de l'article	95
I.	Rôle de p38 dans la résistance au cetuximab	95
II.	Rôle de p38 sur l'expression membranaire de l'EGFR et de son partenaire HER2.....	96
a.	Inhibition de p38 et expression membranaire de l'EGFR et de HER2.....	96
b.	Effet de l'inhibition de p38 dans la formation des dimères EGFR-EGFR et EGFR-HER2	97
III.	Rôle de p38 dans d'autres modèles	99
a.	In vivo	99
b.	In vitro	99
	Conclusion.....	100
	Perspectives pour l'utilisation de p38 comme biomarqueur ou nouvelle cible thérapeutique	101
1.4.	Matériel et méthodes supplémentaire.....	103

III ROLE DE P53 DANS LA REponse AU CETUXIMAB.....	106
1. Introduction	106
2. Matériel et Méthodes.....	106
3. Résultats	109
3.1. Les Caco2 et les DiFi répondent différemment au cetuximab.....	109
3.2. p53 participe à l'activation de p38 par le cetuximab.....	110
3.3. p38 α bloque partiellement la réponse des Caco2 au cetuximab	111
3.4. p38 α participe à la réponse des DiFi shRNA p53 au cetuximab	113
3.5. p53 participe à l'apoptose mais pas à l'inhibition de la prolifération induite par le cetuximab.....	114
3.6. p53 régule l'expression de BIM et PUMA dans les DiFi et les Caco2.....	117
4. Discussion	119
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	125
ANNEXES	129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	130

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Anatomie du côlon et du rectum.....	10
Figure 2: Rôle de l'APC dans la voie Wnt [3]	12
Figure 3 : Evénements génétique conduisant à un carcinome [5].....	13
Figure 4: Stades du cancer colorectal.....	15
Figure 5: Formules du 5-FU et ses métabolites.....	18
Figure 6: Mécanisme d'action du FdUMP sur la thymidilate synthase [7].....	19
Figure 7: Formule oxaliplatine.....	19
Figure 8: sites de fixation de l'oxaliplatine [10]	20
Figure 9: formules Irinotécan et SN38.....	20
Figure 10: Mécanisme d'action de l'irinotécan.....	21
Figure 11: Différents ligands et récepteurs impliqués dans l'angiogenèse [18].....	24
Figure 12: Formule sorafénib.....	25
Figure 13: Ligands, dimères formés et protéines effectrices des récepteurs HERs [26]	27
Figure 14: Contrôle de FOXO3a par l'EGF [29]	29
Figure 15: Voie de signalisation de la survie et de la prolifération.....	36
Figure 16: Formules de trois ITK ciblant l'EGFR	37
Figure 17: Différentes voies MAPK [27].....	39
Figure 18: Signalisation de p38 [110].....	41
Figure 19: Différentes classes d'inhibiteurs de p38 [113].....	42
Figure 20: inhibition de la prolifération par p38 via Sprouty2 [122]	44
Figure 21: Implication de p38 dans la stimulation de la prolifération [123].....	45
Figure 22: Implication physiologique de p38 [111].....	47
Figure 23 : implication de la MAPK p38 dans l'arrêt G2-M suite à une cassure double brin.....	50
Figure 24 : implication de la MAPK p38 dans l'arrêt G1-S suite à une cassure double brin, un stress osmotique ou à l'induction de ROS [175].....	51
Figure 25: Différents sites de phosphorylation de p53 [186].....	55
Figure 26: p53 et contrôle du cycle cellulaire	56
Figure 27 : induction de l'apoptose, de l'arrêt de la prolifération et de la sénescence par p53 en réponse aux drogues [216].....	62
Figure 28: Corrélation entre niveau d'activation de la MAPK p38 et réponse à la combinaison iri+CTX.....	69
Figure 29: Expression de la fibronectine dans la lignée DiFi.....	96
Figure 30: Le SB202190 ne modifie pas la quantité d'EGFR ni d'HER2 à la membrane des DiFi	97
Figure 31: Le SB202190 diminue la quantité d'homodimères EGFR-EGFR au profit des dimères EGFR-HER2	98
Figure 32: Le SB202190 diminue la toxicité de l'erlotinib et du cetuximab sur les LIM1215.....	100
Figure 33: IC50 SN38 en combinaison avec le SB202190 ou le cetuximab dans différentes lignées de CCR... 101	101

Figure 34 : Différence de cytotoxicité du cetuximab entre les DiFi et les Caco2	110
Figure 35: p53 module l'activation de p38	111
Figure 36: Seule l'inhibition de la MAPK p38 α sensibilise les Caco2 au cetuximab	112
Figure 37: Effet des différents traitements sur des tumeurs de Caco2 xenogreffées en sous cutané.....	113
Figure 38: p53 participe à l'effet cytotoxique du cetuximab et effet synergique de la double inhibition p38 et p53	114
Figure 39: L'absence de p53 bloque l'apoptose induite par le cetuximab mais ne modifie pas la prolifération. 116	116
Figure 40: Expression de <i>BIM</i> et <i>PUMA</i> induite par le cetuximab	118
Figure 41: Modèles de réponse au cetuximab, au SB202190 et à la combinaison des deux <i>in vitro</i>	123
Figure 42 : Induction de l'apoptose et de la survie en réponse au cetuximab via p38 dans les cellules possédants une p53 fonctionnelle ou non	127
Tableau 1: liste des gènes touchés par des mutations non réparées	14
Tableau 2: Facteurs de transcription phosphorylés par ERK et AKT	28
Tableau 3: liste des biomarqueurs potentiels de réponse aux anti-EGFR	35
Tableau 4: Listes des cibles de p38 dans les différents compartiments cellulaires	46
Tableau 5 : Rôle oncogénique et suppresseur de tumeur de p38.....	52
Tableau 6: différents gènes induit par p53	58
Tableau 7 : Caractéristiques des Caco2 et DiFi	110
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus.....	119

Liste des abréviations

5-FU: 5-FluoroUracile

ADCC: antibody dependant cell-mediated cytotoxicity

AMM: autorisation de mise sur le marché

BER: base excision repair

CCR: cancer colorectal

CDKs: cyclin-dependent kinases

CTX: cetuximab

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor receptor

ERK: extracellular signal-regulated kinase

F-dUMP: 5-5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-O-monophosphate

FOLFIRI: 5-FU + LV + irinotécan

FOLFOX: 5-FU + LV + oxaliplatine

FOLFOXIRI: 5-FU + LV + oxaliplatine + irinotécan

F-UMP: 5-Fluoroyuridine monophosphate

HNPCC: cancer colorectal héréditaire sans polypose

HR: homologous recombination

IP: iodure de propidium

Iri: irinotécan

ITK: inhibiteur de tyrosine kinase

JNK: Jun amino-terminal kinase

LV: leucovorine

MAP2K: MAPK kinases

MAP3K: MAPK kinase kinase kinase

MAP4: microtubule-associated protein

MAPK: mitogen activated protein kinase

MEKK: MAPK/ERK kinase kinase

MKP: MAPK phosphatase

MMR: mismatch repair

MSH2: mutS homologue 2

MSI: microsatellite instability, **MSI-H:** high microsatellite instability, **MSI-L:** low microsatellite instability

MSS: Microsatellite stability

NER: nucleotide excision repair

NHEJ: non homologous end joining

NK: natural killer

NSCLC: Non-small-cell lung carcinoma

OS: overall survival

PFS: progression free survival

PUMA: p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

RR: response rate

SB: SB202190

SN38: 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin

SNP: single-nucleotide polymorphism

SRB: sulforhodamine B

TopoI: topoisomérase I

TR-FRET: time-resolved fluorescence resonance energy transfer

UA: unite arbitraire

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

Contexte Bibliographique

I. Le cancer colorectal

1.1. Général

1.1.1. Anatomie

Le côlon est l'organe qui relie, par le caecum, l'intestin grêle au rectum. Il est composé de 4 parties: le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant et le colon sigmoïde. C'est dans le côlon que vont être absorbé l'eau et les sels encore présent dans la nourriture digérée. Le rectum quant à lui est l'organe qui relie le côlon à l'anus (Figure 1).

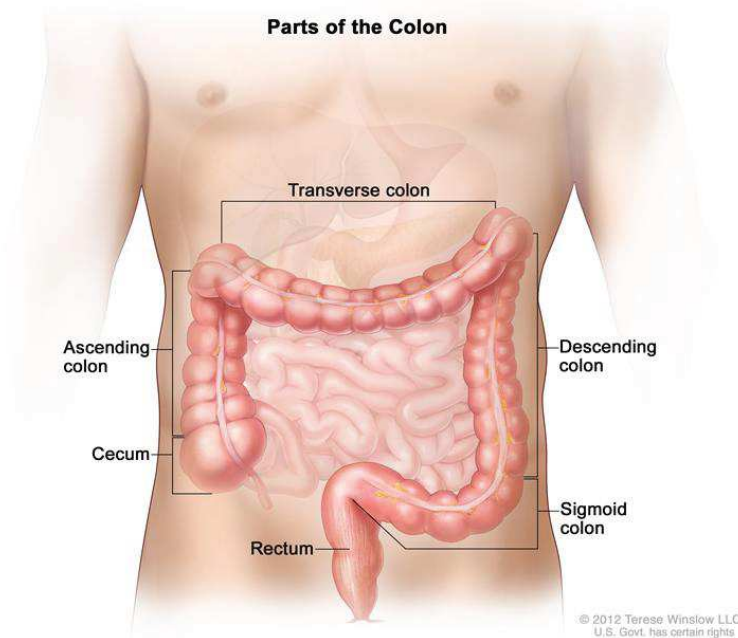


Figure 1: Anatomie du côlon et du rectum
(<http://www.cancer.gov/dictionary>)

Les parois du colon et du rectum sont composées de 4 couches de tissus: la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse et la séreuse reliées entre elles par du tissus conjonctif.

1.1.2. Cancérogenèse

Les cellules de la paroi du côlon et du rectum peuvent proliférer de manière anormale. Elles forment alors une excroissance ou tumeur non cancéreuse (bénigne) appelée polype. La

majorité des tumeurs malignes se développent à partir d'un polype, cependant tous les polypes ne deviennent pas cancéreux. Au cours du temps, une cellule à la surface du polype va présenter des altérations génétiques qui vont conduire à un cancer. Cette cellule en se multipliant va pouvoir envahir les tissus du côlon et du rectum et même atteindre d'autres organes. Les cancers du côlon et du rectum, étant similaires, sont regroupés sous le terme de cancer colorectal.

a. Les formes familiales

On distingue notamment deux types de cancers liés à l'hérédité: la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) et le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC). Ils concernent 15% des cancers colorectaux.

La PAF est une maladie autosomique dominante rare caractérisée par une mutation du gène APC (adenomatous polyposis coli) conduisant à une protéine tronquée. Les patients présentant une PAF ne vont pas tous développer un cancer colorectal. Le devenir de leur maladie est lié au type de mutation que présente leur protéine APC. Selon la position de la mutation elle peut conduire à la formation de centaines voir de milliers de polypes. Ces tumeurs bénignes ne sont pas toutes dangereuses mais garantissent l'apparition de carcinomes dans quasiment 100% des cas [1]. Ainsi les patients qui développent un cancer colorectal sont, en majorité, ceux dont la mutation APC se trouve entre les codons 1250 et 1464 (Nagase et al, 1993).

Le HNPCC, ou syndrome de Lynch, contrairement à la PAF, ne présente pas de polypes. C'est une maladie à transmission autosomique dominante. Il concerne 2 à 4% des CCR et il est caractérisé par des carcinomes peu différenciés et mucineux [2]. Les mutations transmises concernent les gènes de réparation des mésappariements dans l'ADN (gènes MMR): hMSH1, hMLH2, hPMS1 et hPMS2. Ainsi 75% des HNPCC présentent une instabilité des microsatellites (MSI).

b. Les formes sporadiques

Deux sous types de développement du cancer colorectal sont décrits. Le premier est appelé « la voie canonique », elle concerne 80 à 85% des cancers et est caractérisée par une instabilité chromosomique. Fearon et Vogelstein ont proposé un modèle de carcinogenèse colorectale à instabilité chromosomique qui décrit l'apparition successive d'événements génétiques bien définis conduisant un tissu normal à devenir un carcinome. Ce modèle est également appelé « suppressor pathway » ou encore CIN. Dans ce modèle la première mutation à apparaître est la mutation du gène APC dans 60% des cancers du côlon et 82% des cancers du rectum. La protéine APC fait partie, avec les protéines axine et GSK-3Béta, d'un complexe responsable de la dégradation de la Béta-caténine. La mutation au niveau de cette protéine empêche la formation du complexe et donc une activation constitutive de la voie Wnt avec pour conséquence la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et dans la progression tumorale (Figure 2). La mutation du gène APC, suivie de sa perte allélique sont responsables de la transition entre un épithélium normal et un adénome précoce.

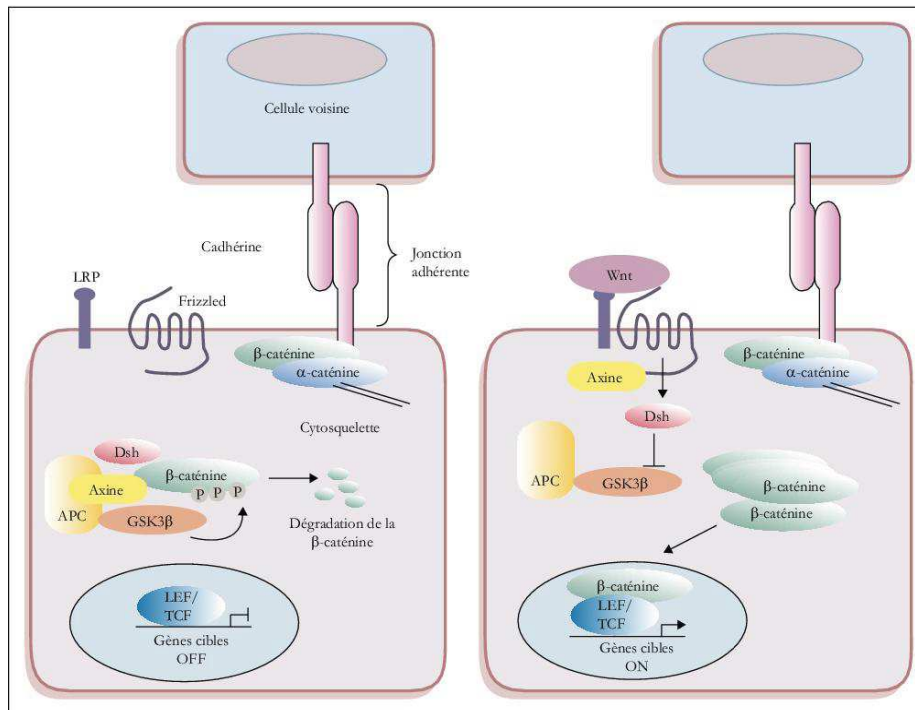


Figure 2: Rôle de l'APC dans la voie Wnt [3]

Les mutations au niveau du gène *KRAS* (35 à 40% des cancers colorectaux possèdent ces mutations) quand à elle va être responsable de la transition entre l'adénome précoce et l'adénome intermédiaire. *KRAS* est un proto-oncogène impliqué dans la prolifération

cellulaire, la survie mais aussi la polarité cellulaire. Son rôle sera plus amplement décrit dans la partie « voie de signalisation du récepteur au facteur de croissance épidermique ». Les mutations suivantes toucheront les gènes DCC (Deleted in Colorectal Cancer) et p53 avec 70% et de 50 à 75% de fréquence dans les cancers colorectaux respectivement [4], et vont conduire à la transition entre un adénome intermédiaire et un carcinome. La protéine DCC est impliquée dans l'apoptose et l'arrêt du cycle dans certaines lignées cellulaires. Elle est également impliquée dans la mobilité cellulaire. La protéine p53 quant à elle régule le cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN. Ses rôles seront décrits plus précisément dans la partie qui lui est dédiée dans ce manuscrit. Le modèle de Fearon et Vogelstein représente la voie de transformation la plus fréquente conduisant à un carcinome colique [5] (Figure 3).

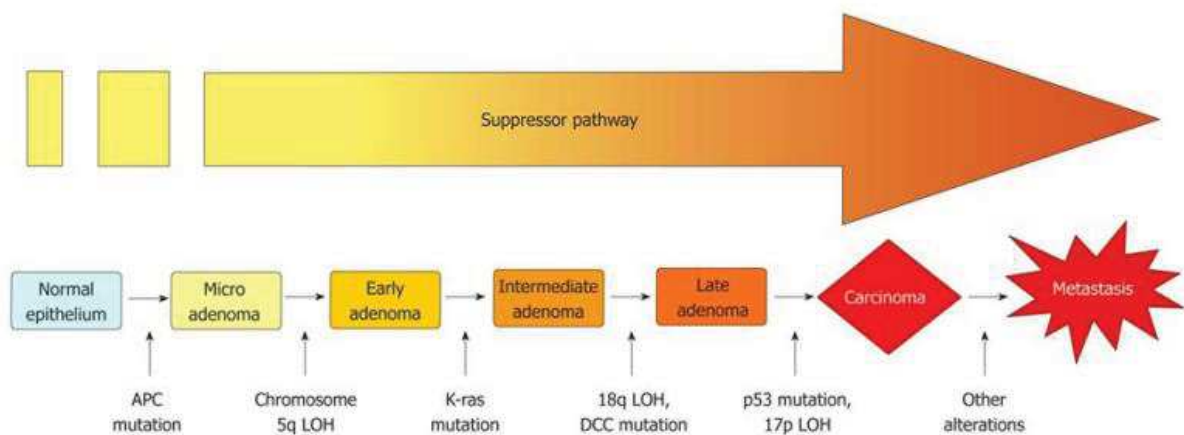


Figure 3 : Evénements génétique conduisant à un carcinome [5]

Le deuxième sous type de développement du cancer colorectal est la voie de l'instabilité des locus microsatellites appelé RER+ pour « replication error » ou encore MSI pour « microsatellite instability ». Il concerne 15 à 20% des cancers colorectaux. Les cellules anormales présentent des mutations au niveau des gènes codant des protéines du système MMR. Il existe 7 de ces protéines: hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 et hPMS2. Ce système n'étant plus capable de corriger les erreurs de la polymérase, des mutations apparaissent alors dans les locus microsatellites, qui sont des régions riches en répétitions et sujettes aux erreurs de réplication. Notamment au niveau des microsatellites de gène impliqués dans la cancérogenèse, par exemple: TGFBIIR, BAX, APC ou encore IGF2R (table1).

Gene	Fonction
<i>ACTRII</i>	Growth/differentiation factor receptor
<i>AIM2</i>	IFN inducible
<i>AXIN-2</i>	Wnt signaling
<i>BAX</i>	Proapoptotic factor
<i>BCL-10</i>	Proapoptotic factor
<i>BLM</i>	Response to DNA damage
<i>Caspase-5</i>	Proapoptotic factor
<i>CDX2</i>	Homeobox transcription factor
<i>CHEK1</i>	Response to DNA damage
<i>FAS</i>	Proapoptotic factor
<i>GRB-14</i>	Growth factor bound protein
<i>hG4-1</i>	Cell cycle
<i>IGFIIR</i>	Growth factor receptor
<i>KIAA0977</i>	Homologue to mouse cordon bleu
<i>MBD-4</i>	DNA glycosylase and methyl CpG binding protein
<i>MLH3</i>	MMR
<i>MSH3</i>	MMR
<i>MSH6</i>	MMR
<i>NADH-UOB</i>	NADH ubiquinone oxidoreductase
<i>OGT</i>	O-linked GlcNAc transferase
<i>PTEN</i>	Cell cycle
<i>RAD-50</i>	Response to DNA damage
<i>RHAMM</i>	Cell motility
<i>RIZ</i>	Cell cycle and apoptotic protein
<i>SEC63</i>	ER membrane protein
<i>SLC23AI</i>	Nucleobase transporter
<i>TCF-4</i>	Transcription factor (Wnt pathway)
<i>TGFβRII</i>	Growth factor receptor
<i>WISP-3</i>	Growth factor (Wnt pathway)

Tableau 1: liste des gènes touchés par des mutations non réparées (adapté de [5])

Les cancers MSI peuvent avoir 2 statuts: MSI-H pour High Microsatellite instability et MSI-L pour Low microsatellite instability. Un panel de 5 séquences de microsatellites a été proposé pour définir le statut MSI-H ou –L. Si la tumeur présente des mutations sur une seule de ces séquences elle sera alors classée MSI-L. Si en revanche elle présente 2 séquences mutées ou plus, elle sera alors classée MSI-H.

Les cancers MSI sont caractérisés par une infiltration lymphocytaire et une faible fréquence des métastases [5]. Les patients présentant un statut MSI ont un meilleur pronostic que ceux qui sont MSS (Microsatellite stability).

1.1.3. Anatomopathologie

Les différents stades du CCR sont établis à partir de l'observation de l'atteinte des différentes couches tissulaires du côlon et du rectum pour les 3 premiers stades.

Stade 0: Tumeur superficielle seule la muqueuse est atteinte.

Stade I: La tumeur a atteint la sous muqueuse ou la couche musculuse.

Stade II: La tumeur a envahit plusieurs couches de tissus.

Les stades suivants correspondent à l'atteinte des ganglions lymphatiques (stade III) puis à la dissémination des cellules cancéreuses jusqu'à d'autres organes: métastases (stade IV) (Figure 4). Les organes principalement touchés par des métastases colorectales sont le foie, les poumons et le péritoine.

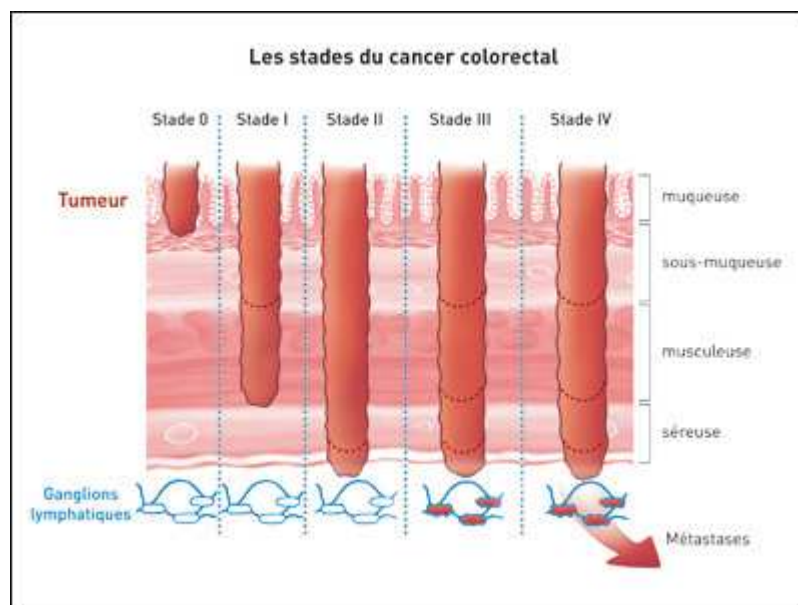


Figure 4: Stades du cancer colorectal

Site Institut National du Cancer.

La classification TNM va permettre de décrire l'état du cancer selon la taille de la tumeur primaire, la profondeur tissulaire qu'elle atteint. Ce système indique si le cancer s'est

disséminé jusqu'aux ganglions lymphatiques et si un grand nombre de ces ganglions sont touchés et enfin si il y a présence de métastases à distance de la tumeur primaire.

T: description de la tumeur primaire

TX: la tumeur primaire ne peut être évaluée

T0: il n'y a pas de preuve de la présence de tumeur primaire

T1 à T4: numéroté selon la taille ou la profondeur de la tumeur.

N: atteinte des ganglions lymphatiques régionaux

NX: ne peut être évaluée

N0: pas d'atteinte des ganglions lymphatiques

N1 à N3: numéroté selon le nombre de ganglions touchés et leur éloignement de la tumeur primaire.

M: atteinte des organes à distance de la tumeur primaire

MX: non évaluable

M0: pas de métastases

M1: présence de métastases à distance de la tumeur primaire.

Les stades vont être établis à partir de cette classification TNM:

Stade I (T1-T2, N0, M0)

Stade IIA (T3, N0, M0)

Stade IIB (T4a, N0, M0)

Stade IIC (T4b, N0, M0)

Stade IIIA (T1-T2, N1, M0 et T1, N2a, M0)

Stade IIIB (T1-T2, N2b, M0; T2-T3, N2a, M0 et T3-T4a, N1, M0)

Stade IIIC (T3-T4a, N2b, M0 et T4b, N1-N2, M0 et T4a, N2a, M0)

Stade IVA (tout T, tout N et M1a)

Stade IVB (tout T, tout N et M1b)

1.1.4. Incidence

Le cancer colorectal (CCR) est, selon les chiffres de 2012 (GLOBOCAN), le troisième cancer dans le monde pour les hommes et le deuxième cancer pour les femmes avec 1,3 million de nouveau cas et près de 700 000 morts. En 2012, en termes d'incidence, chez l'homme il se situe après le cancer de la prostate et du poumon. Chez la femme, juste après le cancer sein. Et en terme de mortalité, Il se situe au second rang, après le cancer du poumon chez l'homme et au troisième rang après le cancer du sein et celui du poumon chez la femme (Binder-Foucard et al., 2014).

En France, on observe une stabilisation de l'incidence depuis 2005 et une baisse de la mortalité depuis 1980 (-1,3% par an) due à la précocité du diagnostic et à l'amélioration des traitements. Cependant en 2012, toujours en France, il a tout de même été recensé plus de 42000 nouveau cas et près de 18000 décès sont survenus [6].

95% des personnes touchées ont plus de 50 ans. Les principaux facteurs de risque, outre les antécédents familiaux d'adénomes ou de cancer colorectal et les prédispositions génétiques, sont les inflammations du tube digestif et la consommation excessive de viande rouge, de charcuterie ou de boissons alcoolisées, la sédentarité et le tabagisme.

1.2. Traitements

Le traitement diffère entre les cancers métastatiques et non métastatiques. Cependant on y retrouve l'utilisation de trois drogues: le 5-FluoroUracile (5-FU), l'oxaliplatine et l'irinotécan, et des thérapies ciblées visant le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR): le cetuximab et le panitumumab, ou visant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF): le Bévacizumab. Très récemment, deux nouvelles thérapies ciblées ont été approuvées, l'aflibercept ciblant également le VEGF, et le Sorafenib qui, en plus de cibler aussi l'angiogénèse, est un inhibiteur de plusieurs kinases impliquées dans la prolifération cellulaire.

Le 5-FluoroUracile

Le 5-FU est un anti-métabolite fluoropyrimidine analogue des nucléotides pyrimidine (cytosines, uracile et thymidine). Une fois dans la cellule le 5-FU va être métabolisé en deux

métabolites distincts aux effets différents: le 5-Fluorouridine monophosphate (F-Ump) et le 5-5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-O-monophosphate (F-dUMP) (Figure 5). Le F-Ump va pouvoir s'incorporer à l'ARN et inhiber ainsi ses modifications et sa traduction en protéine conduisant à l'inhibition de la croissance cellulaire. L'effet majeur du 5-FU serait du à l'inhibition de la thymidylate synthase par le deuxième métabolite, le F-dUMP. Ce métabolite se fixe à l'enzyme avec la même affinité que l'uracile mais le fluor en position 5 empêche l'activité de l'enzyme et le F-dUMP reste fixé de manière covalente à l'enzyme [7] (Figure 6). Cette fixation va entraîner une carence en thymidine triphosphate (TTP) utilisée dans la synthèse d'ADN.

La leucovorine

La leucovorine ou acide folinique (LV) a été associé avec le 5-FU à partir des années 1980 et a montré des taux de réponses tumorales deux fois supérieurs au 5-FU seul [8]. Elle a pour rôle de stabiliser le lien entre le F-dUMP et la thymidylate synthase intensifiant ainsi l'effet du métabolite sur celle-ci.

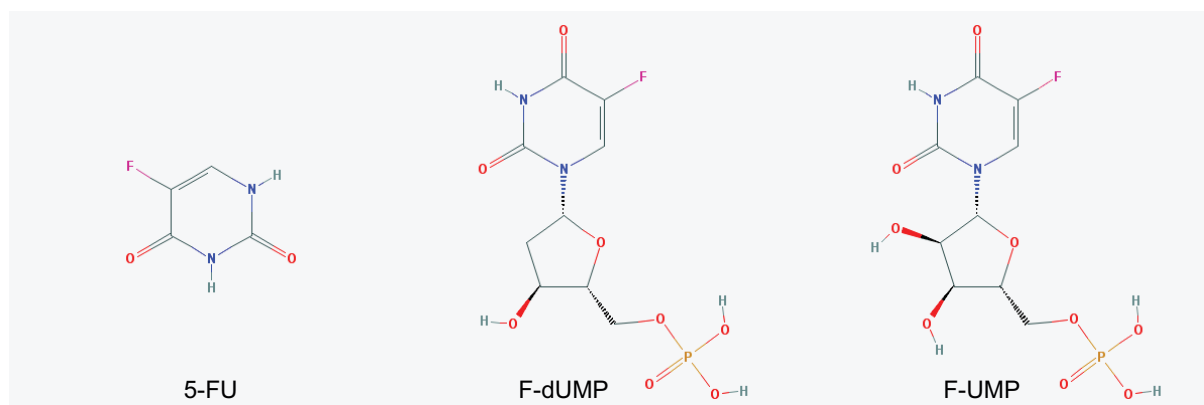


Figure 5: Formules du 5-FU et ses métabolites
(pubchem compound)

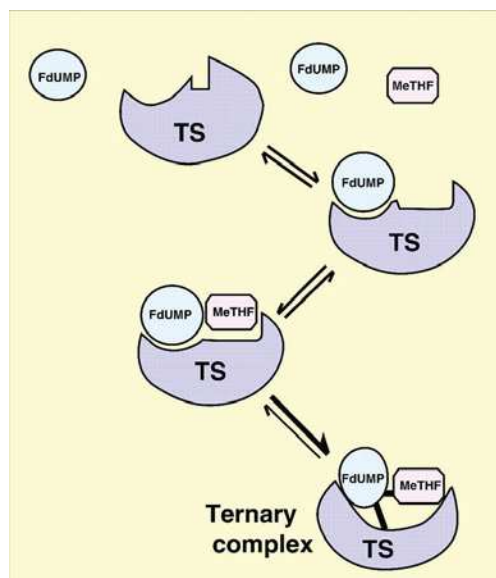


Figure 6: Mécanisme d'action du FdUMP sur la thymidilate synthase [7]

L'oxaliplatine

L'oxaliplatine est un organoplatine complexe dans lequel l'atome de platine est complexé avec un transporteur: le 1,2-diaminocyclohexane (DACH) et un groupe partant: le ligand oxalate (Figure 7). Une fois libérés, les dérivés d'oxaliplatine vont former des ponts inter et intra-brins dans l'ADN inhibant ainsi la réplication et la transcription (Figure 8). Son efficacité a tout d'abord été démontrée en association avec le 5-FU, montrant une synergie entre les deux traitements aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et ce sur des cellules sensibles comme résistantes au 5-FU [9]. Cependant, il a été montré qu'il est également efficace en monothérapie [10].

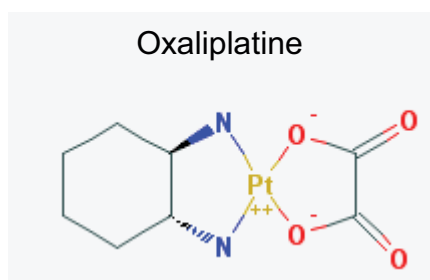


Figure 7: Formule oxaliplatine
(Pubchem compound)

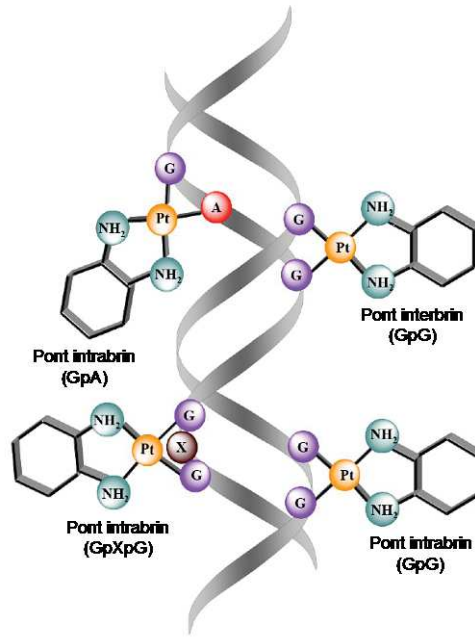


Figure 8: sites de fixation de l'oxaliplatine [10]

L'irinotécan

L'irinotécan est un dérivé semi-synthétique de la camptothécine. C'est une pro-drogue qui va être convertie en un métabolite actif: le 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN38) (Figure 9). Mille fois plus efficace que l'irinotécan, le SN38 inhibe l'activité de la topoisomérase I (TopoI) en stabilisant le complexe ADN-TopoI. Cette action va conduire à une cassure dans l'ADN et donc à l'arrêt de la réplication et à l'apoptose des cellules (Figure 10). L'irinotécan nécessite des cellules en phase de synthèse d'ADN pour être efficace.

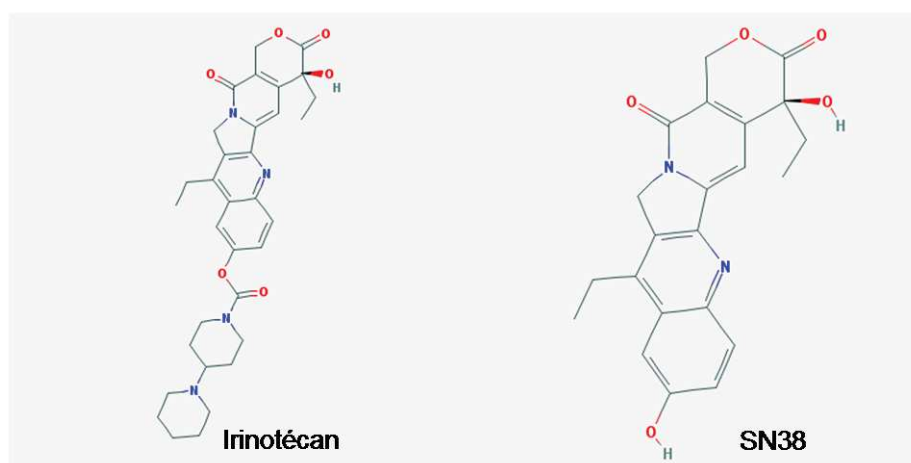


Figure 9: formules Irinotécan et SN38 (Pubchem compound)

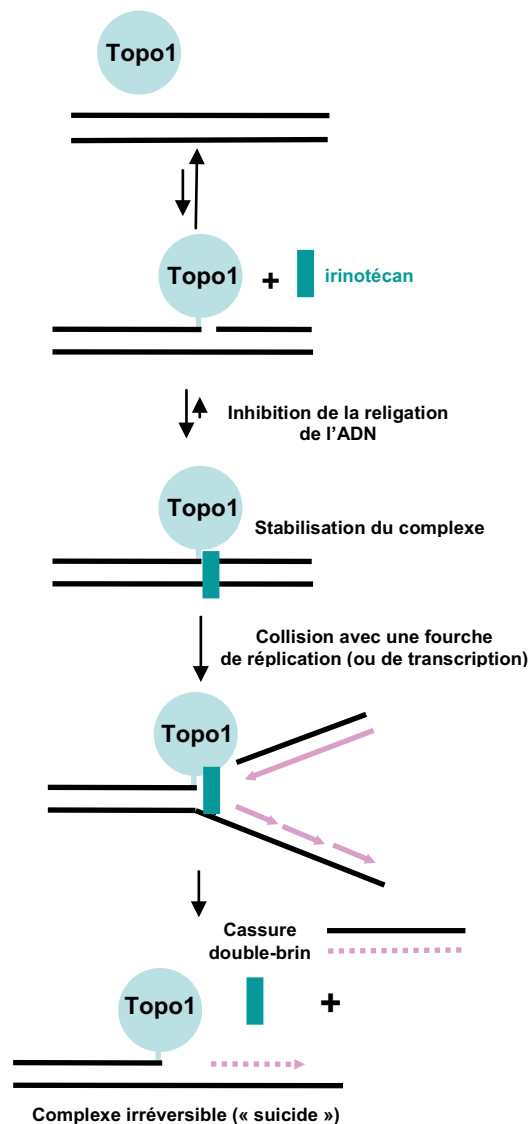


Figure 10: Mécanisme d'action de l'irinotécan
(Adapté de P. Pourquier)

1.2.1. Traitements des cancers non métastatiques

Le traitement d'un cancer non métastatique consistera surtout en la résection de la tumeur et des ganglions lymphatiques périphériques (12 au minimum). L'addition d'une chimiothérapie dépendra de la localisation du cancer et du stade. Un cancer au niveau du rectum de stade II ou III sera traité par chimiothérapie adjuvante préopératoire ou postopératoire avec radiothérapie conventionnelle. Le rectum ne possédant pas de séreuse, l'ajout de ces traitements diminue la récurrence locale en éradiquant les micro-métastases potentielles. La chimiothérapie sera basée sur l'utilisation de 5-FU en infusion continue ou de

capécitabine (forme orale du 5-FU), utilisée récemment et qui montre les mêmes taux d'efficacité. En ce qui concerne le côlon, qui à l'inverse du rectum est moins sujet à des récurrences locales, la chimioradiothérapie ne sera utilisée que dans des cas particuliers (pour revue [11]).

Pour les cancers du côlon présentant une atteinte des ganglions lymphatiques (stade III), sera administrée une chimiothérapie basée sur l'utilisation du 5-FU associé à la leucovorine (LV) pour 6 mois. Ce traitement augmente de 10 à 15% le taux de survie. La capécitabine a montré des effets similaires avec moins d'effets secondaires. Cependant, le traitement le plus utilisé, sauf contre indication, reste l'association 5-FU, LV et oxaliplatine (protocole FOLFOX) qui permet une hausse de 7% de la survie à 3 ans (4,4% pour la capécitabine). Les patients qui ont un cancer du côlon au stade II peuvent également, de manière exceptionnelle, recevoir ce traitement mais uniquement s'ils ont un statut non-MSI-H ou si la résection des ganglions lymphatiques est insuffisante (inférieur à 12 ganglions retirés).

1.2.2. Traitements des cancers métastatiques

Le site le plus touché par les métastases colorectales est le foie. 25% des patients sont diagnostiqués avec des métastases et au cours du temps, les patients ne présentant pas de métastases au moment du diagnostic, vont en développer dans 40 à 50% des cas [12]. Chez les patients présentant des métastases il faudra d'abord déterminer si elles peuvent être retirées par chirurgie. Une chirurgie des métastases sur le foie ne sera envisagée que si les tumeurs sont peu nombreuses, de taille inférieure à 5cm de diamètre et si le foie restant après l'ablation des tumeurs est suffisant. Cette chirurgie pourra être suivie d'une chimiothérapie afin d'éliminer les microtumeurs résiduelles. Les patients qui ne rentrent pas dans ces critères recevront une chimiothérapie visant à réduire la taille des tumeurs afin de les rendre résécables ou à réduire les symptômes (pour revue [11]).

a. Les chimiothérapies

Les patients ayant subi une chirurgie pourront également recevoir une chimiothérapie administrée directement dans l'artère hépatique avec une méthode appelée « trans-arterial

chimioembolization » . Cette méthode combine une embolisation de l'artère hépatique et une infusion de drogue afin d'augmenter la concentration de drogue administrée aux potentielles tumeurs restantes [13]. Le traitement de base des patients présentant des tumeurs résécables reste le FOLFOX ou l'association 5-FU et irinotécan (FOLFIRI), le choix du traitement dépendra de l'oncologue, de l'avancée du cancer et de l'état général du patient. Cependant, récemment la combinaison associant les trois drogues (FOLFOXIRI) a montré de meilleurs résultats avec plus de 60% de réponse comparé au FOLFOX ou au FOLFIRI qui ont un taux équivalent entre eux, autour de 30% [14]. Cependant, la survie à 5ans des patients avec tumeurs hépatiques réséquées reste faible (25 à 35%) [15].

b. Les thérapies ciblées

Des progrès ont également été observés avec l'arrivée des thérapies ciblées dirigées contre les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse du CCR. Notamment avec les anticorps thérapeutiques comme le cetuximab, le panitumumab et le bévacizumab, mais aussi une protéine recombinante: l'aflibercept, et un inhibiteur de tyrosine kinase: le sorafénib. Le but de ces thérapies ciblées est d'inhiber les voies de signalisations cellulaires de prolifération et de survie d'une part, et d'autre part d'inhiber la création de nouveaux vaisseaux qui pourraient alimenter la tumeur. Cette thèse concernera l'étude du mécanisme d'action du cetuximab, une description plus détaillée sera faite dans une partie qui lui sera dédié.

Les anti-angiogéniques

L'angiogenèse est définie par l'apparition de nouveaux vaisseaux à partir de capillaires préexistants. C'est un processus physiologique normal de l'embryogenèse et de la réparation tissulaire. En 1971, Folkman a émit l'hypothèse que les tumeurs solides étaient dépendantes de l'angiogenèse au-delà d'une certaine taille [16] et donc inhiber cette angiogenèse conduirait à une inhibition de la croissance tumorale. Depuis, son hypothèse à été validée par plusieurs études [17] et des thérapies ciblant l'angiogenèse ont vu le jour.

Il y a plusieurs mécanismes d'angiogenèse et tous sont conduit par des cytokines secrétées par les cellules saines ou cancéreuses: les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Il en existe 5: VEGF-A (communément appelé VEGF), -B, -C et -D et le

facteur de croissance placentaire (PlGF). Ils vont se fixer et activer trois récepteurs tyrosine kinase: VEGFR-1, -2 et -3. Les VEGFs ont des affinités différentes avec ces 3 récepteurs (Figure 11). Les neuropilines (NP1 et 2) agissent comme des co-récepteurs, augmentant l'affinité des VEGFs avec leurs récepteurs. Leur fixation va entraîner l'activation de voies de signalisation en aval des récepteurs qui vont conduire à la formation de nouveau vaisseaux (Figure 11).

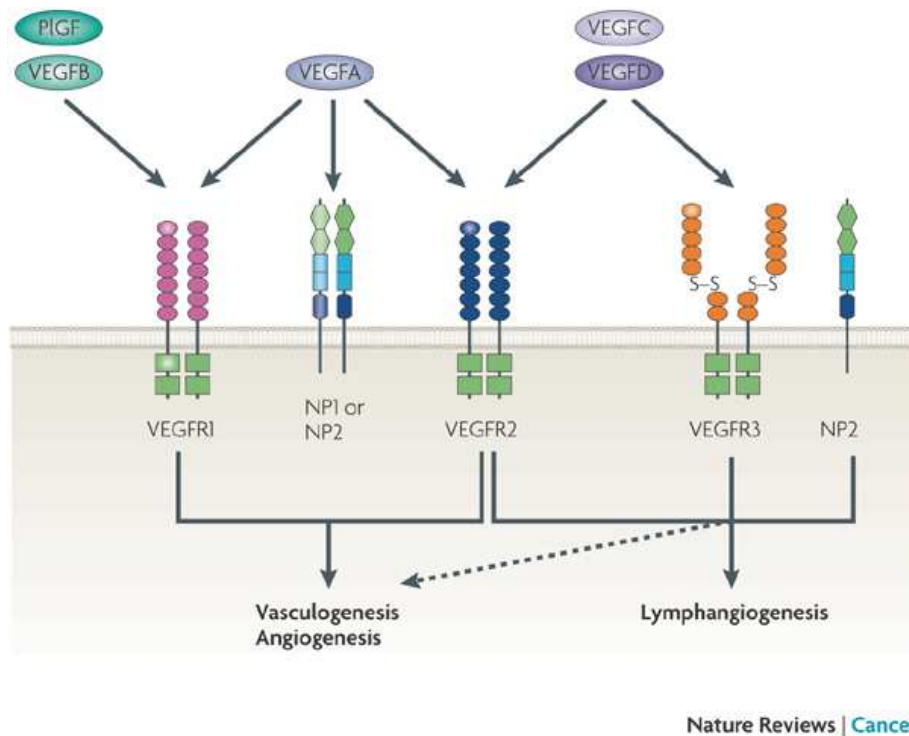


Figure 11: Différents ligands et récepteurs impliqués dans l'angiogénèse [18]

Le bévacicumab (Avastin) est un anticorps monoclonal recombinant dirigé contre une cytokine pro-angiogénique, le VEGF, bloquant ainsi sa fixation sur le récepteur et donc la formation de nouveaux vaisseaux ou la croissance des vaisseaux préexistants pouvant alimenter la tumeur. L'utilisation du bévacicumab augmente le taux de réponse des patients quand il est combiné au 5-FU ou au FOLFIRI [19] mais pas avec l'oxaliplatine, où seule la survie sans progression est améliorée par l'ajout du bévacicumab [20].

L'aflibercept a aussi pour cible le VEGF. C'est une protéine de fusion recombinante associant des segments des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 se liant au VEGF et un domaine Fc d'IgG1 permettant le recrutement du système immunitaire et l'élimination du VEGF. Son efficacité a été démontrée en association avec le protocole FOLFIRI [21].

Il y a une autre stratégie de ciblage de l'angiogenèse, les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant les VEGFR. Il en existe trois, le sorafenib, le regorafenib et le sunitinib, cependant ces inhibiteurs ne ciblent pas uniquement les VEGFR mais d'autres récepteurs tyrosine kinase ou protéine kinase et seul le premier, le sorafenib, a obtenu l'AMM (Figure 12).

Le sorafenib est un inhibiteur multi-cibles utilisé pour traiter le cancer du rein métastatique et le carcinome hépatocellulaire avancé [22] ; [23]. Il est capable d'inhiber C-Raf et B-Raf (sauvage ou muté V600E) mais aussi c-KIT, FLT-3, RET, VEGFR-2 et 3 et PDGFR. Il va ainsi affecter la croissance tumorale en inhibant directement la prolifération cellulaire, en favorisant l'apoptose mais aussi en perturbant l'angiogenèse tumorale [24]. Son activité sur des lignées de cancer colorectal a également été démontrée en préclinique [25].

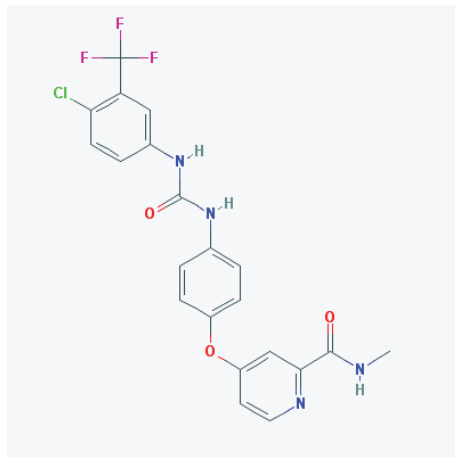


Figure 12: Formule sorafénib

II. Cibler la voie du récepteur au facteur de croissance épidermique

2.1. La voie de l'EGFR

Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) est l'un des quatre membres de la famille des récepteur tyrosine kinase HER. Il est également appelé ERBB1 ou encore HER1. Il forme des dimères avec un autre EGFR (homodimères) ou avec les autres membres de la famille (hétérodimères), HER2, HER3 ou HER4. Ces récepteurs sont composés d'un large domaine extracellulaire qui contient, à l'exception de HER2, un domaine de liaison aux différents ligands, un domaine transmembranaire, un petit domaine juxta membranaire avec le domaine kinase et, en C terminal les différents sites phospho-tyrosine qui vont permettre la fixation des molécules effectrices, sauf pour HER3. Les ligands de l'EGFR sont nombreux: EGF, amphiréguline, TGF-alpha, Bétacelluline, heparin-binding EGF (HB-EGF) et l'épiréguline. Une fois le ligand fixé sur le récepteur, il va permettre la dimérisation du récepteur. Cette dimérisation va conduire à une autophosphorylation des deux partenaires et l'EGFR va pouvoir recruter ses cibles comme: Grb2 (growth factor bound 2), SOS (Son of sevenless) et Shc (Src homology 2 containing). Ces protéines vont à leur tour lier RAS et activer les cascades des « mitogen activated protein kinase » (MAPK). Il peut également recruter STAT5 (signal transducer and activator of transcription). Ces cascades d'activation sous les récepteurs HER sont complexes et dépendent du ligand et du dimère formé [26] (Figure 13). Les effets sur l'expression des gènes détermineront la réponse biologique suite à l'activation du récepteur.

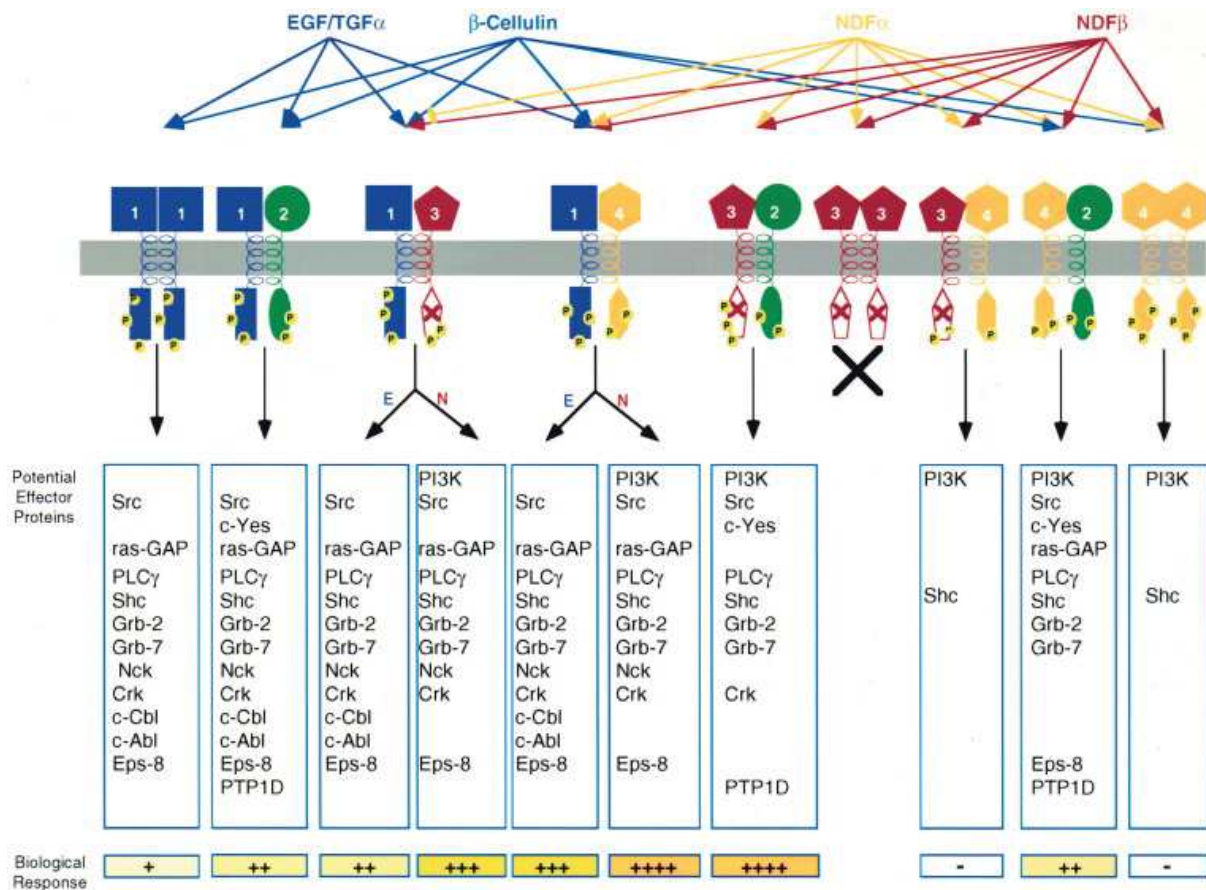


Figure 13: Ligands, dimères formés et protéines effectrices des récepteurs HERs [26]

Les deux voies principales activées, suite à la fixation du ligand sur l'EGFR, sont RAS-RAF-MEK- ERK (extracellular signal-regulated kinases) [27] et PI3K-AKT [28] (fig). Toutes deux sont impliquées dans la prolifération, la survie, la différenciation cellulaire et l'apoptose. Leur activation conduit à la phosphorylation de kinases, de phosphatases, de protéines du cytoplasme et de protéines de l'apoptose [29]. AKT (aussi appelé PKB) et ERK sont également capables de phosphoryler plusieurs facteurs de transcription qui vont agir directement au noyau (tableau 2) comme par exemple les « forkhead transcription factors » FOXO1, FOXO4, FOXO6 et FOXO3a [29][30]. Cette phosphorylation va induire la sortie du noyau de ces facteurs et favoriser leur dégradation [31], ils ne seront alors plus capables de permettre la transcription de leurs gènes cibles et de promouvoir l'arrêt de la prolifération et l'apoptose.

Facteurs de transcription phosphorylés	
ERK	Forkhead transcriptional factor (Fox), c-Jun, SAP1/2, p53, Elk1, STAT1/3, ESR, UBF, BRF1, c-Myc, MLCK, calpain, Pax6 et FAK. <u>Cibles indirectes, via p90RSK ou MSK1/2:</u> CREB, ATF1, HMG14, c-Fos, SRF, ETS. [32] ; [33]
AKT	Forkhead transcriptional factor (Fox) [34] [35] [36], CREB [37], YAP [38], ER-α et -β [39] ; [40], GATA1 et 2 [41], Nur77 [42], Sox2 [43], Tal1 [44] et twist1 [45].

Tableau 2: Facteurs de transcription phosphorylés par ERK et AKT

FOXO3A plus particulièrement, qui promeut l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire via ses cibles (p27, p21, Bim, FasL, TRAIL, etc), va être phosphorylé sur les résidus serine 344, 294 et 425 par ERK [29] et sur les résidus thréonine 32, sérine 253 et 315 par AKT [46]. Les phosphorylations dues à ERK vont favoriser l'interaction entre FOXO3a et MDM2 et conduire à l'ubiquitination de FOXO3a puis sa prise en charge par le protéasome. Les phosphorylations d'AKT quant à elles entraînent la prise en charge de FOXO3a par les protéines 14-3-3 qui vont l'exclure du noyau ce qui favorisera sa dégradation [31] (Figure 14).

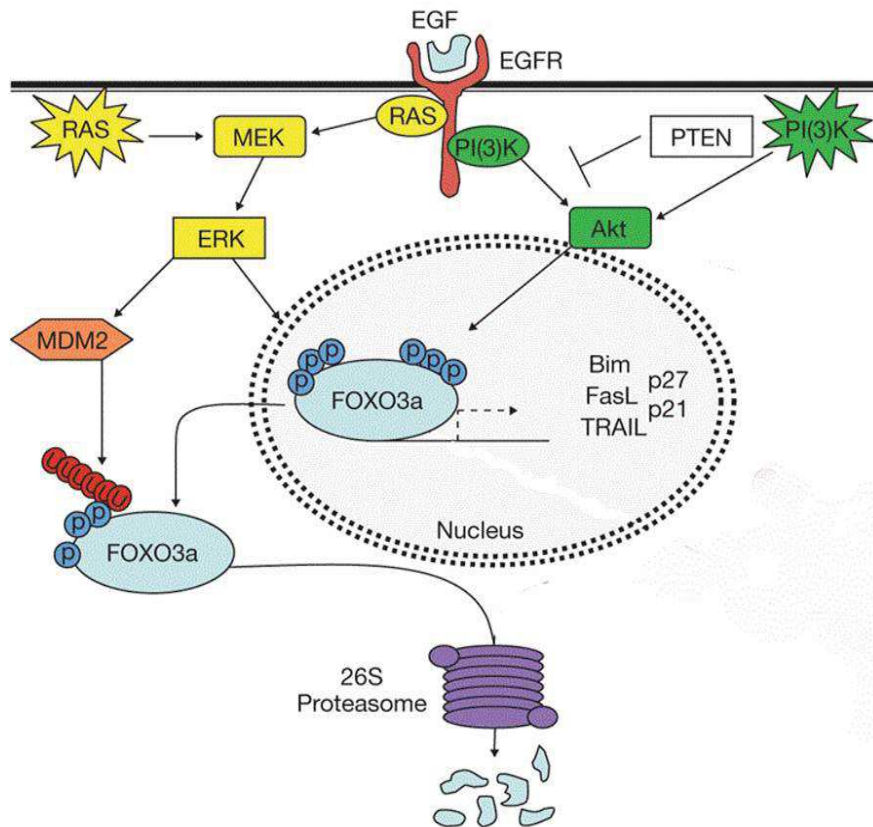


Figure 14: Contrôle de FOXO3a par l'EGF [29]

2.2. Le ciblage de la voie EGFR

Dans la majorité des cancers, le récepteur de l'EGF est surexprimé. Comme nous venons de le voir, cette voie est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire. Il a été également montré que l'expression ou l'activation dans des cellules non cancéreuses peuvent conduire ces cellules à se comporter comme des cellules transformées et qu'une forte expression de l'EGFR dans une tumeur est corrélée à une plus grande agressivité [47], [48]. Il a alors été émis l'hypothèse que l'inhibition de la liaison entre l'EGF et son récepteur ou l'inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur pouvaient être utilisées à des fins thérapeutiques. Rapidement les premiers inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) et anticorps dirigés contre l'EGFR ont été produits.

L'équipe du Dr Sato a produit notamment 3 anticorps anti-EGFR: 528, 225 et 579 IgG. Ils sont capables d'inhiber la fixation de l'EGF sur son récepteur sur des cellules A431 (cellules de carcinome épidermique surexprimant EGFR), HeLa et des fibroblastes. Ils inhibent alors l'activation des récepteurs tyrosine kinase. Ils sont également capables, en plus de bloquer la fixation du ligand, d'induire la dimérisation de l'EGFR et son internalisation. Ces résultats ont

par la suite été également observés dans des cellules cancéreuses de sein, de colon, du poumon, du rein et de la prostate [49].

Plus tard, les études *in vivo* menées sur ces anticorps ont montré que l'anticorps 225 IgG est capable d'inhiber la croissance de tumeurs issues de xénogreffes dans des souris Nude, validant ainsi les résultats obtenus précédemment sur les cultures cellulaires. Cette observation a été faite sur des cellules de sein, du colon et de la prostate. L'effet observé est le même si les auteurs retirent la partie Fc de l'anticorps 225, démontrant que cet effet n'implique pas le système immunitaire [50]. Cependant l'effet de l'anticorps se limite à l'inhibition de la croissance quand il est utilisé dès l'inoculation des cellules cancéreuses, il n'est pas capable de diminuer la taille d'une tumeur après une semaine de croissance sauf dans le cas de tumeurs établies à partir de la lignée DiFi, extrêmement sensible au traitement.

La lignée DiFi

C'est une lignée dérivée d'un patient atteint d'un carcinome colorectal héréditaire. Ces cellules du rectum sécrètent du TGF-Béta et présentent une forte expression d'EGFR [51] due à une amplification génique [52]. La quantité d'EGFR à la membrane des DiFi est deux fois supérieure à celle des A431 usuellement utilisées pour étudier l'EGFR. Elles présentent un statut *KRAS* sauvage [53], ce qui fait de cette lignée un excellent modèle pour étudier la signalisation en aval du récepteur EGFR [51].

2.2.1. Le cetuximab

De part ses résultats prometteurs *in vitro* et *in vivo*, le Mab 225 a été sélectionné pour le développement clinique. Auparavant, il a été produit une version chimérique humain-souris du Mab 225 afin de diminuer la réponse immunitaire qui pourrait se mettre en place contre l'anticorps au cours du traitement. Cet anticorps chimérique, le cetuximab (IMC-C225), est apparu comme plus efficace *in vivo* que la version murine, due à une affinité accrue avec la cible [54]. Cet anticorps est alors capable d'induire la régression de tumeurs xénogreffées établies. Cependant *in vitro* l'effet observé est majoritairement un arrêt de la prolifération mettant en évidence l'existence d'autres mécanismes *in vivo*.

Il a été établi qu'en complément de l'arrêt de la prolifération induite par une augmentation de p27 [55], les DiFi présentent de l'apoptose suite au traitement par le cetuximab [56]. Les

auteurs observent l'activation des caspases 3, -8 et -9, les signes morphologiques de l'apoptose et la fragmentation de l'ADN et démontrent que la voie JNK n'intervient pas dans ce mécanisme.

En plus d'inhiber la prolifération et d'induire de la mort cellulaire, le cetuximab est également capable d'inhiber l'angiogenèse et la formation de métastases. L'inhibition de la voie EGFR conduit à une inhibition de l'activité transcriptionnelle d'AP1 responsable de l'expression, entre autres, du VEGF, de l'IL-8 et du bFGF, tous trois impliqués dans l'angiogenèse et la formation de métastases [57].

En ce qui concerne l'effet immunitaire induit par le cetuximab, la différence entre le C225 privé de sa partie Fc et l'anticorps complet est subtile mais détectable suggérant que même si la mort induite par le système immunitaire n'est pas essentielle elle contribue à l'effet global observé [58;50]. Via sa partie Fc, le cetuximab est capable de recruter les cellules NK et d'induire la mort par le système ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity). La quantité d'EGFR à la membrane ne modifie pas cet effet, même une quantité faible suffit à induire l'ADCC et une augmentation du nombre d'EGFR membranaire n'augmente pas la mort induite par les NK [59].

Les patients présentant des polymorphismes sur les récepteurs des Fc à la surface de cellules de l'immunité présentent des différences de réponse impliquant un nouveau mécanisme de résistance ou de réponse [60;61].

Cependant ces études ont été menées *in vitro* ou *in vivo* sur des xénogreffes et ne prennent pas en compte l'immunité adaptative. En 2013, une équipe a découvert que cette immunité participe à l'effet du cetuximab. Plus particulièrement via les cellules T CD8+ car ils ont observé que leur absence diminue la régression des tumeurs xénogreffées [62].

Les anti-EGFR ont clairement été montrés comme ayant un effet synergique en combinaison avec l'utilisation de chimiothérapies dans le traitement du cancer [63] et le cetuximab ne fait pas exception que ça soit avec de fortes doses [64;50] ou à des doses suboptimales de chimiothérapie [64]. Plus particulièrement dans le cancer colorectal, la combinaison du cetuximab avec le topotécan (dérivé de la camptothécine comme l'irinotécan) ou l'irinotécan est synergique si elle est utilisée de manière séquentielle avec en premier lieu le topotécan/irinotécan puis le cetuximab. Ceci s'explique par le fait que les dérivés de la camptothécine nécessitent le passage des cellules en phase de synthèse pour induire les cassures d'ADN et que le cetuximab bloque les cellules en phase G1 [65]. *In vitro* et *in vivo*, le cetuximab potentialise l'activité d'agents chimiothérapeutiques aux mécanismes d'actions

différents. C'est pour cette raison que les premiers essais cliniques sont majoritairement des essais de combinaison et très peu d'études observent la réponse des patients au cetuximab seul comparée à un placebo. Les essais incluent des patients en échec face à des chimiothérapies conventionnelles comme l'irinotécan ou l'oxaliplatine. L'étude qui a permis au cetuximab d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) est l'étude de phase II BOND où le cetuximab a été comparé à l'association cetuximab + irinotécan chez des patients devenus résistants à l'irinotécan. Cette étude a montré un bénéfice de la combinaison, au niveau du taux de réponse (RR) et du temps de survie sans progression (PFS) [66], démontrant la capacité du cetuximab à sensibiliser de nouveau les patients résistants à l'irinotécan. Cependant, si l'ajout du cetuximab augmente le taux de réponse et la PFS, il n'y a pas de différence significative au niveau de la survie globale (OS). Sachant que cette différence entre bénéfice en PFS et non en OS peut être due au mélange de patients initialement inclus dans le bras du traitement seul ayant reçu la combinaison suite à une forte progression de leur maladie.

L'une des rares études comparant le cetuximab à un placebo, chez des patients où les chimiothérapies avaient échoué, démontre que le cetuximab stabilise la maladie et prolonge la survie [67]. Le panitumumab, qui est aussi un anti-EGFR, en revanche augmente la PFS mais pas l'OS [68].

Les résistances au cetuximab

Seulement 39% des patients, de l'étude de Jonker *et al*, ont répondu à cette thérapie mettant en évidence la nécessité de trouver des biomarqueurs de réponse au cetuximab.

La première hypothèse qui a été émise était que la réponse serait corrélée à la présence d'EGFR détectable en immunohistologie et à son niveau d'expression. Mais rapidement les résultats ont montré des réponses chez les patients ne présentant pas d'EGFR détectable en immunohistologie [66;69]. La raison pour laquelle il n'y a pas de lien entre EGFR détectable et réponse à cet anti-EGFR peut être liée à la méthode de détection ou encore à la part de mort cellulaire dépendante de l'anticorps induite par les cellules NK et les monocytes suite à la fixation de l'anticorps sur sa cible. En ce qui concerne le récepteur EGFR, si les études montrent des résultats discordants en ce qui concerne le lien entre expression du récepteur et réponse au cetuximab, une mutation de l'EGFR a été décrite comme mécanisme de résistance acquise au cetuximab : la mutation S492R [70]. De manière intéressante cette mutation ne change pas la réponse à un autre anticorps anti-EGFR: le panitumumab.

Il est alors apparu que si le niveau de récepteur lui-même n'influe pas la réponse au cetuximab, le nombre de copies de son gène en revanche est un marqueur de résistance [71;72]. Si les mutations de l'EGFR sont rares, des mutations au niveau des protéines des voies de signalisation en aval sont également responsables de l'absence de réponse au cetuximab.

Les mutations KRAS

En 2006, une équipe a montré que KRAS mutée sur les codons 12 et 13 est un facteur prédictif de réponse au cetuximab [73]. Leurs résultats ont par la suite été confirmés sur un plus grand nombre de patients [74].

Les mutations KRAS sur les codons 12 et 13 concernent 40% des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Elles entraînent une activation constitutive de la voie Ras-ERK et donc l'inefficacité du cetuximab mais également des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) comme l'erlotinib ou le gefitinib [73]. Les mutations KRAS sur les codons 12 et 13 sont à ce jour le seul biomarqueur de réponse validé en clinique pour le cetuximab bien que d'autres mutations inhibant la réponse à cet anticorps aient été découvertes. Des mutations plus rares sur d'autres positions du gène *KRAS* ont également été décrites comme étant des facteurs qui peuvent prédire la résistance au cetuximab, comme les mutations sur les codons 61 et 146 [75].

Une équipe a montré que l'ingénierie des anticorps, la glycosylation, peut permettre à un anticorps anti-EGFR de conserver un effet antitumoral malgré les mutations KRAS en augmentant le potentiel d'activation du système immunitaire. En effet, l'ajout d'un fucose au cetuximab (l'afucosylation) favorise la liaison de l'anticorps au récepteur des fragment Fc et donc le recrutement des cellules de l'immunité [76]. Une autre équipe a montré que l'ajout d'un radioélément, le ^{64}Cu , au cetuximab permet d'avoir un effet anti-tumoral indépendamment du statut *KRAS*. En effet, la fixation du cetuximab sur son récepteur entraîne son internalisation et permet l'apport du radioélément au noyau où le ^{64}Cu va pouvoir affecter l'ADN [77].

Il reste encore une forte proportion de patients *KRAS* sauvage qui ne répondent pas au cetuximab. Il est donc nécessaire de déterminer les autres facteurs impliqués dans la réponse à cet anticorps.

Les autres modifications de la voie EGFR impliquées dans la réponse au cetuximab

Une forte expression des ligands épiréguline et amphiréguline, contrairement aux mutations *KRAS* prédictives de résistance, a été montrée comme ayant un impact positif sur la réponse au cetuximab [78]. Cependant la détection de cette particularité nécessite des échantillons tumoraux frais qui sont difficiles à obtenir. L'étude de polymorphisme du gène de l'EGF semble être plus facile à effectuer et est également lié à la réponse au cetuximab [79]. Les patients présentant une homozygotie du SNP *EGF61* montrent de meilleures chances de répondre positivement au traitement avec une meilleure survie globale médiane que ceux présentant une hétérozygotie.

Le récepteur MET est également un activateur des voies de prolifération et de survie PI3K/AKT et RAS/ERK. Une équipe a montré que l'inhibition de MET peut restaurer la sensibilité de lignées cellulaires colorectales au cetuximab en inhibant la production de TGF- α induite par le dimère EGFR-MET sous traitement à l'anticorps [80].

Des mutations de la voie PI3K/AKT ont également été répertoriées, comme la mutation sur l'exon 20 de *PI3KCA* qui est la sous-unité catalytique de PI3K [81]. Le statut de *PTEN* a également été étudié et montré comme associé à la résistance au cetuximab mais il a été observé une différence de réponse entre la tumeur primaire et les métastases [82].

En aval de *KRAS*, les patients présentant une mutation de BRAF V600E répondent moins bien que les patients BRAF sauvage [83]. Encore une fois ce marqueur n'a pas été validé car des résultats contraires ont été montrés [84].

Dans le tableau suivant (tableau 3) sont répertoriées les différentes modifications étudiées comme biomarqueurs de réponse au cetuximab.

Biomarqueur	Incidence	Valeur prédictive
Expression EGFR	80-85%	Non
Nombre de copies du gène EGFR	6-51%	Oui [71] ; [72]
Expression amphiréguline et épiréguline	NR	Oui [78]
Mutations <i>KRAS</i>	35-45%	Oui et c'est à ce jour le seul critère de sélection des patients pour le cetuximab [73]
Mutation BRAF V600E	4-15%	Controversé [83;84]
Mutation PI3KCA exon 20	10-20%	Controversé [85;81;86]
Status PTEN	19-42%	Controversé [87]
Nombre de copies du gène <i>KRAS</i>	NR	Oui, à valider sur une plus grande cohorte [88]
Expression MET	NR	Oui <i>in vitro</i> à confirmer chez les patients [80]

Tableau 3: liste des biomarqueurs potentiels de réponse aux anti-EGFR
(adapté de [89])

L'utilisation du cetuximab est une approche qui a montré son efficacité en clinique pour traiter le CCR cependant l'abondance des mutations entraînant des résistances réduit le nombre de patients pouvant bénéficier de ce traitement (Figure 15). C'est pourquoi il semble essentiel d'élucider les mécanismes mis en jeu afin de découvrir de potentielles cibles thérapeutiques pouvant contourner toutes les mutations évoquées tout en gardant les bénéfices de l'inhibition de la voie EGFR.

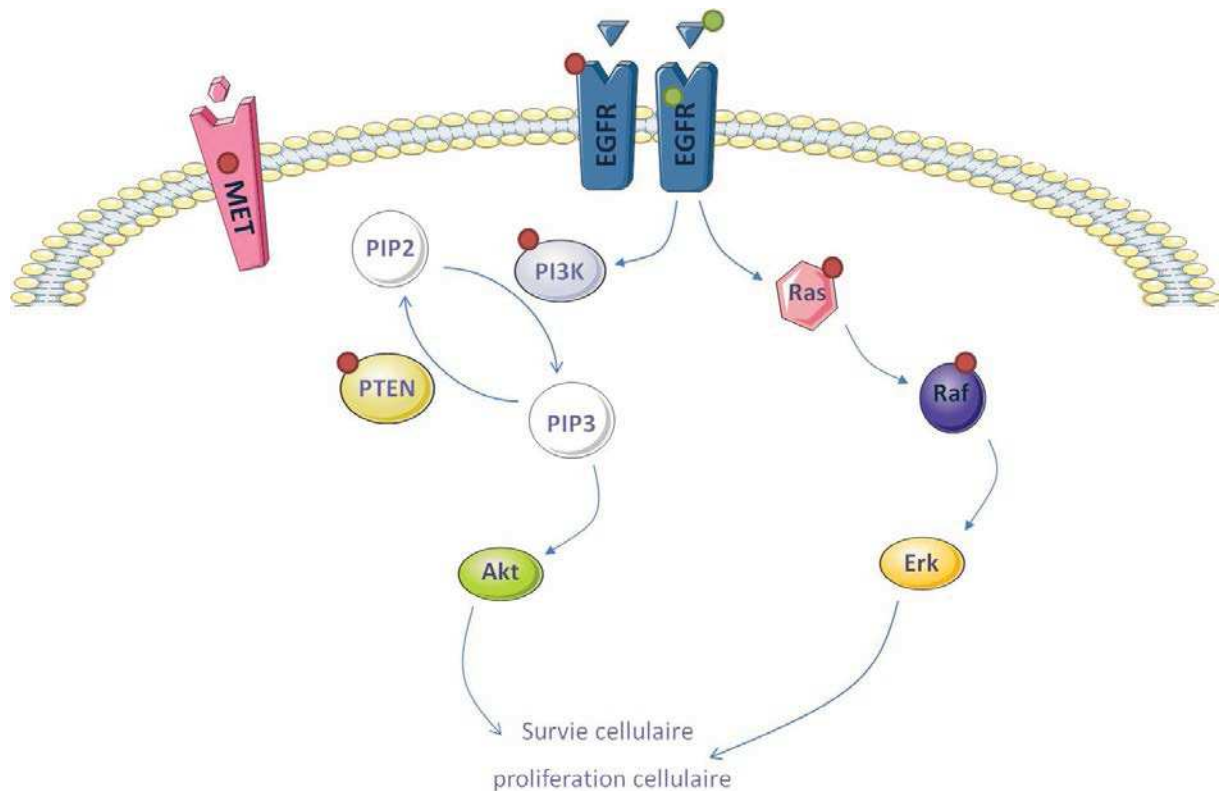


Figure 15: Voie de signalisation de la survie et de la prolifération.

En vert sont pointées les modifications qui semblent conférer une meilleure réponse des tumeurs et en rouge les modifications conférant une résistance au cetuximab.

Lors de la fixation du cetuximab ou des inhibiteurs de tyrosine kinase, les voies PI3K/ATK et RAS/ERK sont très bien décrites dans la littérature. Cependant peu d'informations existent sur l'influence des inhibiteurs de l'EGFR sur les facteurs de transcription. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux zones d'ombres des mécanismes de l'inhibition de l'EGFR.

2.2.1. Les inhibiteurs de tyrosine kinase

En ce qui concerne les ITK ciblant l'EGFR, il en existe à ce jour plus d'une dizaine (gefitinib, erlotinib, lapatinib, canertinib, neratinib, vandetanib, AEE788, etc). Seulement 3 d'entre eux ont obtenu l'AMM: l'erlotinib, le gefitinib et le lapatinib (inhibiteur EGFR/HER2) (Figure 16). Ils ont montré une activité antiproliférative avec un arrêt en phase G1 induite par une expression de p27 dans les cancers du colon et du sein [90;91;92] et apoptotique sur des lignées cellulaires de cancer colorectal [93;94;95]. Tous les trois sont capables d'induire une inhibition des voies ERK et AKT et une augmentation de FOXO3a [96;97;92].

Cependant ils présentent moins d'avantages que les anticorps. Les anticorps anti-EGFR déclenchent une réaction immunitaire, ont une demi-vie plus longue et diminuent la quantité d'EGFR à la membrane. De plus, les ITK peuvent potentiellement avoir des réactions croisées avec d'autres cibles.

Les inhibiteurs de tyrosine kinases comme l'erlotinib ou le gefitinib ne sont pas aussi efficaces que le cetuximab dans le CCR [98;99].

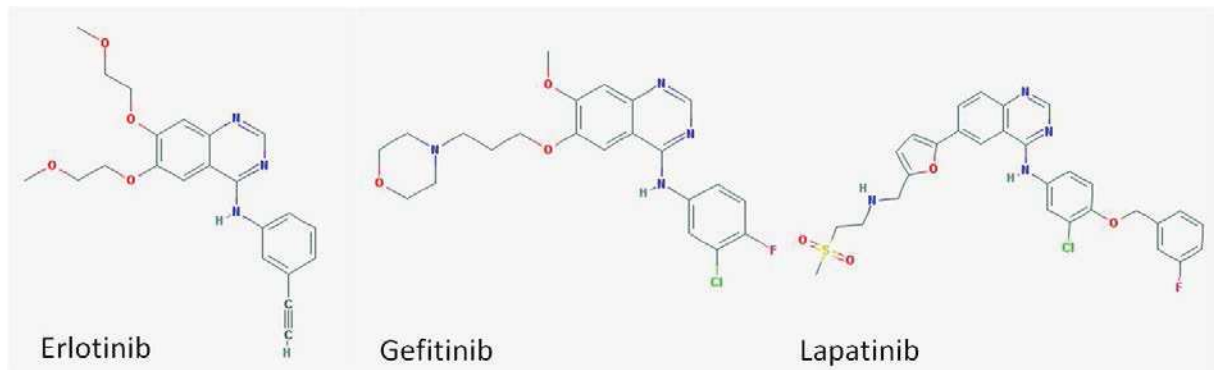


Figure 16: Formules de trois ITK ciblant l'EGFR

III. La MAP Kinase p38

3.1. Les MAPKs

Les « Mitogen activated protein kinase » (MAPKs) ont pour rôle de convertir les stimuli extracellulaires en réponses cellulaires adaptées comme la prolifération, la migration, l'inflammation ou la survie. Il y a quatre voies MAPK très bien décrites: extracellular signal-regulated kinase 1 et 2 (ERK1/2), Jun amino-terminal kinase (JNK), ERK5 et MAPK p38 (p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ). Et quatre autres ont été identifiées plus récemment: ERK3, ERK4, ERK7 et ERK8.

Leur activation nécessite une double phosphorylation sur leur motif thréonine-X-tyrosine médiée par les MAPK kinases (MAP2K). De manière générale, suite à la détection d'un stress, de cytokines ou de facteurs de croissance, les récepteurs de surface vont être activés et phosphoryler les MAPK kinases kinases (MAP3K). À leur tour, ces MAP3K vont activer les MAP2K responsables de l'activation des MAPK (Figure 17). Ces protéines ont pour cibles d'autres protéines kinases mais aussi des facteurs de transcription et des protéines cytoplasmiques. Leur régulation négative se fait via des phosphatases.

Les voies MAPKs sont complexes mais spécifiques des signaux extracellulaires détectés. Les interactions séquentielles entre les MAP2Ks et les MAPKs permettent l'activation de plusieurs MAPKs différentes sous un même stimulus. Ces voies peuvent s'autoréguler en modifiant l'expression des ligands et en inhibant les récepteurs de surface par une boucle de rétroaction.

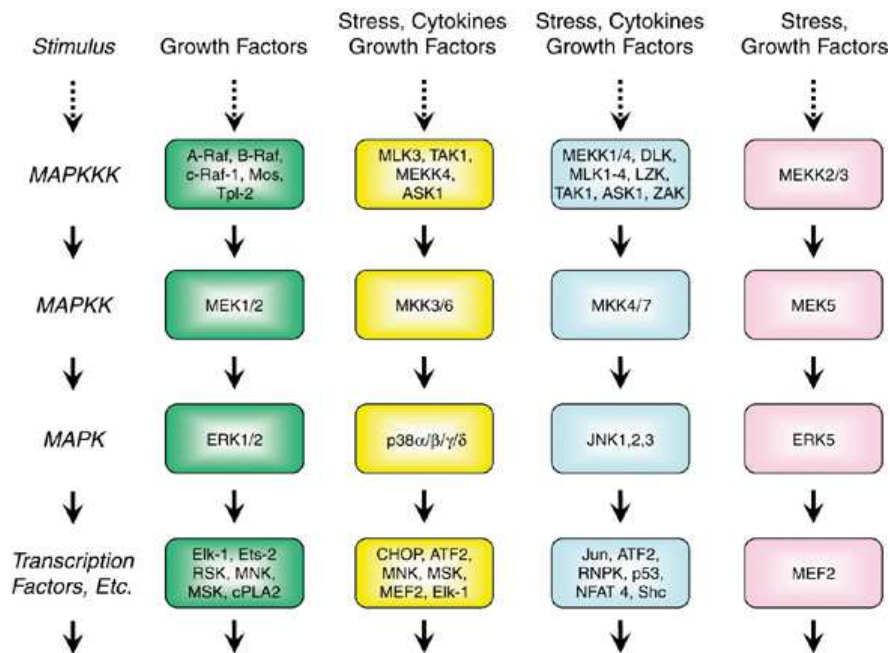


Figure 17: Différentes voies MAPK [27]

Les MAPK peuvent agir dans le noyau, sur des facteurs de transcription liés à l'ADN mais également réguler l'expression de gènes via des cibles cytoplasmiques et réguler la traduction via des kinases effectrices comme MNK1 capable de phosphoryler un facteur d'initiation de la traduction: eIF-4e [100].

Comme nous l'avons vu plus tôt, ERK est impliqué dans la survie et la prolifération. JNK et p38 en revanche sont plutôt décrit pour être impliqués dans l'apoptose [101] mais ces attributions dépendent du type cellulaire et du contexte.

3.2. La MAPK p38

Il y a quatre gènes qui codent pour les MAPKs p38: MAPK14 (p38α), MAPK11 (p38β), MAPK12 (p38γ) et MAPK13 (p38δ). La MAPK p38α est la plus exprimée dans la plupart des types cellulaires et la majorité des publications sur la MAPK p38 se réfèrent à cette isoforme. Les trois autres sont plus faiblement exprimés ou sont spécifiques de certains tissus.

Les MAPK p38 peuvent être distinguées en deux sous groupes, p38α et β d'un côté et p38γ et δ de l'autre, en fonction de plusieurs critères comme leurs homologies de séquence, les différences d'expression tissulaire, leur substrat spécifiques et leur sensibilité à des inhibiteurs de type pyridyl imidazole (SB203580 et SB202190). La p38β est identique à la p38α à 75% contre 62% et 61% respectivement pour les p38γ et δ, sachant qu'entre elles, ces dernières, possèdent 70% d'homologie de séquence d'acide aminés [102]. Ces différences de

séquences entre les deux sous-groupes sont notamment à l'origine de leur sensibilité ou non aux inhibiteurs SB203580 et SB202190. Ces molécules se fixent à la poche d'ATP des p38 α et β grâce à la présence d'un acide aminé thréonine en position 106, les p38 γ et δ en revanche présente une méthionine à cette position qui ne permet pas la fixation de ces molécules ce qui explique leur insensibilité à ces inhibiteurs [103]. Les MAPKs p38 ont également des substrats qui leurs sont spécifiques. Ainsi les p38 α et β peuvent phosphoryler MAPKAP-K2, MAPKAP-K3 et la glycogène synthase alors que les p38 γ et δ peuvent phosphoryler les protéines Tau, syntrophine α 1, SAP90/PSD95 et SAP97/hDlg [102]. En ce qui concerne leur expression, les p38 α et β sont exprimées de manière ubiquitaire alors que l'expression des p38 γ et δ est tissu spécifique. Elles ont été identifiées dans le muscle squelettique pour p38 γ [104] et dans le poumon, le rein, le testicule, le pancréas et l'intestin grêle pour p38 δ [105].

3.2.1. Les mécanismes d'activation de la MAPK p38

L'activation de la voie des MAPKs p38 est fortement déclenchée par les stimuli de stress environnementaux (UV, radiation), par des cytokines inflammatoires principalement et moins stimulée par les facteurs de croissance. En premier lieu, la voie a été étudiée pour son rôle dans l'inflammation, il a alors été découvert qu'elle est impliquée dans l'activation des macrophages mais aussi dans la stimulation des cellules endothéliales par le TNF, des chondrocytes, des lignées cellulaire de monocytes, des plaquettes et des neutrophiles sous l'action de différentes interleukines et facteurs (IL-2,-3,-7,-17,-18 ; TNF, NGF, IGF, VEGF, PDGF et EGF- β) [106].

Une fois le stress détecté ou les ligands sur leur récepteurs, le signal sera transmis aux GTPases de la famille Rho telles que Rac1 et Cdc42 qui vont être responsables de l'activation des MAP3K [107;102]. Les MAP3K, notamment MEKK (MAPK/ERK kinase kinase), MLK (mixed-lineage kinase), ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), TAO (thousand-and-one amino acid) et TAK1 (TGF β -activated kinase 1) vont alors activer les MAP2K.

Ce sont les MAP2K comme MKKs 3, 4, 6 et 7 qui vont finalement transmettre les signaux extracellulaires aux MAPKs p38 en les activant à leur tour. Seule MKK6 est capable de phosphoryler les quatre MAPKs p38. La MKK3 active p38 α , γ et δ , tandis que MKK4 active p38 α et δ et la MKK7 seulement p38 δ (Figure 18). Cette activation se fait par phosphorylation des résidus thréonine-X-tyrosine qui va entraîner un changement de conformation permettant à la fois l'accessibilité des substrats et le rapprochement des sites porteurs de l'activité kinase, les domaines N-terminal et C-terminal.

Bien que ces voies soient les principales responsables de l'activation de la MAPK p38, en parallèle, la MAPK p38 est également capable de s'autophosphoryler de manière indépendante des voies décrites ci-dessus. La première autophosphorylation décrite se produit via une interaction avec la protéine TAB1 (TAK1-binding protein 1) [108]. La deuxième a été observée dans les cellules T, suite à l'activation du TCR (T cell receptor) la MAPK p38 va être phosphorylée sur le résidu tyrosine 323 par ZAP70 ce qui va induire son autophosphorylation [109].

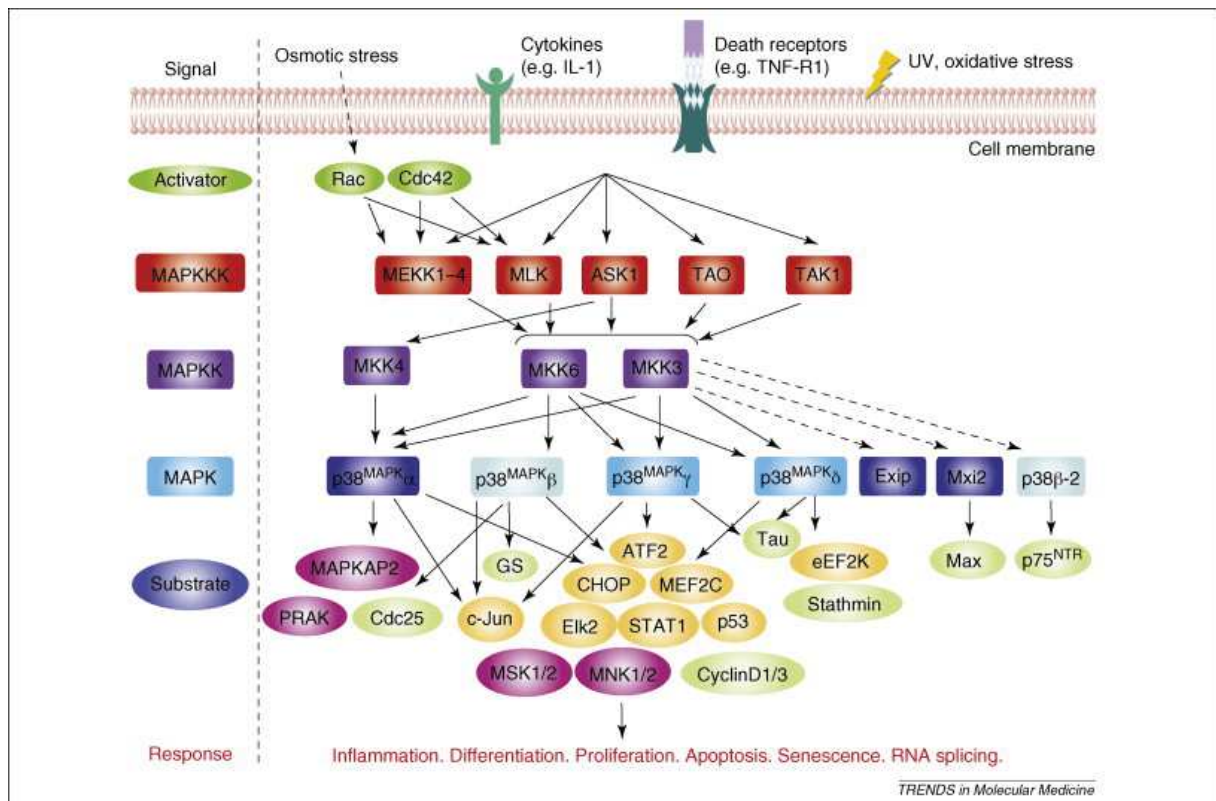


Figure 18: Signalisation de p38 [110]

3.2.2. L'inhibition de la voie MAPK p38

L'activation de la voie MAPK p38 est rapide et transitoire mais le niveau de p38 reste stable suggérant une régulation négative par déphosphorylation. Plusieurs phosphatases ont été montrées comme étant responsable de l'inactivation de p38: les MAPKs phosphatases (MKP), les PP2A et C et les PTPs.

Les MKPs sont des « Dual Specificity Phosphatase » qui déphosphorylent directement les résidus thréonine et tyrosine du motif thr-X-tyr des MAPKs p38. Seulement quatre membres de cette famille sont capables d'inactiver p38: MPK-1, -4, -5 et -7 [106]. Les PP2A et C quant à elles sont des serine/thréonine phosphatases qui inactivent les MAP2Ks: MKK4

et 6. Enfin, les PTPs sont des tyrosines phosphatases. Une fois la tyrosine de p38 déphosphorylée, p38 est monophosphorylée sur le résidu thréonine et son activité est alors diminuée de 10 à 20 fois [111].

Afin d'étudier la voie MAPK p38, des molécules de type pyridinyl imidazole ont été utilisées: le SB203580 et le SB202190. Ces deux molécules sont capables de se fixer dans la poche à ATP des p38 α et β empêchant ainsi leur accès à l'ATP et leur activité kinase. Bien que définis comme des inhibiteurs spécifiques, ils sont également capables, dans un système *in vitro* purifié, d'inhiber CK1 δ , GSK3 β , RIP2 et GAK [112]. Pour cette raison les auteurs recommandent de confirmer les résultats obtenus avec les SBs avec un autre inhibiteur ou par extinction de l'expression de p38 α ou β .

D'autres compétiteurs de l'ATP ont été développés: les pyrimidopyridazinones, les pyrimidinones, les pyrazoles ketones (RO3201195, VX745 and AMG548) (Figure 19).

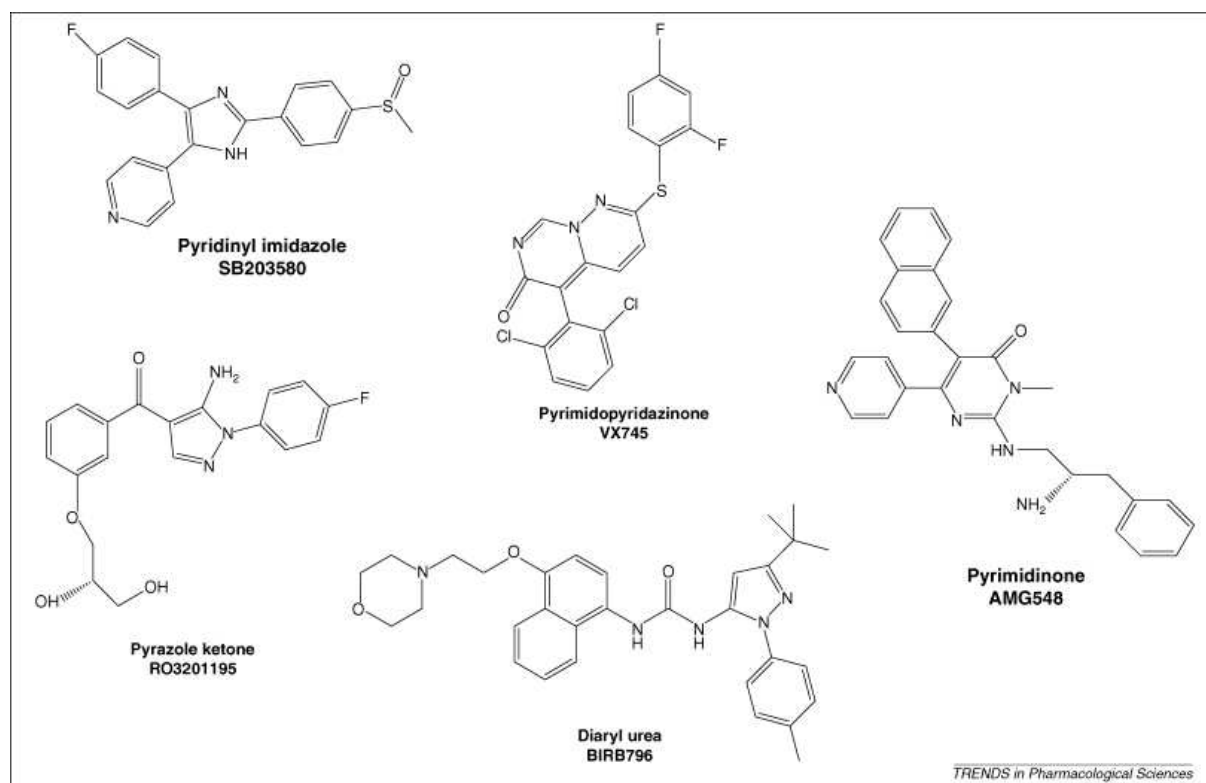


Figure 19: Différentes classes d'inhibiteurs de p38 [113]

Une autre classe d'inhibiteur a également été développée avec un mécanisme d'inhibition différent: le BIRB. Cette molécule induit un changement conformationnel qui verrouille la MAPK p38 dans une conformation inactive. Si sa cible principale est la MAPK

p38 α , il est également capable d'inhiber les trois autres isoformes. De plus, dans le même contexte que les SBs précédemment décrits, il peut également inhiber JNK2.

3.2.3. Les substrats des MAPKs p38

L'utilisation des inhibiteurs a permis d'identifier les cibles des MAPKs p38. Parmi ces substrats on peut retrouver des protéines kinases impliquées dans différents processus, des protéines nucléaires comme des facteurs de transcription ou de remodelage de la chromatine mais aussi des protéines cytoplasmiques ayant un rôle dans les processus de dégradation ou de relocalisation des protéines, dans la stabilité des ARNm, dans l'endocytose et l'apoptose ou encore dans la migration cellulaire et la dynamique de cytosquelette [111].

a. Les protéines kinases

Le premier substrat de p38 identifié est la MAPKAP-K2 [114]. Rapidement, une protéine de la même famille est également identifiée comme cible: MAPKAP-K3. Ces deux kinases sont impliquées dans le remodelage de l'actine via la protéine HSP27 (Heat Shock protein) et dans l'élongation des ARNm via eEF2K (eukaryotic elongation factor 2 kinase). De plus, MAPKAP-K2 et 3 favorisent le recrutement des ARNm par Ago2 (Argonaute2) [115] et TTP (tristetraprolin) [111], qui sont des inhibiteurs de la traduction. La voie p38/MAPKAP-K2 est très importante dans la stabilisation des ARNm qui possèdent une région riche en AU (AU rich element) via HuR, qui stabilise les ARNm de protéines de réponse aux stress et impliquées dans la prolifération [116;117].

Plusieurs substrats kinases impliqués dans l'induction de la transcription de gènes précoces de réponse aux stress et aux stimuli sont des cibles de p38 comme MSK1 et 2. Ces deux kinases contrôlent le remodelage de la chromatine ou le recrutement du système de transcription via CREB, ATF1, p65, STAT1 et 3 (Signal transducer and activator of transcription), l'histone H3, HMG-14 et p53 [118;119].

Les MAPKs p38 peuvent également agir au niveau de la synthèse des protéines via MNK1 et 2 responsables de l'activation du facteur eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E)[120].

b. Les protéines cytoplasmiques

La MAPK p38 est impliquée dans le renouvellement de protéines via la régulation de la dégradation médiée par le protéasome ou par internalisation de récepteur comme l'EGFR. Elle est capable de phosphoryler directement l'EGFR et induit son internalisation clathrine-dépendante avec la participation de protéines effectrices Rab5 [121].

De plus, suite au contact cellule-cellule, p38 va inhiber la prolifération via la dégradation de l'EGFR. p38 va phosphoryler et stabiliser Siah2, une ubiquitine ligase qui régule négativement Sprouty2. Sprouty2 est une protéine inhibitrice de cCbl qui est responsable de la dégradation de l'EGFR. [122] (Figure 20).

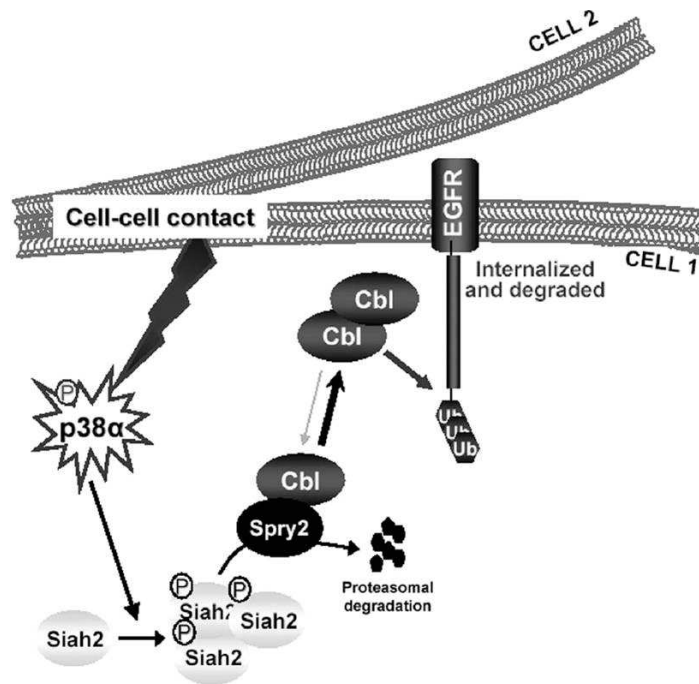


Figure 20: inhibition de la prolifération par p38 via Sprouty2 [122]

Dans un contexte d'inflammation ou de stress en revanche, p38 active la prolifération via l'EGFR. Elle phosphoryle et active TACE (TNF α -converting enzyme), une métalloprotéase associée à la membrane qui va participer à la libération des facteurs de la famille du TGF α . Ces facteurs vont induire la survie cellulaire et la prolifération en activant l'EGFR [123] (Figure 21). Ce processus peut notamment participer à la prolifération de

cellules cancéreuses et au développement de métastases. Par exemple, dans le cancer de la prostate, MMP-2, une métalloprotéase induite par le TGF- β , est dépendante de p38 [124].

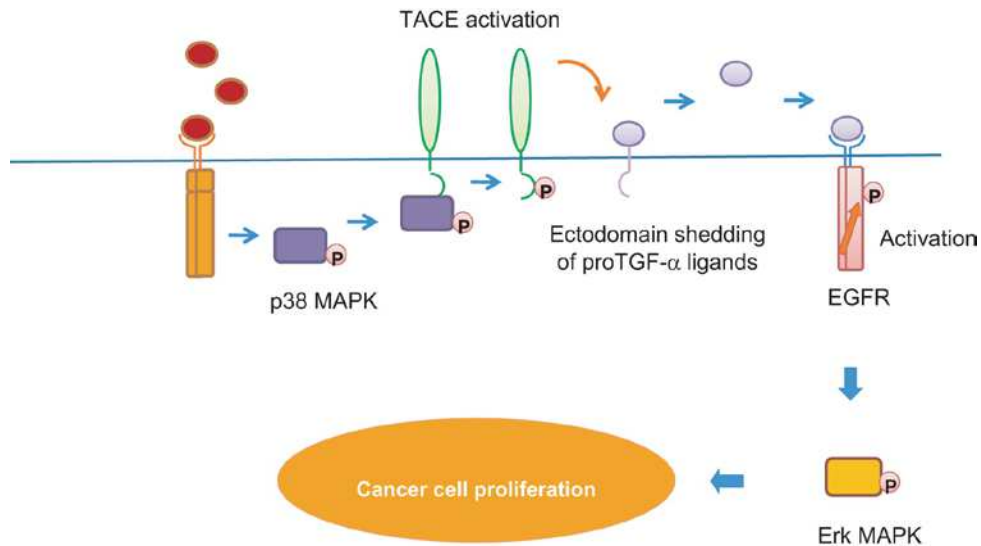


Figure 21: Implication de p38 dans la stimulation de la prolifération [123]

p38 peut également participer à l'induction de l'apoptose via la dégradation des protéines FLIPs. Les FLIPs sont des protéines similaires aux caspases 8 mais ne possèdent pas d'activité protéolytique. Cependant elles possèdent le site de fixation au FADD, de cette manière elles bloquent le recrutement de la caspase 8 par le FADD et inhibent l'apoptose induite par le TNF. p38 peut phosphoryler les FLIPs et ainsi favoriser leur interaction avec cCbl ce qui va conduire à leur dégradation, à l'activation de la caspase 8 et à l'apoptose [125].

La MAPK p38 participe à la régulation du cytosquelette via la protéine Tau et la stathmine lors d'un stress osmotique [126;127].

c. Les protéines nucléaires

La MAPK p38 est responsable de la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription comme ATF1, 2 et 6, SAP1, p53, MEF2C et MEF2A (pour revue [128]). Plus récemment, l'équipe du Dr E. Lam a découvert un nouveau facteur de transcription cible de p38: FOXO3a. Comme vu précédemment, FOXO3a est régulé négativement par les voies ERK et AKT qui l'accumulent dans le cytoplasme pour y être dégradé. Ici le rôle décrit de

p38 est un rôle de relocalisation de ce facteur de transcription vers le noyau, permettant ainsi son activité transcriptionnelle et l'expression de ses gènes cibles [129].

La voie p38 peut également intervenir sur le remodelage de la chromatine via MSK1 et l'histone H3. En étant responsable de la phosphorylation de l'histone H3, p38 augmente l'accessibilité de NF- κ B à ses sites de liaison à l'ADN [130]. En induisant un relâchement de la chromatine, elle permet également aux facteurs de réparation de l'ADN d'accéder aux lésions induites par les UV [131].

Compartiment	Cibles de p38
Noyau	SAP1; FOXO3a; PRAK; Pax6; p53; STAT1; Max; Myc; Elk1; CHOP; MEF2A, C et D; ATF1, 2 et 6; ETS1; MSK1 et 2; MAPKAPK2 et 3; cdc25c; caspases3 et 6; Fra1; JunB et D.
Cytoplasme	EEA1; Rho-GDI; eEF2K; MNK1 et 2; cPLA2; Tau; Siah2; FLIPs; Stathmine; MAPKAPK2 et 3; Ago2; TTP; HuR; AP2 α ; NF- κ B, CEBP α et γ .
Membrane cellulaire	EGFR et TACE.

Tableau 4: Listes des cibles de p38 dans les différents compartiments cellulaires
[132;110;111;133;134;135]

3.2.4. Les rôles physiologiques et pathologiques de p38

Au travers des multiples cibles qui viennent d'être décrites, la MAPK p38 a un rôle dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques comme l'inflammation, la prolifération, la migration, la mort cellulaire ou la survie. La dérégulation de la voie de p38 est donc à l'origine de pathologies liées à ses rôles dans les différents organes (Figure 22).

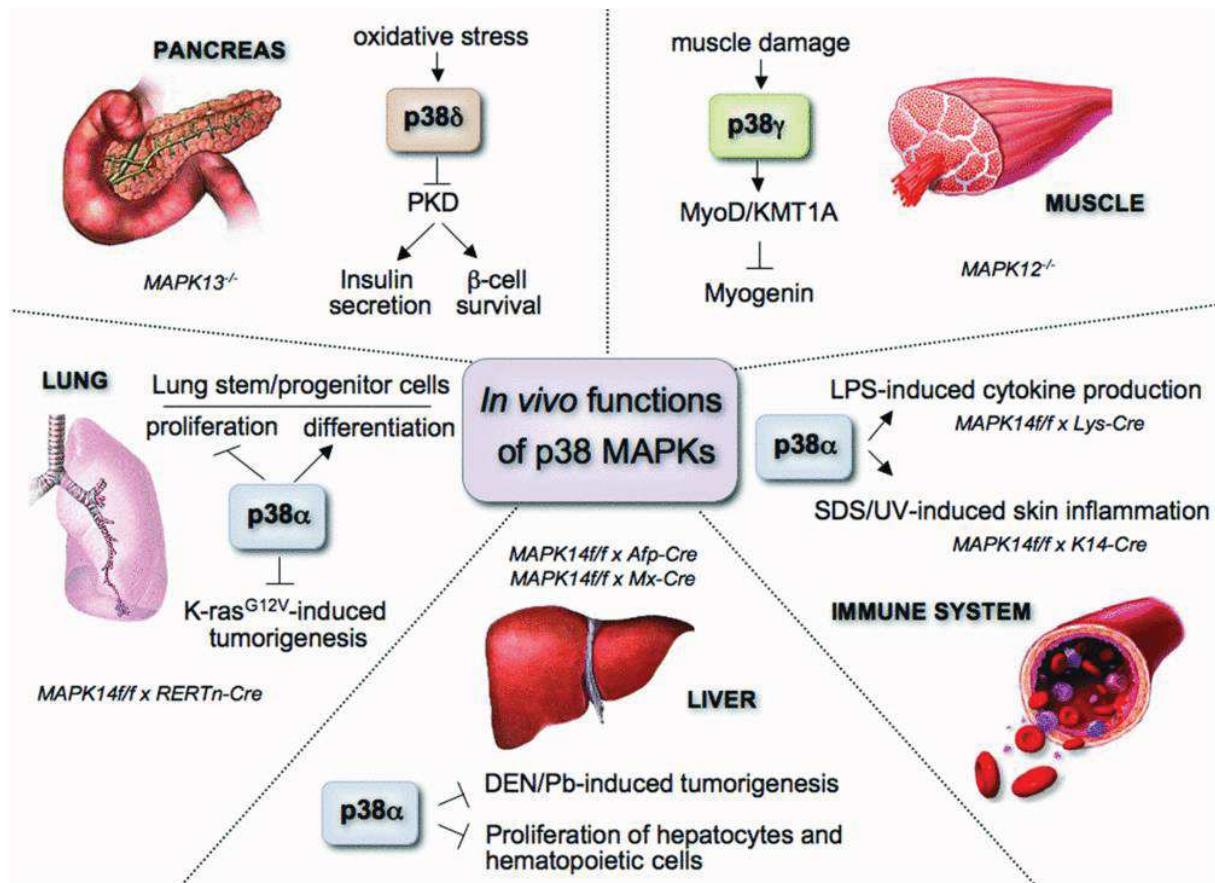


Figure 22: Implication physiologique de p38 [111]

a. p38 et inflammation

Il s'agit d'un des premiers rôles établis de p38. Elle est impliquée dans la régulation de la biosynthèse des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α et l'IL-6 [136]. Notamment via une enzyme : COX-2 [137]. Elle régule également l'expression d'une autre enzyme: iNOS (inducible nitric oxide synthase) qui régule l'oxydation par la production d'oxyde nitrique [138]. Ce rôle de p38 sur ces cytokines peut contribuer à la progression tumorale, via leur rôles pro-angiogénique et de survie, de plusieurs cancers comme le cancer du sein, les gliomes et le cancer de la prostate [139;140;141]

D'autre part, p38 régule également des protéines d'adhésion impliquées dans l'inflammation comme VCAM [142], la prolifération et la différenciation de cellules de l'immunité induite par les facteurs de croissance GM-CSF (Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor), CSF, l'EPO (érythropoïétine), et le CD40 [143;144].

C'est via ces cibles et le contrôle de la production des cytokines que p38 se trouve impliquée dans plusieurs pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn,

le psoriasis et l'asthme chronique [145]. Mais également dans d'autres pathologies que les maladies inflammatoires comme les maladies cardiovasculaires [146], les rétinopathies ischémiques [147] et le développement de résistance à l'insuline dans le diabète [148].

b. p38 et cycle cellulaire

Plutôt décrite comme impliquée dans l'apoptose, p38 est aussi étudiée pour son rôle dans le cycle cellulaire. Des études suggèrent notamment que p38 participe à l'arrêt de la transition de la phase G1 à la phase S via deux mécanismes différents selon le contexte cellulaire.

Dans le contexte d'une cellule adhérente, p38 induit la répression du promoteur de la cycline D1 et donc la progression de la phase G1 vers la phase S via la stabilisation des protéines p21 et HBP1 [149] mais aussi via CHOP/GADD153 (growth arrest and DNA damage-153) [150].

Dans le contexte d'une cellule non adhérente, comme des fibroblastes primaires murin non-adhérents, p38 va être inhibée ce qui va conduire à une augmentation de l'expression de la cycline A et donc à la transition G1/S [151].

La protéine p53, un autre régulateur de la progression dans le cycle, est décrite comme cible de p38 [152]. Dans la lignée murine BJ6 (épiderme), p53 régule l'expression de régulateurs comme l'inhibiteur de cdk: p21. La phosphorylation de p53 va conduire à sa stabilisation par le blocage de son interaction avec Mdm2 [153].

A l'inverse, p38 peut promouvoir la prolifération en phosphorylant pRb (retinoblastoma protein) et ainsi lever l'inhibition de la prolifération induite par la répression de pRb sur E2F dans la lignée Jurkat [154].

D'autre part, p38 est nécessaire pour l'arrêt en phase G2 induit par les radiations γ et les UV. La MAPK p38 γ phosphoryle Chk2 qui, à son tour, phosphoryle cdc25c [155]. À l'aide de l'inhibiteur SB202190 il a également été établi que les MAPKs p38 α et β ont également un rôle dans le blocage de l'entrée en mitose induit par les UV. Le SB202190 bloque la phosphorylation de cdc25B sur le résidu nécessaire à sa liaison avec les protéines 14-3-3 responsables de son inactivation [156].

La durée d'activation de p38 peut induire un arrêt du cycle temporaire ou une entrée en sénescence si le signal est maintenu [157]. Une régulation négative est alors nécessaire lorsque le signal de stress est levé. p38 est capable de stabiliser l'ARNm de MKK6 et permet ainsi de maîtriser la durée d'activation de la voie [158].

Le rôle suppresseur de tumeur de p38 se base sur sa capacité à être activée par le contact cellule-cellule pour inhiber la prolifération [159], sur sa capacité à agir sur cdc25 ou sur pRb comme discuté plus haut [160]. De plus lorsque son rôle dans l'arrêt de prolifération est perturbé cela peut conduire à un défaut de différenciation, une hyper prolifération et favoriser la tumorigenèse comme dans le cas des rhabdomyosarcomes ou des cancers du poumon induit par une mutation *KRAS* [161;162].

c. p38 et l'apoptose

En conditions physiologiques l'implication de la MAPK p38 dans l'apoptose a été démontrée notamment à l'aide des inhibiteurs. La ligation de Fas et la déprivation de NGF (nerves growth factor) induisent de l'apoptose médiée par p38 [163;164]. Des études montrent alors que p38 peut agir soit en amont soit en aval des caspases. En effet, une équipe a montré que les inhibiteurs de caspases bloquent l'activation de p38 induite par Fas [165]. De plus, l'inhibition de MKK6, kinase activatrice de p38, par un dominant négatif induit l'activité des caspases. Ce qui indique que l'inhibition de p38 induit l'apoptose [166].

Une autre équipe a montré que p38 participe à la mort de fibroblastes induite par l'inhibition du TNF [167]. Plus tard les auteurs établiront que p38 est un régulateur négatif de l'activation de NF- κ B, impliqué dans la survie, dans ces cellules [168].

Plus récemment, p38 a été démontré comme impliquée dans l'apoptose induite par l'oridonine, une molécule aux effets anti-tumoraux, dans une lignée du cancer du pancréas. p38 est responsable de la phosphorylation de p53, de l'activation des caspases 3 et 9 et de l'expression de p21 qui vont conduire aux effets cytotoxiques de l'oridonine [169].

d. p38 et réponse aux agents chimiothérapeutiques

Plusieurs agents chimiothérapeutiques nécessitent p38 pour l'induction de l'apoptose comme l'oxaliplatine, le cyclophosphamide ou les anthocyanines [170]. Par exemple dans les cellules traitées à l'oxaliplatine, l'activation de p38 entraîne une diminution de l'expression de sécurine et la formation de γ -H2AX, un marqueur de cassure double brin de l'ADN participant au recrutement du système de réparation, induites par l'oxaliplatine. La MAPK p38 participe donc à l'apoptose en inhibant la réparation des cassures et en levant l'inhibition du cycle cellulaire après traitement à l'oxaliplatine [171].

Cependant, la MAPK p38 peut avoir un rôle différent dans le mécanisme d'action d'autres drogues comme l'irinotécan ou le 5-FU. Des études, dont une menée par notre équipe et à laquelle j'ai participé, ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de p38 augmente la sensibilité des cellules cancéreuses colorectales à ces agents [172]). Soit via Bax pour le 5-FU [173], soit via une induction d'autophagie de survie dans un contexte p53KO [174].

La MAPK p38 est activée par le traitement aux UV, les γ -radiations et certaines chimiothérapies comme l'étoposide qui induisent des cassures double brin. Bien que toutes les isoformes soient activées il semble que seule la MAPK p38 γ soit impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M via le mécanisme décrit dans la Figure 23 [175].

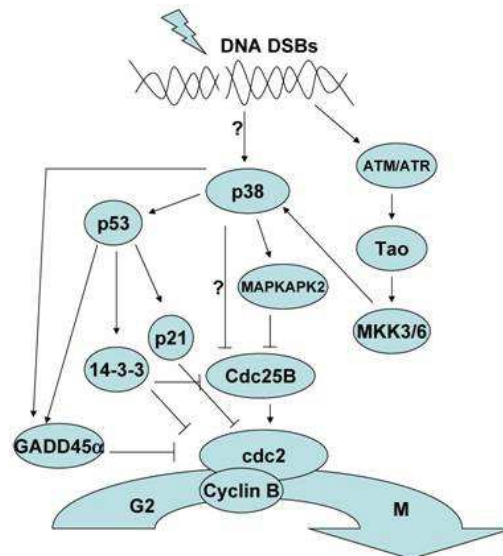


Figure 23 : implication de la MAPK p38 dans l'arrêt G2-M suite à une cassure double brin
[175]

Plusieurs études indiquent également un rôle de p38 dans l'induction d'un arrêt en phase G1-S par les stress osmotique, les ROS (reactive oxygen species) et les dommages à

l'ADN. La MAPK p38 est impliquée dans plusieurs mécanismes conduisant à cet arrêt. Le premier, via la phosphorylation de p53, induit une augmentation de p21 responsable de l'inhibition de la cdk2. Le deuxième via la phosphorylation de cdc25A. p38 est également capable de réguler p16, HBP1 et directement la cycline D. Elle peut ainsi réguler l'arrêt du cycle en phase G1-S et G2-M sous différents traitements induisant des cassures double brin [175] (Figure 24).

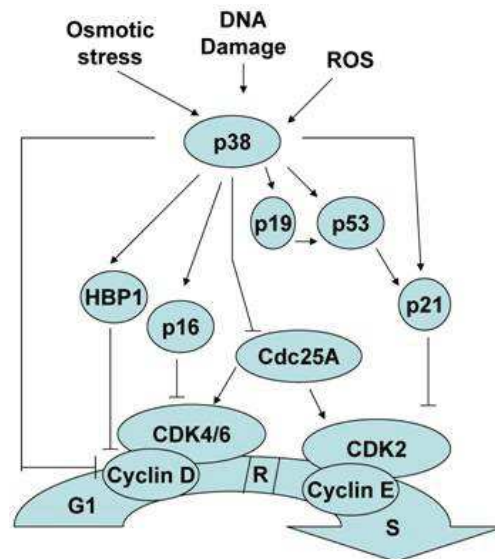


Figure 24 : implication de la MAPK p38 dans l'arrêt G1-S suite à une cassure double brin, un stress osmotique ou à l'induction de ROS [175]

La MAPK p38 est à la fois capable d'induire de l'autophagie et de l'inhiber. Dans les cellules Hela, l'oridonine est capable d'induire de l'autophagie via p38 [176]. En revanche, dans des cellules de fibrosarcome murin, p38 inhibe l'autophagie induite par le $TNF\alpha$ [177]. Il semble que p38 induise l'autophagie via les protéines ATGs. Une phosphorylation d'ATG5 par p38 inhibe l'autophagie induite par la déprivation en nutriments [178]. Par contre, p38 inhibe l'autophagie via la phosphorylation de GSK3 β pour maintenir la survie cellulaire [170].

e. p38 et cancer

Les rôles différents de p38 en fonction du type cellulaire et de l'agent utilisé sont à l'origine de controverse en ce qui concerne son rôle dans la cancérogenèse. La MAPK p38 peut à la fois favoriser la croissance tumorale et avoir un rôle suppresseur de tumeur. Dans le tableau suivant sont répertoriés les différents mécanismes suppresseurs de tumeur ou oncogénique liés à p38.

Rôle oncogénique	Rôle suppresseur de tumeur
p38 induit COX-2 qui peut promouvoir la progression tumorale du cancer du sein et du cerveau [139][140]	L'inhibition de p38 peut conduire à la transformation cellulaire [160]
p38 a un rôle dans la production de cytokines inflammatoires : TNF α , IL-6 et IL-1 qui ont des effets pro-angiogénétiques et de survie [179]	p38 régule le cycle cellulaire lors d'un dommage à l'ADN via cdc25B pour permettre à la cellule de réparer ou induire l'apoptose dans le cas contraire [102]
p38 régule également les cytokines via NF- κ B, comme l'IL-6 induite par le TGF β dans la progression du cancer de la prostate [141]	p38 régule le cycle et la prolifération lors du contact cellule-cellule [159].
p38 régule la production de metalloprotéases qui contrôlent le remodelage de la matrice extracellulaire [180]. Par exemple, MMP-2 induite par le TGF β [124]	p38 induit la différenciation terminale des myoblastes et une diminution de son activité est associée à un défaut de différenciation dans les rhabdomyosarcomes [161]
p38 est impliquée dans la production [181] et la réponse au VEGF [182] en conditions hypoxiques ce qui va activer l'angiogénèse.	p38 inhibe la carcinogénèse mammaire induite par l'expression de HER2 et Ha-ras dans un modèle murin [160]
	L'inactivation de p38 favorise la tumorigénèse pulmonaire induite par la mutation G12V de KRAS [162].

Tableau 5 : Rôle oncogénique et suppresseur de tumeur de p38

Il semble que le rôle suppresseur de tumeur de p38 est au stade précoce de la formation tumorale en maîtrisant la prolifération et la différenciation mais qu'une fois la tumeur mise en place p38 tend à favoriser sa croissance et son expansion à d'autres tissus.

IV. La protéine p53

La fonction de la protéine p53 est altérée dans 50% des cancers. Ces altérations conduisent à une protéine p53 défectueuse dans sa fonction (perte ou gain de fonction) ou dans sa structure pouvant entraîner sa dégradation (protéine p53 absente). Son inactivation ou l'apparition d'une nouvelle fonction oncogénique sont causées par des mutations ponctuelles sur des « points chauds » (hot spots) comme par exemple les codons 175, 248 et 273. Ces mutations sont à l'origine de l'émergence de nombreux cancers (Hainaut and Hollstein, 2000 et [183]). p53 est un suppresseur de tumeur par son rôle de « gardien du génome » via ses fonctions de facteur de transcription, de régulateur du cycle et d'inducteur de mort cellulaire. p53 est capable de lier l'ADN et est un activateur de transcription de gènes. Cette liaison à l'ADN est régulée par l'inhibiteur de p53, MDM-2. Elle est également capable d'induire un arrêt en phase G1 lors de dommages à l'ADN afin que ceux-ci puissent être réparés. Si ce n'est pas le cas, p53 induira alors l'apoptose [184].

4.1. La régulation de la voie p53

Dans les cellules saines l'expression et l'activité de p53 sont inhibées. Il y a trois mécanismes généraux d'activation de la voie p53. Le premier fait suite à un dommage à l'ADN. La protéine kinase ATR est alors activée et active à son tour Chk2 qui va activer la voie p53. Le deuxième est induit par des signaux de croissance aberrant, portés par l'expression d'oncogènes comme Ras ou Myc. Et le troisième est induit par les stress de l'environnement comme les UV, les agents chimiothérapeutiques ou les inhibiteurs via la protéine ATR. Ces trois mécanismes conduisent à l'inhibition de la dégradation de p53 et à sa modification afin qu'elle puisse se lier à l'ADN et aider à la transcription des gènes de régulation du cycle et de la mort cellulaire programmée.

Le principal régulateur de p53 est MDM-2 cependant il existe une boucle de retrocontrôle. MDM-2 est capable d'ajouter des groupes ubiquitine à p53 conduisant à sa prise en charge par la machinerie de dégradation. Et p53 stimule directement la transcription de gène MDM-2 entraînant sa propre régulation négative. MDM-2 va également être régulé par la protéine p14ARF, induite par les signaux de croissance. P14ARF va séquestrer MDM-2 dans un compartiment cellulaire où p53 ne se trouve pas. Les virus à ADN sont également

capables d'inhiber p53 directement ou en se servant de cette régulation de MDM-2. En effet ces virus nécessitent une cellule qui cycle afin de synthétiser l'ADN viral. Ils possèdent donc des protéines oncogènes qui inhibent directement p53 ou via la protéine pRB, inhibitrice de E2F-1, facteur de transcription participant à la synthèse de p14ARF. Ils favorisent ainsi le processus cancéreux en dérégulant l'équilibre p53-MDM-2.

Les phosphorylations induites par ATM, ATR ou Chk1 et 2 se situent à proximité du site de fixation de MDM-2 et bloquent celle-ci conduisant à la stabilisation de p53 et donc à l'augmentation de sa quantité.

Cependant l'augmentation de la quantité de p53 n'est pas suffisante à son activité. Son repliement normal bloque l'accès au site de fixation de l'ADN. Des modifications comme des acétylations ou des phosphorylations sont nécessaires (Figure 25). Certaines vont induire les changements conformationnels qui vont libérer le domaine de fixation à l'ADN de p53, lui permettre de former des tétramères et d'effectuer son activité transcriptionnelle. La phosphorylation de résidus sérine notamment entraîne sa tétramérisation ce qui va masquer les signaux d'export nucléaire, il va donc être séquestré au noyau [185]. Autre exemple, la phosphorylation de p53 sur les sérines 15, 33 et 46 médiée par p38 est importante pour son rôle dans l'apoptose [152].

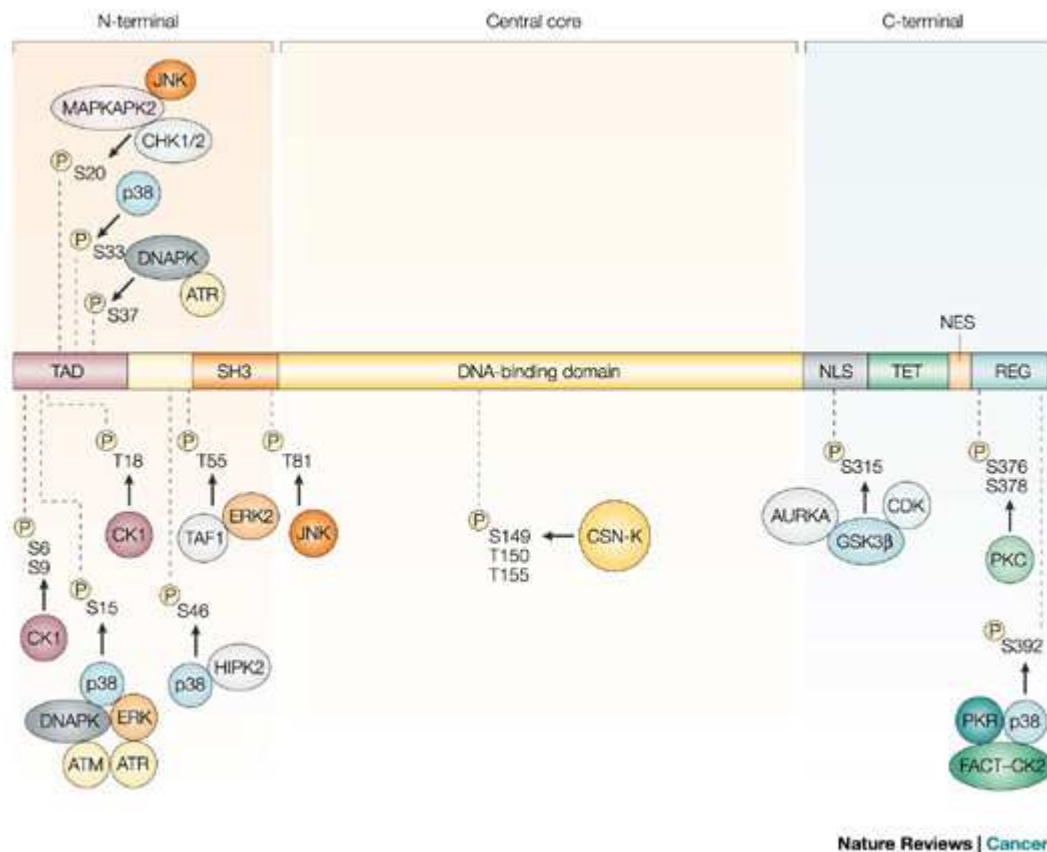


Figure 25: Différents sites de phosphorylation de p53 [186]

4.2. Les rôles biologiques de p53

4.2.1. p53 et cycle cellulaire

La protéine p53 peut induire l'arrêt en phase G1, évitant ainsi la réplication de l'ADN endommagé, ou en phase G2, évitant une mauvaise séparation des chromosomes [187].

L'arrêt du cycle en phase G1 par p53 se fait à deux niveaux. Le premier, par interaction directe avec les protéines ayant un rôle essentiel dans la réplication comme la protéine RPA (replicon protein A) bloquant ainsi la réplication [188]. Le deuxième par régulation de l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle comme l'expression d'un inhibiteur de CDKs (cyclin-dependent kinases): p21 [189].

L'arrêt en phase G2 par p53 est concentré sur un objectif: inhiber le complexe cycline B1-cdc2. Pour cela p53 régule l'expression de trois gènes: la cycline B1, les protéines 14-3-3

et GADD45. p53 réprime l'expression du gène de la cycline B1 et induit l'expression des deux autres impliqués respectivement dans la séquestration de cdc25 (activateur de cdc2) et la déstabilisation du complexe cycline B1-cdc2 [190;191] (Figure 26).

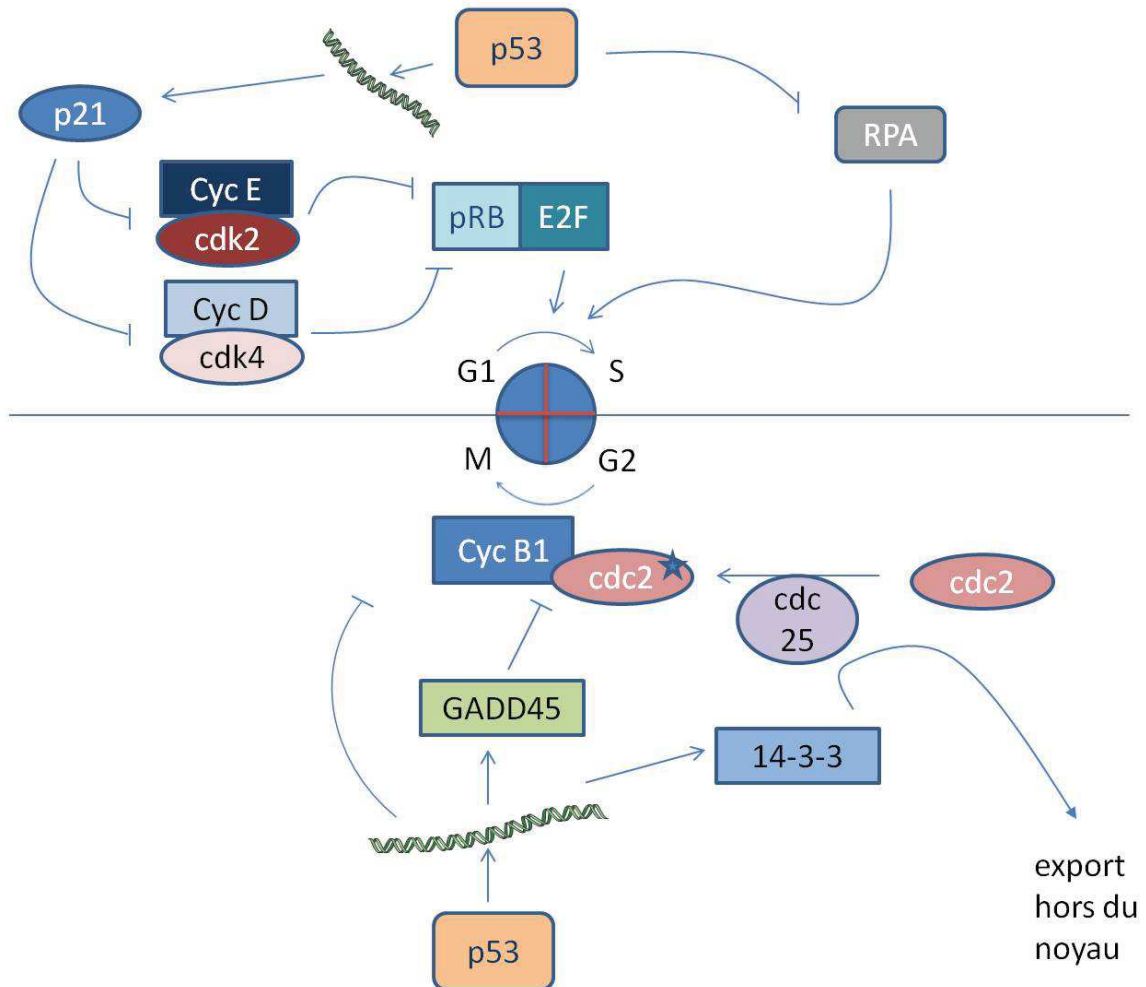


Figure 26: p53 et contrôle du cycle cellulaire

L'ensemble de ces événements provoque un arrêt du cycle permettant l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN.

4.2.2. p53 et réparation de l'ADN

Non seulement p53 permet l'arrêt du cycle nécessaire à la réparation de l'ADN mais il y participe également. Il existe 5 processus de réparation de l'ADN: le NER (nucleotide excision repair), le BER (base excision repair), le NHEJ (non homologous end joining), MMR

(mismatch repair) et la HR (homologous recombination). p53 est impliqué dans 4 d'entre eux, son rôle dans le NHEJ est non résolu à ce jour.

Dans le NER, p53 est capable d'induire l'expression de p48 et XPC, deux effecteurs de ce système de réparation mais est aussi un facteur d'accessibilité à la chromatine. Il va se fixer à l'ADN et recruter p300 afin de favoriser le relâchement de la chromatine et de faciliter l'accès des protéines de réparation au site endommagé.

Dans le BER, p53 peut former un complexe avec l'ADN polymérase β ce qui va avoir pour effet de la stabiliser. De plus, il interagit avec APE1/REF1 qui participe à la réparation par excision de bases.

Il a été montré que p53 régule la transcription d'une protéine du MMR: MSH2 (mutS homologue 2), et se lie à elle avant de fixer RAD50 et RAD51, des protéines de recombinaison, montrant que p53 fait partie du complexe recruté sur le site de réparation et a peut être un rôle supplémentaire à la régulation de MSH2 [192].

Notamment dans le mécanisme HR, il a été démontré à plusieurs reprises que p53 régule négativement la recombinaison via l'inhibition de RAD51. En restreignant l'échange entre les séquences à l'homologie imparfaite, p53 supprime les réarrangements tumorigéniques. De plus, par ce mécanisme, il peut diminuer la formation de lésions de recombinaison [193].

4.2.3. p53 et apoptose

La protéine p53 va induire l'expression de plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose: PIDD, les protéines PIG, la ferredoxine réductase, BAX (Bcl-2-associated X protein), PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis), NOXA, les récepteurs de mort comme Fas ou le récepteur de TRAIL DR5, p85, IGF-BP3 (insulin growth factor binding protein) [194;195;196;197;198;199;200;201]. Dans le tableau 4 sont répertoriés leurs différents rôles dans l'apoptose induite par p53.

Protéine induite par p53	Rôle dans l'apoptose
PIDD	activation caspase 2
PIGs	production de ROS causant des dommages à la mitochondrie
ferrodoxine réductase	sensibilise la cellule aux radicaux oxydatifs
p85	sous unité de PI3K qui participe à la mort cellulaire indépendamment de l'activité de PI3K
IGF-BP3	inhibe le signal de l'IGF1
BOK	participe au relargage de cytochrome c
BAX	déclenche la perte de potentiel de la membrane de la mitochondrie, participe ainsi au relargage du cytochrome c
PUMA	se lie à Bcl-2 et induit le relargage du cytochrome c de la mitochondrie
NOXA	libère BOK de son inhibiteur anti-apoptotique

Tableau 6: différents gènes induit par p53

p53 peut également réprimer des gènes de protéines inhibitrices de l'apoptose comme MAP4 (microtubule-associated protein), PS1 (presenilin1) ou encore le récepteur à l'IGF1 [198;202;203].

En dehors de son rôle de régulateur de transcription, p53 peut aussi agir directement au niveau de la mitochondrie en formant un complexe avec Bcl-2 et Bcl-XL [204].

Le choix de p53 d'induire l'arrêt de prolifération ou l'apoptose semble être conditionné par plusieurs facteurs: contexte cellulaire, présence de facteurs de croissance, nature du stress génotoxique et quantité de l'agent génotoxique. Il y a cependant deux hypothèses concernant le choix de devenir de la cellule (pour revue [205]):

- 1) L'arrêt de prolifération et l'apoptose sont induits en même temps et les facteurs cités plus haut déterminent le destin de la cellule [206].

Ou

- 2) p53 prend directement part à la décision en fonction de sa quantité présente dans la cellule, sachant que peu de p53 semble conduire à un arrêt de prolifération alors qu'une forte quantité de p53 tend à conduire à l'apoptose [207]

Cependant, quelque soit l'ordre d'activation, tous ces mécanismes nous permettent de comprendre le rôle de p53 dans le maintien de l'intégrité du génome et son rôle suppresseur de tumeur.

4.2.4. p53 et cancer

La protéine p53 est mutée dans 50% des cancers (plus de 18 000 mutations différentes) ou rendu inactive par des mécanismes indirects comme l'amplification de son répresseur MDM-2 [186]. La majorité des mutations (80%) se trouvent sur le domaine de liaison à l'ADN et elles conduisent à la production d'une protéine oncogénique qui peut s'accumuler dans les cellules cancéreuses. Cette accumulation peut avoir pour conséquence l'activation de la transcription de *MYC*, un oncogène qui induit la prolifération et la transcription de gènes de résistance à plusieurs agents anti tumoraux. Les mutations d'un seul allèle de *TP53* peut aussi être oncogénique car les protéines p53 mutées peuvent former des tétramères avec les protéines p53 sauvages et agir comme dominant négatif qui inactive les p53 sauvages. Les mutations peuvent également bloquer l'interaction de p53 avec ses partenaires. Il n'est plus capable, par exemple, d'inhiber Bcl-XL, une protéine anti-apoptotique [186].

Le lien entre les modifications nécessaires à l'activation de p53 (phosphorylations, acétylations, etc) et la cancérogenèse n'est pas clair mais des résultats commencent à s'accumuler. Une équipe a montré qu'il ne semble pas y avoir de phosphorylations

spécifiques aux protéines p53 mutées mais il y a en revanche une augmentation de la phosphorylation et de l'acétylation des mutants p53 comparés aux protéines p53 sauvages. Les phosphorylations et acétylations ont un rôle dans l'activité transcriptionnelle de p53 mais elles sont surtout responsables de sa stabilisation entraînant une augmentation de la quantité de p53 dysfonctionnel dans les cellules cancéreuses [208]. Melnikova et ses collègues ont découvert que la protéine p53 mutée est constitutivement phosphorylée par ERK après traitement par les UV ce qui entraîne une activation et une stabilisation de p53 muté [209]. Une autre équipe a montré qu'une mutation de p53 est capable d'induire la perte de la phosphorylation en sérine 392 pouvant être responsable de son rôle oncogénique [210].

Le rôle de p53 dans la carcinogenèse est complexe de part ses nombreuses interactions avec ses partenaires et leurs différences selon les types cellulaires et les signaux perçus. Cependant, il est clair que la dérégulation de p53 a un fort impact dans la transformation cellulaire mais aussi, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, dans la réponse aux traitements.

4.2.5. p53 et traitement

p53 et réponse aux chimiothérapies

p53 est muté dans la moitié des cancers ce qui signifie que l'autre moitié possède une protéine p53 sauvage qui a échoué à prévenir l'apparition du processus cancéreux. Cependant, la protéine p53 sauvage peut être activée par les agents thérapeutiques et participer à la réponse des cellules à ceux-ci. Ainsi il a été montré que p53 participe à la réponse à des drogues anti-tumorales dans plusieurs lignées cellulaires [211]. De ce fait, l'inactivation des fonctions de p53 est un important mécanisme de la mise en place de résistance.

La perte d'une protéine p53 fonctionnelle implique trois conséquences : perte de l'induction de l'apoptose, perte des « checkpoints » et de l'arrêt du cycle et perte de l'entrée en sénescence.

Certains agents chimiothérapeutiques qui induisent des dommages à l'ADN activent les récepteurs de mort et la voie apoptotique de la mitochondrie en partie via p53. Ce qui

signifie que l'inactivation de p53 va conduire à une inhibition de la mort induite par ces agents thérapeutiques.

L'arrêt du cycle est un processus nécessaire à la réparation des dommages à l'ADN et permet la survie cellulaire mais si les dommages ne sont pas réparés la cellule va entrer en apoptose. Il a été montré que dans 60 lignées cellulaires cancéreuses (panel NCI60 du NIH), celles qui conservent un « checkpoint » en phase G1 sont plus sensibles aux agents thérapeutiques à base de sel de platine et présentent une protéine p53 sauvage (oxliplatine, cisplatine, etc) [211;212;213].

La sénescence est un mécanisme important pour prévenir l'immortalisation et la transformation des cellules. Ce phénotype se produit en réponse à des signaux variés comme le raccourcissement des télomères, les stimuli oncogéniques, les radiations ionisantes ou les agents thérapeutiques [214]. p53 a un rôle essentiel dans la sénescence induite par les stress, ce qui implique que les tumeurs qui possèdent une protéine p53 sauvage ont plus de probabilité d'entrer en sénescence en réponse aux chimiothérapies que les tumeurs p53 muté [215].

La protéine p53 est centrale dans l'induction de ces trois mécanismes et dans l'effet des agents anti-tumoraux (Figure 27). C'est pourquoi les mutations entraînant sa perte de fonction sont un mécanisme de résistance aux chimiothérapies.

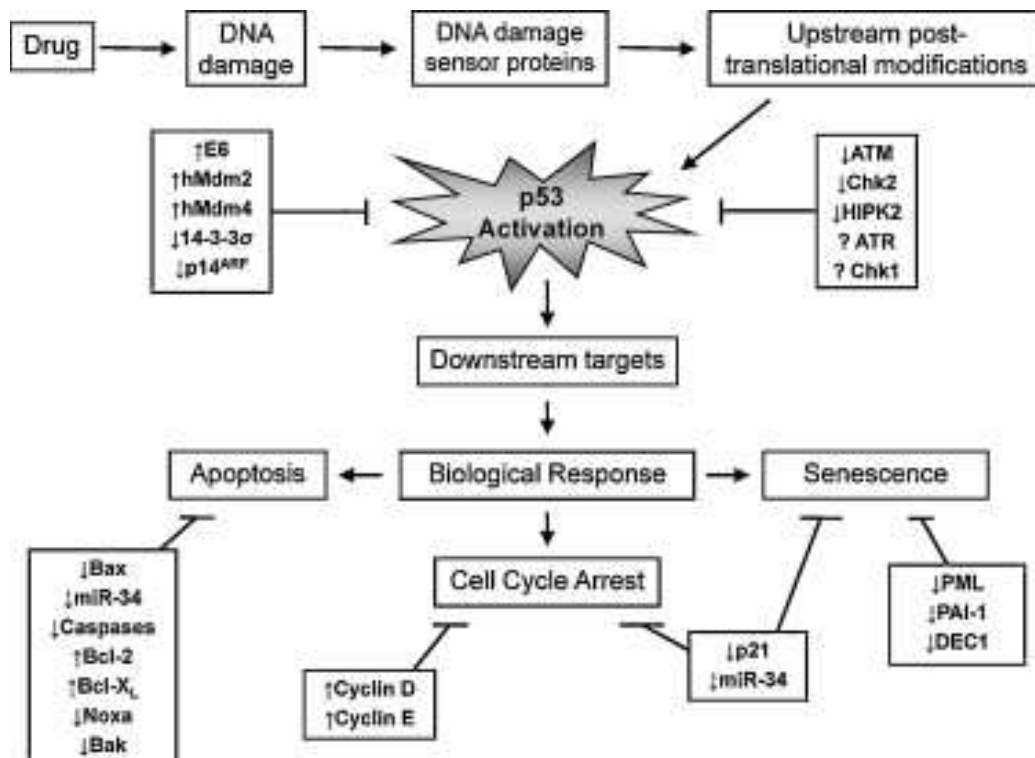


Figure 27 : induction de l'apoptose, de l'arrêt de la prolifération et de la sénescence par p53 en réponse aux drogues [216]

Les mutations gain de fonction de p53 (R175H, R175P, R248W, R249S, R273C et R273L) peuvent également conférer une résistance des tumeurs aux traitements [217] en modifiant la régulation de plusieurs gènes par p53 comme *BFGF*, *EGFR*, *HSP70* et *C-Myc* [216]. Ces gènes sont impliqués dans la promotion de la progression tumorale et l'induction de la résistance à plusieurs agents chimiothérapeutiques. Les mutations gain de fonction peuvent également conduire à l'inhibition de l'interaction de p53 avec certains de ses partenaires comme p63, p73 et MRE11, impliqués dans la transcription de gènes de réponse aux stress et dans la réparation des cassures double brin [218].

Le rôle de p53 dans la résistance aux chimiothérapies ne concerne pas seulement les tumeurs présentant une protéine p53 mutée ou absente. Des résultats s'accumulent sur le rôle de p53 sauvage dans la résistance aux drogues, en contradiction avec son rôle normal pro-apoptotique et antiprolifératif. Et il semble que ce rôle soit lié à des mécanismes de dégradation ou de régulation négative de l'activation post-traductionnelle de p53. Certains traitements vont inhiber la phosphorylation ou l'acétylation de p53 via la régulation négative des kinases en sont responsables. D'autres vont augmenter la quantité ou l'activation des régulateurs négatifs de p53 comme MDM-2 [216].

En clinique, le rôle du statut de p53 sur la réponse des patients aux traitements est difficile à établir car il semble dépendre du traitement utilisé et de l'origine du cancer [219]. Dans le cancer du colon, l'analyse de plusieurs études a permis de déterminer que la présence d'une protéine p53 mutée ne modifie pas la réponse des patients aux chimiothérapies [220].

p53 et réponse aux thérapies ciblées

Le rôle de p53 dans l'activité des thérapies ciblées a été peu étudié à ce jour. Cependant, quelques études ont été menées sur le cetuximab et le bévacizumab. Il n'y a apparemment pas de corrélation entre le statut de p53 et la réponse au bevacizumab [221]. En revanche, plusieurs études démontrent l'implication de p53 dans la réponse au cetuximab. Certaines indiquent que p53 participe à la réponse et d'autres que la présence d'une mutation de *TP53* chez les patients atteints de CCR conduit à une meilleure réponse mais une étude menée sur une plus grande cohorte de patient montre le contraire [222;223;224]. Il semble donc important de clarifier le rôle de p53 dans l'action des thérapies ciblées.

RESULTATS

I Projet de recherche

Comme nous venons de le voir le traitement du cancer colorectal métastatique est basé sur l'utilisation de 3 drogues (irinotécan, oxaliplatine et 5-FU) en association avec les thérapies ciblées (cetuximab et bévacizumab). Cependant, il existe des résistances innées ou acquises au cours du traitement.

Le but de l'équipe est de découvrir de nouveaux marqueurs de résistance, afin de mieux sélectionner les patients pouvant répondre positivement au traitement du CCR, ou de nouvelles cibles thérapeutiques afin de restaurer la sensibilité des cellules tumorales aux anti-tumoraux.

Dans cette optique, durant cette thèse, mon projet a été de déterminer le rôle des protéines p38 (1) et p53 (2) dans le mécanisme d'action du cetuximab.

1 Le rôle de la MAPK p38 dans l'effet du cetuximab

Dans des travaux précédents, nous avons montré que la voie de la MAPK p38 est impliquée dans la réponse des cellules du cancer du colon à l'Irinotécan. En effet, *in vitro* et *in vivo*, la MAPK p38 est responsable de la chimiorésistance de ces cellules. De plus, l'inhibition de la MAPK p38 sensibilise les cellules de CCR à l'irinotécan [172]. En parallèle, d'autres équipes ont montré que l'inhibition de p38 améliore la réponse au 5-FU comme l'irinotécan mais bloque la réponse à l'oxaliplatine [173;171].

Ces trois drogues étant fréquemment utilisées en combinaison avec le cetuximab, nous avons étudié l'implication de la MAPK p38 dans la réponse cellulaire à cet anticorps dans un premier temps.

Pour cela, nous avons combiné l'inhibition de la MAPK p38 avec le cetuximab dans une lignée de cancer colorectal *KRAS*, *EGFR* et *TP53* sauvage: DiFi.

2 Le rôle de p53 dans l'effet du cetuximab

Des études récentes montrent que p53 a un rôle sur la réponse au cetuximab. Une équipe a montré que la présence d'une protéine p53 mutée est corrélée avec le contrôle de la maladie chez des patients atteints de CCR traités avec la combinaison irinotécan plus cetuximab [223]. Cette corrélation n'a cependant pas été démontrée *in vitro*, ni sur une

cohorte de patients traités au cetuximab seul. Une autre équipe a, en parallèle, obtenu des résultats montrant que dans des cellules de cancer du poumon l'extinction de p53 diminue l'effet cytotoxique du cetuximab *in vitro* et *in vivo* [222].

Il semble donc nécessaire de clarifier l'effet de l'absence ou de l'inactivation de p53 sur l'effet du cetuximab *in vitro* sur des cellules de cancer colorectal.

Nous avons donc étudié l'effet de l'absence de p53 sous le traitement au cetuximab dans la lignée DiFi *in vitro* et la réponse d'une lignée possédant un gène *TP53* muté, Caco2, dans la deuxième partie de ma thèse.

L'objectif de ces études est d'apporter de nouvelles connaissances concernant le mécanisme d'action du cetuximab. Il est important d'identifier les effecteurs encore inconnus responsables de l'action du cetuximab sur la prolifération et l'apoptose parce que le statut *KRAS* ne suffit pas à sélectionner les patients pouvant bénéficier de ce traitement.

Il est également important de déterminer si ces effecteurs peuvent constituer de nouvelles cibles thérapeutiques alternatives au ciblage de l'EGFR afin de pouvoir contourner les mutations évoquées plus tôt tout en gardant les effets anti-tumoraux de l'inhibition de cette voie.

Rôle de la MAPK p38 dans la réponse au cetuximab

II Rôle de la MAPK p38 dans la réponse au cetuximab

1.1. Introduction

Au cours de mon stage de M1 et pendant les premiers mois de ma thèse, j'ai participé à l'étude de l'inhibition de p38 en combinaison avec l'irinotécan sur des cellules sensibles et résistantes à cette drogue *in vitro* et *in vivo*. Nous avons alors découvert que la MAPK p38 est fortement activée dans la majorité des tumeurs de patients qui ne répondent plus à l'irinotécan. De plus, l'inhibition de cette MAPK, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique ou d'une inhibition transcriptionnelle, améliore la réponse des cellules sensibles et résistantes à l'irinotécan (article n°1 en annexe).

Nous avons également démontré que le mécanisme de la synergie de ces deux traitements est l'inhibition de l'autophagie de survie induite par l'irinotécan via p38 dans des cellules dépourvues de p53 (article n°2 en annexe).

D'autre part, des résultats similaires ont été obtenus avec le 5-FU, démontrant que l'inhibition de la MAPK p38 sensibilise les cellules à ce traitement [173]. Il semble donc que la combinaison irinotécan+5-FU peut être associée à un inhibiteur de p38 afin d'obtenir une meilleure réduction des tumeurs mais cela doit être testé avant de pouvoir être affirmé.

En parallèle, l'irinotécan (iri) ou le 5-FU sont tout deux utilisés en combinaison avec le cetuximab (CTX) de manière indépendante ou associés (5-FU+CTX ou iri+CTX ou FOLFIRI+CTX). Notre problématique est donc de déterminer s'il est judicieux d'ajouter un inhibiteur de p38 à ces différentes combinaisons. Mais pour cela, il nous faut avant tout déterminer l'impact de l'inhibition de p38 sur la réponse au cetuximab seul.

L'étude d'échantillons de tumeurs de patients, ayant reçu un traitement à base d'irinotécan et de cetuximab, nous a donné un premier élément de réponse. Sur ces coupes de tumeurs nous avons effectué un marquage de la forme active de p38 (phospho-p38) et nous avons quantifié ce marquage avant de le comparer à la réponse des patients au traitement.

Les résultats obtenus montrent qu'un fort marquage de MAPK p38 active est corrélé avec une majorité de patient non répondeur (77% de non répondeurs vs 22.2% de répondeurs, $p=0.02$) alors qu'un faible marquage est associé à une plus importante proportion de patients répondeurs (69.7% vs 30%) (Figure 28). Cependant, les pourcentages obtenus, bien que

significatifs, sont moins importants que ceux obtenus précédemment avec les tumeurs traitées uniquement avec l'irinotécan où la proportion de patients présentant un fort marquage et non répondeurs est de plus de 80% (7 patients sur 8) (article n°1 annexe). Il semble donc qu'une proportion de patients, un peu plus de 10%, répond à la combinaison lorsque p38 est activée. Ceci signifie que chez ces patients p38 semble participer à la réponse.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que dans la lignée DiFi, p38 est nécessaire à l'action cytotoxique et cytostatique du cetuximab. En revanche, comme nous le verrons dans la deuxième partie de ma thèse, dans la lignée Caco2, l'inhibition de la MAPK p38 α conduit à une meilleure réponse au cetuximab. Nous avons donc deux lignées de cancer colorectal dans lesquelles le rôle de p38 est différent. Ces résultats montrent que l'activation de la MAPK p38 n'est pas un marqueur suffisant pour déterminer la réponse au cetuximab. De même, il n'est pas suffisant pour déterminer si le patient va répondre à la combinaison cetuximab plus irinotécan.

L'étude du statut des protéines, impliquées dans la voie de réponse au cetuximab, qui diffèrent entre ces deux lignées pourrait alors indiquer le ou les biomarqueurs devant être associé à la détection de la MAPK p38 active pour prédire la réponse ou non.

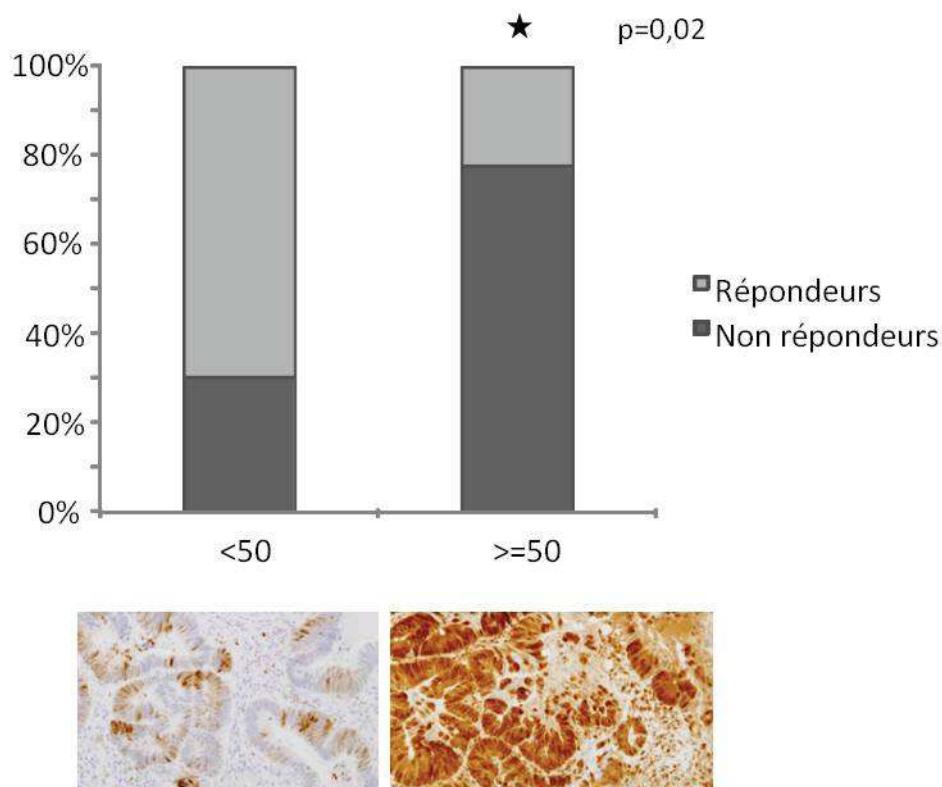


Figure 28: Corrélation entre niveau d'activation de la MAPK p38 et réponse à la combinaison iri+CTX

Dans un premier temps, le but de mon travail de thèse a été d'étudier l'association de l'inhibition de p38 et du cetuximab *in vitro* sur la lignée DiFi afin de confirmer l'implication de la MAPK p38 dans la réponse au cetuximab, indiquée dans les échantillons de tumeur de patient, *in vitro*.

De manière intéressante, comme nous allons le voir dans l'article, l'inhibition de p38 bloque la réponse des DiFi au cetuximab. Nous avons ensuite montré que, dans le mécanisme d'action du cetuximab, le rôle de p38 est de relocaliser le facteur de transcription FOXO3a au noyau où il pourra permettre la transcription des ses gènes cibles. Parmi ces gènes, nous avons identifié BIM et p27 comme étant respectivement impliqués dans l'apoptose et l'arrêt de prolifération induits par le cetuximab.

1.2. Article

MAPK p38 participate to cetuximab induced apoptosis and inhibition of cell proliferation via
FOXO3a in colorectal cancer

L Marzi¹, E Combes¹, N Vié¹, A Torro¹, D Desigaud¹, C. Larbouret¹, C Montagut², V Denis¹,
P Martineau¹, E Lam³, M Del Rio¹, C Gongora¹.

En préparation.

The MAPK p38 participates in cetuximab-induced apoptosis and inhibition of cell proliferation via FOXO3a phosphorylation in colorectal cancer cells

L Marzi¹, E Combes¹, N Vié¹, A Ayrolles-Torro¹, D Desigaud¹, C. Larbouret¹, C Montagut², V Denis¹, L Linares¹, P Martineau¹, E Lam³, M Del Rio¹, C Gongora¹.

¹IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France; INSERM, U896, Montpellier, F-34298, France; Université Montpellier1, Montpellier, F-34298, France; Institut régional du Cancer Montpellier, Montpellier, F-34298, France; ²Department of Medical Oncology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ³Department of Surgery and Cancer, Imperial Centre for Translational and Experimental Medicine (ICTEM), Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, London W12 0NN, United Kingdom.

Correspondence: Céline Gongora, IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France; INSERM, U896, Montpellier, F-34298, France. Tel: 33 4 67 61 37 45, Fax: 33 4 67 61 37 87. e-mail: celine.gongora@inserm.fr

Running title: Cetuximab induces cell death via p38 and FOXO3a

This work has been financed by INSERM and ICM.

Abstract and keywords

Cetuximab is a monoclonal antibody against the Epithelial Growth Factor receptor (EGFR). It is associated with 5-FU and irinotecan for the treatment of patients with colorectal cancer (CRC) harboring wild type KRAS to inhibit signaling pathways downstream of EGFR. However, cetuximab is ineffective in patients with constitutively active mutated KRAS and also in half of the patients with wild type KRAS. As cetuximab downstream cellular targets are not fully characterized, the aim of this study was to identify the signaling pathways activated by cetuximab in CRC cells harboring wild type KRAS (DiFi cells). Our results show that in addition to inhibiting extracellular signal-regulated kinase (ERK) and AKT, cetuximab also activates c-JUN N-terminal kinase (JNK) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 (two stress kinases). JNK inhibition did not affect cetuximab cytotoxic effects; conversely, p38 pharmacological inhibition significantly reduced cetuximab efficacy on cell growth and cell death. Moreover, p38 inhibition enhanced cetuximab-mediated AKT inhibition. At the molecular level, our work shows that cetuximab activates the transcription factor FOXO3a and promotes its nuclear translocation via p38-mediated phosphorylation. FOXO3a phosphorylation by p38 is essential for FOXO3a activation by cetuximab, because a “p38-phosphorylation-defective” FOXO3A mutant could not accumulate in the nucleus upon cetuximab treatment. FOXO3a phosphorylation and activation by p38 led to the up-regulation of its target genes *p27* and *BIM* and the subsequent induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation. Finally, FOXO3a silencing reduced cetuximab cytotoxicity, further confirming FOXO3a role in cetuximab effect. Collectively, our results identify FOXO3a as a key mediator of cetuximab mechanism of action in CRC cells and define p38 as its main activator in this context.

Keywords: Cetuximab. MAPK p38. FOXO3a. Colorectal cancer. Signaling.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the fourth most common cancer worldwide. In 2012, the estimated CRC incidence was of 1.3 million cases worldwide and CRC caused more than 700 000 deaths (Globocan). Moreover, despite the significant progress made in CRC screening and early disease management, 30% of patients present synchronous metastases and 50-60% will develop metastases that will require chemotherapy. The current management is based on various active drugs (5-FU/LV, capecitabine, irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab and panitumumab) either in combination or as single agents (2). Thanks to these treatments, the patients' overall survival has been significantly improved, but tumor resistance is still a frequent cause of chemotherapy failure.

Among the drugs used in CRC treatment, cetuximab is a monoclonal antibody that targets the extracellular domain of Epithelial Growth Factor receptor (EGFR) and can overcome acquired resistance to irinotecan chemotherapy. However, patients with *KRAS*-mutated metastatic CRC (mCRC) do not benefit from this treatment (14,15) and 40-60% of patients with wild type *KRAS* mCRC do not respond to cetuximab. Cetuximab binding to EGFR inhibits receptor activation and, subsequently, signal transduction of the RAS/RAF/MER/ERK and the PI3K/AKT pathways. This leads to cell cycle arrest and/or induction of apoptosis. The downstream cellular targets of cetuximab are not fully characterized and most of the transcription factors induced by cetuximab have not been identified.

The Serine/Threonine MAPK p38 (14) includes four isoforms (α , β , γ and δ) and is activated through phosphorylation at the Thr¹⁸⁰-Gly-Tyr¹⁸² motif by MKK3, MKK4 and MKK6 (16). Phosphorylated p38 activates a wide range of substrates (transcription factors, protein kinases, cytosolic and nuclear proteins), leading to diverse responses, such as cell differentiation, cell-cycle arrest, apoptosis, senescence, cytokine production, regulation of

RNA splicing and inflammatory responses (15). We previously showed that in SN38-resistant HCT116 CRC cells, p38 is activated by treatment with SN38 (the active metabolite of irinotecan) and that pharmacological inhibition of p38 overcomes irinotecan and SN38 resistance (Paillas, 2011). Recently, Lam and collaborators showed that p38 can phosphorylate the transcription factor FOXO3a on serine 7 and contributes to its nuclear localization and activation. The forkhead box O (FOXO) transcription factor family is negatively regulated by growth factors, cytokines and hormones. FOXO3a is one of the four FOXO isoforms and it regulates many cellular processes, including proliferation, apoptosis, autophagy and metabolism. FOXO3a biological activity is mainly modulated via inhibitory phosphorylation by the PI3K/AKT and MEK/ERK pathways. For instance, activated AKT phosphorylates FOXO3a, leading to its translocation into the cytoplasm where it is sequestered by the 14-3-3 chaperone protein and degraded. FOXO3a can be phosphorylated also by ERK, resulting in its proteasomal degradation through MDM2-mediated ubiquitination. Conversely, inhibition of AKT and ERK leads to de-phosphorylation and nuclear localization of FOXO3a and to its activation. This activation induces cell cycle arrest and/or apoptosis through up-regulation of its target genes, such as $p27^{Kip1}$ (its official gene name is *CDKN1B*) and *BIM*.

In the present study, we investigated the molecular pathways induced by cetuximab and involved in cell proliferation inhibition and apoptosis. Particularly, we explored the role of p38 in FOXO3a regulation in response to cetuximab in wild type KRAS CRC cells.

Results

The MAPK p38 is activated by cetuximab

Cetuximab inhibits EGFR activation and subsequently signal transduction of the RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways. However, its impact on other major cell signaling pathways is not clear. We thus analyzed cetuximab effect on the two stress kinases JNK and p38. Western blot analysis using anti-p38 and -JNK phospho-specific antibodies showed an increase of p38 and JNK phosphorylation in the DiFi human CRC cell line (wild type KRAS) following incubation with cetuximab for 24 hours (Figure 1A). As expected, AKT and ERK phosphorylation (used as control) were strongly decreased in cetuximab-treated DiFi cells, indicating that DiFi cells respond accurately to this anti-EGFR treatment.

We then analyzed whether JNK and p38 activation had a functional impact on cetuximab effect on cell death and proliferation. To this aim, we blocked JNK or p38 with specific inhibitors (SP600125 for JNK and SB202190 for p38) and then tested cetuximab cytotoxicity using the SRB assay (Figure 1B). Cetuximab cytotoxicity was not affected by JNK inhibition. Conversely, it was greatly reduced following p38 inhibition, as indicated by the higher 50% inhibiting concentration (IC₅₀) of cetuximab (55 ng/ml) when associated with SB202190 compared to when used alone (35 ng/ml; p-value: 0.005). This indicates that inhibition of p38 makes DiFi CRC cells more resistant to cetuximab.

We then measured p38 phosphorylation of its target protein ATF2 by kinase assay to monitor the effect of cetuximab and SB202190 on p38 activity (Figure 1C, upper panel). ATF2 phosphorylation was increased in cetuximab-treated DiFi cells compared to untreated cells and this effect was lost when cetuximab was combined with SB202190. Western blot analysis using a phospho-specific anti-p38 antibody confirmed cetuximab effect on p38 basal activity (Figure 1C, lower panel). We then investigated whether inhibition of p38 activity by SB202190 could affect also cetuximab-mediated ERK and AKT inhibition. SB202190 alone reduced only slightly AKT phosphorylation, but strongly inhibited AKT phosphorylation

when in combination with cetuximab. Conversely, SB202190 increased ERK phosphorylation when used alone, and reduced cetuximab-mediated inhibition of ERK phosphorylation when associated with the antibody.

These data suggest that the MAPK p38 is activated by cetuximab and contributes to its cytotoxic effect.

The MAPK p38 is necessary for the cytotoxic effect of compounds targeting EGFR

To follow p38 activation by cetuximab, we performed time-course and dose-response analyses of p38 phosphorylation by western blotting. The time-course analysis demonstrated that p38 phosphorylation in DiFi cells was induced about 1 hour after addition of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ cetuximab in the medium, with a peak at 48 hours (Figure 2A, left panels). Incubation of DiFi cells with increasing concentrations of cetuximab for 24 hours showed that p38 was activated by 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$ of cetuximab. These results indicate that cetuximab can activate p38 in DiFi cells already after 1 hour of treatment and with concentrations as low as 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

We then tested whether p38 silencing could affect cetuximab cytotoxic activity in the same way as the p38 inhibitor SB202190. By using the SRB assay we showed that sensitivity to cetuximab was reduced in DiFi cells in which p38 was down-regulated by ShRNA (Shp38 α 1 and Shp38 α 2; Figure 2B, upper panels) compared to control cells (shLuc), as indicated by their significantly different IC_{50} values (ShLuc: 41.7 nM; Shp38 α 1: 67.2nM, p-value: 0.008; Shp38 α 2: 74.5 nM, p-value: 0.032) (Figure 2B, lower panel).

These results indicate that p38 plays a role in cetuximab cytotoxic activity. We thus asked whether p38 could also be involved in the effect of other drugs targeting EGFR, such as the two tyrosine kinase inhibitors (TKI) lapatinib (EGFR and HER2 inhibitor) and erlotinib (EGFR inhibitor). Using the SRB assay and the p38 inhibitor SB202190, we found that the cytotoxic activity of lapatinib and erlotinib in DiFi cells (Figure 2C) was significantly reduced

when they were associated with SB202190, as shown by their IC_{50} (680 ng/ml for lapatinib alone and 1385 ng/ml for lapatinib + SB202190, p-value: 0.0007; 150 nM for erlotinib alone and 300 nM for erlotinib + SB202190, p-value: 0.0006). These results indicate that CRC cell sensitivity to the cytotoxic effect of cetuximab and of anti-EGFR TKIs is dependent on p38 activity, suggesting that this feature could be a hallmark of drugs targeting the EGFR signaling.

The MAPK p38 participates in the apoptotic and anti-proliferative effects of cetuximab

We then investigated whether p38 role in cetuximab effect involves cell death or inhibition of cell proliferation. Western blot analysis of cleaved caspase 3 expression (an apoptosis marker) after incubation of DiFi cells with increasing doses of cetuximab for 24 hours indicated that 1 μ g/ml cetuximab was sufficient to induce caspase cleavage (Figure 3A). Of note, this cetuximab concentration was also enough to induce p38 phosphorylation. We then assessed apoptosis using increasing concentrations of cetuximab and two other assays: i) identification of Annexin V positive cells (Figure 3B, upper panels), representative of early apoptosis, and ii) quantification of cells in the subG1 phase (Figure 3B, lower panels), representative of late apoptosis. The results of these assays indicated that apoptosis of DiFi cells was induced by 0.5 μ g/ml cetuximab (24% Annexin V-positive cells and 24.3% subG1 cells) and the percentage of apoptotic cells increased with the concentration of cetuximab. These experiments demonstrate unequivocally that cetuximab induces apoptosis in DiFi cells.

We then analyzed the combined effect of cetuximab and SB202190 on apoptosis using the three methods described above (Figure 3C, D and E). Cetuximab alone (0.5 μ g/ml for 48 hours) induced apoptosis in DiFi cells, while SB202190 alone (5 μ M for 48 hours) had no effect. Conversely, when associated with cetuximab, SB202190 reduced cetuximab-induced apoptosis. Specifically the percentage of Annexin V- labeled cells (Figure 3C) and subG1

cells (Figure 3D) decreased from 24% and 29% (cetuximab) to 12% and 13% (cetuximab+SB202190), respectively, (p-value: 2×10^{-7}). Similarly, western blot analysis (Figure 3E) showed that induction of caspase 3 cleavage by cetuximab was reduced when SB202190 was associated. These results demonstrate that the MAPK p38 contributes to the apoptotic effect of cetuximab in DiFi cells.

Next, we tested the effect of cetuximab and SB202190 on cell proliferation and cell cycle. Cetuximab inhibited cell proliferation as indicated by the reduction of EdU-positive DiFi cells (from 75% in untreated cells to 10.7% in cetuximab-treated cells; p-value: 3.1×10^{-7}) (Figure 3F). Cetuximab inhibition of cell proliferation was significantly reduced when SB202190 was also present in the medium (40.4% EdU- positive cells compared to only 10.7% with cetuximab alone), indicating that p38 is also necessary for cetuximab anti-proliferative effect. Furthermore, cetuximab-induced accumulation of cells in the G1 phase (from 56% in untreated to 74% in cetuximab-treated DiFi cells, p-value: 0.01) (Figure 3G) was not observed when SB202190 was associated with cetuximab (61% of cells in G1 in cetuximab+SB202190 DiFi cells, p-value: 0.03 compared to cetuximab alone). Altogether these results demonstrate that the MAPK p38 is necessary for cetuximab functional activity and is involved in apoptosis induction and proliferation inhibition.

Cetuximab activates the transcription factor FOXO3A in a MAPK p38-dependent manner

We then tried to identify transcription factor(s) involved in cetuximab effect on cell growth and apoptosis. As cetuximab inhibits the AKT and ERK signaling pathways and activates the MAPK p38 pathway, we focused on FOXO3a, because it is inactivated by ERK and AKT and can be activated by p38. FOXO3a is regulated by controlling its cell localization through phosphorylation events. Phosphorylation by ERK and AKT results in

FOXO3a cytoplasmic accumulation and subsequent degradation, while phosphorylation by p38 leads to FOXO3a nuclear re-localization and activation (Ho et al, JBC, 2012). Western blot analysis of cytoplasmic and nuclear extracts from DiFi cells treated with cetuximab showed that FOXO3a was detected easily in the cytoplasmic fraction (Figure 4A, upper left panel), but was hardly detectable in the nuclear fraction (data not shown). Therefore, to enrich FOXO3a in the nuclear fraction we performed immunoprecipitation experiments with an antibody targeting FOXO3a and then western blot analysis (Figure 4A, upper right panel). We could thus detect FOXO3a also in the nucleus of non-treated (NT) cells, and show that, after incubation with cetuximab for 1 hour, FOXO3a decreased in the cytoplasm and increased in the nucleus (Figure 4A). After 6 hours of incubation with cetuximab, FOXO3a was still mainly localized in the nucleus, but to a lesser extent compared to 1h incubation.

As p38 can phosphorylate and activate FOXO3a (Ho et al, JBC, 2012) and p38 is activated by cetuximab, we investigated whether p38 phosphorylated FOXO3a in DiFi cells incubated with cetuximab. Immunoprecipitation of FOXO3a in nuclear extracts after treatment with 10 $\mu\text{g/ml}$ cetuximab or 10 $\mu\text{g/ml}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Figure 4A, lower panels) showed that nuclear accumulation of FOXO3a after cetuximab treatment was completely inhibited when the p38 inhibitor SB202190 was added to the medium. Moreover, immunoblotting of the immunoprecipitated proteins with an antibody against FOXO3a phosphorylated at ser-7 (p38-specific phosphorylation of FOXO3a) showed that phosphorylated FOXO3a on ser7 was enriched in cells incubated with cetuximab, whereas it was completely absent when SB202190 was associated with cetuximab. Altogether, these results indicate that cetuximab-induced nuclear accumulation of FOXO3a is dependent on p38 activity. To confirm this result, we examined by immunofluorescence staining the subcellular localization of FLAG-tagged wild type FOXO3a in DiFi cells incubated or not with cetuximab, SB202190 or both (Figure 4B). Consistent with the previous results, FOXO3a was

localized predominantly in the cytoplasm in untreated cells and almost exclusively in the cytoplasm in SB202190-treated cells. Conversely, FOXO3a was predominantly in the nucleus after incubation with cetuximab, but was delocalized to the cytoplasm when SB202190 was associated with cetuximab. On the other hand, in cells that express a ser-7 phosphorylation-deficient FLAG-tagged FOXO3a mutant (FOXO3A-A7)(Figure 4D), nuclear re-localization of FOXO3a-A7 in response to cetuximab treatment was reduced compared to wild type FOXO3a. These results show that FOXO3a can be activated by cetuximab in CRC cells and that this activation is dependent on its phosphorylation on ser7 by p38.

To determine whether FOXO3a is involved in cetuximab cytotoxic activity, we generated stable DiFi cell lines in which *FOXO3a* was knocked down with retroviruses that express three different anti-*FOXO3a* ShRNAs (F1 to F3). The F2 ShRNA efficiently reduced FOXO3a expression in DiFi cells (Figure 4C, upper panels) and this cell line was used for testing cetuximab cytotoxic activity by SRB assay. Cetuximab cytotoxicity was reduced in the F2 cell line compared to control cells (ShLuc), as indicated by the higher IC₅₀ of cetuximab (101 ng/ml) in F2 cells than in ShLuc cells (80 ng/ml; p-value: 0.005). The finding that sensitivity to cetuximab is reduced when FOXO3a is down-regulated indicates that FOXO3a is involved in the cytotoxic effect of cetuximab in CRC cells.

BIM and p27, downstream targets of FOXO3a, participate in cetuximab apoptotic effect

To identify FOXO3a target genes induced by cetuximab and involved in the apoptotic and anti-proliferative effect of cetuximab, we performed a proteome profiler analysis (data not shown) combined with specific western blot and quantitative PCR (qPCR) assays. Proteome profiler identified two downstream targets of FOXO3a being specifically overexpressed upon cetuximab treatment and downregulated when SB202190 was added to the medium. Real time RT-qPCR analysis using DiFi cells incubated or not with 10µg/ml cetuximab and/or 5µM

SB202190 (p38 inhibitor) showed that *BIM* and *p27* were up-regulated in DiFi cells treated with cetuximab (BIM: 2.8-fold, p-value: 0.0002, p27: 1.6-fold, p-value 0.0002), and that their up-regulation was inhibited by co-incubation with SB202190 (BIM: 1.9-fold, p-value 0.01; p27: 1.1-fold, p-value: 0.004) (Figure 5A). We confirmed these results by western blot analysis (Figure 5B).

To investigate whether BIM and p27 are involved in cetuximab cytotoxicity, we generated stable DiFi cell lines in which *BIM* or *p27* was knocked down with retroviruses that express three different anti-*BIM* ShRNAs or one anti-*p27* ShRNA. The ShRNA-BIM-2 and 3 efficiently reduced BIM expression in DiFi cells (Figure 5C, left panels) and these two stable cell lines were used to test cetuximab cytotoxicity by SRB assay. Cetuximab cytotoxicity was reduced in DiFi cells in which BIM was down-regulated compared to controls (ShLuc), as indicated by their IC₅₀ (53 ng/ml in ShLuc and 73 ng/ml in ShBIM-2 cells, p-value: 0.0002, 71 ng/ml ShBIM-3, p-value: 0.0002). Of note, cetuximab IC₅₀ values in DiFi ShBIM cells (ShBIM2:73 ng/ml and ShBIM3: 71 ng/ml) and in control cells treated with cetuximab + SB202190 (ShLuc: 73 ng/ml) were similar, indicating that BIM loss has the same biological effect than p38 inhibition. Similar results were obtained with DiFi-Shp27 cells (cetuximab IC₅₀: 64.2 ng/ml in DiFi-Shp27 and 42 ng/ml in ShLuc cells)(Figure 5D). These results show that cetuximab induces FOXO3a and the transcription of its downstream targets *BIM* and *p27* that are implicated in the cytotoxic effect of cetuximab in colorectal cancer cells.

Altogether our results highlight a new pathway induced by cetuximab in wild type KRAS CRC cells. We propose a model of p38 role in cetuximab-induced cytotoxicity (Figure 6). In the absence of cetuximab (Figure 6A), EGF binds to EGFR and activates the AKT and ERK signaling pathways, which are involved in cell survival and proliferation. AKT and ERK phosphorylate FOXO3a and this phosphorylation leads to FOXO3a re-localization from the nucleus to the cytoplasm and to its degradation. The two FOXO3a target genes *BIM* and *p27*

are therefore not transcribed any longer and this leads to cell survival and cell proliferation. On the other hand, cetuximab binding to EGFR (Figure 6B) leads to inhibition of AKT and ERK signaling, relieving their negative effect on FOXO3a. At the same time, cetuximab activates the MAPK p38 that further inhibits ERK signaling and activates FOXO3a by specific phosphorylation on serine 7. FOXO3a activation combined with the lack of ERK and AKT signaling leads to FOXO3a nuclear accumulation, transcription of its target genes, among which there are *BIM* and *p27*, and induction of apoptosis and inhibition of proliferation.

Discussion

In the present study, we demonstrate the role of p38 and FOXO3a in the mechanism of action of cetuximab in CRC cells. Moreover we show that *BIM* and *p27* have a major role in cetuximab cytotoxic and cytostatic effects.

We show for the first time that p38 phosphorylation is increased in CRC cells upon cetuximab treatment. Previously, Eke et al (Eke et al, Cancer Research, 2013) reported that in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, cetuximab-induced p38 activation, together with JNK phosphorylation, promotes fibronectin biosynthesis and secretion. This can lead to cetuximab resistance in cells that express integrins, because the heterodimeric $\alpha5\beta1$ integrin receptor is the main mediator for cell-fibronectin interactions. In this case p38 induction participates in a mechanism of drug resistance, thus its inhibition would increase the cytotoxic effect of cetuximab. Although DiFi cells also express fibronectin and the $\alpha5\beta1$ receptor (Vial et al, JBC 2012), our results are different because all the experiments were done on plastic and cells were not grown in the presence of extracellular matrix.

The relationship between EGFR and p38 has not been extensively studied, but few data have been published on EGFR phosphorylation by p38. In 2006, three studies demonstrated that p38 can phosphorylate EGFR, leading to its internalization and subsequent degradation (Zwang et al, 2006, EMBO, Vegarajauregui et al, 2006 and Winograd-Katz et al, 2006). These data have been confirmed by Adachi et al who showed in CRC cells that (2)-Epigallocatechin gallate (EGCG) causes EGFR phosphorylation at ser1046/1047 via p38 activation, leading to EGFR internalization and degradation (Adachi et al, Carcinogenesis, 2009). More recently, Swat et al demonstrated that p38 is involved in EGFR degradation without affecting its phosphorylation, but rather by regulating negatively the cCBL inhibitor Sprouty2, leading to up-regulation of the ubiquitin ligase cCBL and subsequent EGFR degradation (Swat et al, MCB, 2009). As cetuximab inhibitory activity can be attributed to its ability to translocate EGFR molecules away from the plasma membrane, p38 role in EGFR internalization may be involved in the mechanism of action of cetuximab. Indeed, by removing EGFR from the cell surface, p38 blocks the growth factor-mediated survival and proliferation pathways. Conversely, p38 inhibition can prevent EGFR internalization and degradation, ultimately promoting cell survival and proliferation.

Our study shows that upon cetuximab treatment, p38 can activate FOXO3a. Lam and collaborators have recently reported that p38 phosphorylates directly FOXO3A on ser 7, promoting its nuclear translocation and activation (Ho et al, JBC, 2012). This new p38 target protein is specific, because the other mammalian members of the FOXO family (FOXO1, FOXO4 and FOXO6) do not harbor this phosphorylation site. Moreover, FOXO3a phosphorylation on ser-7 is exclusively mediated by p38, because inhibition of JNK, PI3K and ERK has no effect on this phosphorylation. These data reinforce the role of p38 in FOXO3a activation after cetuximab treatment. While most FOXO3a phosphorylation sites

have inhibitory effects on its activity and nuclear localization, ser-7 phosphorylation is associated with FOXO3a nuclear accumulation and the subsequent induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation. Our results are consistent with the role of p38 on FOXO3a activity described by Lam.

While FOXO3a activation upon incubation of CRC cells with cetuximab was never reported, some publications have shown that drugs targeting the EGFR signaling, particularly erlotinib in cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (Ganesan et al, Thorax, 2013) or gefitinib, lapatinib and trastuzumab in breast cancer cells (Krol et al, Mol Cancer Therapeutics, 2007, Hedge et al, Mol Cancer Therapeutics, 2007, Real et al, Cancer Research, 2005), can activate FOXO3a, leading to cell death and/or cell cycle arrest. These results indicate that cell death and the anti-proliferative effects induced by EGFR inhibition can be attributed, at least in part, to the specific activation of FOXO3a and that, as a consequence, FOXO3a nuclear localization could become a useful biomarker of the therapeutic success of EGFR inhibitors.

However, our results contradict the work by Simone's group showing that p38 inhibition (and not p38 activation like in the present study) in CRC cells induces FOXO3a activation and subsequently autophagy, cell death and tumor growth reduction (Chiacchiera et al, Cancer Letters, 2012). They demonstrated that p38 inhibition leads to a decrease in intracellular ATP levels and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK in turn activates FOXO3a (phosphorylation at Thr-179, Ser-399, Ser-413, Ser-555, Ser-588, and Ser-626) without affecting its cytoplasmic/nuclear distribution. These differences may be linked to the specific FOXO3a phosphorylation. We have shown that p38-specific ser-7-phosphorylation of FOXO3a is essential because the ser-7 phosphorylation-defective FOXO3a mutant could not localize to the nucleus any longer upon cetuximab treatment.

Moreover, Chiacchiera et al used KRAS or BRAF mutated CRC cells and chemotherapy, whereas we used an anti-EGFR antibody in wild type KRAS CRC cells.

In conclusion, here we show that p38 participates in the cytotoxic and cytostatic effect of cetuximab in colorectal cancer cells. We and others have previously shown that p38 is involved in the mechanism of action of other anti-cancer drugs. For example, inhibition of p38 sensitizes colon cancer cells to SN38 (Paillas et al, Cancer Research 2011, Paillas, Autophagy, 2012), 5-fluorouracil (Yang et al, International journal of oncology, 2011), sorafenib (Grossi et al, Cancer Biology and therapy, 2012) and cisplatin (Germani et al, Cancer Letters, 2014). Moreover, p38 contributes to the cytotoxic effect of oxaliplatin (Chiu et al, Toxicol Letters, 2008, Liu et al, Chem Biol Interact, 2010, Dey et al, BMC Cell Biol, 2012). Altogether, these results indicate that p38 is a major player in the treatment of colorectal cancer.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Cetuximab (Erbix®) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). SB202190 and SP600125 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lapatinib (Tyverb®) and erlotinib (Tarceva®) were from . Primary antibodies against phospho-p38, phospho-AKT, phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-ATF2, p38 α , cleaved caspase 3, tubulin, FOXO3a, BIM and p27 were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); the anti-FOXO3a-phosphoSer7 antibody was from E. Lam (ref). Secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antisera (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Kinase assay

The p38 kinase assay was performed using the non-radioactive p38 MAPK Assay Kit from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), as previously described (Gongora, Cancer Biol Ther, 2008).

Cell culture and retroviral infections

The human EGFR-positive rectum adenocarcinoma DiFi cell line was obtained from Dr Clara Montagut (Barcelona, Spain). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO₂.

DiFi cells expressing ShRNAs targeting *luciferase*, *p38 α* , *FOXO3a*, *BIM* and *p27* mRNA were obtained by retroviral gene transduction of the pSIREN vector in which the ShRNAs were cloned. Cells were selected with 1 μ g/mL puromycin and then stable clones were pooled.

Plasmids

The pCMV-FLAG-tagged human wild type FOXO3a and mutated FOXO3a S7A expression vectors have been previously described (Ka-Ke Ho, 2012, JBC).

Subcellular protein extraction and immunoprecipitation

3 10^6 DiFi cells were scraped and lysed in lysis buffer (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.34M sucrose, 10% glycerol, protease inhibitors and 1 mM DTT) and then rapidly centrifuged at 3500 RPM. Supernatants containing cytosolic proteins were stored. Pellets were then lysed in 3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and protease inhibitors and then vortexed to obtain the nuclear protein fraction. Immunoprecipitations were performed using 0.4 mg of proteins, protein A/G magnetic beads (Pierce) and the anti-FOXO3a antibody (CST).

Cell line authentication

DiFi cell lines have been identified by Enrofins Genomics on September 2014.

Immunofluorescence

Cells were plated on 12 mm glass coverslips in culture dishes. They were fixed in 3.7% formaldehyde, blocked in PBS with 1% BSA and 0.3% Triton and incubated with an anti-FLAG monoclonal antibody and then with a FITC-conjugated anti-rabbit antiserum. DAPI was used to stain nuclei. Coverslips were then mounted in Moviol and images were recorded using a 63XNA objective and a Leica inverted microscope.

RNA preparation and RT-qPCR

Total RNA was isolated from DiFi cells using the RNeasy[®] mini Kit (Qiagen, Netherland) with an additional DNase digestion step (Qiagen, Netherland). RNA was quantified by UV spectroscopy. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using the SuperScript III reverse

transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, USA). Real-time quantitative PCR was performed using the LC480 cycler (Roche Diagnostics, France) according to the manufacturer's instruction. The amplification specificity was verified by melting curve analysis. Real-time PCR values were determined by reference to a standard curve that was generated by real-time PCR amplification of a serially diluted cDNA sample using primers specific for *p27*, *BIM* and *28s*. The quantification data were normalized to the amplification data for the reference gene *28s*.

Drug sensitivity assay

Cell growth inhibition and cell viability after cetuximab incubation were assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay, as previously described (Candeil, International Journal of cancer 2004).

Cell death analysis

Cell death analysis was performed using the Annexin V-FITC/7-AAD Kit (Beckman Coulter, Indiannapolis, USA). Cells were seeded in 6-well plates at 1×10^6 cells/well. After a 24-hour rest, cells were incubated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ cetuximab, 5 μM SB202190, or 0.5 $\mu\text{g/ml}$ cetuximab + 5 μM SB202190 for 48 hours. Cells (1×10^6) and the corresponding supernatants were then labeled using the Annexin V-FITC/7-AAD Kit. Analyses were done on a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer. Annexin V-FITC positive cells were quantified using the Flow Jo analysis software (Treestar Inc, Ashland, Oregon, USA).

Cell cycle analysis

Cells were seeded in 6-well plates at 1×10^6 cells/well. After a 24-hour rest, cells were treated with 0.5 µg/ml cetuximab, 5 µM SB202190, or 0.5 µg/ml cetuximab + 5 µM SB202190 for 48 hours. One million cells were pelleted, washed with PBS, fixed in 75% ethanol, treated with 100 µg/mL RNase (QIAGEN) and stained with 40 µg/mL propidium iodide. Analyses were done on a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer. The cell cycle distribution was then determined with a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer using the FL-3 channel. Cells were gated on a dot plot that displayed the DNA pulse-peak versus the DNA-pulse area to exclude doublets. Cell cycle distributions were illustrated using the Flow Jo analysis software (Treestar Inc, Ashland, Oregon, USA).

Cell proliferation analysis

Cell proliferation was measured by incorporating 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) into DNA during the active DNA synthesis (i.e., the last 30 hours of culture). After cell fixation – permeabilization in 75% ethanol/PBS, incorporated Edu was labeled and detected with the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Analyses were done on a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer. Alexa Fluor 488-conjugated EdU-positive cells were quantified using the Flow Jo analysis software (Treestar Inc, Ashland, Oregon, USA).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank the Montpellier RIO Imaging facility for flow cytometry experiments, in particular Nadia Vié.

This work was supported by INSERM and ICM Val D'Aurelle. Laetitia Marzi had a PhD studentship from the French government. Eve Combes had a PhD studentship from the Labex MabImprove. Adeline Torro had a MabImprove post-doctoral fellowship.

References

Figures

Figure 1: *The MAPK p38 is activated by cetuximab.* **A:** Western blot analysis of phospho-AKT (P-AKT), phospho-ERK (P-ERK), phospho-p38 (P-p38) and phospho-JNK (P-JNK) in DiFi cells incubated with cetuximab (Ctx) for 24 hours. Equal loading is shown by tubulin (Tub). **B:** SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells incubated with cetuximab alone or together with the JNK inhibitor SP600125 (SP) or the p38 inhibitor SB202190 (SB). **C: Top panel:** Kinase assay to test p38 activity (performed with immunoprecipitated p38) in cells incubated with 0.5 µg/ml cetuximab alone (Ctx), 5 µM SB202190 (SB) alone or with 0.5 µg/ml cetuximab + 5µM SB202190 (Ctx + SB) for 24 hours. Western blot analysis of phosphorylated ATF2. **Lower panels.** Western blot analysis of phospho-p38 (P-p38) in DiFi cells incubated with 0.5 µg/ml cetuximab alone (Ctx), 5 µM SB202190 (SB) alone or 0.5 µg/ml cetuximab + 5µM SB202190 (Ctx + SB) for 24 hours. Equal loading is shown by tubulin (Tub). **D:** Western blot analysis of phospho-AKT (P-AKT) and phospho-ERK (P-ERK) in DiFi cells incubated with 0.5 µg/ml cetuximab alone (Ctx), 5 µM SB202190 (SB) alone or with 0.5 µg/ml cetuximab + 5µM SB202190 (Ctx + SB) for 24 hours. Equal loading is shown by tubulin. NT, not treated. ★★ p<0.01.

Figure 2: *The MAPK p38 is necessary for the cytotoxic effect of EGFR-targeted therapies.* **A:** Western blot analysis of phospho-p38 (P-p38) to evaluate p38 activation in DiFi cells incubated with 0.5µg/ml cetuximab for 1, 6, 24, 48, 72 and 96 hours (**Left panels**) or at 0.01, 0.1, 1 and 10 µg/ml for 24 hours (**Right panels**). Equal loading was assessed with an anti-

tubulin antibody. **B: Top panels:** Western blot analysis of p38 α expression in DiFi cells transduced with ShRNAs against p38 α (Shp38 α 1 and Shp38 α 2) or against *Luciferase* (ShLuc) (control). Equal loading is shown by tubulin. **Low panel:** SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells transduced with two different ShRNAs against p38 α (Shp38 α 1 and Shp38 α 2). **C:** SRB assays to assess the cytotoxicity of lapatinib (Lapa) (**Top panel**) or erlotinib (Erlo) (**Lower panel**) alone or in combination with 5 μ M SB202190 (SB, p38 inhibitor) in DiFi cells. NT, not treated. \star p<0.05, $\star\star$ p<0.01.

Figure 3: The MAPK p38 participates in cetuximab apoptotic and anti-proliferative effect. **A:** Western blot analysis of cleaved-caspase 3 (Cleaved Casp3) or phospho-p38 (P-p38) in DiFi cells incubated with increasing concentrations of cetuximab (Ctx, 0.01, 0.1, 1 and 10 μ g/ml) for 48 hours. Equal loading was assessed with an anti-tubulin antibody. **B:** DiFi cells were incubated with increasing concentrations of cetuximab (Ctx) for 48 hours and apoptosis was determined by quantifying the number of 7AAD-negative and Annexin V-FLUOS-positive cells with a FACScan flow cytometer (**Top Panels**) or by quantifying the proportion of cells in the subG1 phase of the cell cycle (**Lower panels**). **C:** Quantification of apoptosis in DiFi cells incubated with 0.5 μ M cetuximab (Ctx) alone, 5 μ M SB202190 alone (SB) or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 48 hours by calculating the number of 7AAD-negative and Annexin V-FLUOS-positive cells with a FACScan flow cytometer or (**D**) the proportion of cells in the subG1 phase of the cell cycle (**Left panels**). The histogram shows the mean of three experiments (**Right panel**). **E:** Western blot analysis of cleaved-caspase 3 (Cleaved Casp3) in DiFi cells incubated with 0.5 μ M cetuximab (Ctx) alone, 5 μ M SB202190 (SB) alone or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 48 hours. Equal loading was assessed with an anti-tubulin antibody. **F:** Cell proliferation was analyzed by quantifying the percentage of Edu-labeled DiFi cells after incubation with 0.5 μ M cetuximab (Ctx) alone, 5 μ M SB202190 alone (SB) or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 48 hours

(Left panels). The histogram shows the mean of three experiments **(Right panel).** **G:** Cell cycle distribution in DiFi cells was assessed by quantifying propidium iodide staining with a FACScan flow cytometer after incubation with 0.5 μ M cetuximab (Ctx) alone, 5 μ M SB202190 alone (SB) or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 48 hours. NT, not treated. ★★ ★ $p < 0.001$.

Figure 4: *Cetuximab activates the transcription factor FOXO3a in a MAPK p38-dependent manner.* **A:** Western blot analysis of FOXO3a in the cytoplasm and in the nucleus (in this case after FOXO3a immunoprecipitation). DiFi cell were incubated with 10 μ g/ml cetuximab (Ctx) for 1 and 6 hours **(Top panels)**. Western blot analysis of FOXO3a and phospho-ser7-FOXO3a in nuclear extracts after FOXO3a immunoprecipitation. DiFi cell were treated with 10 μ g/ml cetuximab alone (Ctx) or 10 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx + SB) for 1 hour **(Lower panels)**. **B:** Detection of FLAG-tagged wild type FOXO3a by immunofluorescence in DiFi cells incubated with 10 μ g/ml cetuximab (Ctx), 5 μ M SB202190 (SB) or 10 μ g/ml cetuximab+5 μ M SB202190 (Ctx + SB) for 1 hour. **C:** Western blot analysis of FOXO3a expression in DiFi cells transduced with three different ShRNAs against *FOXO3a* (F1, F2 and F3) or against *Luciferase* (Luc) (control). Equal loading is shown by tubulin expression **(Top panels)**. SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells transduced with the F2 ShRNA against FOXO3a **(Lower panel)**. **D:** Detection of FLAG-tagged mutant FOXO3a-7A by immunofluorescence in DiFi cells incubated with 10 μ g/ml cetuximab (Ctx), 5 μ M SB202190 (SB) or 10 μ g/ml cetuximab+5 μ M SB202190 (Ctx + SB) for 1 hour. NT, not treated.

Figure 5: *BIM and p27, downstream targets of FOXO3a, participate in cetuximab apoptotic effect.* **A:** RT-qPCR quantification of *BIM* **(Left panel)** and *p27* transcripts **(Right panel)** in

DiFi cells incubated with 0.5 μ M cetuximab (Ctx) alone, 5 μ M SB202190 alone (SB) or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 48 hours. **B:** Western blot analysis of BIM and p27 expression in DiFi cells incubated with 0.5 μ M cetuximab (Ctx) alone, 5 μ M SB202190 alone (SB) or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 48 hours. Equal loading was assessed with an anti-tubulin antibody. **C:** Western blot analysis of BIM expression in DiFi cells transduced with three different ShRNAs directed against *BIM* (ShBIM1, ShBIM2 and ShBIM3) or against *Luciferase* (ShLuc) (control). Equal loading is shown by tubulin expression (**Left panels**). SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells transduced with ShRNAs against *BIM* (shbim2 and shbim3) or *Luciferase* (shLUC) and incubated with 0.5 μ g/ml cetuximab alone (Ctx) or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 96 hours (**Right panel**). **D:** Western blot analysis of p27 expression in DiFi cells transduced with ShRNAs against *p27* (Shp27) or against *Luciferase* (ShLuc) (control). Equal loading is shown by tubulin expression (**Left panels**). SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells that express ShRNAs against *p27* and incubated with 0.5 μ g/ml cetuximab alone (Ctx) or 0.5 μ g/ml cetuximab + 5 μ M SB202190 (Ctx+SB) for 96 hours (**Right panel**). ★ $p < 0.05$, ★★ $p < 0.01$, ★★★ $p < 0.001$.

Figure 6: Schematic model summarizing the MAPK p38 and FOXO3a implication in cetuximab signaling. **A:** EGF binding to EGFR activates the AKT and ERK signaling pathways. AKT and ERK can phosphorylate FOXO3a and this phosphorylation leads to FOXO3a re-localization from the nucleus to the cytoplasm and to FOXO3a degradation. As a consequence, *BIM* and *p27*, which are target genes of the transcription factor FOXO3a and are involved in apoptosis and repression of cell proliferation, are not transcribed. This leads to cell survival and cell proliferation. **B:** Binding of cetuximab to EGFR leads to inhibition of the AKT and ERK signaling pathways and, consequently their negative effect on FOXO3a is relieved. Concomitantly, cetuximab activates the MAPK p38 that further inhibits ERK

signaling and specifically activates FOXO3a by phosphorylation on serine 7. FOXO3a activation combined with the lack of ERK and AKT activity leads to FOXO3a localization into the nucleus, transcription of its target genes, such as *BIM* and *p27*, and activation of apoptosis and inhibition of cell proliferation.

Figure 1

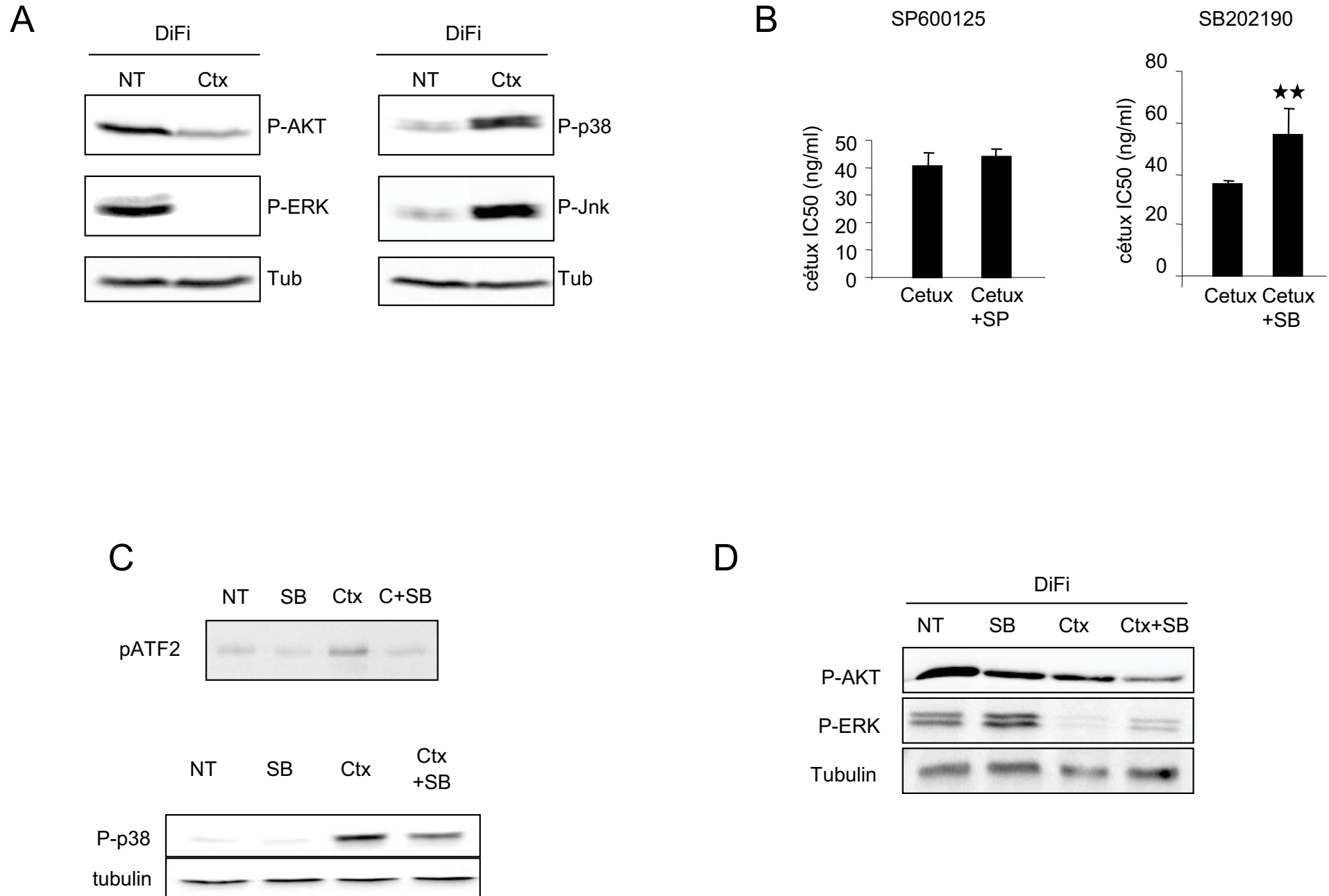
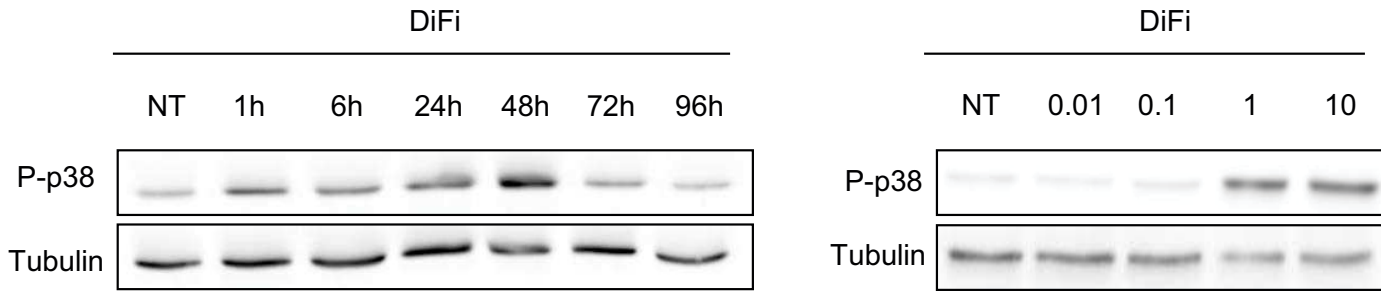
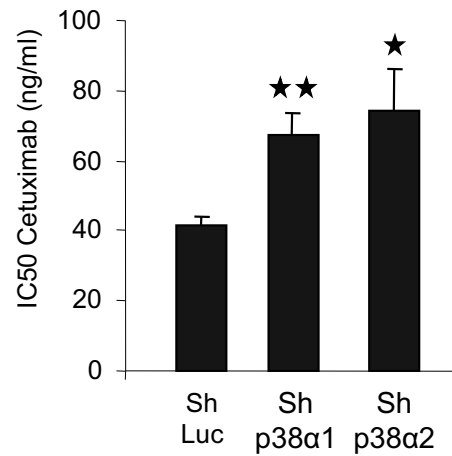
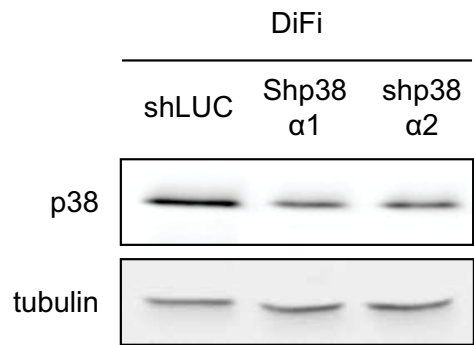


Figure 2

A



B



C

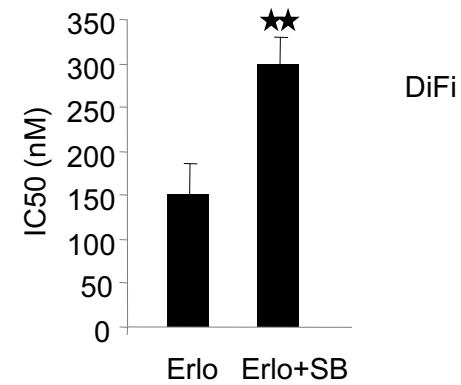
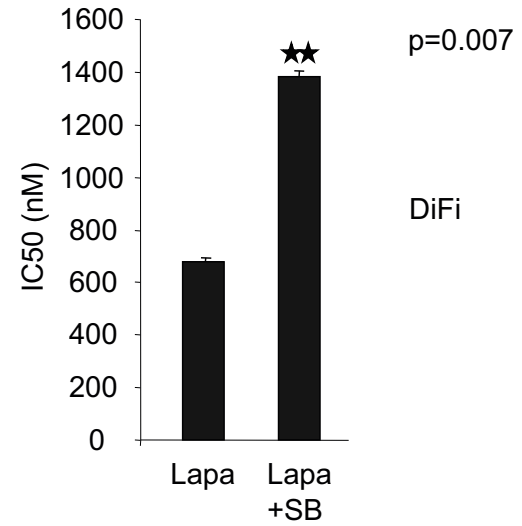
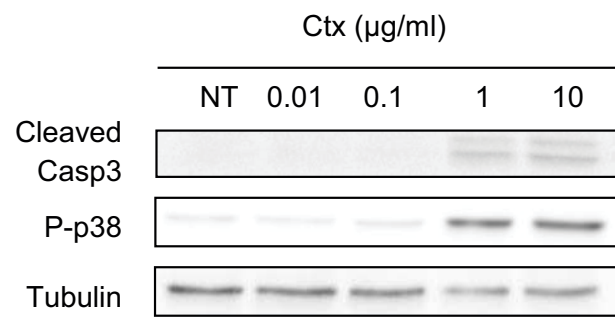
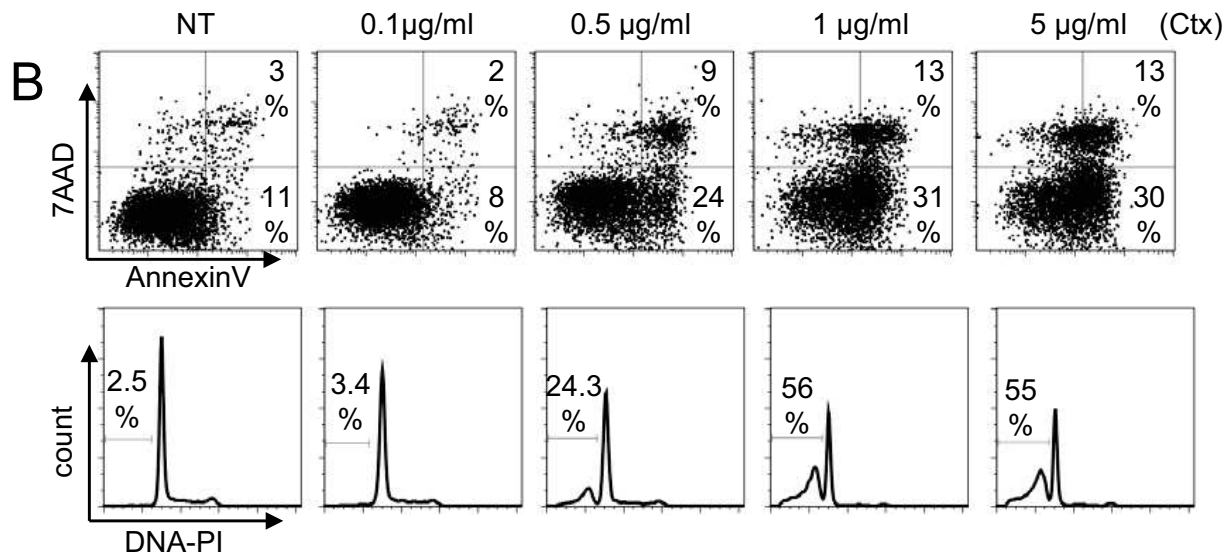


Figure 3

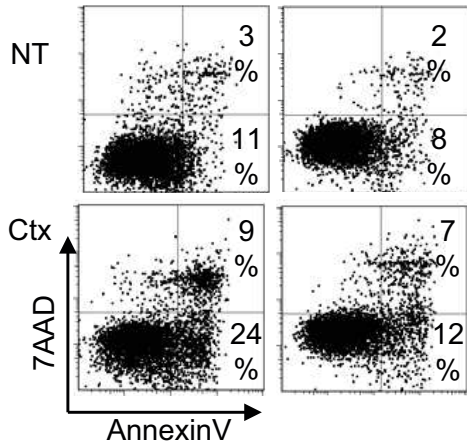
A



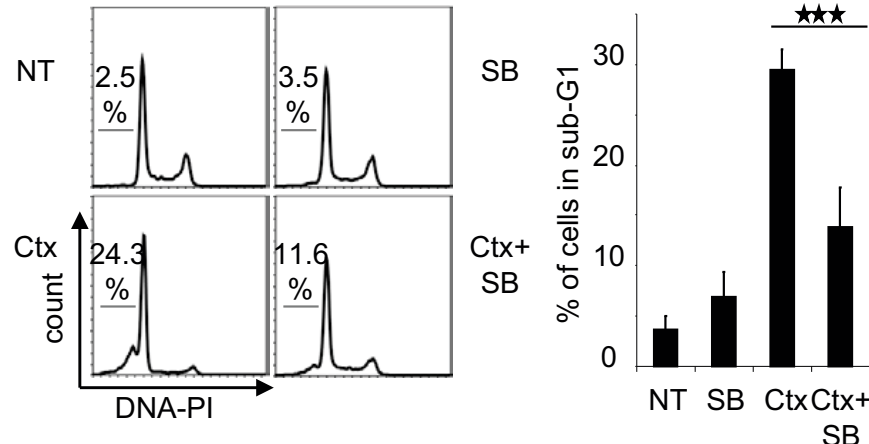
B



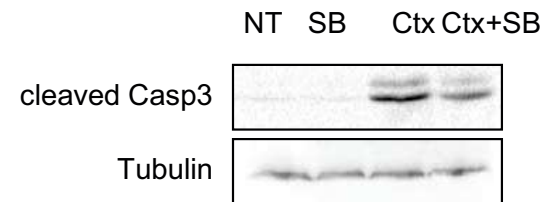
C



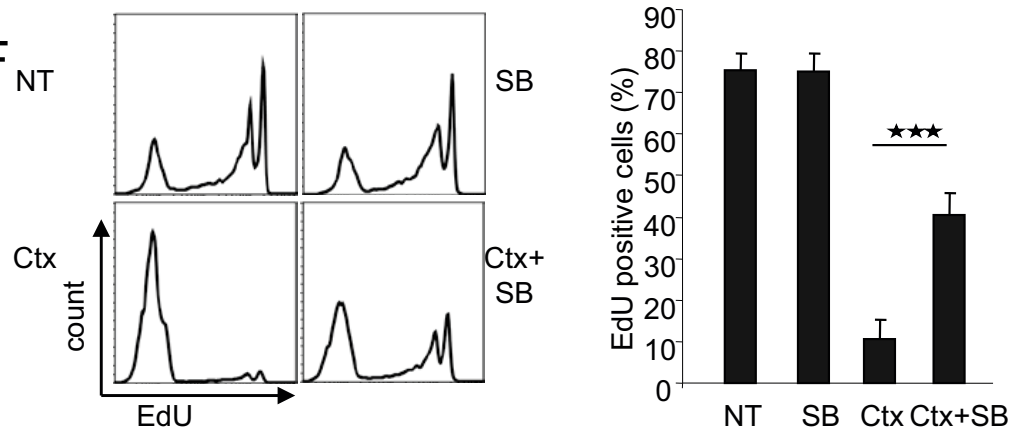
D



E



F



G

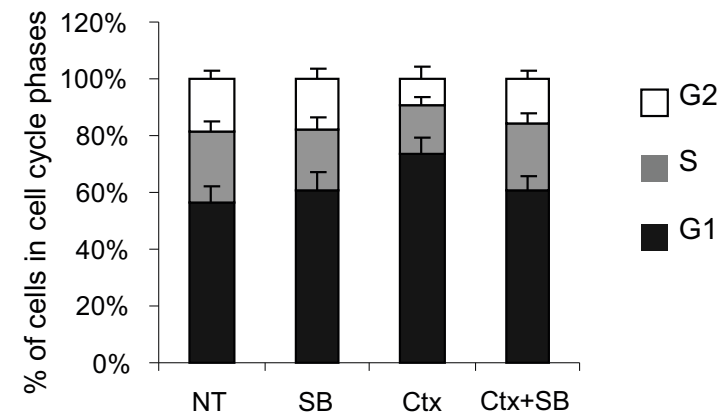


Figure 4

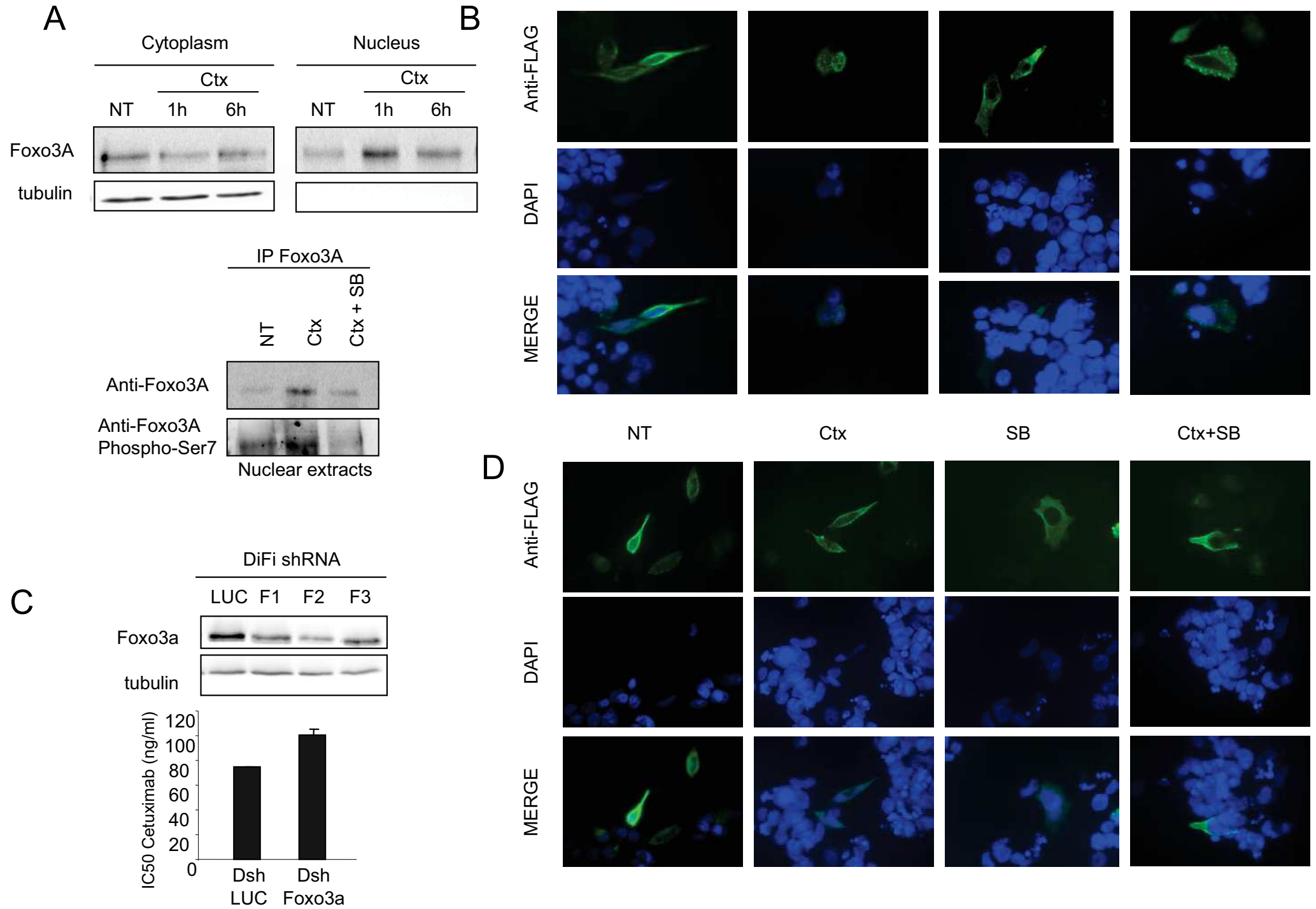


Figure 5

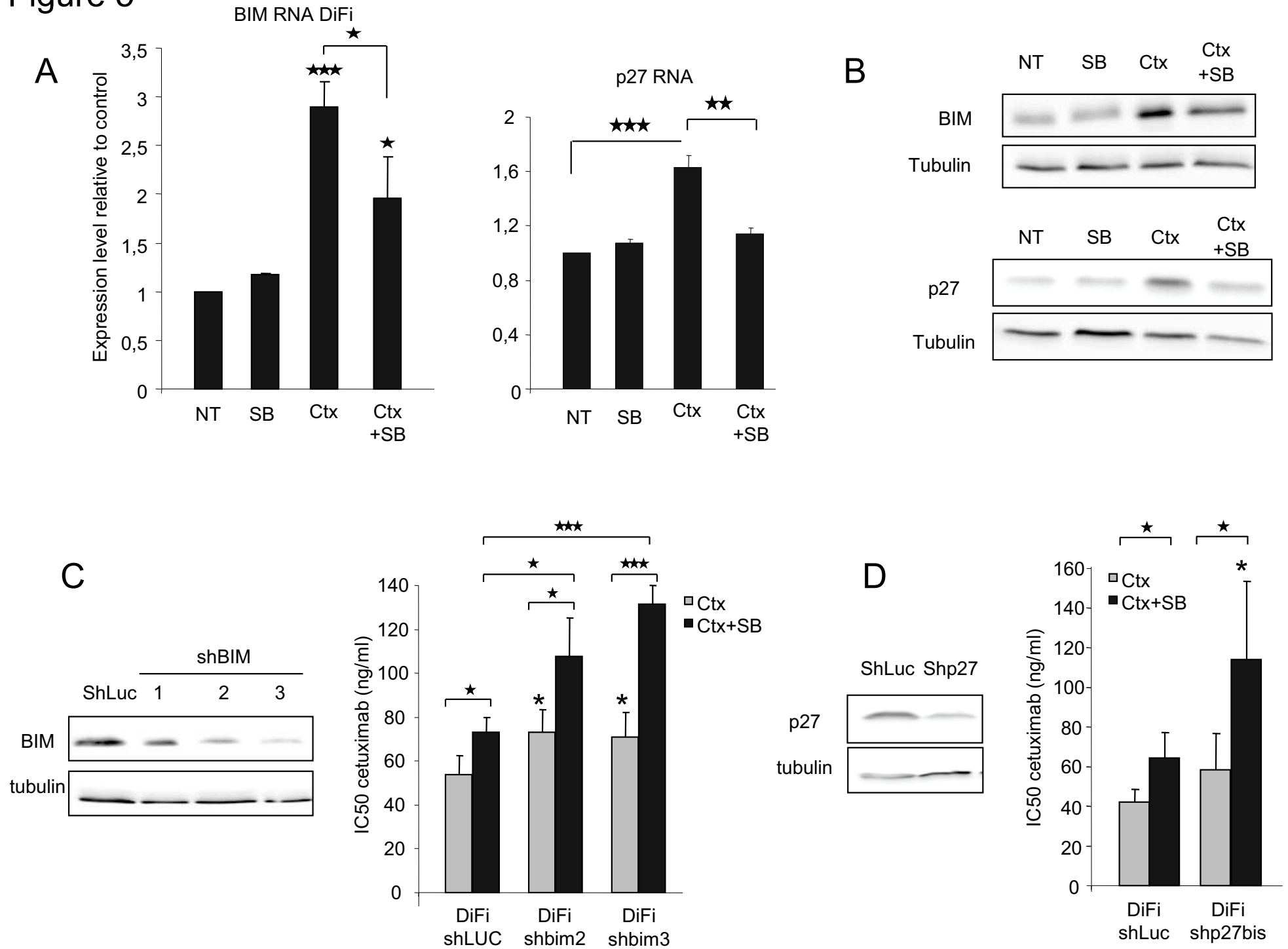
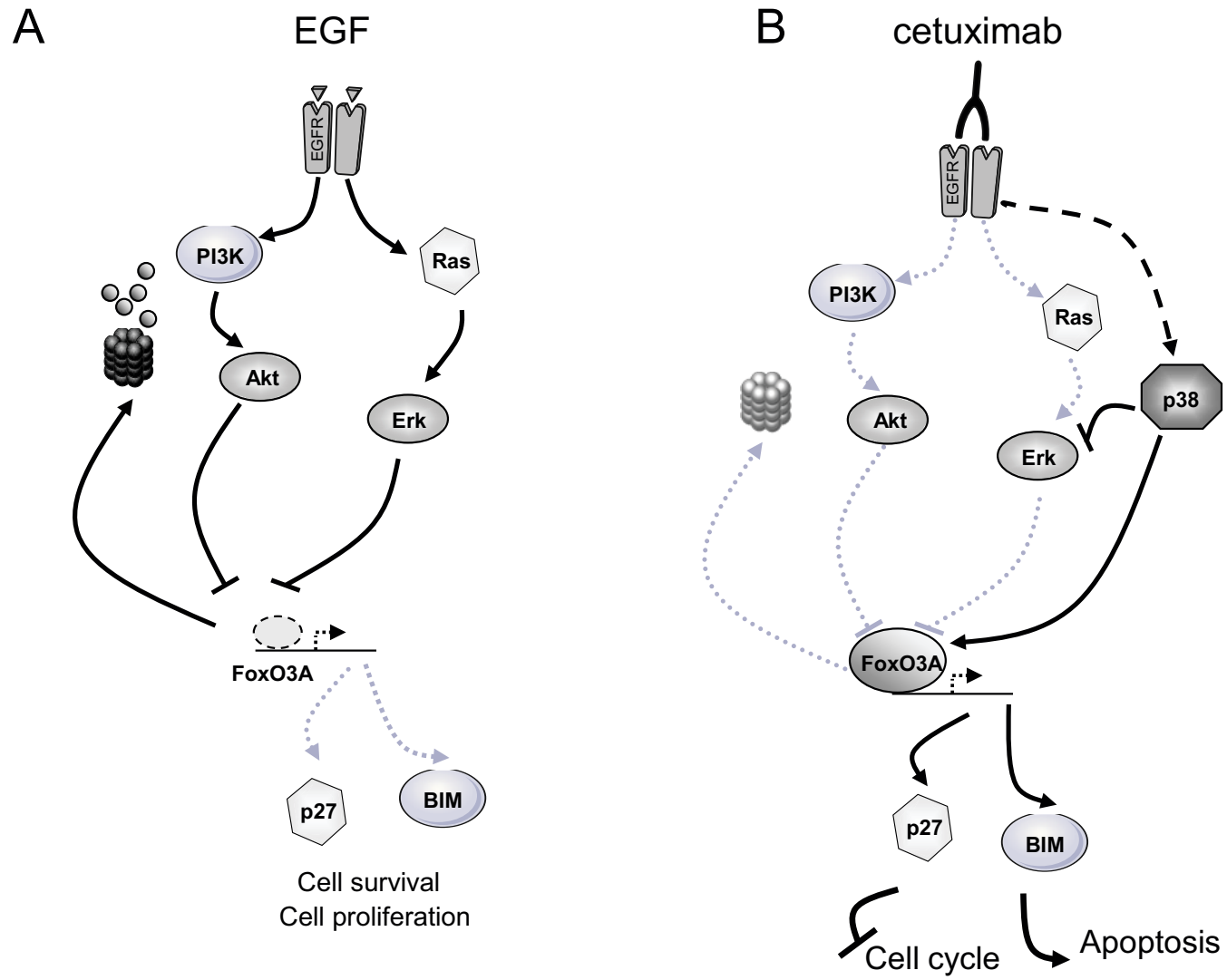


Figure 6



1.3. Commentaire de l'article

Nous avons montré pour la première fois l'implication de la MAPK p38 dans le mécanisme d'action moléculaire du cetuximab dans le modèle DiFi. En effet, l'inhibition de la MAPK p38 bloque partiellement l'effet apoptotique et antiprolifératif du cetuximab sur cette lignée. Nous avons également identifié l'effecteur transcriptionnel de ce blocage: FOXO3a.

Cependant le rôle de p38 semble être différent dans les autres études menées précédemment. Il semble alors que p38 peut moduler la réponse au cetuximab via l'expression de la fibronectine (I) ou la modulation de la quantité ou des partenaires de l'EGFR (II). Dans la troisième partie, je discuterai de ce qu'il reste à faire pour compléter ce travail (III).

I. Rôle de p38 dans la résistance au cetuximab

Les résultats obtenus précédemment par d'autres équipes sur l'étude de p38 dans la réponse aux anti-EGFR, démontrent que p38 est impliquée dans la résistance. L'équipe de Zuo et collaborateurs a montré que l'activation de p38 est augmentée dans une lignée de carcinome nasopharyngial résistante au cetuximab [225]. Et en 2013, il a été établi que p38 est responsable de la production de cytokine pro-tumorale induite par l'erlotinib dans les cellules de cancer tête et cou [226].

De plus, une équipe a déterminé que la MAPK p38 a plutôt un rôle dans la résistance des cellules de cancer du poumon au cetuximab via son action sur la fibronectine. La MAPK p38 participe à la production de fibronectine responsable de l'inhibition de l'effet de l'anticorps. Les auteurs démontrent ainsi le rôle de p38 sur l'interaction de la cellule traitée avec son environnement extracellulaire après traitement au cetuximab [227]. Nous observons également cette augmentation de l'expression de fibronectine après traitement au cetuximab (Figure 29). En revanche, même si l'inhibition de p38 diminue la quantité de fibronectine cela ne suffit pas à induire une sensibilisation indiquant que le rôle de p38 dans la signalisation induite par le cetuximab est prépondérant à son rôle dans la résistance. Cependant, nous avons effectué nos expériences sur des cellules cultivées sur du plastique et non sur de la matrice extracellulaire comme les auteurs de cet article. De plus, les cellules de cancer du poumon ne se comportent pas comme les autres cellules face au cetuximab. Il a été montré que dans ces

cellules le statut *KRAS* n'est pas prédictif de la réponse au cetuximab [228;229]. Il est alors possible que le rôle de p38 soit dépendant de la lignée utilisée (tissu) et/ou des conditions de culture utilisées.

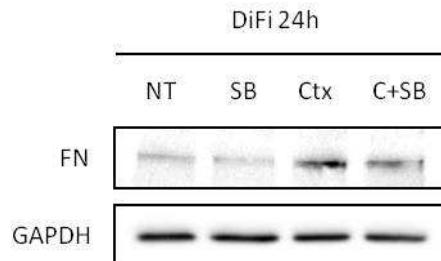


Figure 29: Expression de la fibronectine dans la lignée DiFi

Expression de la fibronectine dans les DiFi traitées au cetuximab, au SB202190 ou au cetuximab + SB202190. Les cellules ont été ensemencées à 1 millions sur des boîtes de pétri 10cm puis traitées au cetuximab 10 μ g/ml, au SB202190 5 μ M ou la combinaison et incubées 24h à 37°C.

II. Rôle de p38 sur l'expression membranaire de l'EGFR et de son partenaire HER2

a. Inhibition de p38 et expression membranaire de l'EGFR et de HER2

Des études montrent que p38 régule le renouvellement de l'EGFR à la membrane soit directement par phosphorylation [121] soit via SPROUTY2 et cCbl [122]. On pourrait alors émettre l'hypothèse que p38 a également un rôle dans l'effet du cetuximab via la régulation de la disponibilité du récepteur à la surface des cellules. Nous avons donc étudié l'effet de l'inhibition de p38 dans la régulation de l'expression membranaire des récepteurs EGFR et HER2 et la formation des homodimères d'EGFR ou des hétérodimères EGFR-HER2.

Nous avons déterminé si l'inhibition de la MAPK p38 par le SB202190, à la concentration utilisée dans les expériences, modifie la quantité des récepteurs EGFR et HER2 à la surface des DiFi par des expériences de cytométrie en flux. Les résultats indiquent que ce n'est pas le cas, l'inhibition de p38 ne modifie la quantité d'aucun de ces deux récepteurs de la famille HER (Figure 30).

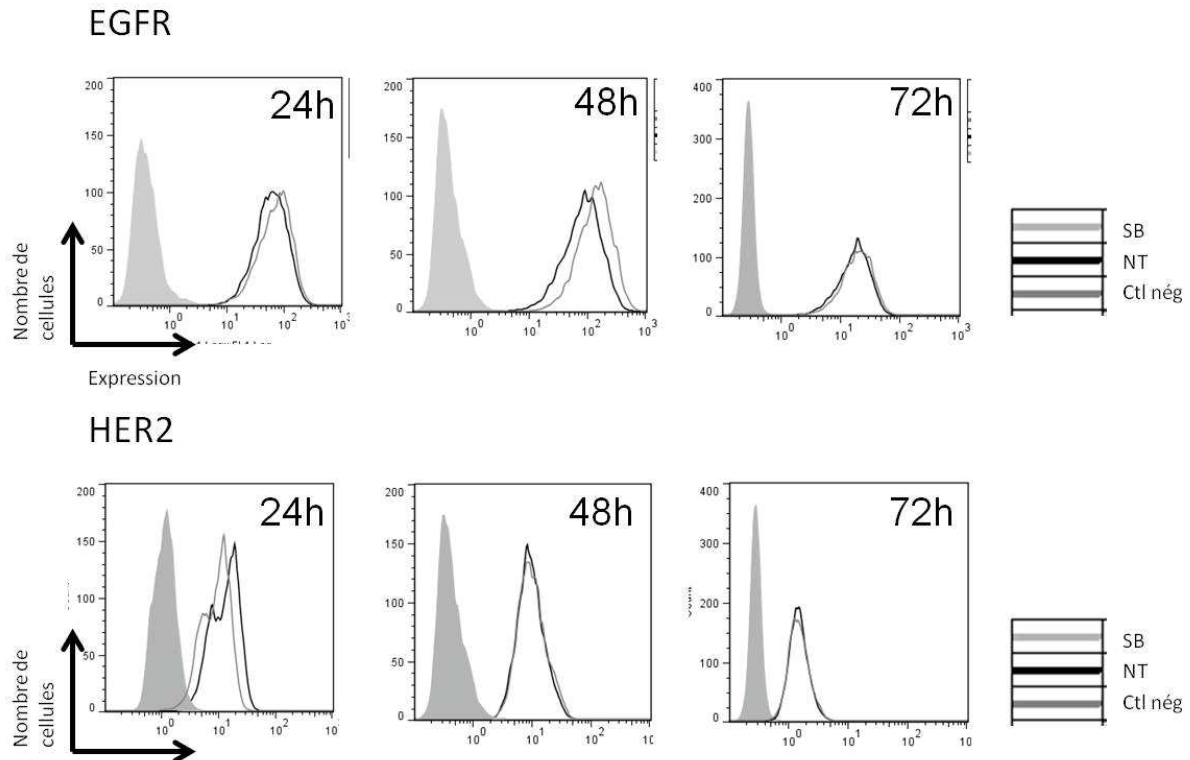


Figure 30: Le SB202190 ne modifie pas la quantité d'EGFR ni d'HER2 à la membrane des DiFi
 Expression membranaire de l'EGFR et de HER2 de DiFi traitées au SB202190. Les cellules ont été ensemencées puis traitées 24h, 48h ou 72h au SB202190 5 μ M. Les graphes obtenus représentent l'expression des protéines en fonction du nombre de cellules. Plus le signal est décalé vers la droite, plus les cellules expriment de la protéine.

b. Effet de l'inhibition de p38 dans la formation des dimères EGFR-EGFR et EGFR-HER2

Grâce à une collaboration au sein de notre institut, nous avons pu tester l'effet de l'inhibition de p38 sur les dimères EGFR-EGFR et EGFR-HER2 sur une lignée de pancréas: BxPC3. Pour cela nous avons utilisé la technique de TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) qui consiste à détecter la proximité de deux cibles grâce à l'échange de fluorescence entre deux fluorochromes. Ces deux fluorochromes, l'un donneur et l'autre accepteur d'énergie, sont fixés à des anticorps ciblant, dans notre cas, l'EGFR ou HER2. Si les deux récepteurs sont à proximité à la surface de la cellule il va y avoir un transfert d'énergie entre les fluorochromes donneur et accepteur et le signal alors émit par l'accepteur va être détecté. Il s'agissait dans notre étude de comparer si la proximité entre les récepteurs était modifiée par l'inhibition de p38 (SB202190).

Les résultats préliminaires obtenus montrent une tendance à perdre les dimères EGFR-EGFR au profit des dimères EGFR-HER2 (Figure 31).

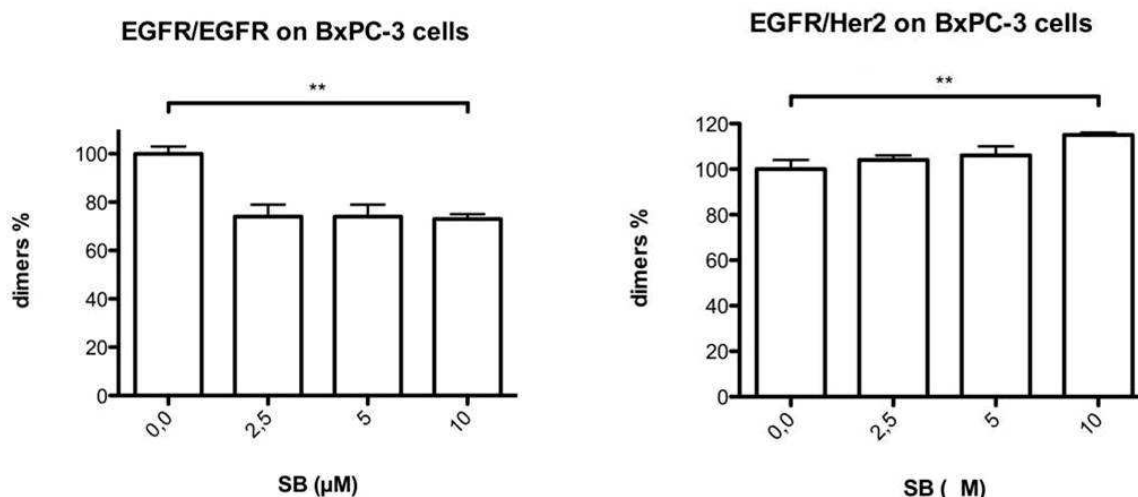


Figure 31: Le SB202190 diminue la quantité d'homodimères EGFR-EGFR au profit des dimères EGFR-HER2

Détection de la quantité de dimères EGFR-EGFR et EGFR-HER2 à la surface de BxPC3 traitées au SB202190. * p <0,05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Il semble donc que p38 favorise la dimérisation de l'EGFR avec un autre EGFR plutôt qu'avec HER2 dans la lignée BxPC3. Dans la littérature, il apparaît que les dimères EGFR-HER2, comme les autres dimères contenant HER2, sont responsable d'une induction plus forte des fonctions de prolifération et d'invasion dans des cellules CHO (hamster) que les dimères EGFR-EGFR [230]. L'inhibition de ce dimère devrait donc conduire à une inhibition de la prolifération. De plus, il a été montré que le cetuximab diminue la formation des dimères EGFR-EGFR et EGFR-HER2 [231] et cet effet participe directement à l'action anti-tumorale du cetuximab dans des lignées de NSCLC et de carcinome gastrique p53 mutées. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que soit, en modifiant les dimères de récepteurs à la surface de la cellule, l'inhibition de p38, en augmentant la proportion de dimères EGFR-HER2 disponible au cetuximab, conduit à une meilleure inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses. Soit cette accumulation de dimères EGFR-HER2 par l'inhibition de p38 conduit à une augmentation de la prolifération et contrebalance l'effet inhibiteur du cetuximab.

Dans la lignée de CCR DiFi, nous observons que l'inhibition de p38 conduit à une meilleure survie des cellules au cetuximab.

Il est donc probable que soit l'effet de l'inhibition de p38 est le deuxième décrit, soit cet effet est dépendant de la lignée étudiée (tissu et statut *TP53*), ou alors l'impact de p38

dans ce mécanisme est moins important que son rôle dans l'action du cetuximab dans la lignée BxPC3. Les résultats doivent être reproduits avec la lignée DiFi avant de pouvoir conclure clairement sur l'effet de l'inhibition de p38 sur la formation des différents dimères et l'implication dans la réponse au cetuximab.

III. Rôle de p38 dans d'autres modèles

La limite de notre travail se situe dans l'utilisation de cellules *in vitro* et l'accessibilité à d'autres lignées de CCR *KRAS* sauvage.

a. *In vivo*

Nous devons confirmer les résultats que nous avons obtenus *in vitro* dans un modèle *in vivo* sur des xénogreffes de la lignée DiFi. Ce modèle nous permettra de prendre en compte l'ADCC induite par le cetuximab via les NK. La MAPK p38 a été montrée comme impliquée dans l'activation des NKs [232]. Ce qui signifie qu'en complément de son rôle dans le mécanisme d'action du cetuximab, p38 est également capable de favoriser l'ADCC suite à la fixation de la partie Fc du cetuximab sur les cellules effectrices de l'immunité. Malgré plusieurs tentatives nous avons échoué à mettre en place un test de l'ADCC *in vitro*.

b. *In vitro*

In vitro, nous avons démontré l'implication de p38 dans les cellules DiFi. Les résultats préliminaires sur une autre lignée sensible au cetuximab, les LIM1215, montrent que l'inhibition de p38 semble également bloquer l'effet du cetuximab et de l'erlotinib (Figure 32). La confirmation de ces travaux préliminaires est en cours.

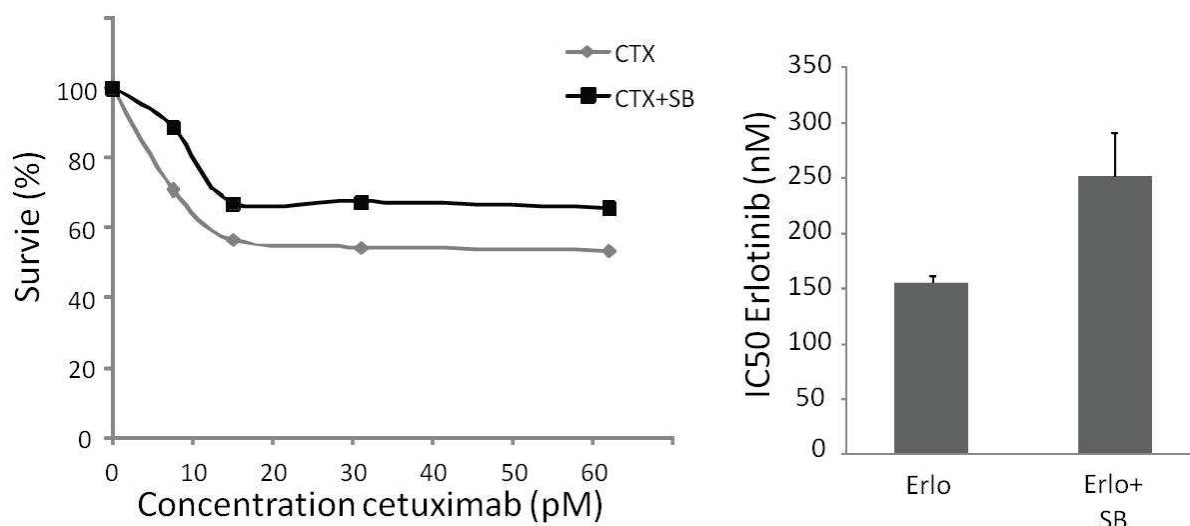


Figure 32: Le SB202190 diminue la toxicité de l'erlotinib et du cetuximab sur les LIM1215
Cytotoxicité de l'erlotinib, du cetuximab et de la combinaison erlotinib ou cetuximab et SB202190 sur les cellules LIM1215.

Conclusion

Au vu de ces résultats, et même s'ils restent à être confirmés *in vivo*, il ne semble pas judicieux de combiner l'inhibition de la MAPK p38 avec l'utilisation du cetuximab dans le traitement du CCR. Cependant, comme indiqué dans l'introduction, l'implication de la MAPK p38 dans la réponse des patients au cetuximab avec l'irinotécan ne semble concerner qu'une faible proportion de patients traités. Il apparaît que, dans la majorité des patients, l'activation de la MAPK p38 reste un marqueur de non réponse à cette combinaison. Il nous faut donc maintenant identifier les autres marqueurs biologiques de réponse à cet anticorps qui doivent être associés à la détection de p38 afin de sélectionner les patients atteints de CCR pouvant bénéficier de cette thérapie ciblée. Les résultats où p38 est inhibiteur de l'action du cetuximab ont été obtenus sur des lignées présentant des mutations de la protéine p53. En effet, une équipe a montré que le rôle de p38 dans des lignées de CCR p53 mutées est plutôt d'inhiber l'activation de FOXO3a [233], son inhibition conduisant alors à une sensibilisation des cellules à l'inhibition de MEK/ERK [234]. Il semble donc que dans ces lignées p53 mutées, p38 ait un rôle différent et opposé de celui que nous décrivons dans notre modèle p53 sauvage. Ces résultats indiquent que le statut de p53 semble avoir un impact sur le rôle de p38.

Afin de déterminer si le rôle de p38 est influencé par p53, nous nous proposons d'étudier le rôle de p53 dans la réponse au cetuximab.

Perspectives pour l'utilisation de p38 comme biomarqueur ou nouvelle cible thérapeutique

Le cetuximab n'est bénéfique qu'à un certain nombre de patients présentant des statuts sauvages pour un nombre important de protéines de la voie EGFR. Il serait intéressant de trouver une thérapie ciblée bénéficiant à une plus grande majorité de patients. D'autres équipes et nous-mêmes avons démontré que l'inhibition de la MAPK p38 améliore la réponse des cellules de CCR à l'irinotécan et au 5-FU [172;173]. L'inhibition de p38 en combinaison avec l'irinotécan est efficace dans plusieurs lignées de colon aux caractéristiques différentes. Nous proposons donc de déterminer si l'inhibition de la MAPK p38 en combinaison avec les chimiothérapies serait plus efficace que l'association du cetuximab avec les chimiothérapies et permettra également de traiter un plus grand nombre de patient atteint de CCR.

Pour valider cette hypothèse il nous faut déterminer, *in vitro* et *in vivo*, quelle est la meilleure combinaison entre iri+CTX et iri+inhibition de p38 sur un panel de lignées cellulaires de CCR.

Nous avons donc comparé les combinaisons iri+CTX et iri+SB202190 par des tests de cytotoxicité sur plusieurs lignées de CCR. Dans toutes les lignées que nous avons testé la combinaison iri+SB et meilleure que la combinaison iri+CTX, à l'exception des lignées SW48 et LS174T dans lesquelles aucune des combinaisons n'améliore la réponse (figure 33).

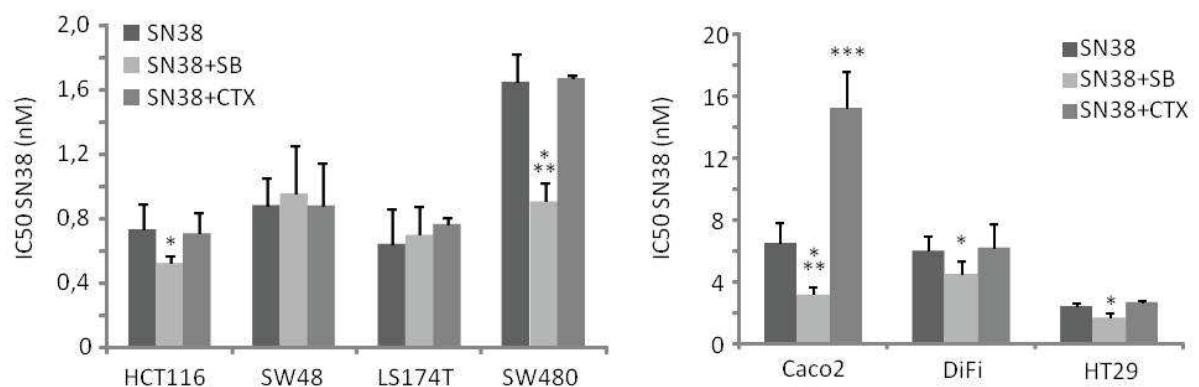


Figure 33: IC50 SN38 en combinaison avec le SB202190 ou le cetuximab dans différentes lignées de CCR
 Comparaison des cytotoxicités du SN38 seul, combiné au SB202190 ou combiné au cetuximab sur les cellules HCT-116, SW48, LS174T, SW480, Caco2, DiFi et HT29. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Dans 5 lignées de CCR sur 7 testées, l'inhibition de p38 améliore la cytotoxicité du SN38. En revanche, le cetuximab n'améliore la réponse au SN38 dans aucune des lignées testées même les lignées KRAS sauvage. La combinaison d'un autre dérivé de la camptothécine, le topotécan, avec le cetuximab a auparavant été démontré *in vitro*, dans la

lignée GEO [93]. Les auteurs utilisent alors un traitement séquentiel des cellules (2jours topotécan puis 2 jours cetuximab) et obtiennent un meilleur effet cytotoxique de la combinaison comparée aux traitements seuls. Le topotécan nécessitant des cellules en prolifération pour agir et le cetuximab bloquant la prolifération cellulaire, l'idée de traitement séquentiel est compréhensible. Et la différence entre leurs résultats et les nôtres semble être due à la différence dans la méthode de traitement. Le SN38 ayant également besoin de cellules en prolifération pour agir, il nous faudra donc tester l'efficacité d'un traitement séquentiel sur nos lignées afin de pouvoir comparer l'efficacité de la combinaison SN38 plus cetuximab à la combinaison SN38 plus inhibition de p38 et de valider la supériorité d'un traitement sur l'autre.

L'idée ici n'est pas de confirmer une nouvelle fois que le cetuximab n'est pas efficace dans les lignées *KRAS* mutées mais plutôt de démontrer qu'en utilisant l'inhibition de p38 nous traiterions un plus grand nombre de patients.

Au vu de ces résultats, l'inhibition de la MAPK p38 en combinaison avec l'irinotécan semble meilleure que la combinaison cetuximab+irinotécan. Ces résultats doivent être validés avec la méthode de traitement séquentiel puis confirmés *in vivo* afin de prendre en compte l'effet du système immunitaire et de l'environnement tumoral.

Pour conclure, notre étude a permis de mettre en évidence, dans une lignée de CCR, le rôle encore inconnu de la MAPK p38 sur le mécanisme d'action du cetuximab et d'émettre l'hypothèse d'une thérapie alternative à cette thérapie ciblée: l'inhibition de cette MAPK. Elle nous a également permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle de p53 dans l'effet de l'inhibition de p38 en réponse au cetuximab.

La MAPK p38 est connue pour agir sur p53. Des études récentes montrent que p53 peut être impliqué dans la réponse au cetuximab. La deuxième partie du projet a donc été d'étudier le rôle de p53 et son lien avec la MAPK p38 dans la réponse au cetuximab dans la lignée DiFi p53 sauvage et Caco2 p53 mutée.

1.4. Matériel et méthodes supplémentaire

Analyse des coupes de tumeurs des patients

Les coupes de tumeurs de 55 patients ayant reçu un traitement associant irinotécan et cetuximab ou FOLFIRI et cetuximab (6 patients) ont été marquées avec un anticorps anti-phospho p38 (pp38 9211 CST). Le taux de marquage de pp38 correspond au nombre de cellules marquées combiné à l'intensité du marquage. Les comparaisons ont été réalisées avec le test de Wilcoxon et le test de Kruskal-Wallis. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque $p < 0.05$. Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel STATA 11.0 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

Extraits protéiques

Après retrait du milieu et du traitement, les cellules ont été décollées à l'aide d'une spatule puis reprise dans un volume de tampon SDS (bleu de bromophénol, 5% β -mercaptoéthanol, 2% SDS, 10% glycérol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) correspondant à 10 000 cellules/ μ l. 20 μ l d'extrait ont été déposé sur un gel SDS-PAGE 7,5%. L'anticorps anti-fibronectine (BD transduction laboratories) est utilisé au 1000^{ème} et le secondaire anti-mouse au 5000^{ème}. Le signal HRP est révélé à l'aide d'une solution (Western lightning plus ECL Perkin Elmer) puis détecté à l'aide d'une Gbox.

Détection des récepteurs membranaires

Les cellules ont étéensemencées (1 million de cellules par puits) puis traitées au SB202190 à 5 μ M pendant 24, 48 ou 72h. Elles ont ensuite été fixées mais non perméabilisées afin de ne détecter que les récepteurs à la surface. Suite à une incubation avec l'anticorps primaire anti-EGFR (CST) et l'anti-HER2 (FRP5 Larbouret C., IRCM), puis l'anticorps secondaire anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen), elles ont été analysées par cytométrie en flux (FC500 Beckman coulter) puis avec le logiciel Flow Jo.

Expérience HTRF : TR-FRET

La lignée de carcinome de pancréas, BxPC-3, a été obtenue de l'ATCC. Les cellules ont étéensemencées sur une plaque 96 puits noire après dépôt de polyornithine au fond des puits. Après 24h, le SB202190 est dilué dans du milieu sans rouge de phénol pour obtenir une concentration de 5 μ M puis ajouté aux cellules pour 24h. Les anticorps utilisés pour ce test sont l'anti-EGFR m425 et l'anti-HER2 FRP5 (Larbouret C., IRCM) marqués avec un

donneur et un accepteur (Cisbio Bioassays). Après 24h les cellules ont été lavées avec un tampon KREBS (146 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1 g/L glucose et 1 g/L de bovine serum albumin, Sigma-Aldrich), fixées en formaline 10% pour 2 min puis lavées de nouveau au tampon KREBS. Après incubation avec les anticorps marqués (5nM en tampon KREBS) à 37°C pendant 6h, les cellules ont été lavées en tampon KREBS. La fluorescence des fluorochromes a été mesurée à 620nm et 655nm après excitation à 337nm sur un Pherastar FS instrument. Sur la même plaque, une courbe étalon a été effectuée en mesurant le signal de dilution en série des anticorps. Le signal est exprimé comme $\Delta F665(\%)$ (% dimères) qui correspond au rapport entre le signal de l'échantillon moins le bruit de fond (milieu seul) et la courbe étalon. En parallèle, la quantité des deux récepteurs EGFR et HER2 sont mesurées afin que la variation de la quantité de dimère ne soit pas influencée par la diminution de la quantité d'un des deux récepteurs. Afin que le résultat ne soit pas influencé par une variation de la quantité de cellules dans le puits, la valeur obtenue sera normalisée par la concentration d'ADN (Hoechst 33342, Invitrogen) [235].

Test de cytotoxicité

Les DiFi ont étéensemencées en plaque 96 puits, 5000 cellules par puits, puis incubées 92h à 37°C avec des doses croissantes de cetuximab seul, d'erlotinib ou avec des concentrations croissantes de cetuximab ou d'erlotinib associées à 5 μ M de SB202190 (S7067, SIGMA). Les cellules sont ensuite fixées au trichloroacetate 10% (TCA) et le test est révélé avec la sulforhodamine B 4% (SRB). L'absorbance à 540nm est alors mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA. Le pourcentage de cellules vivantes est calculé par rapport aux puits ne recevant pas de traitement. L'IC₅₀ est déterminé graphiquement par report de la courbe sur l'axe des ordonnées.

Rôle de p53 dans la réponse au cetuximab

III Rôle de p53 dans la réponse au cetuximab

1. Introduction

Plusieurs résultats nous ont amené à nous intéresser au statut p53 de la ligné DiFi que nous utilisons pour étudier le cetuximab.

Des études récentes montrent que p53 a un rôle sur la réponse au cetuximab. Une équipe a montré que, chez 64 patients atteints d'un CCR métastatique traités au cetuximab avec l'irinotécan, la présence d'une mutation de la protéine p53 est corrélée avec le contrôle de la maladie (réponse complète ou partielle ou stabilisation de la maladie). Cette corrélation se trouve chez les patients indépendamment de leur statut KRAS mais elle est encore plus significative chez les patients KRAS sauvage [223]. Cependant, elle n'a pas été démontrée *in vitro*, ni sur une cohorte de patients traités au cetuximab seul. De plus, les auteurs ne précisent pas si les patients présentent une protéine p53 inactive/absente ou si la mutation induit un gain de fonction. L'étude des différentes mutations indiquées dans leur article donnerait des informations plus précises sur leur impact dans la réponse au cetuximab.

Une autre équipe a montré au contraire, dans des cellules de cancer du poumon, que l'extinction de p53 diminue l'effet cytotoxique du cetuximab *in vitro* et *in vivo*. De plus, ils ont démontré que l'expression de p53 est perdue dans les clones cellulaires qu'ils ont rendu résistants au cetuximab. Et lorsqu'ils rétablissent l'expression de p53 dans ces clones, ils redeviennent sensibles à l'anticorps [222]. Cependant les cellules de cancer de poumon ne se comportent pas comme les autres cellules face au cetuximab. Il a été montré que dans ces cellules le statut KRAS n'est pas prédictif de la réponse au cetuximab à l'inverse du CCR [228;229].

Il semble donc nécessaire de clarifier le rôle de p53 sur l'effet du cetuximab *in vitro* dans des cellules de cancer colorectal.

2. Matériel et Méthodes

Lignées cellulaires:

Les cellules Caco2 (ATCC) sont cultivées en RPMI complémenté avec 20% de SVF et maintenues sous atmosphère humide avec 5% de CO₂. Les cellules DiFi ont été fournies par Dr Clara Montagut (Barcelone, Espagne). Elles sont maintenues en culture dans du milieu

DMEM-F12 complétement avec 10% de sérum de veau fœtal et maintenues sous atmosphère humide avec 5% de CO₂.

Les cellules DiFi exprimant un shRNA ciblant les ARNm de la protéine p53 ou de la protéine p38 ont été obtenues par transduction génétique rétrovirale du vecteur pSIREN dans lequel ont été clonés les shRNAs. La sélection se fait par résistance à l'hygromycine (125 µg/ml) ou à la puromycine (1 µg/ml).

Réactifs et anticorps

Le cetuximab (Erbix®) provient de Merck (Damstadt, Allemagne). Le SB202190 provient de Sigma-Aldrich (S7067, St Louis, MO, USA).

Les anticorps primaires dirigés contre phospho-p38, p38, caspase 3 clivée, BIM et p27 proviennent de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), l'anticorps anti-fibronectine de BD transduction laboratories et l'anticorps p53 (DO-1) de Santa Cruz Biotechnology. Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin sont conjugués horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, USA). Le signal HRP est révélé à l'aide d'une solution Western lightning plus ECL de Perkin Elmer.

Test SRB

Les Caco2 et les DiFi ont étéensemencées en plaque 96 puits (DiFi : 5000 cellules par puits, Caco2 : 1000 cellules par puits), puis incubées 96h à 37°C avec des doses croissantes de cetuximab seul ou avec des concentrations croissantes de cetuximab associées à 5 µM de SB202190. Les cellules sont ensuite fixées au trichloroacétate 10% (TCA) et le test est révélé avec la sulforhodamine B 4% (SRB). L'absorbance à 540nm est alors mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA. Le pourcentage de cellules vivantes est calculé par rapport aux puits ne recevant pas de traitement. L'IC₅₀ est déterminé graphiquement par report de la courbe sur l'axe des ordonnées.

Extraits protéiques

Après retrait du milieu et du traitement, les cellules ont été décollées à l'aide d'une spatule puis reprise dans un volume de tampon SDS (bleu de bromophénol, 5% β-mercaptoéthanol, 2% SDS, 10% glycérol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) correspondant à 10 000 cellules/µl. 20 µl d'extrait ont été déposés sur un gel SDS 7,5%.

Analyse du cycle cellulaire et prolifération

Les cellules ont été ensemencées en plaques 6 puits à 1 million de cellules par puits. Après 24h, les cellules sont traitées avec 0.5µg/ml de cetuximab pendant 48h et/ou 5µM de SB202190. Pour déterminer la prolifération, l'EdU a été ajouté pendant la durée du temps de doublement des cellules (30h) avant la fin du traitement. Ainsi, toutes les cellules ayant progressé au travers cycle seront marquées et celles dont le cycle est bloqué ne le seront pas. Après un traitement à la trypsine, les cellules ont été lavées au PBS, fixées et perméabilisées à l'Éthanol puis une partie des cellules a été marquée à l'iodure de propidium (IP) 40µg/ml (+100µg/ml de RNase Quiagen). Dans l'autre partie des cellules, l'EdU incorporé sera marqué à l'aide du Kit Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La détection des cellules marquées à l'IP ou à l'Alexa 488 sera faite sur un FC500 Beckman coulter Flow Cytometer. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle et la quantité de cellules EdU positives ont été déterminées avec le logiciel Flow Jo analysis (Treestar Inc, Ashland, Oregon, USA).

QPCR

Les ARN totaux ont été extraits des cellules DiFi et Caco2 à l'aide du kit RNeasy® mini kit (Quiagen, Hollande), une étape de digestion de l'ADN a été ajoutée (DNase Quiagen). L'ARN a été quantifié à l'aide d'un nanodrop et 1µg a été utilisé pour la transcription inverse par la « reverse transcriptase » SuperScript III (Invitrogen, Life Technologies, USA). Les PCR quantitatives en temps réel ont été effectuées avec un LC480 (Roche Diagnostics, France) selon les recommandations du fabricant. La spécificité de l'amplification a été vérifiée par analyse de la courbe de température de fusion. Les valeurs de Q-PCR ont été déterminées par référence à une courbe standard établie à partir de dilutions en série d'ADNc en utilisant les primers de *BIM*, *PUMA* et *28s*. La quantification a été normalisée à partir du gène de référence: *28s*.

Essai kinase

Le test d'activité de p38 a été fait à partir d'un kit non-radioactif de Cell Signaling Technology (9820, Danvers, MA, USA) selon les directives du fournisseur.

Expériences in vivo

Xénogreffes: Les souris femelles athymique nu/nu de 6 à 8 semaines proviennent des laboratoires Harlan. Les cellules diluées dans mélange 50/50 de milieu sans SVF et de

matrigel (BD Biosciences, réf. 356231) ont été injectées en sous-cutané (1 million) sur le flanc de chaque souris. Les tumeurs ont été mesurées avec un pied à coulisse deux fois par semaine. Les souris ont été sacrifiées lorsque les tumeurs ont atteint 1500mm³ et les tumeurs ont été congelées.

Traitement au cetuximab et au SB202190: les traitements ont été administrés une fois que la taille des tumeurs ont été supérieures ou égales à 100mm³. Le groupe contrôle a reçu des injections de 200µl d'une solution de chlorure de sodium à 0.9% cinq jours par semaine. Le cetuximab a été injecté en intra-péritonéal deux fois par semaine à 5 mg/Kg. Le SB202190 a également été injecté en intra-péritonéal cinq jours par semaine à une concentration de 0,05 µmol/kg (soit 0,2 mg/kg).

3. Résultats

3.1. Les Caco2 et les DiFi répondent différemment au cetuximab

Nous avons choisi d'utiliser deux lignées de CCR KRAS sauvage au statut *TP53* différent: les DiFi utilisées dans l'étude précédente et la lignée Caco2.

Ces deux lignées possèdent deux caractéristiques qui diffèrent : statut du gène *TP53* et niveau d'expression de l'EGFR. La lignée DiFi présente une protéine p53 sauvage. En revanche, la lignée Caco2, présente une mutation sur l'exon 6 (STOP codon 204) du gène codant la protéine p53 entraînant la production d'une protéine tronquée [236]. La lignée DiFi possède une amplification génique de l'*EGFR*. L'impact de cette caractéristique sur la réponse au cetuximab a été établi précédemment. Cependant, nous nous sommes demandé si cette différence d'expression de l'EGFR est la seule explication à la différence de réponse entre les deux lignées (Tableau 7).

Nom de la lignée	p53	EGFR	KRAS	Perte d'expression de PTEN	PI3KCA	BRAF
Caco2	Muté (stop204)	+	sauvage	NON	sauvage	sauvage
DiFi	sauvage	++++ (amplification génique)	sauvage	NON	sauvage	sauvage

Tableau 7 : Caractéristiques des Caco2 et DiFi
[237;70;238;75]

Nous avons donc comparé la réponse des lignées DiFi et Caco2 au cetuximab notamment dans l'apoptose et l'effet antiprolifératif induits.

Les résultats des tests de cytotoxicité montrent que les Caco2 et les DiFi ont des sensibilités différentes au cetuximab. Les Caco2 répondent beaucoup moins bien que les DiFi (30% d'inhibition vs 80%, IC50 DiFi: 35ng/ml vs Caco2: NA) (Figure 34).

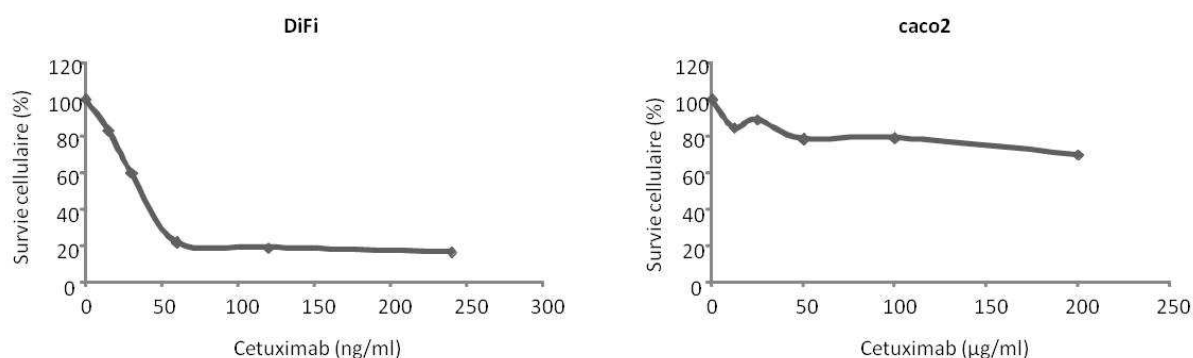


Figure 34 : Différence de cytotoxicité du cetuximab entre les DiFi et les Caco2

Comparaison de la cytotoxicité du cetuximab entre les DiFi et les Caco2. Pour les DiFi les doses de cetuximab sont en ng/ml, sur les Caco2 en µg/ml.

3.2. p53 participe à l'activation de p38 par le cetuximab

La suite du travail a consisté à étudier le lien entre p38 et p53 dans la réponse au cetuximab. La MAPK p38 peut phosphoryler p53 sur les résidus sérine 15, 33 et 46. Il existe donc un lien entre ces deux protéines. Il est intéressant de déterminer si, à l'inverse, p53 est impliqué dans l'induction de l'activation de p38 par le cetuximab.

Pour cela, nous avons analysé par Western Blot la phosphorylation de p38 afin de déterminer son niveau d'activation dans les lignées DiFi et Caco2 après traitement au cetuximab. Les résultats montrent que la MAPK p38 est activée dans les deux lignées mais

plus faiblement dans les Caco2 (Figure 35A). Afin de déterminer si cette différence d'activation est due à l'absence de p53 dans les Caco2 nous avons inhibé la transcription de p53 dans les DiFi à l'aide d'un shRNA (Figure 35B). Les résultats obtenus indiquent que l'absence de p53 entraîne une diminution de la phosphorylation de p38 (Figure 35C).

Par un essai kinase nous avons déterminé l'activité de p38 après traitement au cetuximab dans les DiFi shRNA Luc et shRNA p53. Les résultats montrent que l'absence de p53 inhibe l'activité de p38 dans les DiFi (Figure 35D).

L'absence de p53 diminue la phosphorylation de p38 et son activité après induction par le cetuximab.

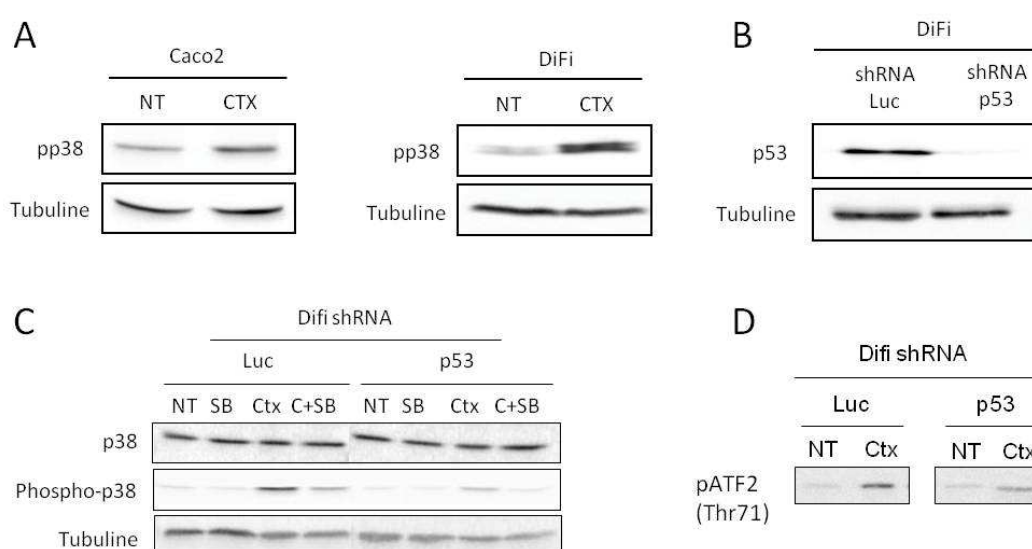


Figure 35: p53 module l'activation de p38

A. Activation de p38 dans les Caco2 et les DiFi. B. Western Blot contrôle de l'inhibition transcriptionnelle de p53. C. Activation de p38 dans les DiFi contrôles et les DiFi shRNA p53 sous les différents traitements. D. kinase assay afin de tester l'activité de p38 après traitement au cetuximab.

3.3. p38 α bloque partiellement la réponse des Caco2 au cetuximab

Nous avons évalué le rôle de p38 dans le mode d'action du cetuximab dans les caco2. Pour cela, nous avons utilisé soit l'inhibition pharmacologique des isoformes p38 α et β par le SB202190 soit l'inhibition transcriptionnelle de la MAPK p38 α à l'aide de deux shRNA différents (Figure 36C). L'effet de ces inhibitions sur la réponse des Caco2 au cetuximab a été déterminé par des tests de cytotoxicité révélés à la sulforhodamine B *in vitro* et l'inhibition pharmacologique a également été testée *in vivo* sur des tumeurs de Caco2 xéno greffées sur des souris Nude. Les résultats montrent que la toxicité du cetuximab reste inchangée lorsque les deux isoformes α et β sont inhibées, en effet les taux de survie sont identiques entre les cellules traitées au cetuximab seul et celles traitées avec la combinaison cetuximab plus

SB202190 (Figure 36A). En revanche, la cytotoxicité du cetuximab est plus importante dans les cellules où seule la MAPK p38 α est inhibée par les shRNAs, comparé aux cellules contrôle (shRNA Luc), la survie est diminuée (ShRNA Luc: 78% de survie, ShRNAp38: 55% de survie, p-value: 0.01 et shRNAp38bis: 58%, p-value: 0.04, Figure 36B). Ces résultats montrent que la MAPK p38 α bloque l'effet cytotoxique du cetuximab dans les Caco2.

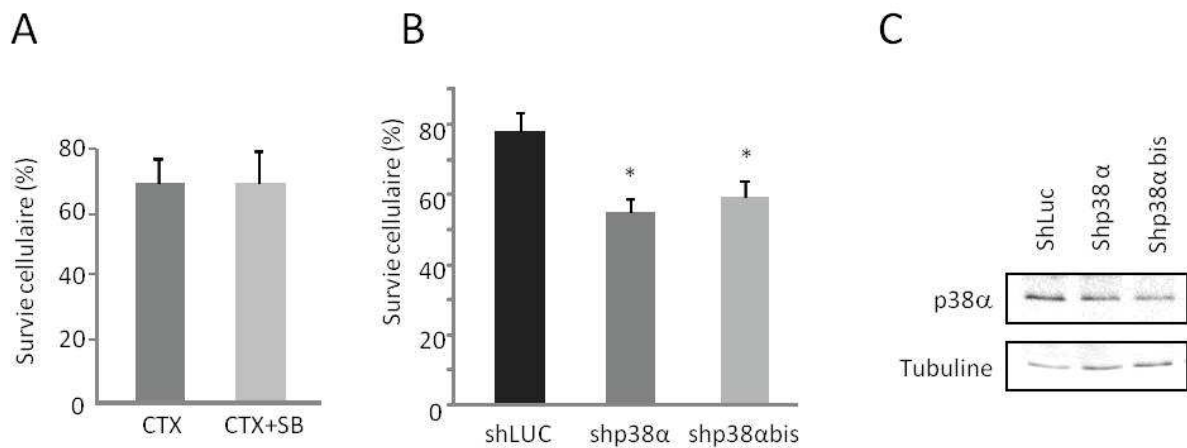


Figure 36: Seule l'inhibition de la MAPK p38 α sensibilise les Caco2 au cetuximab

A. Cytotoxicité du cetuximab et du cetuximab plus SB202190 sur les Caco2. B. Cytotoxicité du cetuximab sur les Caco2 shRNA Luc ou shRNA p38 α . C. WB contrôle de l'inhibition de l'expression de p38 α par les shRNAs. * p < 0,05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

In vivo, la croissance des tumeurs traitées par le cetuximab et la combinaison cetuximab plus SB202190 est identique à celle du contrôle NaCl ou du traitement au SB seul (Figure 37).

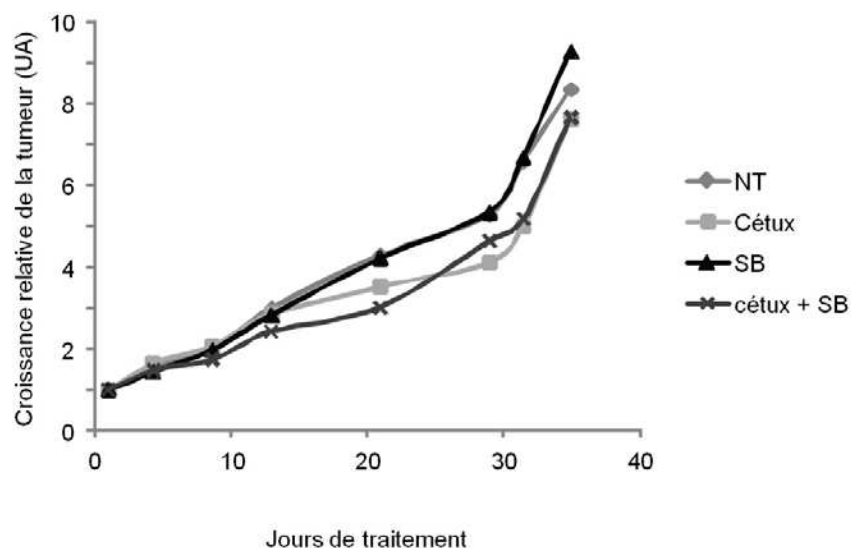


Figure 37: Effet des différents traitements sur des tumeurs de Caco2 xenogreffées en sous cutané

UA: unité arbitraire représentant la croissance de la tumeur par rapport à sa taille initiale (100 mm³).

Moyenne de trois expériences *in vivo* de traitement de xénogreffes sur des souris Nude au cetuximab, au SB202190 ou à la combinaison cetuximab plus SB202190. Les souris non traitées (NT) ont reçu des injections de NaCl. Dose de cetuximab : 200 µg/souris. Dose SB202190 : 0,05 µmol/kg.

3.4. p38 α participe à la réponse des DiFi shRNA p53 au cetuximab

Afin de déterminer le rôle de p38 et de p53 dans la réponse des DiFi au cetuximab nous avons également effectué des tests de cytotoxicité SRB. Les résultats montrent que la toxicité du cetuximab est moins importante dans les DiFi shRNAp53 comparée aux cellules contrôle (shRNA Luc), comme indiqué par une IC₅₀ (dose de drogue nécessaire pour obtenir une survie de 50%) plus élevée que celle des DiFi contrôle (IC₅₀ CTX shRNALuc: 28ng/ml et IC₅₀ CTX shRNAp53: 38ng/ml, p-value: 0.01, Figure 38). De plus, cette diminution de la réponse au cetuximab est équivalente à l'effet induit par l'inhibition de p38. En effet, l'absence de p53 induit la même augmentation de l'IC₅₀ que l'inhibition de p38 par le SB dans les cellules contrôle (IC₅₀ CTX+SB shRNALuc: 38ng/ml p-value 0.01, Figure 38). Ces résultats confirment le rôle de p53 dans l'effet cytotoxique du cetuximab.

Enfin, l'inhibition combinée de p38 et p53 semble avoir un effet synergique d'inhibition de l'effet du cetuximab. Elles induisent une augmentation plus prononcée de l'IC₅₀ (IC₅₀ CTX+SB shRNAp53: 63ng/ml, p-value: 0.001, figure 38). Des expériences

supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la synergie. Cependant afin d'identifier le rôle respectif de p38 et p53 et leur rôle conjoint dans la réponse au cetuximab, nous avons continué à associer leur inhibition dans les expériences qui vont suivre.

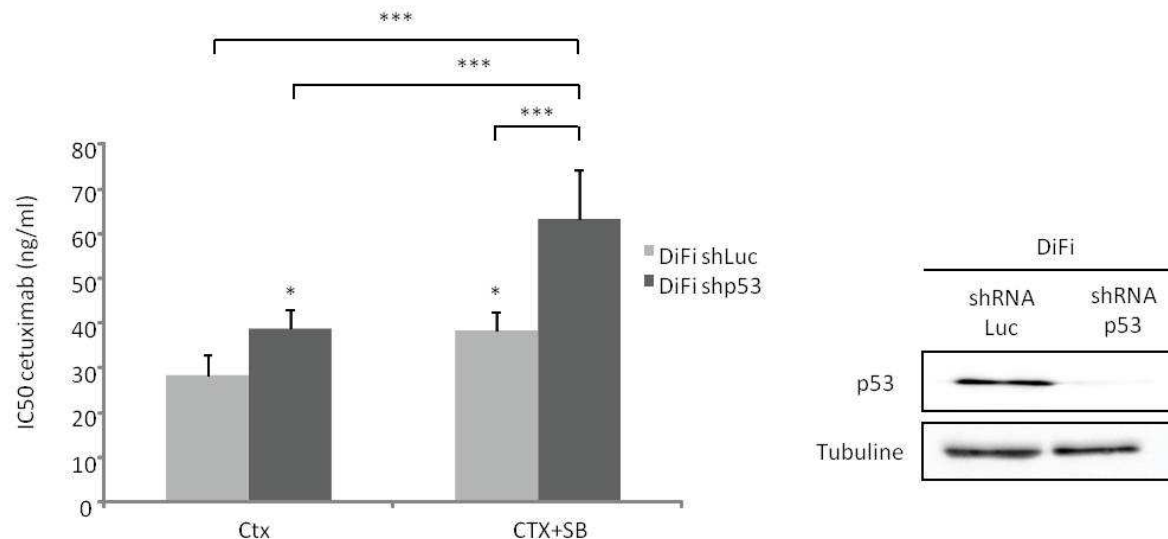


Figure 38: p53 participe à l'effet cytotoxique du cetuximab et effet synergique de la double inhibition p38 et p53

Cytotoxicité du cetuximab en l'absence de p53 seule ou combinée à l'inhibition de p38 dans les DiFi. WB contrôle de l'inhibition de l'expression de p53. * p < 0,05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

3.5. p53 participe à l'apoptose mais pas à l'inhibition de la prolifération induite par le cetuximab

Nous avons ensuite voulu déterminer dans quel(s) mécanisme(s) d'action du cetuximab p53 a un rôle. Nous avons donc dans un premier temps, étudié l'effet de l'absence de p53 dans l'induction de l'apoptose par le cetuximab.

Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes de détection de l'apoptose. La première est la détection de caspase 3 clivée par Western Blot. La deuxième est l'analyse de la proportion de cellules en phase sub-G1 du cycle cellulaire, qui correspond à des cellules en apoptose tardive, par analyse de cytométrie en flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP).

L'analyse par Western Blot indique que le cetuximab induit le clivage de la caspase 3 dans les cellules contrôle mais l'absence de p53 suffit à inhiber ce clivage (figure 39A). De plus, ce résultat est confirmé par la diminution de la proportion de cellules en phase sub-G1 des cellules shRNA p53 par rapport aux cellules contrôles shRNA Luc (shRNA Luc: 26% de cellules en sub-G1, shRNAp53: 13% de cellules en sub-G1, p-value: 0.005) (Figure 39B).

Comme observé précédemment dans les tests de cytotoxicité, l'absence de p53 induit la même diminution de l'apoptose que l'inhibition de p38 (shRNALuc CTX+SB: 12% de cellules en sub-G1, p-value: 0.0008) (Figure 39B). Et la combinaison de l'inhibition de ces deux protéines bloque l'apoptose induite par le cetuximab dans les cellules contrôles (shRNA Luc CTX: 26% de cellules en sub-G1 *versus* shRNAp53 CTX+SB: 6% de cellules en sub-G1, p-value: 0.001). Ces résultats montrent que p53 contribue à l'effet apoptotique du cetuximab tout comme p38 comme démontré dans nos précédant travaux.

Nous avons ensuite testé l'effet de l'absence de p53 sur la prolifération cellulaire. Pour cela nous avons utilisé le marquage des cellules en prolifération par l'incorporation d'EdU puis détection par FACS. Comme attendu, les résultats montrent que le cetuximab diminue la prolifération des cellules contrôles, en effet le pourcentage de cellules marquée à l'EdU passe de 63% à 31% à 48h de traitement (p-value: 0.0001, Figure 39C). L'absence de p53 ne modifie pas cette inhibition de prolifération (shRNAp53 CTX: 33% de cellules en prolifération). Seule l'inhibition de p38 a un effet sur le pourcentage de cellules marquées, comme décrit dans nos travaux précédent, dans les cellules contrôles (shRNALuc CTX: 32% de cellules en prolifération et shRNALuc CTX+SB: 46% de cellules en prolifération, p-value: 0.006) et dans les cellules dépourvues de p53 (shRNAp53 CTX: 33% de cellules en prolifération et shRNAp53 CTX+SB: 52% de cellules en prolifération, p-value: 0.006). Ceci indique que p53 n'est pas impliqué dans le rôle antiprolifératif du cetuximab.

Dans les Caco2, le cetuximab n'induit pas d'apoptose et induit une faible diminution de la prolifération qui n'est pas significative (Figure 39D et 39E).

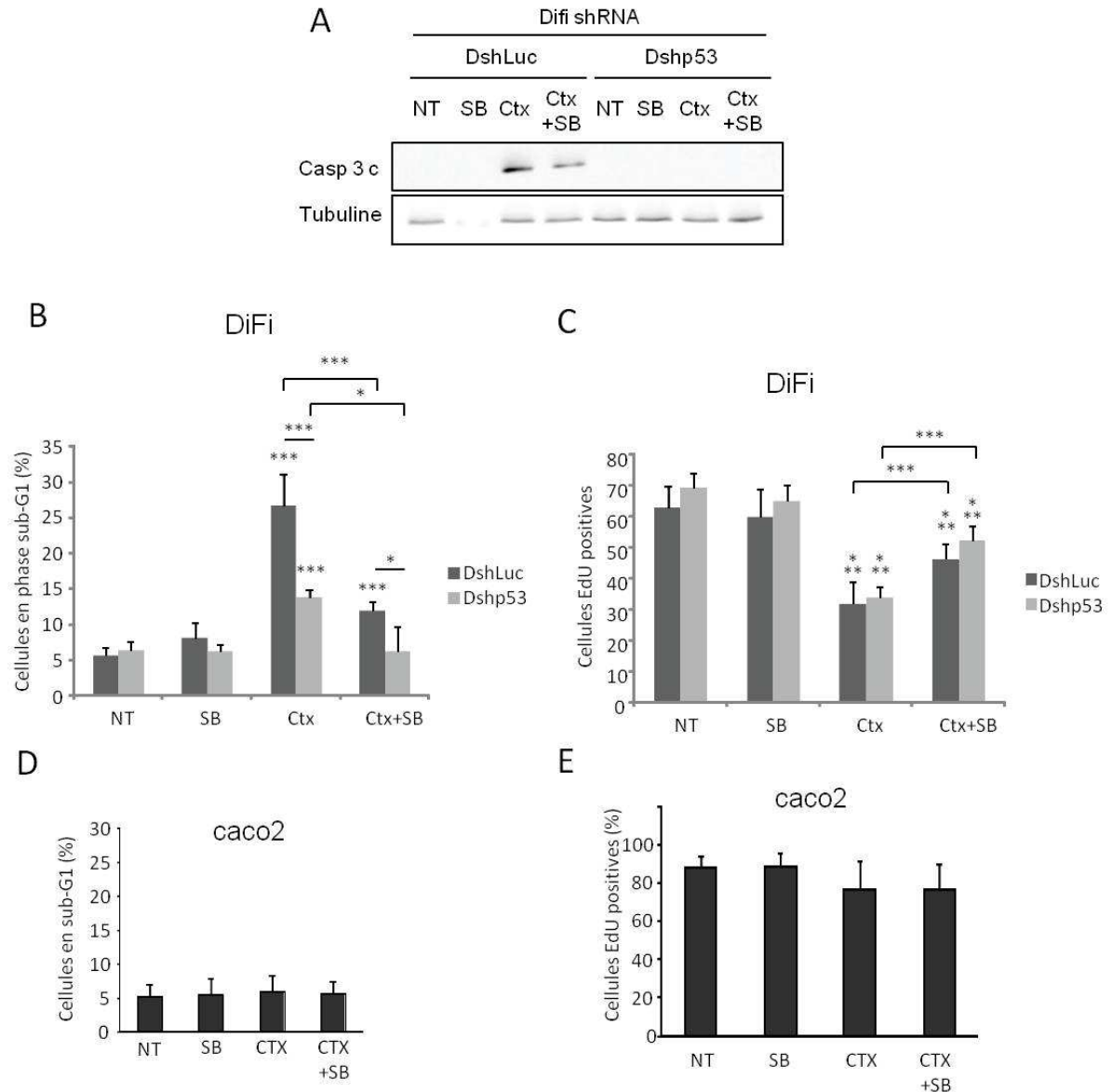


Figure 39: L'absence de p53 bloque l'apoptose induite par le cetuximab mais ne modifie pas la prolifération

A. Détection de la caspase 3 clivée en réponse aux différents traitements (cetuximab, SB202190 ou cetuximab plus SB202190) dans les DiFi shRNALuc et shRNA p53. B. Pourcentage de cellules DiFi en phase sub-G1 (apoptotiques). C. Pourcentage de cellules DiFi EdU positives. D. Pourcentage de cellules Caco2 en phase sub-G1 (apoptotiques). E. Pourcentage de cellules Caco2 EdU positives. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.6. p53 régule l'expression de BIM et PUMA dans les DiFi et les Caco2

Dans nos travaux précédents, nous avons identifié deux gènes régulés par le cetuximab et impliqués dans son action cytotoxique: *BIM* et *p27*. Nous avons voulu déterminer si l'absence de p53 modifie la transcription de ces deux gènes.

Pour cela, nous avons effectué des PCR quantitatives (Q-PCR) et des Western Blot d'extraits de cellules contrôles et shRNAp53 traitées ou non au cetuximab à 10µg/ml et au cetuximab combiné au SB202190 à 5µM. L'expression des gènes est indiquée par une unité arbitraire (UA) qui correspond au rapport entre la valeur obtenue et la valeur de l'expression d'un gène de ménage, la sous unité ribosomique 28S.

Comme montré dans la figure 40A, le cetuximab induit l'expression de *BIM* dans les cellules contrôles (shRNALuc NT: 0.8 UA et shRNALuc CTX: 2.2 UA, p-value: 0.02). Cependant l'absence de p53 diminue cette induction (shRNALuc CTX: 2.2 UA et shRNAp53 CTX: 1.4 UA). L'inhibition de p38 quant à elle diminue également l'induction de l'expression de *BIM* par le cetuximab (shRNALuc CTX: 2.2 UA et shRNALuc CTX+SB: 1.2 UA). L'association des deux inhibitions par contre ne semble pas présenter un effet synergique sur l'induction de *BIM* par le cetuximab (shRNALuc CTX+SB: 1.2 *versus* shRNAp53 CTX+SB: 1.4 UA).

La protéine p53 est connue pour être impliquée dans la transcription de *PUMA* une protéine pro-apoptotique. Nous avons donc voulu savoir si p53 participe à l'effet apoptotique du cetuximab via la régulation de l'expression de *PUMA* dans les DiFi. Les résultats montrent que le cetuximab induit bien une augmentation de l'expression de *PUMA* (shRNALuc NT: 0.9 UA et shRNALuc CTX: 2.3 UA, p-value: 0.009, Figure 40B). L'absence de p53 diminue globalement l'expression de *PUMA* et surtout après induction par le cetuximab (shRNALuc CTX: 2.3 UA et shRNAp53 CTX: 1.5 UA, p-value: 0.02, Figure 40B). Dans les DiFi, p53 semble être responsable de l'induction de l'expression de *BIM* et de *PUMA*.

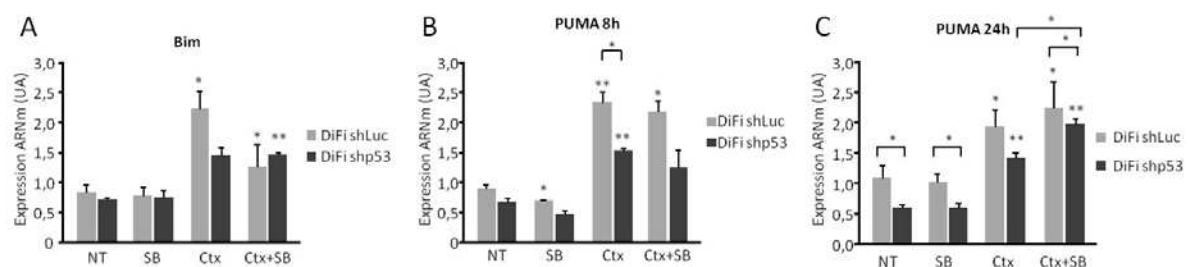
L'inhibition de p38, en revanche ne modifie pas l'effet de l'absence de p53 sur l'expression de *PUMA*. Cependant, il semble que la MAPK p38 bloque partiellement l'induction de *PUMA* par le cetuximab à un temps plus long. En effet, son inhibition conduit à l'augmentation de l'expression de *PUMA* induite par le cetuximab dans les cellules DiFi, cependant cette augmentation est faible (shRNALuc CTX: 1.9 UA *versus* shRNALuc CTX+SB: 2.2 UA, NS et shRNAp53 CTX: 1.4 UA *versus* shRNAp53 CTX+SB: 1.9 UA, p-value: 0.02, Figure 40C).

Les Caco2 en étant dépourvues de p53 répondent tout de même au cetuximab. Nous avons étudié si ces deux gènes sont induits dans cette lignée. Pour cela nous avons effectué des QPCR pour les gènes *BIM* et *PUMA* dans la lignée Caco2.

Les premiers résultats indiquent que le cetuximab induit l'expression de *BIM* et de *PUMA* indépendamment de p38 dans la lignée Caco2 p53 muté (Figure 40D et 40E). En effet, le traitement au cetuximab conduit à l'augmentation de l'expression de *BIM* induite dans cette lignée (Caco2 NT: 1 UA vs Caco2 CTX: 1.8, p-value: 0.006) et cette augmentation est du même niveau que dans les DiFi shRNA p53. L'inhibition de p38 ne modifie pas cette induction (Caco2 CTX+SB: 1.7 UA).

En revanche, l'expression de *PUMA* est induite par l'inhibition de p38 (Caco2 NT: 1 UA et Caco2 SB: 1.6 UA, p-value: 0.009) et par le cetuximab (Caco2 NT: 1 UA et Caco2 CTX: 2 UA, p-value: 0.0004). Mais, de manière surprenante, l'association des deux ne conduit pas à une meilleure induction (Caco2 C+SB: 1.8 UA). Le rôle de p38 ne semble donc pas essentiel dans l'induction de *PUMA* par le cetuximab dans cette lignée.

DiFi



Caco2

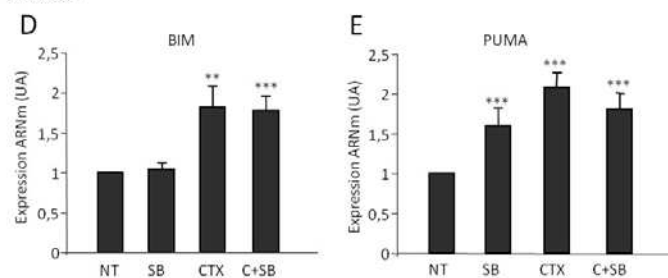


Figure 40: Expression de *BIM* et *PUMA* induite par le cetuximab

A, B, C, D et E. Analyse QPCR de l'expression de *BIM* et *PUMA* (après 8h ou 24h de traitement) dans les DiFi et la Caco2 traitées au cetuximab, au SB202190 ou à la combinaison cetuximab plus SB202190.

Les étoiles au dessus des histogrammes correspondent à la significativité de l'expression de l'ARNm comparé aux cellules non traitées. Les étoiles au dessus des barres reliant deux histogrammes correspondent à la significativité entre les deux expressions de l'ARNm désignées. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Les résultats sur la quantification des ARNm par Q-PCR n'ont été effectués que sur un seul lot d'échantillons. Des expériences sur d'autres extraits ARN de DiFi et de Caco2 sont nécessaires pour conclure définitivement sur le rôle de p53 et p38 dans la transcription de ces gènes.

4. Discussion

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que, non seulement les Caco2 sont moins sensibles au cetuximab que les cellules DiFi, mais qu'elles répondent également différemment à l'inhibition de la MAPK p38 α . En effet, comme nous l'avions démontré précédemment lorsque la p38 α est inhibée dans les DiFi la réponse au cetuximab est bloquée. En revanche, dans la lignée Caco2, cette inhibition conduit à une sensibilisation au cetuximab alors que l'inhibition des deux isoformes α et β ne modifie pas la réponse (Tableau 8).

Lignée	p53	EGFR	Activation de p38 par le Cetuximab	Réponse au CTX	Réponse au CTX lorsque p38 est inhibée	Inhibition de la prolifération par le cetuximab	Apoptose déclenchée par le Cetuximab	Expression BIM	Expression PUMA
Caco2	Muté	+	+	+	↗	Faible	NON	+	+
DiFi	wt	++++	+++	+++	↘	OUI	OUI	+++	+++
DiFi shRNA p53	inhibé	++++	+	++	↘↘	OUI	Faible	+	++

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus

Dans certaines expériences sur les Caco2, il nous est arrivé d'obtenir une meilleure réponse au cetuximab lors de l'utilisation du SB202190. Ce résultat était observable lorsque que les cellules étaient maintenues en culture etensemencées à une plus forte confluence. L'hypothèse est que l'activation de p38 suite au contact cellule-cellule, dans une boîte où la confluence est élevée, détermine l'impact de son inhibition lors du traitement au cetuximab.

Dans la lignée DiFi nous montrons que p53 participe avec p38 à l'induction de l'apoptose en réponse au cetuximab. En effet l'inhibition de p38 et l'absence de p53

conduisent à une diminution des cellules en apoptose et de l'expression des protéines BIM et PUMA, toutes deux décrites comme impliquées dans l'apoptose.

Nous montrons également que l'activation de p38 par le cetuximab est moins forte en l'absence de p53. Notre hypothèse est que c'est via son rôle sur l'activation de p38 que p53 module en partie la réponse au cetuximab, l'autre voie semblant être son rôle sur PUMA dans les DiFi.

De plus, p38 semble participer à la régulation négative de l'expression de PUMA en l'absence de p53 étant donné qu'elle augmente quand nous utilisons l'inhibiteur de p38 sur les Caco2. On ne voit cette augmentation dans les DiFi dépourvues de p53 que sous l'induction par le cetuximab. Cette augmentation est faible mais le rôle de p38 dans l'expression de PUMA a déjà été démontré précédemment dans le mélanome [239]. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse qu'un système de régulation de la mort cellulaire est mis en place par p38 via l'inhibition de PUMA dans les DiFi shRNA p53 et les Caco2 et p38 les protège en partie de la mort induite par le cetuximab.

Nous sommes en présence de deux mécanismes opposés de p38. Dans les DiFi shRNA p53 et les Caco2 traitées au cetuximab, p38 a un rôle de protection via l'inhibition de PUMA et a un rôle dans l'induction de la mort via FOXO3a et ce rôle semble prendre le pas sur le premier. D'autre part, il semble que les deux isoformes de p38 α et β ont un rôle opposé dans les cellules. En effet, il a été démontré qu'elles peuvent être impliquées l'une dans l'apoptose, p38 α , et l'autre dans la survie des cellules endothéliales, p38 β [240]. L'hypothèse émise est que p38 β pourrait induire la survie des cellules en diminuant l'expression de PUMA.

Les tests cytotoxiques effectués sur les Caco2 indiquent que l'utilisation du SB202190 ne modifie pas la réponse globale des Caco2 au cetuximab. L'hypothèse est que si la MAPK p38 β participe à la survie alors que la MAPK p38 α participe à la mort de manière égale, l'inhibition des deux conduit à une annulation des effets de chacune dans cette lignée. Cependant dans les DiFi le rôle dans l'apoptose supplante le rôle dans la survie.

Les deux lignées présentent des statuts *TP53* différents. De plus, les deux isoformes α et β de p38 sont connues pour être régulées de manière inverse par p53. p53 inhibe l'activation de p38 α et augmente l'activité de la p38 β pour induire l'apoptose des cardiomyocytes traités aux œstrogènes [241].

Les résultats obtenus conduisent à penser que l'influence de l'absence de p53 sur l'activation de p38 α et p38 β semble être en partie à l'origine de la différence de réponse au cetuximab entre les DiFi et les Caco2. L'hypothèse est que, dans les Caco2 qui n'ont pas de

p53 active, l'activation de p38 α est inhibée partiellement en conditions normales et son activation par le cetuximab est plus faible donc l'apoptose induite sera moindre. En revanche, l'absence de p53 favorise l'activation de la p38 β et donc la survie. Les caco2 répondent donc moins au cetuximab mais l'inhibition de p38 α conduit à une meilleure réponse.

L'augmentation de la mort cellulaire induite par l'inhibition de p38 a déjà été observée dans des cellules du CCR p53 muté mais en combinaison avec une inhibition de la protéine ERK au lieu de l'utilisation du cetuximab [234]. Les auteurs ont également décrit que l'inhibition de p38 α provoque l'inactivation de FOXO3a via l'AMPK dans des cellules de CCR p53 mutées [233]. Ces résultats discordants de ceux obtenus dans les cellules DiFi semblent indiquer que le rôle de p38 sur FOXO3a est dépendant du statut de p53.

L'implication de p53 dans la réponse au cetuximab que nous décrivons est en accord avec les études menées sur les cellules des cancers de la prostate et du foie [242;243] *in vitro* et dans le modèle murin. Et également avec une étude menée sur des patients atteints de CCR [224]. La seule étude qui semble être en contradiction avec nos résultats est celle de Oden-Gangloff en 2009 [223]. En effet, les auteurs montrent que les patients présentant une mutation de *TP53* répondent mieux au traitement au cetuximab avec l'irinotécan que les patients *TP53* sauvage. Cependant, les primers utilisés ne détectaient que les mutations affectant les exons 5 à 8 alors que d'autres sont possibles sur les exons 4 et 8 [244]. Il est connu que les mutations de p53 peuvent conduire à plusieurs conséquences: la perte de fonction, la perte totale de la protéine ou le gain de fonction [245;246]. Le résultat obtenu par cette équipe pourrait donc être influencé par la sélection de mutations de ce dernier type. La comparaison entre la liste des mutations des patients de l'équipe de Oden-Gangloff et des « points chauds » de mutation de *TP53* conduisant à un gain de fonction indique que quatre patients possèdent la mutation R175H [246], deux présentent la mutation R273H, deux présentent la mutation R273C et enfin un présente la mutation C135Y [247] soit 9 patients sur 64 possèdent une mutation gain de fonction de p53. L'étude plus approfondie des mutations de *TP53* détectées chez leurs patients semble nécessaire à la compréhension des résultats d'Oden-Gangloff.

La synthèse de nos résultats et de ceux obtenus précédemment nous permet d'établir les modèles présentés dans la Figure 41. Dans les cellules p53 sauvage, le traitement au cetuximab induit l'activation de p38 α via p53. La MAPK p38 α va alors pouvoir participer à l'inhibition de ERK et directement activer la localisation nucléaire de FOXO3a afin de lui

permettre de transcrire les gènes impliqués dans l'apoptose et l'arrêt de la prolifération. Dans ces cellules p53 sauvage, l'inhibition de p38 α conduit donc à une inhibition des effets du cetuximab.

L'étude de la réponse au cetuximab des cellules présentant une p53 mutée indique que l'absence de l'activité de p53 induit une activation plus faible de p38 α . Il y a donc une inhibition de l'apoptose induite par cette voie dans les cellules où p53 est inactif ou absent. En revanche, la p38 β activée en l'absence de p53, peut diminuer l'expression de PUMA induite par le cetuximab et donc inhibe l'effet du cetuximab. L'AMPK induite par l'inhibition de p38 α participe à l'activation de FOXO3a via l'inhibition de son régulateur négatif AKT. JNK est également capable d'activer FOXO3a. À ce jour, le rôle de JNK sur FOXO3a n'a été démontré que dans des cellules où la protéine p53 est mutée et sous l'action de TKI ciblant l'EGFR [248]. Il est donc possible que JNK soit responsable de l'activation de FOXO3a après traitement au cetuximab en l'absence de p53 (Figure 41).

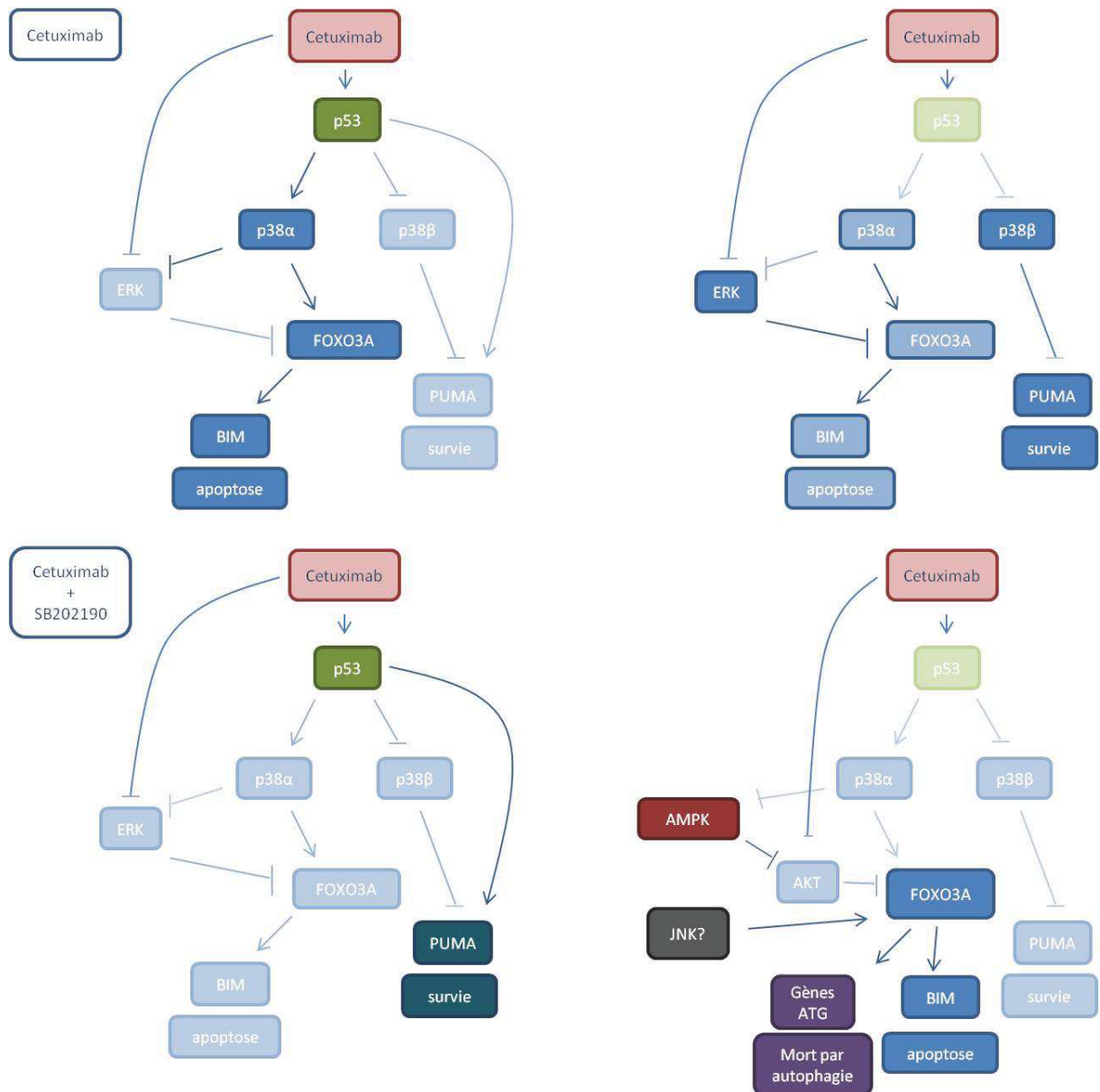


Figure 41: Modèles de réponse au cetuximab, au SB202190 et à la combinaison des deux *in vitro*

Afin de valider ces modèles des expériences supplémentaires sont nécessaires. En premier lieu, nous devons étudier la réponse au cetuximab *in vivo*. De plus, sur les échantillons de tumeurs de patients traités cetuximab + irinotécan, il serait intéressant de connaître le statut p53 afin de déterminer si les patients qui répondent moins au cetuximab et présentent une p38 activée possèdent effectivement une protéine p53 absente ou inactive. *In vitro*, il est important de valider les hypothèses émises sur le mécanisme par lequel p38 inhibe l'activation de FOXO3a conduisant à la survie dans les lignées où p53 est muté (via l'AMPK), de valider l'implication de JNK et d'analyser l'induction de l'autophagie par le cetuximab dans les lignées *TP53* mutées. Enfin, *in vivo*, il faudrait étudier les tumeurs issues des xénogreffes dans les souris Nude récupérées des expériences faites dans notre projet afin

d'analyser l'activation des différentes isoformes de p38, les marqueurs de mort et d'autophagie mais également l'expression de PUMA.

Pour finir, l'inhibition de p38 ayant un effet sur l'activation du système immunitaire (Chini et al., 2000) et l'activation de p38 par le contact cellule-cellule bloquant l'effet bénéfique de son inhibition sur les cellules *TP53* mutées, il ne semble toujours pas judicieux d'associer inhibition de p38 et cetuximab.

Nos résultats montrent cependant pour la première fois que l'activation de p38 et le statut de la protéine p53 peuvent constituer de bons marqueurs de réponse au cetuximab dans le CCR.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer dans le monde pour les hommes et le deuxième cancer pour les femmes avec 1,3 million de nouveau cas et près de 700 000 morts. En France, on observe une stabilisation de l'incidence depuis 2005 et une baisse de la mortalité depuis 1980 due à la précocité du diagnostique et à l'amélioration des traitements. Cependant en 2012, il a tout de même été recensé plus de 42000 nouveau cas et près de 18000 décès sont survenus (Binder-Foucard et al., 2014). L'échec thérapeutique reste à ce jour le problème majeur du traitement du CCR. Cet échec est dû à l'apparition de résistances au cours du traitement ou à la résistance innée des tumeurs aux anti-tumoraux utilisés.

Le but de l'équipe est de découvrir de nouveaux marqueurs de résistance, afin de mieux sélectionner les patients pouvant répondre positivement au traitement du CCR, ou de nouvelles cibles thérapeutiques afin de restaurer la sensibilité des cellules tumorales devenues résistante aux anti-tumoraux. Dans ce but, nous avons étudié la réponse au cetuximab des lignées cellulaires de cancer colorectal.

Précédemment, nous avons montré que l'activation de la « mitogen activated protein kinase » p38 (MAPK p38) induit une résistance à l'irinotécan *in vitro* et *in vivo* et est un marqueur de non réponse à cette drogue. De plus, d'autres équipes ont montré que la MAPK p38 bloque également la réponse au 5-FU et participe à la cytotoxicité de l'oxaliplatine. La MAPK p38 est impliquée dans les mécanismes d'action des chimiothérapies, il semblait alors intéressant de savoir si la MAPK p38 participe également à la cytotoxicité des thérapies ciblées comme le cetuximab.

Une connaissance plus approfondie des mécanismes d'action du cetuximab est nécessaire pour découvrir des méthodes de sélection des patients qui pourront bénéficier du traitement au cetuximab ou de trouver comment améliorer la réponse des patients.

Récemment, des études montrent que la protéine p53 participe à la réponse au cetuximab. De plus, la MAPK p38 étant capable de phosphoryler l'EGFR entraînant son internalisation, il était donc intéressant de déterminer si le statut p53 et le rôle de p38 sur l'EGFR régulent la réponse des cellules au cetuximab et si p38 et p53 peuvent constituer un bon marqueur de réponse.

Pour répondre à ces questions nous avons comparé deux lignées cellulaires de CCR KRAS sauvage qui répondent différemment au cetuximab et au statut *TP53* différent : la lignée Caco2 (30% d'inhibition de la survie, *TP53* muté) et la lignée DiFi (80% d'inhibition de la survie, *TP53* sauvage). Nous avons effectué des tests de cytotoxicité combinant cetuximab et l'inhibition transcriptionnelle ou pharmacologique de p38 ou l'inhibition

transcriptionnelle de p53. Nous avons également testé l'apoptose et la prolifération induite par le cetuximab en l'absence de la MAPK p38 ou de p53.

Grâce à cette étude, nous avons déterminé que dans les cellules de CCR KRAS sauvage et p53 sauvage traitées au cetuximab, p38 induit la phosphorylation et la relocalisation nucléaire du facteur de transcription FOXO3a en parti responsable de l'apoptose et de l'arrêt de la prolifération via la transcription de *BIM* et de *p27*.

Nous avons également découvert que le rôle de p38 dans l'action du cetuximab est différent dans les cellules possédant une protéine p53 mutée. Dans ce cas, la MAPK p38 protège les cellules de la mort induite par le cetuximab.

Enfin, notre travail a également permis de mettre en évidence le rôle de p53 dans l'apoptose induite par le cetuximab.

La somme de ces résultats nous a permis d'établir un modèle du rôle de p38 et p53 dans l'action du cetuximab (Figure 42).

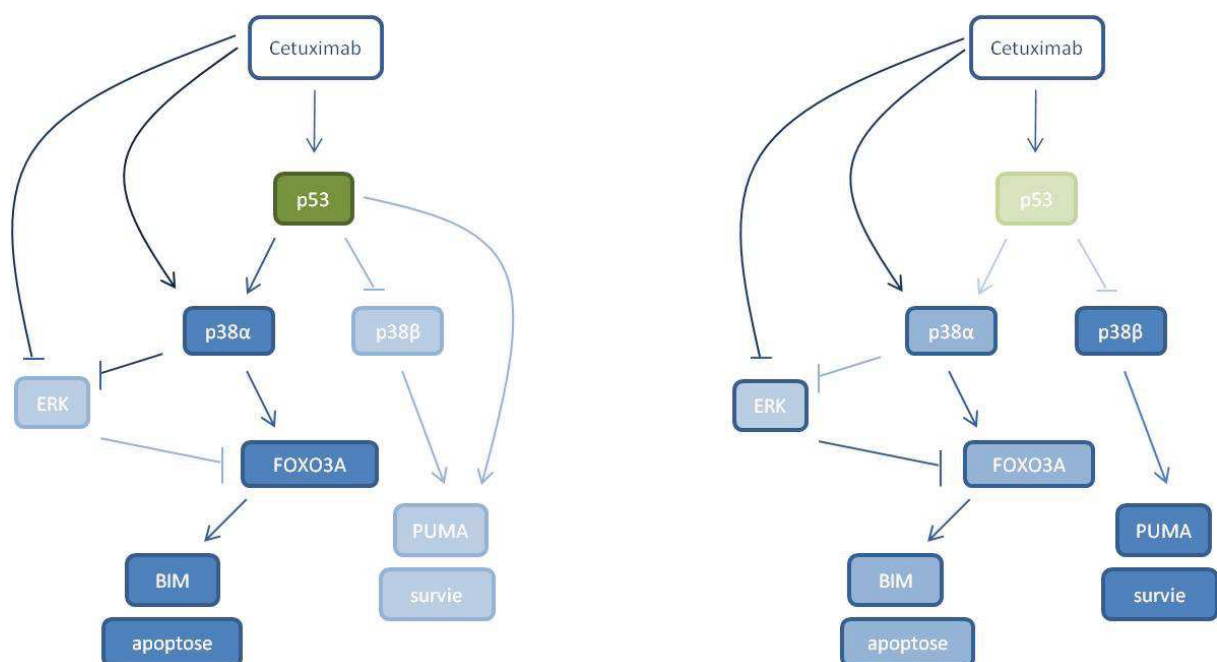


Figure 42 : Induction de l'apoptose et de la survie en réponse au cetuximab via p38 dans les cellules possédant une p53 fonctionnelle ou non

Avant de pouvoir valider ce modèle il faut confirmer l'implication de la MAPK p38β dans l'inhibition de l'expression de PUMA.

L'inhibition de la MAPK p38 et p53 est suffisante pour bloquer partiellement la réponse au cetuximab, ces deux protéines ne peuvent donc pas constituer de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer la réponse des patients à cette thérapie ciblée. Cependant, il serait intéressant de confirmer qu'elles peuvent être détectées dans des coupes de tumeurs afin

de déterminer les patients qui pourront bénéficier de l'utilisation du cetuximab. Le cetuximab étant utilisé en combinaison avec les chimiothérapies, nous devons, en plus de l'étude de ces deux marqueurs chez des patients traités au cetuximab seul, étudier la valeur prédictive de l'activation de p38 et de la mutation de p53 sur des patients ayant reçu les combinaisons de cetuximab plus 5-FU et irinotécan ou oxaliplatine.

Ce travail s'inscrit ainsi dans l'avancée prometteuse de la médecine personnalisée visant à apporter au patient le traitement approprié au profil génétique et protéomique de sa tumeur. D'autre part, même si la recherche de nouvelles thérapies visant à traiter un grand nombre de patients, sans distinction des caractéristiques génétiques des cellules tumorales n'est plus d'actualité, ce projet a également cette dimension. En effet, nous décrivons le potentiel de la MAPK p38 comme cible thérapeutique pour augmenter l'efficacité de l'irinotécan. Le traitement de référence des patients atteint de CCR métastatique étant l'utilisation du cetuximab en combinaison avec l'irinotécan, il nous faut déterminer si la combinaison que nous proposons (inhibition de p38 + irinotécan) est meilleure et permet de traiter un plus grand nombre de patients. Pour cela, nous avons prévu des expériences *in vivo* sur plusieurs lignées de CCR. De plus, nous visons à obtenir les autorisations pour effectuer un essai clinique testant la combinaison de l'inhibition de p38 avec l'irinotécan chez des patients résistants aux protocoles traditionnels. Les résultats de cette étude en complément des études préclinique permettront de pouvoir conclure sur le potentiel thérapeutique du ciblage de la MAPK p38.

ANNEXES



Cancer Research

Targeting the p38 MAPK Pathway Inhibits Irinotecan Resistance in Colon Adenocarcinoma

Salomé Paillas, Florence Boissière, Frédéric Bibeau, et al.

Cancer Res 2011;71:1041-1049. Published OnlineFirst December 15, 2010.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2726
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/12/15/0008-5472.CAN-10-2726.DC1.html

Cited Articles	This article cites by 40 articles, 15 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/3/1041.full.html#ref-list-1
Citing articles	This article has been cited by 3 HighWire-hosted articles. Access the articles at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/3/1041.full.html#related-urls

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .

Targeting the p38 MAPK Pathway Inhibits Irinotecan Resistance in Colon Adenocarcinoma

Salomé Paillas¹, Florence Boissière², Frédéric Bibeau², Amélie Denouel², Caroline Mollevi³, Annick Causse¹, Vincent Denis¹, Nadia Vezzio-Vié¹, Laetitia Marzi¹, Cédric Cortijo¹, Imade Ait-Arsa¹, Nadav Askari⁴, Philippe Pourquier⁵, Pierre Martineau¹, Maguy Del Rio¹, and Céline Gongora¹

Abstract

Despite recent advances in the treatment of colon cancer, tumor resistance is a frequent cause of chemotherapy failure. To better elucidate the molecular mechanisms involved in resistance to irinotecan (and its active metabolite SN38), we established SN38-resistant clones derived from HCT-116 and SW48 cell lines. These clones show various levels (6- to 60-fold) of resistance to SN-38 and display enhanced levels of activated MAPK p38 as compared with the corresponding parental cells. Because four different isoforms of p38 have been described, we then studied the effect of p38 overexpression or downregulation of each isoform on cell sensitivity to SN38 and found that both α and β isoforms are involved in the development of resistance to SN38. In this line, we show that cell treatment with SB202190, which inhibits p38 α and p38 β , enhanced the cytotoxic activity of SN38. Moreover, p38 inhibition sensitized tumor cells derived from both SN38-sensitive and -resistant HCT116 cells to irinotecan treatment in xenograft models. Finally, we detected less phosphorylated p38 in primary colon cancer of patients sensitive to irinotecan-based treatment, compared with nonresponder patients. This indicates that enhanced level of phosphorylated p38 could predict the absence of clinical response to irinotecan. Altogether, our results show that the p38 MAPK pathway is involved in irinotecan sensitivity and suggest that phosphorylated p38 expression level could be used as a marker of clinical resistance to irinotecan. They further suggest that targeting the p38 pathway may be a potential strategy to overcome resistance to irinotecan-based chemotherapies in colorectal cancer. *Cancer Res*; 71(3); 1041-9. ©2010 AACR.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent malignancy in Western countries. Despite significant developments in CRC treatment, it still causes extensive mortality. Nowadays, the chemotherapy options for metastatic CRC patients consist in the combination of 5-fluorouracil/leucovorin (5-FU/LV) and irinotecan (FOLFIRI) or 5-FU/LV and oxaliplatin (FOLFOX) associated, or not, with the anti-VEGF antibody Bevacizumab or the anti-EGFR antibody Cetuximab (1). Cetuximab indication is restricted to patients with wild type KRAS, as KRAS mutations predict resistance to treatment with

anti-EGFR monoclonal antibodies (2). Therapeutic failure is mainly due to resistance to drug treatment. Thus, identifying the cellular mechanisms that lead to resistance is a crucial issue for improving CRC treatment and survival.

Irinotecan (CPT-11) is a derivative of camptothecin and its active metabolite is SN-38. Like other camptothecin derivatives, SN38 inhibits topoisomerase I (TopoI), a nuclear enzyme needed for replication and transcription by unwinding supercoiled DNA (3). SN38 interferes with TopoI activity by trapping TopoI-DNA cleavage complexes, leading to lethal replication-mediated double strand breaks (3) that induce phosphorylation of the H2AX histone variant and activate the ATM-CHK2-p53, DNA-PK, and ATR-CHK1 signaling pathways.

Cellular mechanisms causing irinotecan resistance have been reported for each step of the CPT-11 pathway (4). Reduced intracellular drug accumulation (5) and alterations in CPT-11 and SN38 metabolism play important role in the development of resistance (6). In addition, quantitative and qualitative alterations of TopoI have been extensively reported in cell lines (7-10, 27). Finally, alterations in the cellular responses to ternary complex formation that ultimately lead either to repair of DNA damage or to cell death (11, 12) can induce resistance to camptothecins. The clinical relevance of these resistance mechanisms is poorly documented, except for the high variability in patients' metabolism of CPT-11, which represents a good response indicator. Moreover, there is a need to find new

Authors' Affiliations: ¹IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier; INSERM, U896; Université Montpellier1, CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque; Departments of ²Pathology and ³Biostatistics, CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque, Montpellier, F-34298 France; ⁴Department of Biological Chemistry, the Silberman Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel; and ⁵INSERM U916, VINCO, Institut Bergonié, Bordeaux, France

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

Corresponding Author: Céline Gongora, IRCM INSERM U896, Montpellier, France. Phone: 33-4-67-61-37-45; Fax: 33-4-67-61-37-87. E-mail: celine.gongora@valdorel.fnclcc.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2726

©2010 American Association for Cancer Research.

markers that can predict patients' response to irinotecan-based regimens and thus help to identify the patients who are most likely to respond to such treatments. We have previously shown that SN38-resistant HCT116 cells display endogenous activation of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK; ref. 13). p38 belongs to a class of serine/threonine MAPK (14) and is composed of 4 isoforms (α , β , γ , and δ) with more than 60% overall sequence homology and more than 90% identity within the kinase domains. p38 α and p38 β are expressed in most tissues and are both sensitive to pyridinyl imidazole inhibitors (such as SB202190), whereas p38 γ and p38 δ have a more restricted pattern of expression and are insensitive to these inhibitors (15). p38 is activated through phosphorylation at the Thr¹⁸⁰-Gly-Tyr¹⁸² motif by MKK3, MKK4, and MKK6 (16). Phosphorylated p38 then activate a wide range of substrates that include transcription factors, protein kinases, and cytosolic and nuclear proteins, leading to diverse responses such as inflammatory responses, cell differentiation, cell-cycle arrest, apoptosis, senescence, cytokine production, and regulation of RNA splicing (15). The role of p38 in cancer depends on the cell type and cancer stage: some studies have reported that p38 increases cell proliferation, whereas in others the activation of the MAPK p38 pathway is described as a tumor suppressor. For example, p38 α expression is downregulated in lung tumors, suggesting that p38 loss could be related to tumor formation (17). Consistent with this, the expression of MKK4, a p38 activator, is reduced in advanced tumors (18). Conversely, increased levels of phosphorylated p38 α have been correlated with malignancy in follicular lymphoma, lung, thyroid, and breast carcinomas, glioma, and head and neck squamous cell carcinoma (19). In CRC, p38 α is required for cell proliferation and survival and its inhibition leads to cell-cycle arrest and autophagic cell death (20).

Here, we have examined the functional role of the four p38 isoforms in the development of irinotecan resistance. We show that p38 is activated by irinotecan treatment and that all the tested SN38-resistant HCT116 cell lines display higher p38 phosphorylation level than control or SN38-sensitive cells. Pharmacologic inhibition of p38 α and p38 β overcome irinotecan resistance and, therefore, could be used to prevent the development of a resistant phenotype in sensitive cells. Finally, we report higher level of phosphorylated p38 in tumor samples from patients who are refractory to irinotecan-based therapy compared with responder patients.

Material and Methods

Cell lines and reagents

The HCT116 colon adenocarcinoma cell line from ATCC were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mmol/L L-glutamine at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO₂. The HCT116-s, SW48-s, and SN38-resistant clones were obtained as previously described (5; Supplementary Data).

SN38 was provided by Sanofi-Aventis. SB202190 was purchased from Sigma-Aldrich. Irinotecan, 5-fluorouracil, and oxaliplatin were provided by Dr. F. Pinguet (CRLC Val d'Aurèle, France).

Drug sensitivity assay

Cell growth inhibition and cell viability after SN38 treatment were assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay as previously described (5).

Western blot analyses

Western blot analysis of cell extracts from control and retrovirus-infected cells were performed as previously described (21). Primary antibodies were directed against phospho-p38, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , pATF2 (Cell Signaling Technology), β -actin (AbCam), and TopoI (1). Secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antisera (Sigma Aldrich).

Immunofluorescence

Cells were plated on 12-mm glass coverslips in culture dishes. They were fixed in 3.7% formaldehyde, blocked in PBS with 1% BSA and 0.3% Triton, and incubated with an anti-phospho p38 monoclonal antibody (Cell Signaling Technology) and then with a FITC-conjugated anti-rabbit antiserum (maker). 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to stain the nuclei. Coverslips were then mounted in Moviol, and images were recorded using a 63 \times NA objective and a Leica inverted microscope.

Retroviral infection

HCT116-s and HCT116-SN6 cells that stably express the 4 constitutively active (CA) p38 isoforms were obtained by retroviral gene transduction of the pMSCV vector in which CA variants of p38 α , p38 β , p38 γ , and p38 δ (22) had been previously subcloned. Twenty-four hours after transduction, cells were selected with 1 μ g/mL of hygromycin and then stable clones were pooled.

HCT116-s and HCT116-SN6 cells expressing short hairpin RNA's (shRNA) targeting *luciferase*, *p38 α* , *p38 β* , *p38 γ* , and *p38 δ* mRNA were obtained by retroviral gene transduction of the pSIREN vector in which the shRNAs were cloned. Cells were selected with 1 μ g/mL of puromycin and then stable clones were pooled.

Kinase assay

The p38 kinase assay was performed using the nonradioactive p38 MAPK Assay Kit from Cell Signaling Technology as previously described (13).

In vivo experiments

Xenografts. Female athymic *nu/nu* mice were purchased from Harlan Laboratories and used at 6 to 8 weeks of age. About 3×10^6 tumor cells were injected subcutaneously (s.c.) into the left flank of each mouse. Tumors were detected by palpation and measured periodically with calipers. Mice were euthanized when the tumor volume reached 1,000 mm³.

Irinotecan and SB202190 treatment. Irinotecan stock solution was diluted in 0.9% sodium chloride and 40 mg/kg were administered intraperitoneally (i.p.) to tumor-bearing mice according to the following schedule: 4 injections (1 every 4 days) starting when tumors reached 100 mm³. Mice in the

control group received 0.2 mL of 0.9% sodium chloride solution according to the same schedule.

SB202190 stock solution was diluted in 0.9% sodium chloride and administered i.p. at 0.05 $\mu\text{mol/kg}$ daily for 12 days when tumors reached 100 mm^3 .

Irinotecan + SB202190 were administered when tumors reached 100 mm^3 : 4 injections (1 every 4 days) of irinotecan at 40 mg/kg + SB202190 at 0.05 $\mu\text{mol/kg}$ for 12 days.

Protein extraction from xenografts

Xenografts from nude mice were isolated and proteins extracted as follows. Tumors were cut and lysed in 500 μL of lysing buffer (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.5% NP40, 1% Triton, 2 mmol/L PMSF, 100 mmol/L NaF, 10 mmol/L Na_3VO_4 , and a cocktail of protease inhibitors) and then homogenized with beads using the MixerMill apparatus. Extracts were centrifuged and proteins in the supernatants were quantified with the Bradford assay and loaded on SDS-PAGE gels.

Detection of phosphorylated p38 by immunohistochemistry in clinical samples

A tissue microarray (TMA) including samples from 21 metastatic CRC patients was constructed as previously described (24), using 3 malignant tissue cores (0.6-mm diameter) per tumor. Tissue samples were from patients of a previously published prospective series (25) and were all chemotherapy-naïve at the time of surgery of their primary tumor. They all subsequently received the FOLFIRI regimen as first-line chemotherapy. Tumor response was evaluated according to the WHO recommendations after each of the 4 or 6 cycles of chemotherapy. Nine patients showed a decrease of 50% or more of their metastatic lesion and were classified as responders, and 12 patients, with a decrease of less than 50% or with an increase in size of lesions, were classified as nonresponders. Three-micrometer sections of the TMA were deparaffinized and rehydrated in graded alcohols. Following epitope retrieval treatment in EDTA buffer (pH 9) and neutralization of endogenous peroxidase, TMA sections were incubated overnight at 4°C with the anti-phospho-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²; Cell Signaling Technology), followed by a standard detection system (FLEX+; Dako). Phospho-p38 signals were observed both in the nucleus and cytoplasm of tumors cells, but only the nuclear staining was taken into account. Briefly, each spot in the TMA sections received a score for the percentage of marked cells and for the staining intensity. Data were then consolidated into a single score as the mean of the triplicate score. Finally, we defined a Quick Score (QS) by multiplying the intensity grade by the percentage of stained nuclei.

Statistical analysis

Continuous variables were presented as medians (range) and compared between populations with the nonparametric Wilcoxon rank-sum test. Qualitative variables were compared using the Fisher's exact test. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Survival rates were estimated from the date of the xenograft to the date when the tumor reached a volume of 200 mm^3 , using the Kaplan–Meier method. Survival curves were compared using the log-rank test. Statistical analysis was performed using STATA 11.0 software (StatCorp).

Results

The MAPK p38 is constitutively activated in SN38-resistant colon carcinoma cells and its phosphorylation is increased by SN38 treatment

We have already shown that HCT116-SN6 colon adenocarcinoma cells, which display a 6-fold resistance to SN38, present constitutive activation of the MAPK p38, compared with a sensitive clone HCT116-s (13). Now, we investigated whether SN38 treatment favors p38 activation in sensitive HCT116-s and SN38-resistant HCT116-SN6 cells. Western blot analysis using phospho-specific p38 antibodies showed an increase of p38 phosphorylation following SN38 treatment in both cell lines (Fig. 1A). In untreated cells, basal p38 phosphorylation was more pronounced in HCT116-SN6 than in HCT116-s cells, as previously reported. We confirmed these results by immunofluorescence (IF; Fig. 1B). Phospho-p38 staining (in green) appeared to be granular or punctuated as previously reported (26). These results indicate that p38 is activated by SN38 in both SN38-sensitive and -resistant HCT116 cells.

To determine whether p38 is constitutively activated only in the SN38-resistant HCT116-SN6 clone, we tested the level of p38 phosphorylation in 4 other resistant clones, HCT116-A2, -SN50, -C8, and -G7 by immunofluorescence. We found that in all SN38-resistant clones, basal p38 phosphorylation was higher than in HCT116-s cells (Fig. 1C). To determine whether this phenomenon could be observed in another colon cancer cell model, we used the SW48-sensitive cells and generated SN38-resistant clones (Supplementary Fig. 1). Similar to HCT116 SN38-resistant clones, all SW48 resistant clones displayed higher p38 phosphorylation, as compared with the parental SW48-s clone further suggesting that this feature could be a hallmark of SN38 resistance.

The p38 α and p38 β isoforms are involved in SN38 resistance

We then analyzed the potential functional impact of p38 phosphorylation on the development of resistance to SN38. To this aim, we expressed a CA form of the upstream p38 activating kinase MKK6 in HCT116 cells. CA MKK6 rendered cells more resistant to SN38 treatment (Supplementary Fig. 2), confirming the notion that activation of p38 can induce SN38 resistance. Because p38 has 4 isoforms (α , β , γ , and δ), we then overexpressed or downregulated each isoform in HCT116-s and HCT116-SN6 cells to identify which one was involved in the development of resistance to SN38.

First, each of the 4 p38 isoforms was downregulated by shRNA in SN38-sensitive HCT116-s cells (Fig. 2A, left), and the effect of their silencing on the sensitivity to SN38 was tested with the SRB assay. SN38 cytotoxicity was stronger only in the cells in which p38 α was silenced (Fig. 2B, left), as shown by their lower IC₅₀ (50% inhibitory concentration) than in control

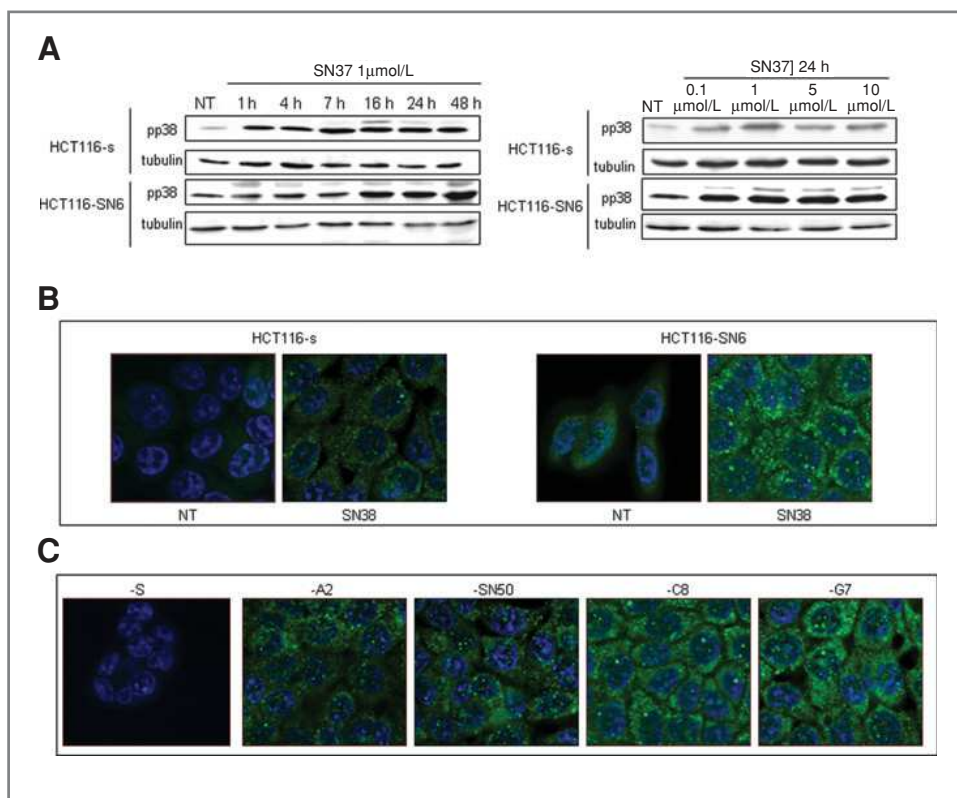


Figure 1. p38 is activated by phosphorylation in SN38-resistant HCT116 cells. A, timecourse and dose-dependency analysis by Western blotting of phosphorylated p38 (pp38) in SN38-sensitive HCT116-s and SN38-resistant HCT116-SN6 cells. Equal loading is shown by tubulin. B, detection of phospho-p38 by immunofluorescence in HCT116-s and HCT116-SN6 cells treated or not (NT) with SN38. C, detection of phospho-p38 by immunofluorescence in SN38-sensitive HCT116-s and in SN38-resistant HCT116-A2, -SN50, -C8 and -G7 cells.

cells (1.1 and 1.9 nmol/L, respectively, $P = 0.002$). Silencing of the β , γ , or δ isoform had no impact on SN38 sensitivity in HCT116-s cells.

Then, HCT116-s cells were infected with retroviruses expressing a CA variant of each p38 isoform (22) and sensitivity to SN38 was again tested using the SRB assay. Expression of the CA p38 variants was monitored by Western blotting with an anti-HA antibody (Fig. 2A, right). No difference in the IC_{50} of the different cell lines was observed (Fig. 2C). We then tested whether coexpression of the α and β isoforms could affect HCT116-s cell sensitivity to SN38 and found that these cells became more resistant to SN38 as evidenced by a higher IC_{50} (Fig. 2D). This result indicates that overexpression of both p38 isoforms α and β can influence sensitivity of HCT116-s cells to SN38.

Silencing of the 4 p38 isoforms by shRNA and expression of the CA isoforms were then carried out in SN38-resistant HCT116-SN6 cells and were monitored by Western blotting as before (Fig. 2E). For HCT116-s cells, only downregulation of p38 α sensitized HCT116-SN6 cells to SN38 treatment (Fig. 2F; IC_{50} : 3.6 and 10 nmol/L respectively, $P = 0.0003$). In addition, overexpression of CA p38 β (Fig. 2G) or p38 α + β (Fig. 2H) rendered HCT116-SN6 cells more resistant to SN38 treatment (β overexpression; IC_{50} : 19.4 and 10 nmol/L, respectively, $P = 0.0018$ and α + β overexpression; IC_{50} : 16.125 and 9 nmol/L, $P = 0.0028$). These results indicate that coexpression of CA p38 α and p38 β can further enhance the level of resistance of resistant clones.

Because alterations of Topo1 (9, 28, 29) can confer resistance to camptothecin derivatives (30–32), we then investigated

whether overexpression of CA p38 β or downregulation of p38 α in HCT116-SN6 and HCT116-s cells influenced Topo1 expression (Western blotting) and activity (ICE bioassay; ref. 23). No changes in Topo1 expression or activity were detected (Supplementary Fig. 3), indicating that p38 effect on cell sensitivity to SN38 is not linked to quantitative alteration of Topo1 expression or to a difference in the number of Topo1-DNA complexes.

Association of SB202190 with SN38 decreases resistance to SN38 *in vitro*

Because p38 α and p38 β appear to play a role in the development of resistance to SN38, we then assessed the effect of blocking concomitantly the activity of both isoforms with SB202190, a specific inhibitor of p38 α and p38 β , on the sensitivity to SN38 by SRB assay in HCT116-s and HCT116-SN6 cells. Incubation with SB202190 alone had similar effect on cell growth in both SN38-sensitive and SN38-resistant cells (Fig. 3A). When SN38 was associated with SB202190, the IC_{50} in both sensitive and resistant cells was decreased by 2-fold in comparison to cells treated only with SN38 (Fig. 3A). The effect of SB202190 on p38 activity was then monitored by kinase assay (Fig. 3B) that follows p38 activity on its target protein ATF2. Basal p38 activity was more pronounced in HCT116-SN6 than in HCT116-s cells, as we previously described (13). SN38 treatment enhanced p38 activity and this effect was inhibited by SB202190 treatment. These experiments show that sensitivity to SN38 is largely increased when SB202190 is added to the culture medium in both cell lines, indicating that

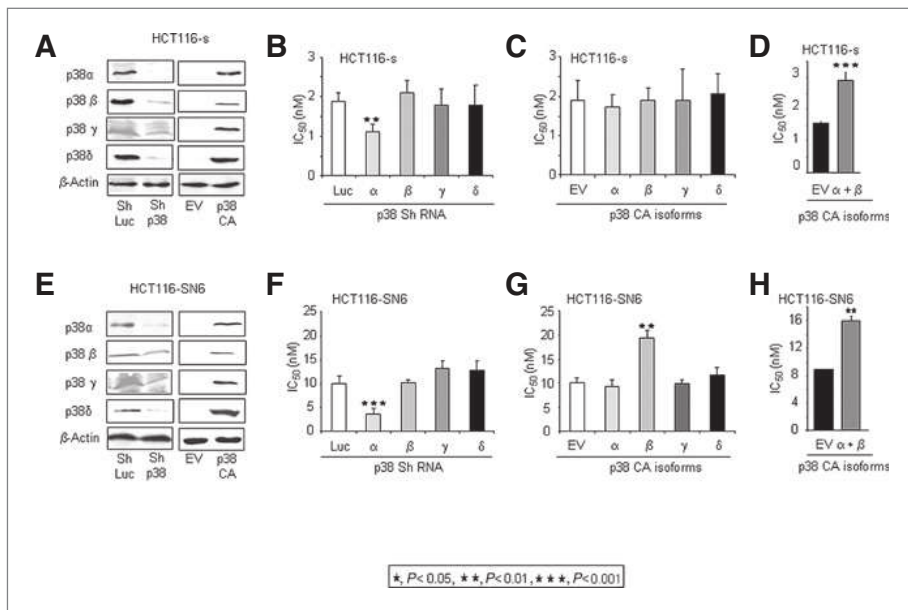


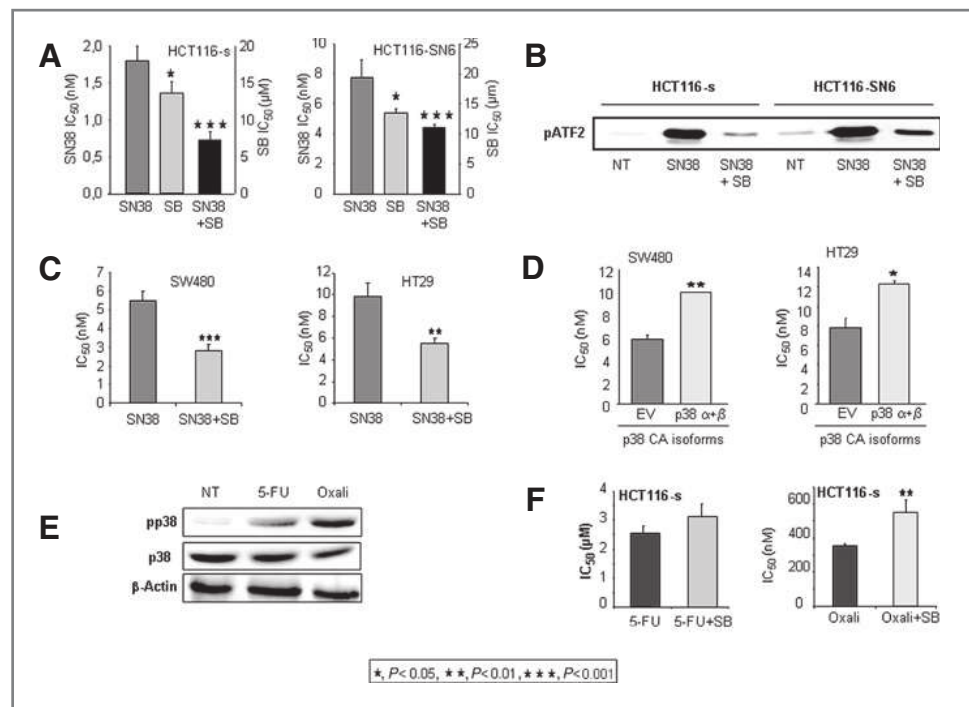
Figure 2. Analysis of the involvement of the different p38 isoforms in SN38 sensitivity. A, left, Western blot analysis of p38 isoforms in SN38-sensitive HCT116-s cells transduced with shRNAs directed against p38 α , β , γ , or δ , or with the control shRNA against *Luciferase* (ShLuc). Right, Western blot analysis (anti-HA antibody) of HCT116-s cells that express CA p38 α , β , γ , or δ [or empty vector (EV) as a control]. B, SRB assays to assess cytotoxicity of HCT116-s that stably express shRNA targeting p38 α , β , γ , or δ or *ShLuc* (control). C, SRB assay: HCT116-s that stably express the 4 CA p38 isoforms or EV as control. D SRB assay: HCT116-s expressing p38 α + p38 β CA or EV as control. E, Western blot analysis of the 4 p38 isoforms in SN38-resistant HCT116-SN6 cells that stably express shRNAs directed against p38 α , β , γ , or δ , or the shRNA control *ShLuc* (left), or the 4 CA p38 isoforms or EV (right). F, SRB assay on HCT116-SN6 cells that stably express shRNA targeting p38 α , β , γ , or δ or *ShLuc*. G, SRB assay on SN38-resistant HCT116-SN6 cells that stably express the 4 CA p38 isoforms or the EV control. H, SRB assay: HCT116-SN6 expressing p38 α + p38 β CA or EV as control.

inhibition of p38 α and p38 β activity sensitizes even SN38-resistant cells to SN38 *in vitro*.

SB202190 effect on SN38 sensitivity was tested on 2 other colon adenocarcinoma cell lines (HT29 and SW480) that have

different genotypes. The HCT116 cell line has wild-type p53 and mutated KRAS, whereas HT29 cells have mutated p53 and wild-type KRAS and SW480 cells show mutated p53 and KRAS. SRB assays were carried out in HT29 and SW480 cells treated

Figure 3. SB202190 sensitizes colon adenocarcinoma cells to SN38 treatment. A, SRB assay on HCT116-s and HCT116-SN6 cells using SN38 alone, SB202190 (SB) alone or SN38 + SB202190 (SN38 + SB). B, p38 kinase assay to test p38 α activity in HCT116-s and HCT116-SN6 cells after treatment with SN38 (SN38), cotreatment with SN38 and SB202190 (SN38+SB) or no treatment (NT). C, SRB assay on SW480 and HT29 cells, using SN38 alone or SN38 + SB202190 (SN38 + SB). D, SRB assay: SW480 or HT29 expressing p38 α + p38 β CA or EV as control. E, Western blot analysis of phospho-p38 expression in HCT116-s cells, treated or not with 10 μ mol/L 5-FU or 5 μ mol/L oxaliplatin (Oxali) for 24 hours. Equal loading is shown by β -actin. F, SRB assay on HCT116-s cells using 5-FU alone, 5-FU + SB202190 (5-FU+SB), oxaliplatin (Oxali) alone, or oxaliplatin + SB202190 (Oxali + SB).



with SN38 alone or in combination with SB202190 (Fig. 3C). As for the different HCT116 cell lines, the association of SN38 with SB202190 also lowered the IC_{50} of HT29 (IC_{50} : 9.8 and 5.5 nmol/L, respectively, $P = 0.005$) and SW480 cells (IC_{50} : 5.5 and 2.8 nmol/L respectively, $P = 0.0013$), indicating that SB202190 effect on SN38 sensitivity is independent of the p53 and KRAS status. Conversely, when CA α and β isoforms were coexpressed in SW480 or in HT29 cells, we found that cells became more resistant to SN38 (Fig. 3D), further strengthening the role of both p38 α and p38 β isoforms in the development of SN38 resistance.

We then asked whether the inhibition of p38 α and p38 β activity by SB202190 could also affect sensitivity to 5-FU or oxaliplatin in HCT116-s cells. Although both drugs induced p38 phosphorylation, total p38 levels were not affected (Fig. 3E), SB202190 had no impact on 5-FU cytotoxicity, whereas it reduced oxaliplatin cytotoxicity (IC_{50} : 350 nmol/L for oxaliplatin and 550 nmol/L for oxaliplatin + SB202190, $P = 0.005$; Fig. 3F).

These data suggest that inhibition of p38 α and p38 β by SB202190 enhances specifically the cytotoxic effect of SN38, independently of the type of colon cancer cell lines.

HCT116-SN6 cells are resistant to irinotecan in a xenograft model

To evaluate the behavior of SN38-resistant and -sensitive HCT116 cell lines *in vivo*, HCT116-s and HCT116-SN6 cells were s.c. injected in nude mice and mice treated with or without irinotecan. Without treatment, similar tumor growth was observed for both cell lines (Fig. 4A), but they responded differently to irinotecan. In mice with HCT116-s xenografts, tumor growth was blocked by irinotecan, and at the end point (day 18),

tumor size was 5-fold lower than in untreated mice (Fig. 4A, $P < 0.001$). Conversely, mice with HCT116-SN6 xenografts were less sensitive to irinotecan, as tumor size was only half of that of untreated mice at day 18 (300 mm³ in irinotecan-treated mice and 600 mm³ in untreated mice, $P = 0.001$) and tumor growth was not completely blocked as in the case of HCT116-s xenografts. These observations further confirm that HCT116-SN6 cells are less sensitive to irinotecan than HCT116-s.

We then analyzed the *in vivo* response to irinotecan in xenografts of HCT116-SN6 cells in which p38 α had been downregulated by shRNA or CA p38 β overexpressed. As before, tumor growth before irinotecan treatment was similar in all groups (mice xenografted with HCT116-SN6-pMSCV, HCT116-SN6-CAp38 β , HCT116-SN6-ShLuc, or HCT116-SN6-Shp38 α cells), (Supplementary Fig. 4A), indicating that differential p38 expression did not influence tumor growth. However, HCT116-SN6-CAp38 β tumors were less sensitive to irinotecan treatment than control HCT116-SN6-pMSCV tumors (Supplementary Fig. 4B). Conversely, HCT116-SN6-Shp38 α tumors were slightly more sensitive to irinotecan than control HCT116-SN6-ShLuc tumors (Supplementary Fig. 4D). Overexpression of CA p38 β and downregulation of p38 α were monitored by Western blot analysis of xenografts at the end of the experiment (Supplementary Fig. 4C and 4E). These *in vivo* results confirm that p38 α downregulation sensitizes HCT116 cells to irinotecan treatment whereas p38 β overexpression renders cells less sensitive to the drug.

Association of SB202190 with irinotecan decreases resistance to therapy *in vivo*

We then investigated the impact of inhibition of p38 α and p38 β activity on resistance to irinotecan in mice injected s.c.

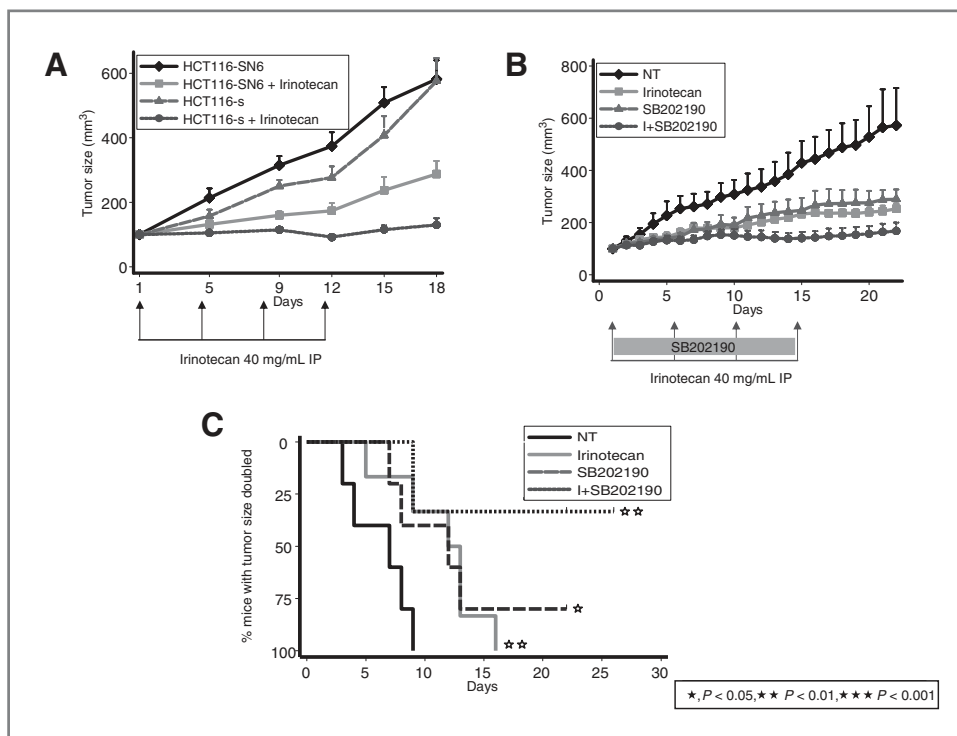
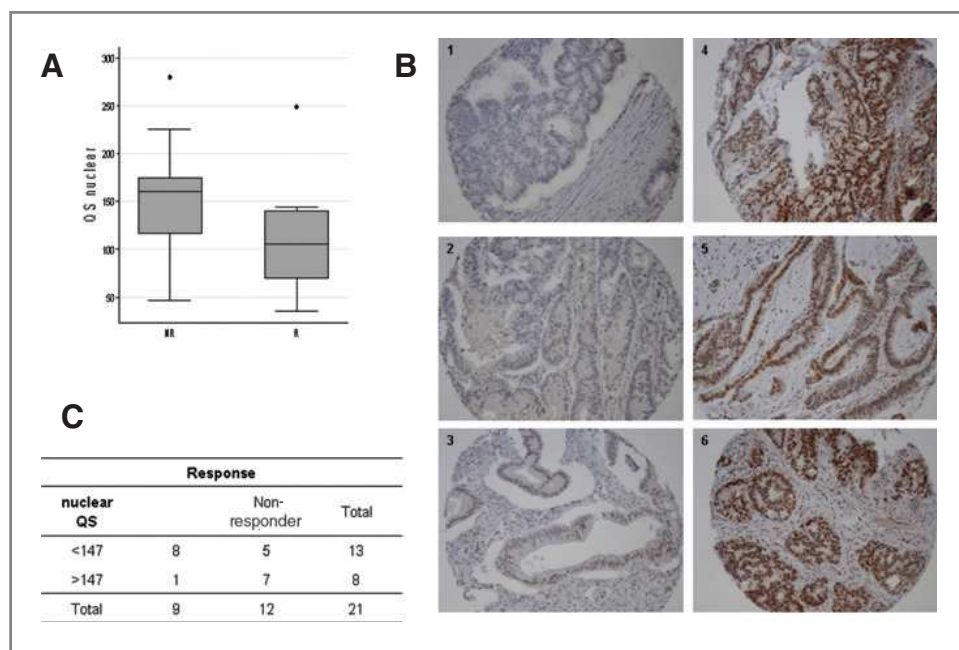


Figure 4. Effect of SB202190 on irinotecan cytotoxicity *in vivo*. A, tumor growth kinetics of mice xenografted with HCT116-s or HCT116-SN6 cells and treated or not with irinotecan. HCT116-s: NT versus irinotecan, $P < 0.001$, HCT116-SN6: NT versus irinotecan, $P = 0.001$. B, tumor growth kinetics of tumors in mice xenografted with SN38-resistant HCT116-SN6 cells and left untreated (NT), or treated with irinotecan alone, SB202190 alone, irinotecan + SB202190 (I+SB202190). C, Kaplan-Meier survival curves for the 4 groups described in B. Tick marks indicate censored events.

Figure 5. High expression of phosphorylated p38 in nonresponder patients. A, phospho-p38 expression according to the clinical response. Phospho-p38 nuclear expression was assessed by immunohistochemistry in 21 primary tumors. QS is calculated from the TMA phospho-p38 staining. Gray boxes represent the 25th to 75th percentiles with the medians as black lines, whiskers marking the lower and upper adjacent values, all outliers indicated by dots. B, phospho-p38 expression in colorectal primary tumors from FOLFIRI responders (panels 1, 2, 3) and FOLFIRI nonresponders (panels 4, 5, 6; 100 \times). C, correlation between the expression of phospho-p38 and the response to chemotherapy. The QS threshold (147) is the phospho-p38 level correlated with the response.



with HCT116-SN6 cells. When tumors reached 100 mm³, xenografted mice were divided in 4 groups: one group was left untreated, one was treated with irinotecan alone, one with SB202190 alone (32), and the last group with irinotecan and SB202190. SB202190 inhibited tumor growth as efficiently as irinotecan (Fig. 4B, $P = 0.792$), whereas the combination of irinotecan and SB202190 was statistically more effective than irinotecan ($P = 0.001$) or SB202190 alone ($P = 0.003$) and completely abolished growth of SN38-resistant xenografts, making HCT116-SN6 cells behave like SN38-sensitive HCT116-s cells (cf. Fig. 4A and B). This result provides evidence that inhibition of p38 α and p38 β activity can reverse resistance to irinotecan *in vivo*.

Survival was significantly longer in the groups treated with irinotecan ($P = 0.016$) or SB202190 ($P = 0.047$) alone (median survival = 12 days in each group) than in untreated mice (NT; median survival = 7 days). Although irinotecan or SB202190 were efficient in inhibiting growth of HCT116-SN6 xenografts, as previously described (20), the irinotecan + SB202190 combination was much more effective, as survival was significantly better than with irinotecan alone ($P = 0.045$). This data shows an additive effect of SB202190 and irinotecan on tumor growth.

Level of p38 phosphorylation is linked to impaired response to FOLFIRI therapy in CRC patients

To address the clinical relevance of p38 activation on the response to treatment, the level of p38 α phosphorylation was analyzed in a TMA composed of 21 primary colorectal carcinomas from metastatic CRC patients who received, following surgery, first line FOLFIRI chemotherapy. Nine patients were classified as responders (R) and 12 patients as nonresponders (NR) according to the WHO recommendations (25). TMA phospho-p38 signals were recorded to define a Quick Score (QS) that reflected the level of nuclear phospho-p38 expres-

sion in each clinical sample. Responders displayed less phospho-p38 staining than nonresponders [Fig. 5A; median QS (range): 105 (35; 248.9) and 160 (46.7; 180), respectively, $P = 0.0644$] as evidenced by immunohistochemistry in Figure 5B (compare samples from responders 1, 2, and 3 with samples from nonresponders 4, 5, and 6). This is in agreement with our *in vitro* results, where SN38-resistant HCT116-SN6 cells presented constitutive p38 activation.

These data were then analyzed using the ROC curves and the Youden index to define a threshold (147) that separated the QS depending on the response to treatment (Fig. 5C). Eight of the 9 responders were correctly classified (QS lower than 147; sensitivity = 89%). Thus, the correlation between low p38 phosphorylation and good response to FOLFIRI regimen was almost significant ($P = 0.067$, Fisher's test). Conversely, the threshold did not correctly classify the nonresponders (specificity = +58%). This result means that high p38 phosphorylation is a marker of impaired response, and that other mechanisms may also be involved in resistance to irinotecan treatment, explaining the clinical response of nonresponder patients with a low level of activated p38 α .

Discussion

In the present study, we have demonstrated the role of the 2 p38 isoforms α and β in the resistance to irinotecan. Moreover we have shown that inhibition of p38 enhances the efficacy of irinotecan-based chemotherapies.

We have shown that p38 phosphorylation is increased in SN38 resistant clones derived from HCT116 and SW48 cells, suggesting that p38 activation might represent a general resistance mechanism. Even though p38 constitutive activation was never reported in irinotecan-resistant cells, we could reproducibly detect a low level of p38 phosphorylation in our resistant clones. This low level of p38 activation may not be

sufficient to induce the negative regulatory controls such as protein phosphatases explaining the permanent constitutive activation (39). Moreover, we report that treatment with SN38 induces p38 activation both in SN38-sensitive and -resistant HCT116 cells. Activation of p38 MAPK by SN38 has already been observed in MCF-7 breast cancer cells (37), or in response to other chemotherapeutic agents such as 5-FU (35) or oxaliplatin (36). In these studies, p38 activation was shown to be involved in the cytotoxic effect of the drugs, but the authors did not discriminate between the four p38 isoforms. Here, we could provide experimental evidences showing that activation of both p38 α and p38 β isoforms inhibit the cytotoxic effect of SN38 in HCT116 colorectal cancer cells. In addition, pharmacologic inhibition of p38 α and p38 β restores sensitivity to irinotecan in a xenograft model.

p38 involvement in resistance to SN38 or irinotecan may be explained by its role in cell survival. Indeed, p38 mediates colon cancer cell survival pathway, in particular, via its role in DNA repair and autophagy. First, p38 is one of the effector kinases of the DNA damage sensor system starting with the activation of ATM, ATR and DNA-PK (33). The CA p38 in colon cancer cells may induce enhanced DNA repair in response to chemotherapy and lead to drug resistance. Second, according to Comes and colleagues, p38 α inhibits autophagy and cell death of CRC cells (34) demonstrating that p38 α activity is necessary for their survival.

Detection of p38 activation in clinical samples has already been shown in reports studying the resistance to treatment. Gutierrez and colleagues demonstrated that p38 activation contribute to tamoxifen resistance in ER-positive breast tumors (38). More recently, Wen and colleagues showed that p38 inhibition enhances the sensitivity to arsenic trioxide and bortezomib in multiple myeloma (40). In line with these results, we show that the level of phosphorylated p38 α

is higher in patients unresponsive to chemotherapy compared with responders, suggesting that p38 activation is correlated with irinotecan resistance in CRC. Indeed, 8 of the 9 responders exhibit low phospho-p38 expression and were correctly classified. Half of the nonresponders were correctly classified, and in the rest of the nonresponders, we could not detect high p38 α phosphorylation. Both isoforms α and β being involved in SN38 resistance, misclassified nonresponder patients might present high p38 β phosphorylation, a hypothesis that we could not test because of the absence of available antibody directed against the active form of p38 β . In addition, other mechanisms of resistance, independent of p38 activation may be present in this patient's population. Altogether, our data show, for the first time, that phosphorylation status of the MAPK p38 α and p38 β isoforms may be a marker of resistance to irinotecan-based chemotherapies in CRC. They further suggest the use of p38 inhibitors as an adjuvant therapy to potentiate the efficacy of irinotecan-based chemotherapies in nonresponder CRC patients. Further studies using larger cohorts of patients will be necessary to confirm this result.

Disclosure of Potential Conflicts of Interests

No potential conflicts of interests were disclosed.

Grant Support

Funds for this research were provided by INSERM and La Ligue Contre le Cancer.

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

Received July 26, 2010; revised November 18, 2010; accepted November 23, 2010; published OnlineFirst December 15, 2010.

References

- Segal NH, Saltz LB. Evolving treatment of advanced colon cancer. *Ann Rev Med* 2009;60:207-19.
- Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992-5.
- Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006;6:789-802.
- Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol* 2002;13:1841-51.
- Candeil L, Gourdiere I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F, et al. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer* 2004;109:848-54.
- van Ark-Otte J, Kedde MA, van Der Vijgh WJF, Dingemans A-MC, Jansen WJM, Pinedo HM, et al. Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. *Br J Cancer* 1998;77:2171-6.
- Tan KB, Mattern MR, Eng WK, McCabe FL, Johnson RK. Nonproductive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1732-5.
- Saleem A, Edwards TK, Rasheed Z, Rubin EH. Mechanisms of resistance to camptothecins. *Ann N Y Acad Sci* 2000;922:46-55.
- Sugimoto Y, Tsukahara S, Oh-hara T, Isoe T, Tsuruo T. Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell lines as determined by a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1990;50:6925-30.
- Husain I, Mohler JL, Seigler HF, Besterman JM. Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res* 1994;54:539-46.
- Park SY, Lam W, Cheng YC. X-ray repair cross-complementing gene I protein plays an important role in camptothecin resistance. *Cancer Res* 2002;62:459-65.
- Pommier Y, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H, et al. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* 2003;532:173-203.
- Gongora C, Candeil L, Vezzio N, Copois V, Denis V, Breil C, et al. Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol Ther* 2008;7:822-32.
- Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;15:11-18.
- Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1358-75.
- Wilson KP, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Griffith JP, Chen W, McCaffrey PJ, et al. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996;271:27696-700.

17. Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, et al. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2007;39:750–8.
18. Robinson VL, Hickson JA, Vander Griend DJ, Dubauskas Z, Rinker-Schaeffer CW. MKK4 and metastasis suppression: a marriage of signal transduction and metastasis research. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:25–30.
19. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009;9:537–49.
20. Chiacchiera F, Simone C. Signal-dependent regulation of gene expression as a target for cancer treatment: inhibiting p38alpha in colorectal tumors. *Cancer Lett* 2008;265:16–26.
21. Vié N, Copois V, Bascoul-Mollevis C, Denis V, Bec N, Robert B, et al. Overexpression of phosphoserine aminotransferase PSAT1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Mol Cancer* 2008;7:14.
22. Avitzour M, Diskin R, Raboy B, Askari N, Engelberg D, Livnah O. Intrinsically active variants of all human p38 isoforms. *FEBS J* 2007;274:963–75.
23. Subramanian D, Kraut E, Staubus A, Young DC, Muller MT. Analysis of topoisomerase I/DNA complexes in patients administered topotecan. *Cancer Res* 1995;55:2097–103.
24. Granci V, Bibeau F, Kramar A, Boissière-Michot F, Thézénas S, Thirion A, et al. Prognostic significance of TRAIL-R1 and TRAIL-R3 expression in metastatic colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 2008;44:2312–318.
25. Del Rio M, Molina F, Bascoul-Mollevis C, Copois V, Bibeau F, Chalbos P, et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol* 2007;25:773–80.
26. Wood CD, Thornton TM, Sabio G, Davis RA, Rincon M. Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *Int J Biol Sci* 2009;5:428–37.
27. Woessner RD, Eng WK, Hofmann GA, Rieman DJ, McCabe FL, Hertzberg RP, et al. Camptothecin hyper-resistant P388 cells: drug-dependent reduction in topoisomerase I content. *Oncol Res* 1992;4:481–8.
28. Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, et al. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:23668–74.
29. Arakawa Y, Suzuki H, Saito S, Yamada H. Novel missense mutation of the DNA topoisomerase I gene in SN-38-resistant DLD-1 cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:502–8.
30. Van Der Merwe M, Bjornsti MA. Mutation of Gly721 alters DNA topoisomerase I active site architecture and sensitivity to camptothecin. *J Biol Chem* 2008;283:3305–15.
31. Losasso C, Cretaio E, Fiorani P, D'Annessa I, Chillemi G, Benedetti P. A single mutation in the 729 residue modulates human DNA topoisomerase I DNA binding and drug resistance. *Nucleic Acids Res* 2008;36:5635–44.
32. Chiacchiera F, Matrone A, Ferrari E, Ingravallo G, Lo Sasso G, Murzilli S, et al. p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription. *Cell Death Differ* 2009;16:1203–14.
33. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 2007;11:175–89.
34. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, et al. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* 2007;14:693–702.
35. Zhao HY, Ooyama A, Yamamoto M, Ikeda R, Haraguchi M, Tabata S, et al. Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-fluorouracil. *Cancer Res* 2008;68:7035–41.
36. Chiu SJ, Chao JI, Lee YJ, Hsu TS. Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. *Toxicol Lett* 2008;179:63–70.
37. Ling X, He X, Apontes P, Cao F, Azrak RG, Li F. Enhancing effectiveness of the MDR-sensitive compound T138067 using advanced treatment with negative modulators of the drug-resistant protein surviving. *Am J Transl Res* 2009;1:393–405.
38. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol* 2005;23:2469–76.
39. Owens DM, Keyse S. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 2007;26:3203–13.
40. Wen J, Feng Y, Huang W, Chen H, Liao B, Rice L, et al. Enhanced antimyeloma cytotoxicity by the combination of arsenic trioxide and bortezomib is further potentiated by p38 MAPK inhibition. *Leuk Res* 2010;34:85–92.

MAPK14/p38 α confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy

Salomé Paillas,¹ Annick Causse,¹ Laetitia Marzi,¹ Philippe De Medina,² Marc Poirot,² Vincent Denis,¹ Nadia Vezzio-Vie,¹ Lucile Espert,³ Hayat Arzouk,¹ Arnaud Coquelle,¹ Pierre Martineau,¹ Maguy Del Rio,¹ Sophie Pattingre¹ and Céline Gongora^{1,*}

¹Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM); Montpellier, France; ²INSERM; U896; Montpellier, France; Université Montpellier1; Montpellier, France; CRLC Val d'Aurelle Paul Lamarque; Montpellier, France; ³Inserm U563; Toulouse, Haute-Garonne, France; ³CPBS; UMR5236; CNRS/UMI-UMII; Montpellier, France

Keywords: MAPK14/p38, survival autophagy, irinotecan resistance, colon cancer, chemotherapy

Abbreviations: ATG, autophagy-related; Baf, bafilomycin A₁; CRC, colorectal cancer; EGFR, epidermal growth factor receptor; FOLFIRI, 5-fluorouracil/leucovorin and irinotecan; FOLFOX, 5-fluorouracil/leucovorin and oxaliplatin; HCT116-TP53KO, HCT116 human colorectal adenocarcinoma cells in which *TP53* was genetically ablated; HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells, HCT116-TP53KO cells in which constitutively active p38alpha (MAPK14) was stably transduced; HCT116-TP53KO-EV cells, HCT116-TP53KO cells stably transduced with an empty vector (pMSCV) to serve as a control; HCT116-MAPK14-CA cells, HCT116 cells in which constitutively active p38alpha (MAPK14) was stably transduced; HCT116-EV cells, HCT116 cells stably transduced with an empty vector (pMSCV) to serve as a control; HCT116-TP53KO-ShMAPK14, HCT116-TP53KO cells in which Shp38alpha (MAPK14) was stably transduced; HCT116-TP53KO-ShLuc, HCT116-TP53KO cells in which ShpLuc was stably transduced to serve as a control; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; 3MA, 3-methyladenine; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MAPK14, p38 alpha; MAPK11, p38 beta; MAPK12, p38 gamma; MAPK13, p38 delta; NT, untreated cells; p38 α , MAPK p38 alpha (MAPK14); FAM48A, p38 interacting protein (p38IP); PtdIns3K, phosphatidylinositol 3-kinase; SRB assays, sulforhodamin B assay; SN38, active metabolite of irinotecan; ShLuc, shRNA targeting luciferase, serve as a control; ShMAPK14, shRNA targeting p38 α (MAPK14); siCT, control siRNAs; TOP1, topoisomerase I; VEGF, vascular endothelial growth factor

Recently we have shown that the mitogen-activated protein kinase (MAPK) MAPK14/p38 α is involved in resistance of colon cancer cells to camptothecin-related drugs. Here we further investigated the cellular mechanisms involved in such drug resistance and showed that, in HCT116 human colorectal adenocarcinoma cells in which *TP53* was genetically ablated (HCT116-TP53KO), overexpression of constitutively active MAPK14/p38 α decreases cell sensitivity to SN-38 (the active metabolite of irinotecan), inhibits cell proliferation and induces survival-autophagy. Since autophagy is known to facilitate cancer cell resistance to chemotherapy and radiation treatment, we then investigated the relationship between MAPK14/p38 α , autophagy and resistance to irinotecan. We demonstrated that induction of autophagy by SN38 is dependent on MAPK14/p38 α activation. Finally, we showed that inhibition of MAPK14/p38 α or autophagy both sensitizes HCT116-TP53KO cells to drug therapy. Our data proved that the two effects are interrelated, since the role of autophagy in drug resistance required the MAPK14/p38 α . Our results highlight the existence of a new mechanism of resistance to camptothecin-related drugs: upon SN38 induction, MAPK14/p38 α is activated and triggers survival-promoting autophagy to protect tumor cells against the cytotoxic effects of the drug. Colon cancer cells could thus be sensitized to drug therapy by inhibiting either MAPK14/p38 or autophagy.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent malignancy in Western countries. The current chemotherapy options for patients with metastatic CRC include the combination of 5-fluorouracil/leucovorin and irinotecan (FOLFIRI), or of 5-fluorouracil/leucovorin and oxaliplatin (FOLFOX) associated, or not, with the anti-VEGF antibody Bevacizumab or the

anti-EGFR antibody Cetuximab.¹ Treatment with Cetuximab is restricted to patients with wild-type *KRAS*, because *KRAS* mutations predict resistance to treatment with anti-EGFR monoclonal antibodies.² As therapeutic failure is mainly due to resistance to drug treatment, identifying the cellular mechanisms that lead to such resistance is a crucial issue for improving the management and survival of patients with CRC.

*Correspondence to: Céline Gongora; Email: celine.gongora@inserm.fr
Submitted: 09/28/12; Revised: 04/03/12; Accepted: 04/04/12
<http://dx.doi.org/10.4161/auto.20268>

SN38 is the active metabolite of irinotecan (CPT-11), a derivative of camptothecin. Like other camptothecin-derivatives, SN38 inhibits topoisomerase I (TOP1), a nuclear enzyme needed for replication and transcription by unwinding supercoiled DNA.³ SN38 interferes with TOP1 activity by trapping TOP1-DNA cleavage complexes, leading to lethal replication-mediated, double-strand breaks.³ Cellular mechanisms causing irinotecan resistance have been identified for each step of the CPT-11 pathway.⁴ We previously showed that SN38-resistant HCT116 cells display endogenous activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38.⁵ Specifically, p38 is activated by treatment with SN38 and pharmacological inhibition of MAPK14/p38 α and MAPK11/p38 β overcomes irinotecan and SN38 resistance both in vitro and in vivo.⁶ Moreover, in CRC patients, MAPK14/p38 α is required for cell proliferation and survival and its inhibition leads to cell cycle arrest and autophagy-mediated cell death.⁷

Autophagy is a highly conserved process that maintains homeostasis by eliminating unnecessary proteins or injured organelles and is responsible for the survival response to growth limiting conditions, in which cellular components are sequestered, degraded and released for recycling. It is regulated by the family of autophagy-related (*ATG*) genes. The function of autophagy in cancer is still controversial as it has been involved in mechanisms inducing either cell death or stimulating cell survival. Indeed, autophagy has been described as a tumor suppressor mechanism, because, in mice, the loss of one allele of *Becn1*, which is required for autophagy, is sufficient to promote tumorigenesis⁸ and human breast epithelial carcinoma cell lines and tissue display lower level of BECN1 than normal breast epithelia.⁹ However, after a cancer is established, autophagy may help cancer cells to survive in the presence of growth-limiting conditions, such as nutrient depletion and hypoxia, or cytotoxic drugs.

Here, we further investigated the functional role of MAPK14/p38 α in the development of irinotecan resistance in HCT116 cells in which *TP53* was deleted (HCT116-TP53KO cells), because *TP53* is often mutated in CRC and p53 is a p38 target. We showed that, in HCT116-TP53KO cells, overexpression of constitutively active MAPK14/p38 α reduces their sensitivity to SN38 and impairs cell proliferation. Moreover, MAPK14/p38 α overexpression leads to an increase in autophagy and cell survival. Finally, MAPK14/p38 α or autophagy inhibition increases the sensitivity of HCT116-TP53KO cells to SN38.

Results

MAPK14 is involved in SN38 resistance in HCT116-TP53KO cells. We already showed that p38, particularly MAPK14 and MAPK11, is involved in resistance to irinotecan and to its active metabolite SN38.⁶ Since one of the p38 targets is TP53 and *TP53* is frequently mutated in colon cancer, we now investigated whether p38 was also involved in irinotecan resistance in cells depleted of *TP53*. To this aim, each of the four p38 isoforms (MAPK14, MAPK11, MAPK12 and MAPK13) was down-regulated by ShRNA (Fig. 1A) in HCT116 colorectal cancer cells, in which *TP53* was genetically ablated (HCT116-TP53KO cells)

and the effect of their silencing on the sensitivity to SN38 was tested with the SRB assay (Fig. 1B). Silencing of the MAPK11, MAPK12 and MAPK13 had no impact on SN38 sensitivity in HCT116-TP53KO cells. On the contrary, SN38 cytotoxicity was more elevated in cells in which MAPK14 was silenced by two different hairpins (shMAPK14 and ShMAPK14bis) (Fig. 1B) than in control cells (shLuc), as indicated by their significantly lower IC₅₀ (50% inhibitory concentration) (ShLuc 1.9 nM, shMAPK14 1.2 p = 0.03 and ShMAPKbis 1.1 p = 0.0014). This result suggests that MAPK14 loss is sufficient to increase the sensitivity of HCT116-TP53KO cells to SN38.

Then, HCT116-TP53KO cells were infected with retroviruses expressing constitutively active (CA) variant of each p38 isoform¹⁰ and their sensitivity to SN38 was again tested using the SRB assay. Expression of the CA p38 variants was monitored by western blotting with an anti-HA antibody (Fig. 1C) and activity by kinase assay (Fig. 1D). Cells expressing constitutively active MAPK14 (HCT116-TP53KO-MAPK14CA cells) were more resistant to SN38 than control cells that were transduced with empty vector (EV) (HCT116-TP53KO-EV cells), as evidenced by their higher IC₅₀ (2.6 nM and 1.3 nM, respectively, p = 0.015) (Fig. 1E). No difference in the IC₅₀ of HCT116-TP53KO-MAPK11CA, -MAPK12CA and -MAPK13CA cell lines was observed (Fig. 1E).

Then, we investigated whether SN38 induces p38 phosphorylation in HCT116-TP53KO. Western blot analysis using phospho-specific p38 antibody showed an increase of p38 phosphorylation following SN38 treatment in HCT116-TP53KO (Fig. 1F). Overall these results show that MAPK14 is responsible for SN38 resistance and are in accordance with our previous results obtained in the parental HCT116 cell line.⁶

Expression of constitutively active MAPK14 inhibits proliferation of HCT116-TP53KO cells. To further delineate the effects of the expression of constitutively active MAPK14 in HCT116-TP53KO cells, we first compared the cell growth rates of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and HCT116-TP53KO-EV cells (Fig. 2A). Growth rates were assessed for both cell lines 14 d after retroviral transduction. In HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells, cell growth was greatly reduced, with a doubling time of 89.8 h compared with HCT116-TP53KO-EV, 33.3 h (p = 9.9 10⁻⁶) (Fig. 2A and B). Since MAPK-CA overexpression did not influence cell proliferation in parental HCT116 cells (Fig. S1A), its negative effect on the growth rate of HCT116-TP53KO cells might be linked to the absence of *TP53*.

As these results were obtained by counting the cells at different intervals, they could be due to increased cell death or inhibition of cell proliferation. We thus compared the number of living cells and the level of apoptosis in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and control HCT116-TP53KO-EV cells. The percentage of annexin V-positive and 7AAD-negative cells (cells in early apoptosis) was roughly comparable in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells (Fig. 2D) and also between HCT116-MAPK14-CA and HCT116-EV cells (Fig. S1B). In order to determine whether other cell death mechanisms could be involved, the percentage of living cells relative to the total number of cells was quantified by using the

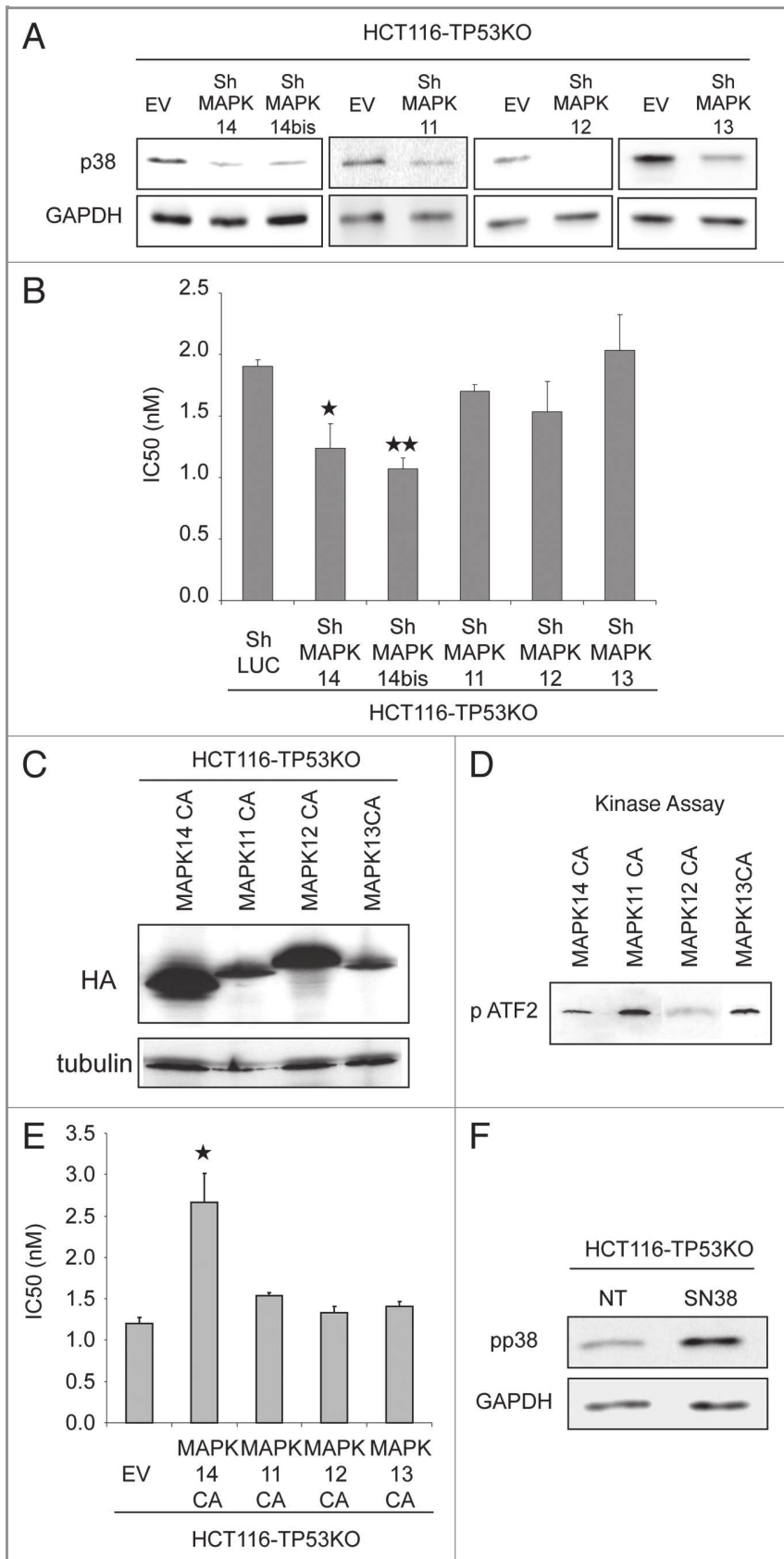


Figure 1. MAPK14 plays a role in the sensitivity to SN38 of HCT116-TP53KO cells. (A) Western blot analysis of MAPK14, MAPK14bis, MAPK11, MAPK12, MAPK13 expression in HCT116-TP53KO cells transduced with ShRNAs directed against MAPK14, MAPK11, MAPK12, MAPK13 or against *Luciferase* (ShLuc) (control). Equal loading is shown by GAPDH. (B) SRB assays to assess SN38 cytotoxicity in HCT116-TP53KO cells that stably express ShRNA targeting MAPK14, MAPK11, MAPK12, MAPK13 or *ShLuc* (control). (C) Western blot analysis (anti-HA antibody) of HCT116-TP53KO cells that express constitutively active MAPK14, MAPK11, MAPK12, MAPK13 (MAPK14-CA, MAPK11-CA, MAPK12-CA, MAPK13-CA) or empty vector (EV), as a control. Equal loading is shown by tubulin. (D) Kinase assay performed with 2 μ g of recombinant MAPK14, MAPK11, MAPK12 and MAPK13 to test p38 constitutively active isoforms activity. Western blot analysis of phosphorylated ATF2. (E) SRB assay to evaluate SN38 cytotoxicity in HCT116-TP53KO cells that stably express MAPK14, MAPK11, MAPK12, MAPK13-CA or EV. (F) Western blot analysis (anti-phospho p38 antibody) of HCT116-TP53KO cells treated or not with SN38, 1 μ M 24h00. Equal loading is shown by GAPDH.

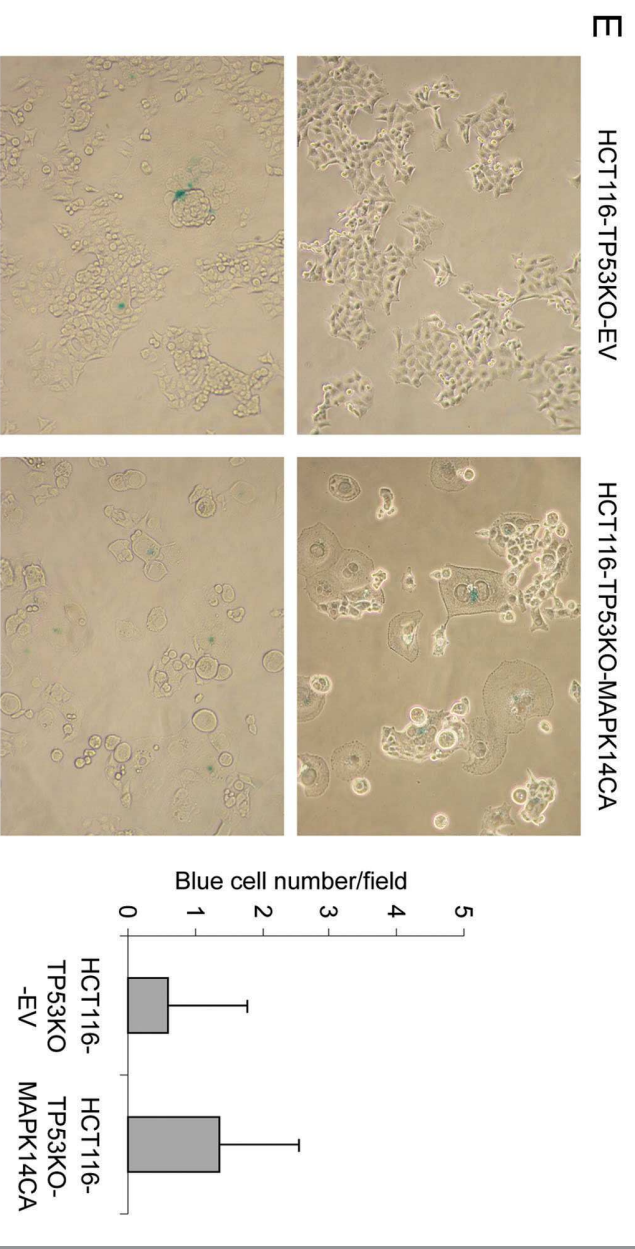
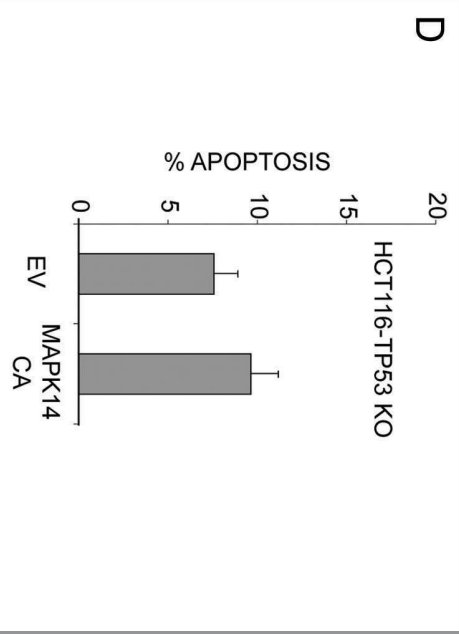
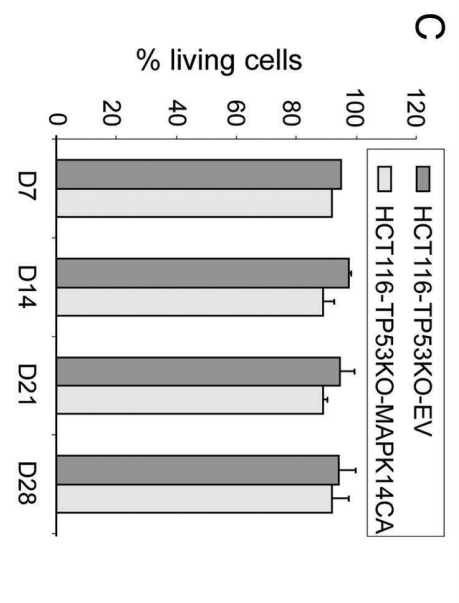
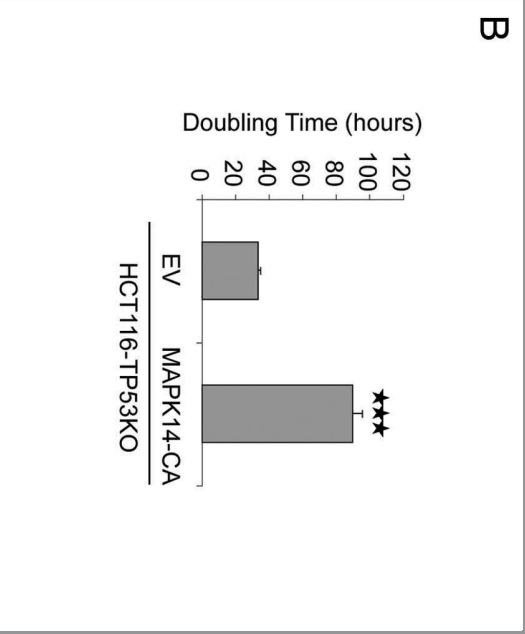
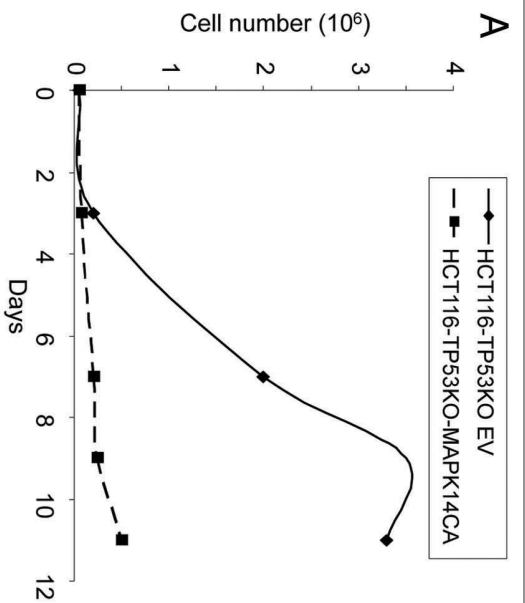


Figure 2 (See previous page). Overexpression of constitutively active MAPK14 inhibits cell growth in HCT116-TP53KO cells. (A) Growth curve of HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells cultured in complete medium (10% FCS). (B) Doubling time histograms of HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA determined at day 14 after retroviral transduction of MAPK14-CA or EV. (C) Percentage of living cells in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day (d) 7, 14, 21 and 28 after retroviral transduction. The number of viable cells was determined by counting the number of cells not stained by the Trypan blue dye. Data are representative of three independent experiments. (D) Quantification of apoptosis in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 after retroviral transduction of MAPK14-CA or pMSCV empty vector (EV). Apoptosis was determined by quantifying the number of 7AAD-negative and Annexin V-FLUOS-positive cells with a FACScan flow cytometer. (E) Senescence-associated β -galactosidase staining in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 after retroviral transduction of MAPK14-CA or EV. The number of β -galactosidase-positive (blue) cells was counted in 20 fields for each cell type.

Trypan blue exclusion method in each cell line at day 7, 14, 21 and 28 after transduction (Fig. 2C). No differences in the percentage of living cells were observed between control HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at any timepoint, indicating that MAPK14 overexpression in HCT116-TP53KO cells does not increase cell death. Similar results were obtained also in HCT116-MAPK14-CA cells (Fig. S1C). These results indicate that HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells were not dying, but rather slow down their proliferation. As p38 can induce cell senescence, we then investigated whether HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells were senescent.^{11,12} The number of cells that were positive for β -galactosidase activity (a marker of cell senescence) was similar in control and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells (Fig. 2E), indicating that senescence is not the mechanism by which HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells proliferate slowly.

CDKN1A/p21 is responsible for the proliferation decrease of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA. We then examined the cell cycle distribution of control HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells using BrdU staining and flow cytometry at day 14 after transduction (the time we observed the cell growth inhibition) (Fig. 3A). We observed that more HCT116-TP53KO-EV cells were in S phase (49.4%) after 15 min of BrdU labeling, in comparison with HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells (37.1%), indicating that the HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells grew more slowly. We then incubated the cells for 2, 8 and 24 h with BrdU (Fig. 3B) and observed that for each timepoint, BrdU incorporation was lower in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA, confirming again the lower proliferating rate of MAPK14-CA overexpressing cells.

As the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor CDKN1A/p21^{WAF1/Cip1} is involved in the regulation of cell cycle inhibition¹³ and is a MAPK14 target,¹⁴ we then quantified the RNA and protein levels of CDKN1A in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and -EV cells at different time points after retroviral infection. CDKN1A protein expression level was increased at day 14 and 21 after retroviral infection only in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells (Fig. 3C). Conversely, *CDKN1A* mRNA level remained unchanged in both cell lines (Fig. 3D). This suggests that, in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells, CDKN1A overexpression is mainly due to post-translational modifications.

We then investigated whether the elevated levels of CDKN1A were responsible for the cell cycle slowdown of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells. To this aim, CDKN1A expression in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells was downregulated with shRNAs targeting *CDKN1A* (Fig. 3E) and the cell cycle

distribution of such cells was again monitored using BrdU staining and flow cytometry (Fig. 3F). We observed that HCT116-TP53KO-Shp21-MAPK14-CA grew faster than HCT116-TP53KO-ShLuc-MAPK14-CA as indicated by a higher proportion of BrdU labeled cell (46.1% compared with 25.8%). We next incubated the cells for 4, 8 and 24 h with BrdU and confirmed that for each timepoint, that BrdU incorporation was higher in HCT116-TP53KO-Shp21-MAPK14-CA than in the control HCT116-TP53KO-ShLuc-MAPK14-CA cells (Fig. 3G). This result demonstrated that the reduction of cell growth was due, at least in part, to the overexpression of CDKN1A in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA. In conclusion, MAPK14 overexpression in HCT116-TP53KO cells leads to CDKN1A overexpression and slowing down of cell proliferation.

Expression of constitutively active MAPK14 induces autophagy in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells. While examining the morphology of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 after retroviral infection, we observed that they displayed large cytoplasmic vacuoles (Fig. 4A). This feature together with the observation that HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells grow slowly, but were neither apoptotic nor senescent, prompted us to investigate whether they exhibited autophagy characteristics. First, the expression of the two forms of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 protein (LC3) was assessed by immunoblotting. Indeed, during autophagy, cytosolic LC3-I is converted into the membrane-bound lipidated LC3-II, which is detected by a mobility shift during electrophoresis. Higher LC3-II expression was observed only in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 after transduction (Fig. 4B, top panel), suggesting that expression of constitutively active MAPK14 in HCT116-TP53KO cells induced autophagy. A slight increase of LC3-II level was also observed in HCT116-MAPK14-CA (Fig. S1D). We also observed a high level of LC3-II from day 7 to day 21 after retroviral transduction of the MAPK14-CA plasmid in *TP53*-deficient H1299 lung cancer cells (Fig. 4B, low panel). Then, to confirm the induction of autophagy in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells, cells were analyzed by electron microscopy (Fig. 4C). More double-membrane vacuoles, typical of early autophagic structures (arrow), were observed in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA than in control HCT116-TP53KO-EV cells (4.4 vacuoles/cells and 1.01 vacuoles/cells, respectively; $p = 2.05 \times 10^{-5}$). Similarly, transient transfection with GFP-tagged LC3 of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and HCT116-TP53KO-EV control cells at day 14 after retroviral transduction allowed showing that while in control cells the GFP fluorescence was diffused, in cells

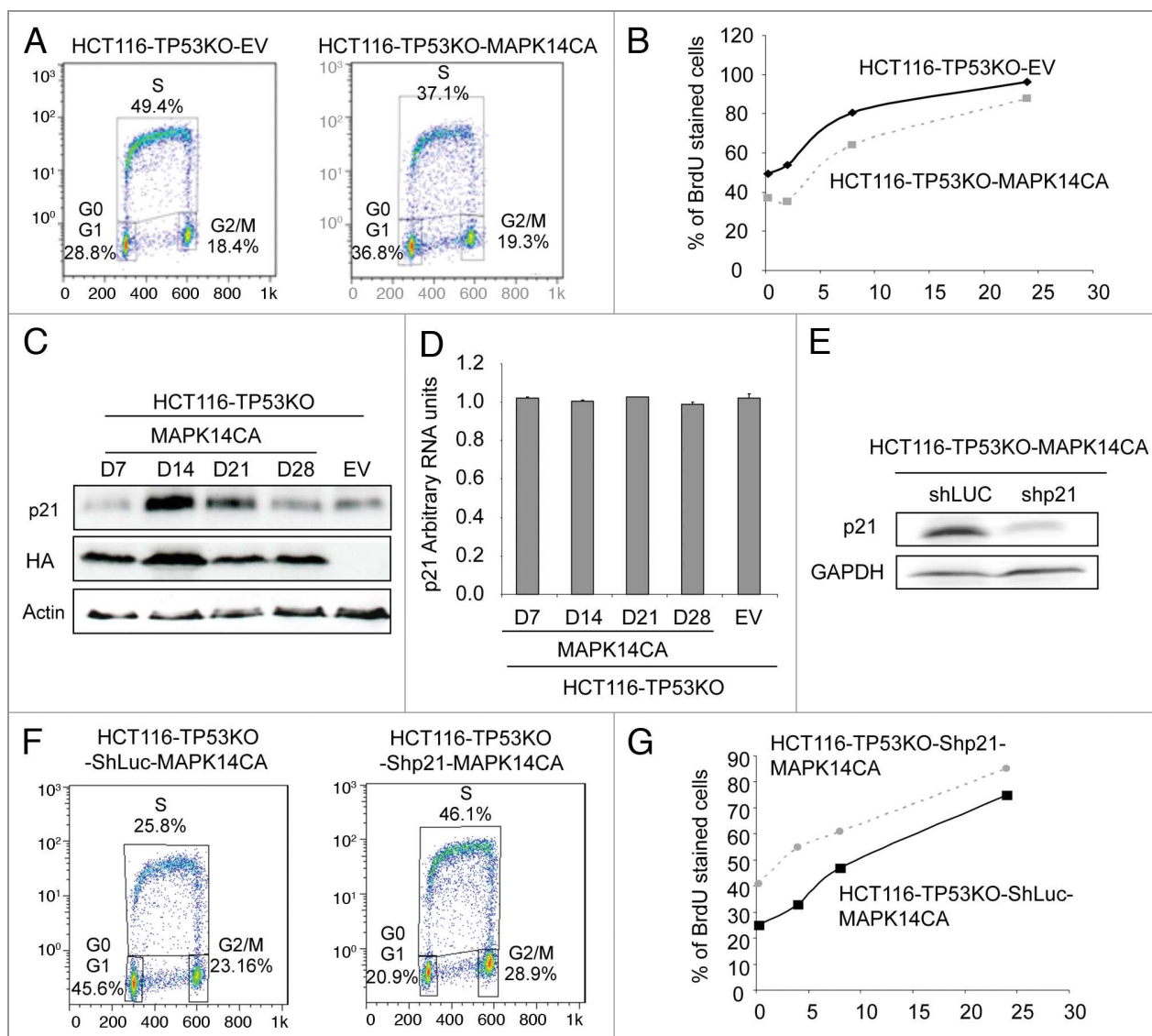


Figure 3. The proliferation inhibition of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells correlates with p21 overexpression. (A) Cell cycle distribution of HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 after retroviral transduction of MAPK14-CA or pMSCV empty vector (EV). The cell cycle distribution was evaluated after 15 min of BrdU staining with a FACScan flow cytometer. (B) Percentage of BrdU stained HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells after 15 min, 2, 8 and 24 h of BrdU incubation. (C) Western blot analysis (anti-CDKN1A antibody and anti-HA antibody to evaluate the expression of MAPK14-CA) of HCT116-TP53KO-EV (control) and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 7, 14, 21 and 28 following retroviral transduction (only day 14 is shown for control cells as CDKN1A level did not change). Equal loading was assessed with an anti-actin antibody. (D) *CDKN1A* mRNA levels were determined by real-time qPCR in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at days 7, 14, 21 and 28 after retroviral transduction (only day 14 for HCT116-TP53KO-EV cells as expression was unchanged). (E) Western blot analysis of CDKN1A expression in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and HCT116-TP53KO-EV (control) cells after retroviral transduction of ShRNA targeting *CDKN1A* (Shp21) or *Luciferase* (ShLuc), respectively. Equal loading is shown by GAPDH expression. (F) Cell cycle distribution of HCT116-TP53KO-ShLuc-MAPK14-CA and HCT116-TP53KO-Shp21-MAPK14-CA cells at day 14 after retroviral transduction. The cell cycle distribution was evaluated after 15 min of BrdU staining with a FACScan flow cytometer. (G) Percentage of BrdU stained HCT116-TP53KO-ShLuc-MAPK14-CA and HCT116-TP53KO-Shp21-MAPK14-CA cells after 15 min, 4, 8 and 24 h of BrdU incubation.

overexpressing MAPK14-CA LC3 expression was more frequently punctuated (8.5 dots/cell and 2.01 dots/cell for control cells; $p = 2 \times 10^{-7}$) (Fig. 4D).

To evaluate the relationship between reduction of growth rate and autophagy induction, we have performed LC3 western blot analysis on HCT116-TP53KO-ShLuc-MAPK14-CA and

HCT116-TP53KO-Shp21-MAPK14-CA (Fig. 4E). We could observe that the LC3-II expression is not reduced in HCT116-TP53KO-Shp21-MAPK14-CA, while the proliferation is increased (Fig. 3F and G), indicating that the proliferation and the autophagy induction may not be connected. These results demonstrate that overexpression of constitutively active MAPK14

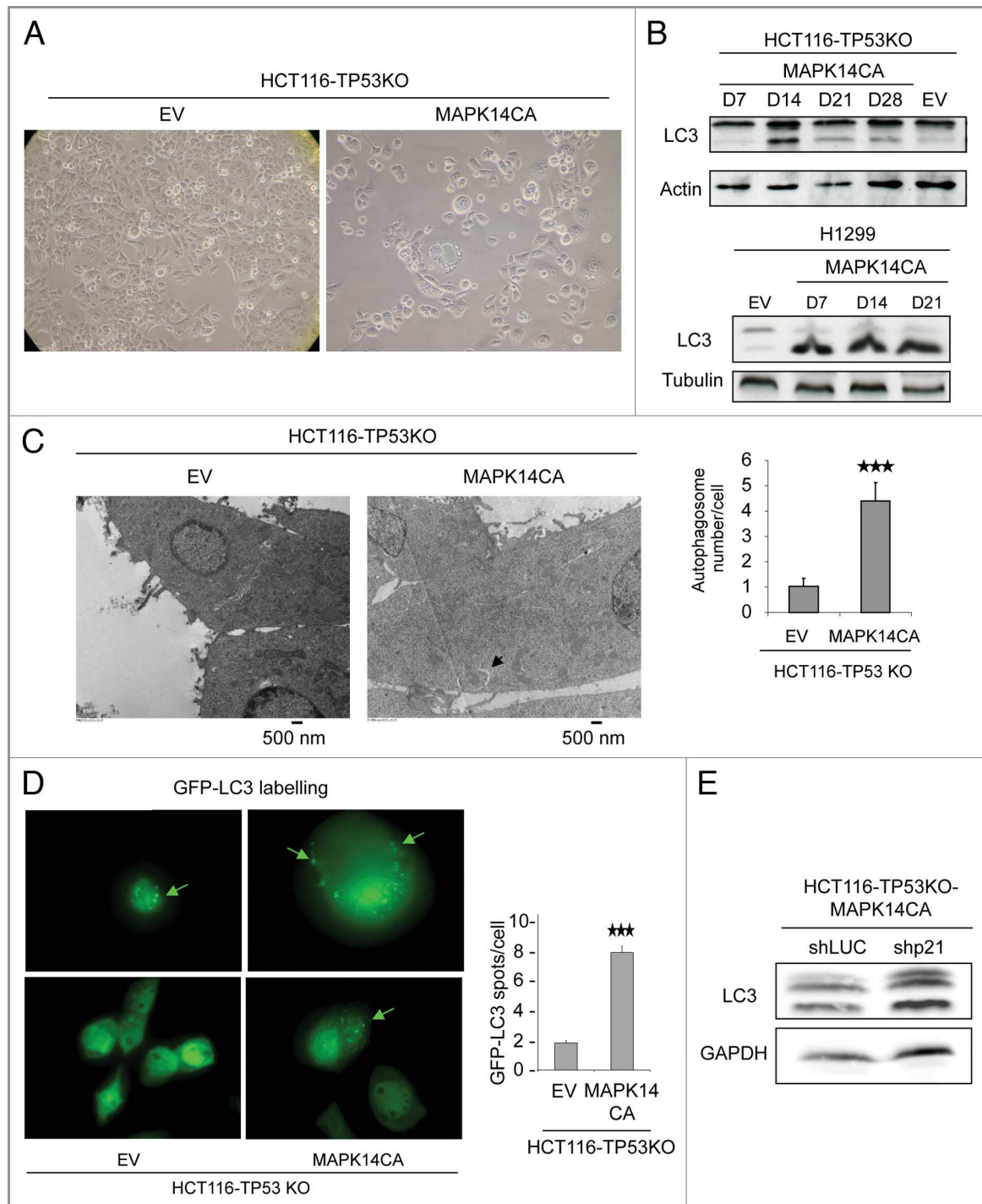


Figure 4. Overexpression of constitutively active MAPK14 induces autophagy in HCT116-TP53KO cells. (A) Phase-contrast images describing the morphology of HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 after retroviral transduction. (B) Analysis of the expression of LC3-I and LC3-II by western blotting in HCT116-TP53KO (top panel) and H1299 (*TP53*-deficient lung cancer cells) (low panel) cells that express constitutively active MAPK14 (MAPK14-CA) or empty vector (EV), as a control at day 7, 14, 21 and 28 following retroviral transduction. Only day 14 is shown for cells transduced with EV as LC3 expression was unchanged. Equal loading is shown by actin expression. (C, left panel) Electron micrographs of HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 15 after retroviral transduction. Arrow indicates the presence of a double-membrane vacuole. (C, right panel) Number of autophagosomes/cell in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 15 after retroviral transduction (100 cells were counted for each cell type). (D, left panel) HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells expressing GFP-LC3 were analyzed by immunofluorescence. The pattern of GFP-LC3 expression in the cytosol changed from diffuse to punctate/vesicular. (D, right panel) The number of vesicular GFP-LC3 spots/cell in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells was scored (100 cells were counted for each cell type). The results are represented as the mean \pm SD. (E) Western blot analysis (anti-LC3 antibody) of HCT116-TP53KO-ShLuc-MAPK14-CA and HCT116-TP53KO-Shp21-MAPK14-CA cells. Equal loading is shown by GAPDH.

inhibits cell proliferation and induces autophagy in *TP53*-depleted colon cancer cells. As a consequence, decreases in cell proliferation and autophagy induction can both be involved in MAPK14 induced resistance to SN38.

MAPK14-induced autophagy promotes survival of HCT116-TP53 KO-MAPK14-CA cells. Autophagy is a dynamic process that begins with the generation of autophagosomes and terminates with their degradation in lysosomes and corresponds to the autophagic flux. To examine the autophagic flux in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells, we monitored the expression of SQSTM1/p62, which is incorporated into the completed autophagosome and degraded in autolysosomes.¹⁵ Western blot analysis of SQSTM1 expression (Fig. 5A) indicates that, in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells, SQSTM1 is degraded from day 14 to day 28 after MAPK14-CA transduction. To confirm this result, we have also compared the half-life of SQSTM1 in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and in HCT116-TP53KO-EV after shutting off protein synthesis with cycloheximide (Fig. 5B) at day 14 after retroviral transduction. Cycloheximide-chase experiment indicated that SQSTM1 is unstable in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA but not in HCT116-TP53KO-EV cells. These results indicate that MAPK14-CA expression induces functional autophagic flux. Incubation with 3-methyladenine (3MA), an inhibitor of class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K), which blocks the early steps of autophagy,¹⁵ decreased LC3-II expression in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and in HCT116-TP53KO-EV control cells in comparison to untreated cells (NT) (Fig. 5C). Finally, incubation with bafilomycin A₁ (Baf), which alters the lysosomal pH and inhibits lysosomal degradation,¹⁵ increased the expression level of LC3-II in both HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells in comparison to untreated cells (NT), indicating a stabilization of LC3-II probably due to an increase in the number of autophagosomes as a result of the inhibition of lysosomal degradation. The lower LC3-II expression after 3MA treatment and the higher LC3-II expression after treatment with Baf demonstrate a complete execution of the autophagic pathway, reinforcing our hypothesis that MAPK14 induce functional autophagy.

We next evaluated the impact of MAPK14-induced autophagy on cell survival. To this end, we inhibited autophagy either pharmacologically or genetically and evaluated cell viability using the Trypan blue exclusion method. First, HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells were incubated with Baf or 3MA (Fig. 5D). Both autophagy inhibitors did not have any effect on the cell viability of control HCT116-TP53KO-EV cells, whereas in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells they significantly reduced the number of viable cells in comparison to untreated cells (NT) (3MA: 31% of dead cells, $p = 0.00014$; bafilomycin: 47.5%, $p = 0.00003$). These results were confirmed by downregulating the expression of *ATG5* and *ATG7*, two genes which are essential for autophagy, with specific siRNAs (Fig. 5E). Indeed, downregulation of *ATG5* or *ATG7* strikingly increased cell mortality in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells (but not in HCT116-TP53KO-EV cells) in comparison to cells transfected with control siRNAs (siCT) (siATG5: 88% of dead cells, $p = 1 \cdot 10^{-8}$; siATG7: 90%, $p = 1.9 \cdot 10^{-7}$). In conclusion, these data demonstrate that overexpression of constitutively active MAPK14 induces survival-promoting autophagy in HCT116-TP53KO cells.

Autophagy is involved in SN38 resistance of TP53-defective cancer cells. As MAPK14 overexpression in HCT116-TP53KO cells induces survival autophagy, we then investigated whether autophagy could play a role in the mechanism of cancer cell resistance to SN38. We first assessed autophagy induction with SN38 by LC3 labeling immunofluorescence in HCT116 (Fig. S2A) and HCT116-TP53KO (Fig. 6A). The untreated cells (NT) presented a diffuse LC3 staining while SN38 treated cells presented punctated labeling (Fig. 6A). We then treated HCT116, HCT116-TP53KO and the *TP53* mutated colorectal cancer cells, SW480, with 1 μ M SN38 for 24 h (Fig. 6B; Fig. S2B) and performed LC3 western blot analysis. The LC3-II expression was increased in SN38 treated cells in comparison to untreated cells (NT), indicating that SN38 can induce autophagy in HCT116, HCT116-TP53KO and SW480 cells. To address the autophagic flux, we have co-treated HCT116-TP53KO cells with Baf and SN38, and observed that these cells display more LC3-II labeling than HCT116-TP53KO treated with SN38

Figure 5 (See next page). Autophagy in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells promotes cell survival. (A, top panel) Western blot analysis of SQSTM1/p62 expression in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 7, 14, 21 and 28 following retroviral transduction (only day 14 is shown for control HCT116-TP53KO-EV cells as expression did not change). Equal loading is shown by actin expression. (A, bottom panel) Quantification of SQSTM1 expression relative to β -actin in control HCT116-TP53KO-EV (day 14) and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 7, 14, 21 and 28 following retroviral transduction. (B, top panel) Western blot analysis of SQSTM1 expression in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 following retroviral transduction after cycloheximide chase (2, 4 and 8 h of cycloheximide treatment). Equal loading is shown by GAPDH expression. (B, bottom panel) Quantification of SQSTM1 expression relative to GAPDH in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 14 following retroviral transduction after cycloheximide chase. (C, left panel) Western blot analysis of the expression of LC3-I and LC3-II in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and control HCT116-TP53KO-EV cells at day 14 after retroviral transduction following incubation or not (NT) with 3-methyladenine (3MA) or bafilomycin A₁ (Baf). Equal loading is shown by actin expression. (C, right panel) Quantification of LC3-II expression relative to β -actin in control and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells incubated or not (NT) with 3MA or Baf. (D) Cell viability of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and control HCT116-TP53KO-EV cells at day 14 after retroviral transduction, incubated or not with 3-methyladenine (3MA) or bafilomycin A₁ (Baf) for 72 h. The number of viable cells was determined by counting the cells not stained with the Trypan blue dye. Data are representative of three independent experiments. (E, top panel) Cell viability of HCT116-TP53KO-MAPK14-CA and control HCT116-TP53KO-EV cells at day 14 after retroviral transduction, following transfection with control siRNA or anti-*ATG5* or -*ATG7* siRNAs. The number of viable cells was determined by counting the cells not stained with the Trypan blue dye. Data are representative of three independent experiments. (E, bottom panel) Western blot analysis of *ATG5* and *ATG7* expression in HCT116-TP53KO-MAPK14-CA cells at day 2 (d2) and 4 (d4) after transfection with control siRNA or anti-*ATG5* or -*ATG7* siRNAs (similar results were obtained for HCT116-TP53KO-EV). Equal loading is shown by actin expression.

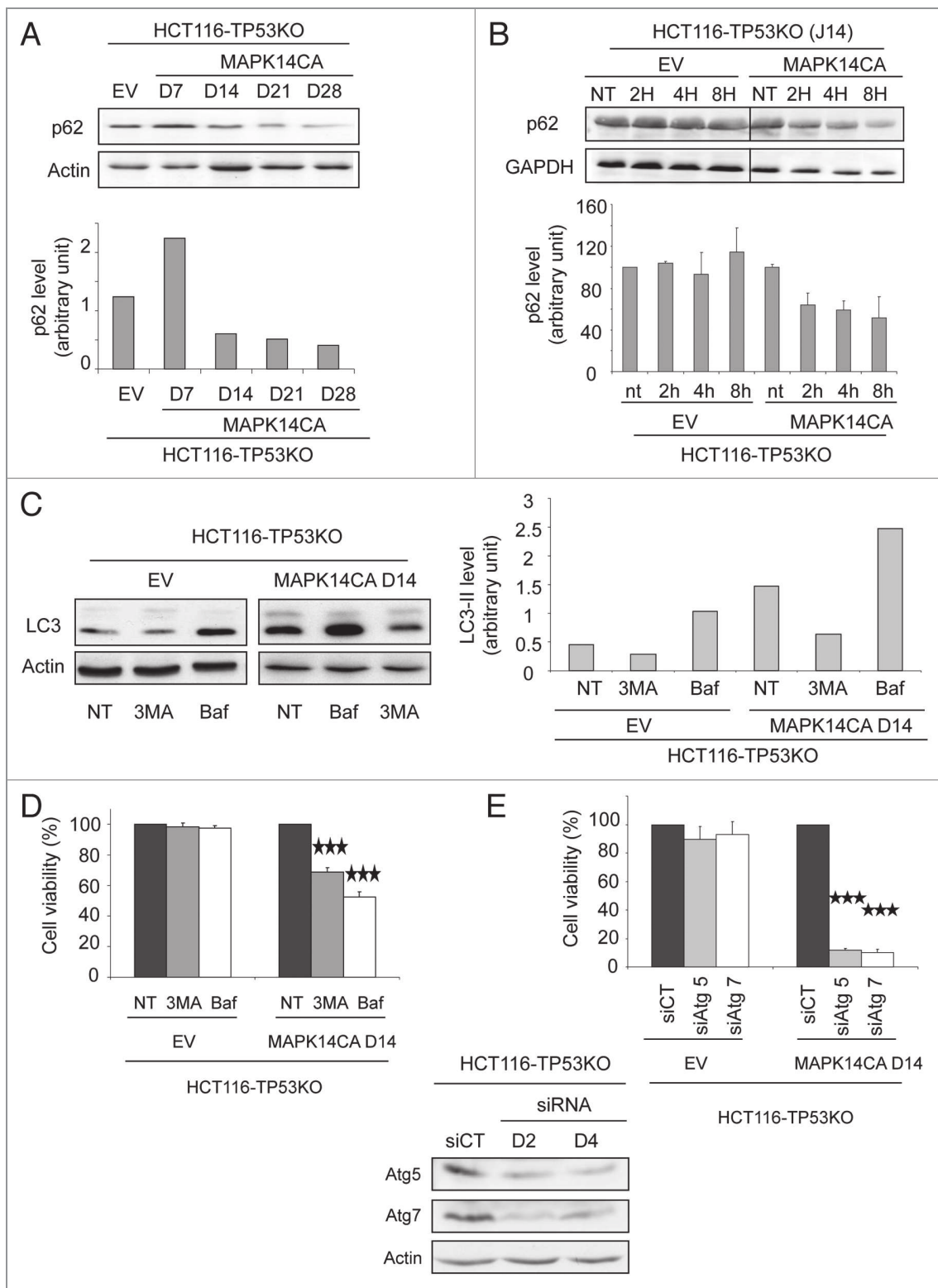


Figure 5. For figure legend, see page 1105.

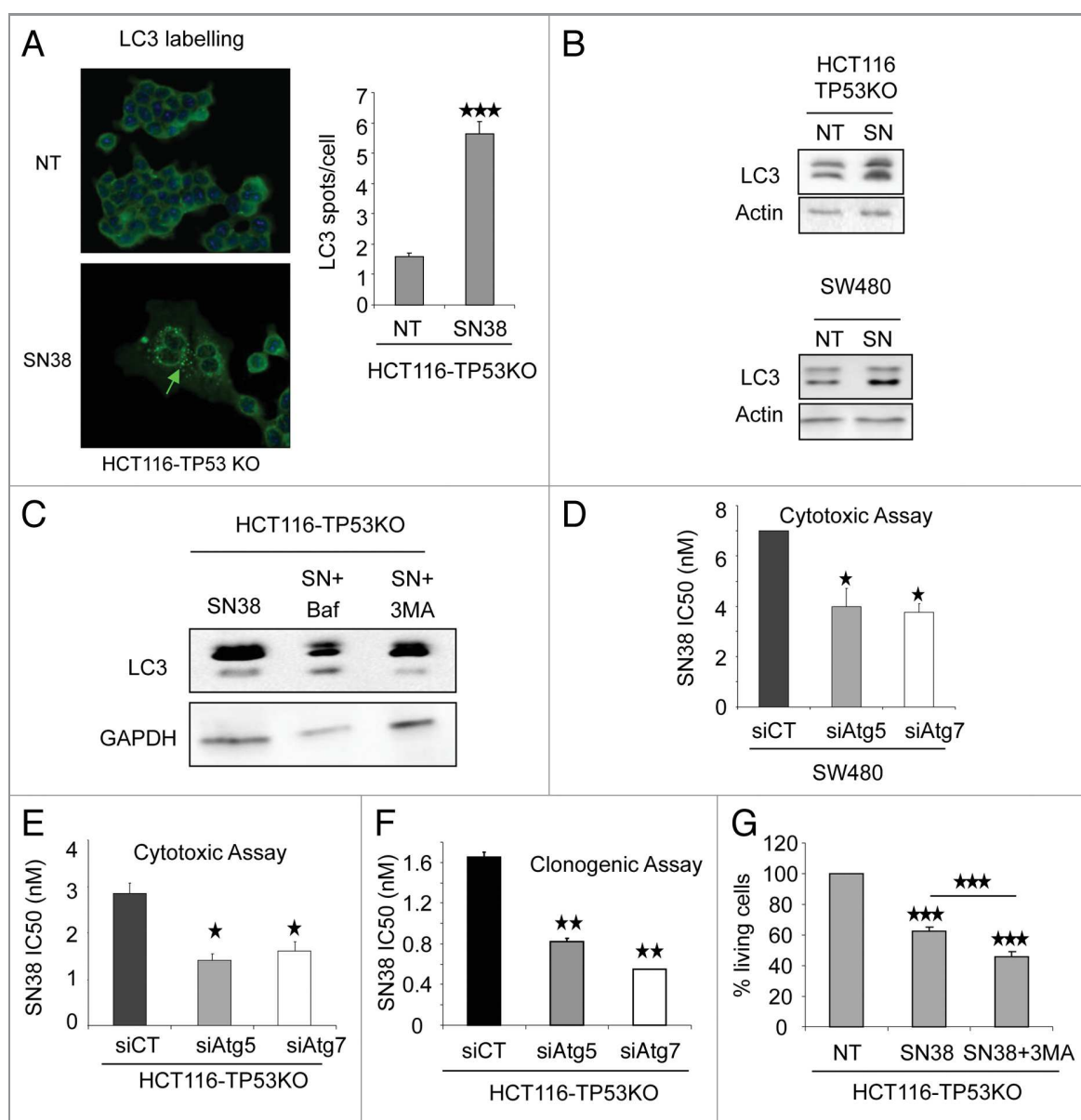


Figure 6. Inhibition of autophagy enhances the cytotoxic effect of SN38 on p53-defective colorectal cancer cells. (A, left panel) LC3 staining analyzed by immunofluorescence of HCT116-TP53KO cells treated or not (NT) with 1 μ M SN38 for 24 h. The pattern of LC3 expression in the cytosol changed from diffuse to punctate/vesicular. (A, right panel) The number of vesicular LC3 spots/cell in HCT116-TP53KO cells treated or not with 1 μ M SN38 for 24 h was scored (100 cells were counted for each cell type). The results are represented as the mean \pm SD. (B) Western blot analysis of LC3-I and LC3-II expression in HCT116-TP53KO and SW480 cells treated or not (NT) with 1 μ M SN38 for 24 h. Equal loading is shown by actin expression. (C) Western blot analysis of HCT116-TP53KO treated with Baf, SN38, SN38+Baf and SN38, SN38+3MA. Equal loading is shown by GAPDH expression. (D) SRB assays to assess SN38 cytotoxicity in SW480 cells transfected with control siRNA or anti-*ATG5* or -*ATG7* siRNAs. (E) SRB assays to assess SN38 cytotoxicity in HCT116-TP53KO cells transfected with control siRNA or anti-*ATG5* or -*ATG7* siRNAs. (F) Clonogenic assay to assess SN38 cytotoxicity in HCT116-TP53KO cells transfected with control siRNA or anti-*ATG5* or -*ATG7* siRNAs. (G) Percentage of living cells in HCT116-TP53KO treated with SN38 or SN38 + 3MA. The number of viable cells was determined by counting the number of cells not stained by the Trypan blue dye. Data are representative of three independent experiments.

alone (Fig. 6C). Conversely, HCT116-TP53KO cells incubated with 3MA+SN38 presented a lower LC3-II level compared with cells treated with SN38 alone. Both results indicate that SN38 induced functional autophagy in HCT116-TP53KO.

We then inhibited autophagy in HCT116, HCT116-TP53KO and SW480 cells and tested the effect of such inhibition on the

sensitivity to SN38. SW480 cells were transfected with *ATG5*- or *ATG7*-specific siRNAs and SN38 cytotoxicity, assessed by SRB assay, was evaluated. We found that SN38 IC₅₀ was lower in cells in which autophagy was inhibited (Fig. 6D) than in cells transfected with control siRNAs (siCT), indicating that autophagy is involved in SN38 resistance. We confirmed the impact of

autophagy inhibition on SN38 cytotoxicity in HCT116 TP53KO cells with siATG transfection and 3MA treatment, using SRB (Fig. 6E), clonogenic (Fig. 6F) and Trypan blue exclusion assay (Fig. 6G), confirming the protective role of autophagy on SN38 treatment. At the opposite, autophagy inhibition with siATG transfection or 3MA treatment was not able to impact on SN38 cytotoxicity in HCT116 cells (Fig. S2D–S2F), indicating that SN38 induces autophagy-mediated survival only in TP53-defective cells. In conclusion, similarly to what we observed following inhibition of MAPK14,⁶ inhibition of autophagy enhanced the cytotoxic effect of SN38, but only in cells where TP53 is altered.

As we have previously observed that the two other drugs used to treat colorectal cancer, 5-fluorouracil (5-FU) and oxaliplatin, induced p38 phosphorylation, we asked whether these drugs can

induce autophagy, and if autophagy has an impact on their cytotoxicity (Fig. S3). We first determined IC₅₀ concentrations for both drugs using SRB assay (Fig. S3A), and found 0.4 μM for HCT116, 1.4 μM for HCT116-TP53KO concerning oxaliplatin and 4 μM for 5-FU for both cell lines. We then treated the cells with 5-FU and oxaliplatin at the IC₅₀ concentration during 96 h and determine the autophagy level. Western blot monitoring LC3 showed that neither 5-FU nor oxaliplatin induced autophagy (Fig. S3B). We then inhibited autophagy by transfecting HCT116 and HCT116-TP53KO with ATG5- or ATG7-specific siRNAs and tested the effect of such inhibition on the sensitivity to 5-FU and oxaliplatin using the SRB assay. We observed that autophagy inhibition did not impact the 5-FU and oxaliplatin cytotoxicity in HCT116 and HCT116-TP53KO cells (Fig. S3C–S3F).

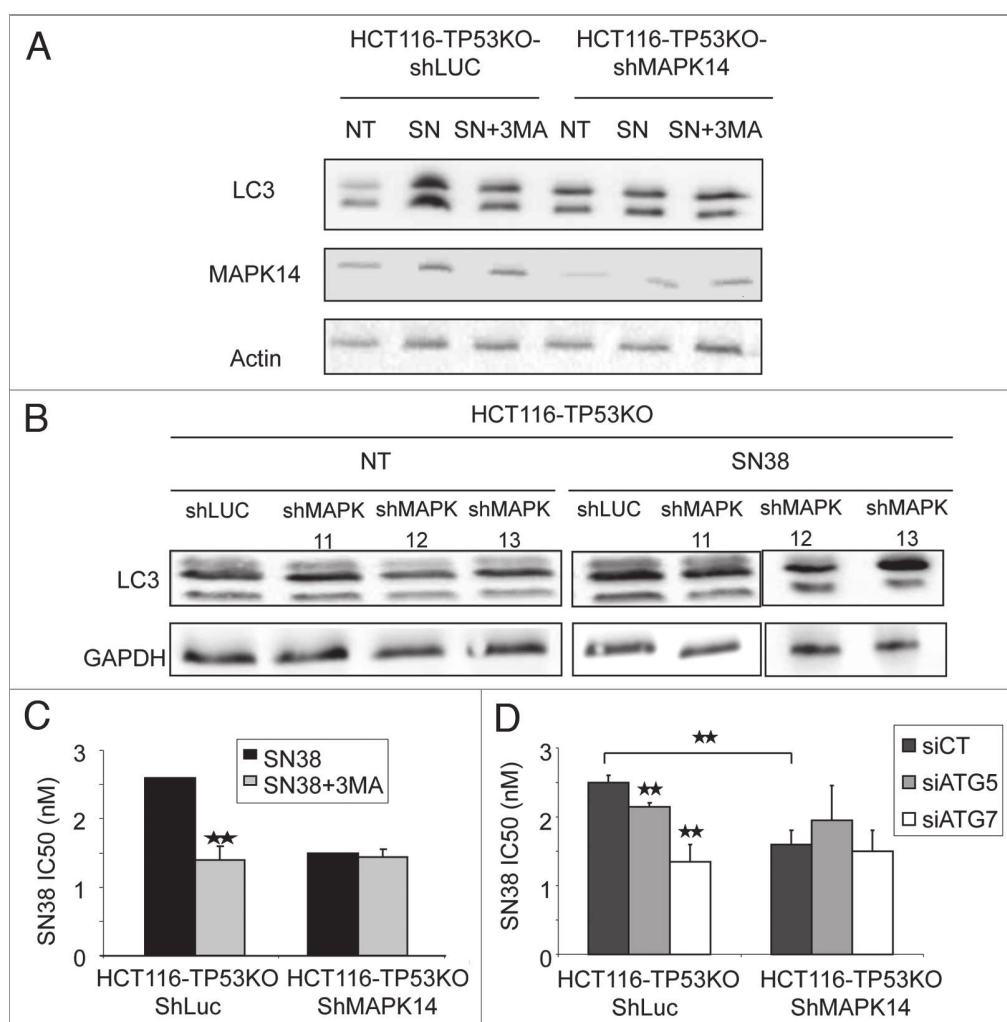


Figure 7. Involvement of autophagy in SN38 resistance depends upon MAPK14. (A) Western blot analysis of LC3-I and II and MAPK14 expression in HCT116-TP53KO-ShLuc and HCT116-TP53KO-ShMAPK14 cells after treatment or not (NT) with 2 nM SN38 alone (SN) or with 10 nM 3-methyladenine (SN+3MA) for 96 h. (B) Western blot analysis of LC3-I and II of HCT116-TP53KO-ShLuc, HCT116-TP53KO-ShMAPK11, HCT116-TP53KO-ShMAPK12 and HCT116-TP53KO-ShMAPK13 cells after treatment or not (NT) with 2 nM SN38 alone (SN) for 96 h. (C) SRB assays to assess the cytotoxicity of SN38 alone or in combination with 3-methyladenine (SN38+3MA) in HCT116-TP53KO-ShLuc and HCT116-TP53KO-ShMAPK14 cells. (D) SRB assays to assess SN38 cytotoxicity of HCT116-TP53KO-ShLuc and HCT116-TP53KO-ShMAPK14 cells transfected with control siRNA or anti-ATG5 or -ATG7 siRNAs.

We finally asked whether SN38-mediated induction of autophagy is MAPK14-dependent. To answer this question, we downregulated, or not (HCT116-TP53KO-ShLuc cells), the expression of MAPK14 with a specific shRNA (ShMAPK14) in HCT116-TP53KO cells and incubated them with 2 nM SN38 for 96 h. Western blot analysis (Fig. 7A) showed that SN38 induced higher LC3-II levels in control HCT116-TP53KO-ShLuc (as expected), but not in HCT116-TP53KO-ShMAPK14. Concomitant incubation of cells with 2 nM SN38 and 10 nM 3MA, which inhibits autophagy, for 96 h prevented the LC3-II increase observed in HCT116-TP53KO-ShLuc cells treated with SN38 alone, but did not have any effect on HCT116-TP53KO-ShMAPK14 cells (Fig. 7A). This result clearly indicates that MAPK14 is necessary for SN38-mediated induction of autophagy. In addition to MAPK14, we have also performed inhibition of MAPK11, MAPK12 and MAPK13 and treated the HCT116-TP53KO cells with SN38. LC3-II western blot analysis indicates that inhibition of MAPK11, MAPK12 and MAPK13 did not inhibit the SN38 autophagy induction (Fig. 7B). Moreover, we have treated HCT116-ShLuc and HCT116-shMAPK14 cells with SN38 and we found that autophagy is not reduced in HCT116-ShMAPK14 (Fig. S2C). In conclusion, ShMAPK14 is the main p38 isoform involved in autophagy induction by SN38 (Fig. 7A), and exclusively in a *TP53*KO context.

We then evaluated the impact of autophagy inhibition on the sensitivity to SN38 of HCT116-TP53KO-ShMAPK14 cells. HCT116-TP53KO-ShLuc and HCT116-TP53KO-ShMAPK14 cells were either treated with SN38 and SN38+3MA (Fig. 7C) or transfected with siATG5 and siATG7 (Fig. 7D), and their IC₅₀ were determined. Autophagy inhibition increased the SN38 cytotoxic effect in control HCT116-TP53KO-ShLuc cells, but not in HCT116-TP53KO-ShMAPK14 cells. These results suggest that MAPK14 activation and survival-promoting autophagy are part of the same mechanism induced by SN38, and that hindering MAPK14 activity will block the SN38 effect on survival-promoting autophagy. In conclusion MAPK14 confers SN38 resistance to HCT116-TP53KO cells by inducing survival autophagy.

Discussion

In this study, we demonstrated the role of MAPK14 in the resistance to SN38, the active metabolite of irinotecan, in *TP53*-depleted HCT116 colorectal cancer cells. Moreover we showed that overexpression of constitutively active MAPK14 induces survival autophagy in colorectal cancer cells depleted of *TP53* and that inhibition of autophagy in such cells enhances the cytotoxic effect of SN38.

We previously reported that MAPK14 is involved in irinotecan resistance in in vivo and in vitro experimental settings and in clinical samples.⁶ Here we confirm this finding by showing that overexpression of constitutively active MAPK14 makes also *TP53*-depleted colorectal cancer cells more resistant to irinotecan, and conversely its downregulation sensitizes these cells. This new finding indicates that the involvement in irinotecan resistance is

not dependent on the *TP53* status of the cancer cells. This suggests that p38 inhibitors could be used as an adjuvant therapy to potentiate the efficacy of irinotecan-based chemotherapies, whatever the *TP53* status of the tumor.

Moreover, we report that overexpression of MAPK14 leads to cell growth inhibition of HCT116-TP53KO cells. Previous works have already reported that MAPK14 can cause cell cycle arrest via two pathways. Specifically, after UV radiation, MAPK14 can phosphorylate and inhibit the phosphatase CDC25B, which in turn inhibits the CCNB/cyclin B-CDK1/CDC2 complex needed for cell cycle progression.¹⁶ The other pathway involves the phosphorylation and activation of *TP53* and induction of the *TP53*-dependent G₂/M checkpoint.¹³ Here, we showed that MAPK14 overexpression leads to an increase of CDKN1A protein (but not of mRNA) level even in the absence of *TP53* and that CDKN1A upregulation is responsible for proliferation inhibition. Our findings are in agreement with the work by Kim and colleagues who demonstrate that MAPK14 can phosphorylate directly CDKN1A, leading to CDKN1A stabilization.¹⁷

It is well known that p38 has a dual role in autophagy, both as a positive and negative regulator. Our results show that, in HCT116-TP53KO cells, MAPK14 can induce autophagy which in turn promotes cell survival. Similarly, Tang et al., reported that, in the mouse model of Alexander disease, p38 is involved in GFAP accumulation in astrocytes and in the induction of survival-promoting autophagy. Furthermore, Cui et al., described that, in HeLa cells, oridonin induces autophagy through p38 activation.^{18,19} On the other hand, Comes and colleagues found that, in colon cancer cells, p38 inhibition leads to autophagy and apoptosis,²⁰ and Webber et al., showed that p38 negatively regulates autophagy by inhibiting the interaction of ATG9 with FAM48A/p38IP in starvation conditions.²¹ Although these results seem contradictory, our hypothesis is that the role of p38 in autophagy depends on the nature of the stimulus, the strength and duration of p38 activation and the *TP53* status. Moreover, it is important to differentiate the autophagy promoting cell survival from the autophagy leading to cell death as they may involve different signaling pathways.

It has already been reported²² that camptothecin can induce autophagy in breast cancer cells. When this autophagic response is inhibited, camptothecin-induced apoptotic cell death is increased, suggesting that autophagy might play a role in a drug-resistance mechanism. Our data demonstrated that the camptothecin-derivative SN38 activates autophagy also in colon cancer cells, a more relevant cancer model since camptothecin-derivative drugs are used in the clinic to treat patients with CRC (but not for breast cancer). It was recently shown that 5-fluorouracil (5-FU), a drug widely used in combination with irinotecan in the clinic (FOLFIRI protocol), also induces autophagy in HCT116 and DLD-1 colorectal cancer cells²³ and inhibition of 5-FU-induced autophagy increases cell death. We did not reproduce these data, most probably because we treated the cells with lower concentration of autophagy inhibitor. We rather showed that inhibition of MAPK14-mediated autophagy in our model can increase the sensitivity of colon cancer cells to SN38 cytotoxic effect. It would be interesting to test the combination of

irinotecan+autophagy inhibitor and to treat nonresponder patients who receive FOLFIRI with an autophagy inhibitor.

Our findings also indicate that the *TP53* status is crucial because autophagy inhibition does not increase the cytotoxic effect of SN38 in colorectal cancer cells with wild-type *TP53*. p53 can modulate autophagy depending on its cellular localization.²⁴ Indeed, nuclear p53 will act as a transcription factor and transactivate several autophagy inducers (such as DRAM1, SESN2/Sestrin2, BAX and BBC3/PUMA) to induce autophagy and facilitate apoptosis. Conversely, cytoplasmic TP53 inhibits autophagy by an unknown mechanism. Here, we show that in the absence of TP53, overexpression of MAPK14 (by retroviral transduction of constitutively active MAPK14 or upon treatment with SN38) can induce survival-promoting autophagy.

Growing evidence indicates that chemotherapy induces autophagy in a variety of tumor cells,²⁵ leading either to tumor protection or tumor cell death. In the present study, we demonstrated that, in *TP53* defective colorectal cancer cells, camptothecin-derivative drugs induce survival-promoting autophagy via MAPK14 activation. In conclusion, it appears that survival-promoting autophagy, which is responsible for resistance to chemotherapy, is dependent on the *TP53* status of the tumor and TP38 activation. As autophagy inhibitors could be used to overcome camptothecin-related drug resistance, it is crucial to determine the *TP53* status of the patients and the level of p38 activation by the drug.

Materials and Methods

Cell lines and reagents. The HCT116 (CCL-247), SW480 (CCL228) human colon adenocarcinoma cell lines and the H1299 (CRL5803) human non-small cell lung cancer cell line from ATCC were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 mmol/L l-glutamine at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. HCT116-TP53KO cells, in which *TP53* had been genetically ablated, were kindly given by Bert Volgestein. SN38 was provided by Sanofi-Aventis.

Drug sensitivity. Cell growth inhibition and cell viability after SN38 treatment were assessed using the sulforhodamine B (SRB) (Sigma, S-9012) assay as previously described and called SRB assays.⁶

Western blot analyses. Western blot analysis of cell extracts from control and retrovirus-infected cells were performed as previously described.⁶ Primary antibodies were directed against CDKN1A (CST-2947), MAPK14/p38 α (CST-9218), tubulin (CST-2125) (Cell Signaling Technology), LC3 (Sigma Aldrich, L7543), SQSTM1/p62 (BD Transduction Laboratory, 610833), actin (Abcam, ab8227), GAPDH (Abcam, ab9482). Secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (sc-2314) or anti-rabbit (sc-2004) antisera (Santa Cruz).

Ultrastructural evaluation. Cells were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen's buffer (NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄, pH 7.4) at 4°C overnight. They were then rinsed in Sorensen's buffer and post-fixed in 0.5% osmic acid in the dark and at room temperature for 2 h. After two rinses in Sorensen's buffer, cells were dehydrated through a graded series of ethanol solutions (30–100%) and embedded in EmBed 812 (EMS

14120) using an Automated Microwave Tissue Processor for Electronic Microscopy (Leica EM AMW). Thin 70 nm sections were cut with a Leica-Reichert Ultracut E microtome at different levels of each block and were counterstained with uranyl acetate. Cell structures were assessed using a Hitachi 7100 transmission electron microscope at the Centre de Ressources en Imagerie Cellulaire de Montpellier (France). The number of autophagosomes was evaluated in 100 cells for each cell type.

Cell senescence. Senescent cells were identified by detecting β -galactosidase activity at pH 6, a known marker of cell senescence. Cells were plated on 12-mm glass coverslips in culture dishes. After 48 h, they were fixed in 2% paraformaldehyde/0.2% glyceraldehyde, and then incubated with the staining solution (20 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside); 40 mM citric acid/sodium phosphate, pH 6.0; 5 mM potassium ferrocyanide; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂)²⁶ overnight. The number of stained cells was evaluated in 20 fields (using a 63 \times NA objective and a Leica inverted microscope) for each cell type.

GFP-LC3 expression. Cells were plated on 12-mm glass coverslips in culture dishes and transiently transfected with the expression plasmid encoding the chimeric protein pEGFP-LC3 (a generous gift from Dr. L. Espert, Montpellier, France) using Lipofectamine (Invitrogen, 18324012) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were then fixed in 3.7% formaldehyde, mounted in Moviol, and images were recorded using a 63 \times NA objective and a Leica inverted microscope. Autophagosomes were counted in 100 cells for each cell type.

Retroviral infection. HCT116-TP53KO cells that stably express the constitutively active (CA) p38 isoforms were obtained by retroviral transduction of the pMSCV-MAPK14-CA, pMSCV-MAPK11-CA, pMSCV-MAPK12-CA and pMSCV-MAPK13-CA plasmids. MAPK14 mutant is p38 α ^{D176A F327S}, MAPK11 mutant is p38 β ^{D176A}, MAPK12 mutant is p38 γ ^{D179A} and MAPK13 mutant is p38 δ ^{F324S}. Control cells were transduced with the pMSCVhyg (Clontech, 6344001) empty vector (EV) (HCT116-TP53KO-EV cells). Twenty-four hours after transduction, cells were selected with 1 μ g/mL hygromycin. HCT116-TP53KO-EV or -MAPK14-CA cells were co-infected with the pSIREN (Clontech, 631526) vector in which the short hairpin RNAs (shRNA) targeting *CDKN1A* was cloned. Cells were selected with 0.5 μ g/mL puromycin and with 0.5 μ g/mL hygromycin. HCT116-TP53KO cells expressing ShRNAs targeting, *MAPK14*, *MAPK14bis*, *MAPK11*, *MAPK12* and *MAPK13* mRNA were obtained by retroviral gene transduction of the pSIREN vector in which the ShRNAs were cloned. Two different hairpins had been used targeting different part of the MAPK14 mRNA (ShMAPK14 and ShMAPK14bis). Cells were selected with 1 μ g/mL of puromycin and then stable clones were pooled. The shRNA targeting *Luciferase* (shLuc) was used as negative control.

Autophagy inhibition. Two autophagy inhibitors were used: 3-methyladenine (3MA) (M9281), a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor that inhibits the formation of autophagosomes, and bafilomycin A₁ (11707), a V type proton pump that inhibits the formation of secondary lysosomes (both from Sigma Aldrich).

HCT116-TP53KO-EV or -MAPK14-CA cells (0.75×10^6) were grown in 6-well plates for 48 h and then incubated with 10 nM 3-methyladenine or 50 nM bafilomycin A₁ for 48 h. Cell viability was then estimated using the Trypan blue exclusion method.

For studying the autophagic flux, 0.1×10^6 HCT116-TP53KO-EV or -MAPK14-CA cells were grown in 6-well plates for 72 h and then incubated with 10 nM 3-methyladenine or 50 nM bafilomycin A₁ for 96 h.

For SRB assays, cells were plated in 96 well plates and treated during 96 h with SN38 alone or with SN38+3MA (10 nM) or SN38 + Baf (50 nM).

The cells are treated with a very low concentration of 3-MA (10 nM) when the treatment is 48, 72 or 96 h. This 3-MA concentration avoids the nonspecific side effect, is sufficient to inhibit autophagy induction and is not toxic for control cells.

SQSTM1 degradation was evaluated by cycloheximide-chase experiments in HCT116-TP53KO-EV and HCT116-TP53KO-MAPK14-CA.

Cell growth assay. Cells (5×10^4) were seeded in 6-well plates in triplicate. Six identical plates were seeded for each counting experiment. Every 24 h after plating, cells were counted in one of the plates.

Cell cycle analysis. BrdU labeling. Cells were incubated continuously with 30 μ M of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU, B9285, Sigma) for the indicated times. Cells were harvested, centrifuged at 1200 rpm for 5 min, washed in PBS, and resuspended in 75% ethanol by vortexing before storage at 4°C for 24 h. After a pepsin treatment cells were resuspended in 2 M hydrochloric acid, washed and incubated for 30 min with a rat anti-BrdU antibody (Oxford Biotechnology, OBT0030S) and revealed with a goat anti-rat IgG coupled with FITC fluorochrome (Southern Biotech, 3010-02). Cells were stained with propidium iodide (PI, 25 μ g/ml, Invitrogen, P3566) and cytofluorometric analyses were performed.

RNA preparation and RT-Q-PCR. Total RNA was isolated from HCT116-TP53KO-EV and -MAPK14-CA cells using the RNeasy[®] mini Kit (Qiagen, 74104) with an additional DNase digestion step (Qiagen, 79254). RNA was quantified by UV spectroscopy. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, 1808004). Real-time quantitative PCR was performed using the LC480 (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instruction. The amplification specificity was verified by using the melting curve analysis. Real-time PCR values were determined by reference to a

standard curve that was generated by real-time PCR amplification of a serially diluted cDNA sample using primers specific for *CDKN1A*, *ATG5*, *ATG7* and Hypoxanthine Phosphorybosyl Transferase (*HPRT*). The quantification data were normalized to the amplification data for the reference gene *HPRT*.

Apoptosis assay. Cells were seeded in 25 cm² flasks (10^5 cells/flask). After 48 h, they were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Annexin V and 7AAD (Coulter, PN IM3614) to determine the number of apoptotic cells.

siRNA and transfection procedures. siRNA oligonucleotides targeting *ATG5*, *ATG7* and control non-targeting constructs (siCT) (SR-CL000-005) were obtained from Eurogentec. Transfections were performed using Oligofectamine (Invitrogen, 12252011) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2×10^5 cells were plated in each well of a 6-well plate and incubated overnight. A mixture of 3 μ g siRNA and Oligofectamine diluted in OptiMEM (31985) was added for 6 h, followed by incubation in regular medium. Cells were harvested 96 h after siRNA transfection.

Kinase assay. The p38 kinase assay was performed using the non-radioactive p38 MAPK Assay Kit from Cell Signaling Technology (9820) with 2 μ g of p38 isoforms. MAPK14 mutant is p38 α ^{D176A F327S}, MAPK11 mutant is p38 β ^{D176A}, MAPK12 mutant p38 γ ^{D179A} and MAPK13 mutant p38 δ ^{F324S}.

Statistical analysis. Analysis of quantitative data was performed by using the Student's t-test. Differences were considered statistically significant, when $p < 0.05$.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors are grateful to Chantal Cazeville and Cécile Sanchez (*Montpellier* Rio Imaging (*MRI*) electron microscopy facility) for their technical assistance and for interpreting data concerning ultrastructural evaluation.

The authors are also grateful to the *Montpellier* Rio Imaging (*MRI*) cytometry facilities, and particularly to the technical assistance of Nadia Vié.

Funds for this research were provided by INSERM.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here:

www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/20268

References

- Segal NH, Saltz LB. Evolving treatment of advanced colon cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60:207-19; PMID: 19630571; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.60.041807.132435>
- Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66:3992-5; PMID:16618717; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0191>
- Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:789-802; PMID: 16990856; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1977>
- Xu Y, Villalona-Calero MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol* 2002; 13:1841-51; PMID: 12453851; <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdf337>
- Gongora C, Candeil L, Vezzio N, Copois V, Denis V, Breil C, et al. Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol Ther* 2008; 7:822-32; PMID:18340113; <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.7.6.5838>
- Paillas S, Boissière F, Bibeau F, Denouel A, Mollevi C, Causse A, et al. Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 2011; 71:1041-9; PMID:21159664; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2726>
- Chiacchiera F, Simone C. Signal-dependent regulation of gene expression as a target for cancer treatment: inhibiting p38alpha in colorectal tumors. *Cancer Lett* 2008; 265:16-26; PMID:18395970; <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.061>

8. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:15077-82; PMID: 14657337; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2436255100>
9. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402:672-6; PMID:10604474; <http://dx.doi.org/10.1038/45257>
10. Avitzour M, Diskin R, Raboy B, Askari N, Engelberg D, Livnah O. Intrinsically active variants of all human p38 isoforms. *FEBS J* 2007; 274:963-75; PMID: 17241234; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05644.x>
11. Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, et al. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 2002; 22:3389-403; PMID:11971971; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.10.3389-3403.2002>
12. Haq R, Brenton JD, Takahashi M, Finan D, Finkelsztejn A, Damaraju S, et al. Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res* 2002; 62:5076-82; PMID:12208764
13. Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 1999; 18:6845-54; PMID: 10581258; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.23.6845>
14. Weng MS, Ho YS, Lin JK. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:1815-27; PMID:15869744; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.03.011>
15. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4:151-75; PMID: 18188003
16. Bulavin DV, Amundson SA, Fornace AJ. p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:92-7; PMID:11790561; [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X\(01\)00270-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X(01)00270-2)
17. Kim GY, Mercer SE, Ewton DZ, Yan Z, Jin K, Friedman E. The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J Biol Chem* 2002; 277:29792-802; PMID:12058028; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M201299200>
18. Tang G, Yue Z, Tallozy Z, Hagemann T, Cho W, Messing A, et al. Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1540-55; PMID:18276609; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn042>
19. Cui Q, Tashiro SI, Onodera S, Minami M, Ikejima T. Oridonin induced autophagy in human cervical carcinoma HeLa cells through Ras, JNK, and P38 regulation. *J Pharmacol Sci* 2007; 105:317-25; PMID: 18094523; <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.FP0070336>
20. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, et al. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* 2007; 14:693-702; PMID:17159917; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402076>
21. Webber JL, Tooze SA. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J* 2010; 29:27-40; PMID:19893488; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.321>
22. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* 2007; 14:500-10; PMID:16990848; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402039>
23. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur J Cancer* 2010; 46:1900-9; PMID:20231086; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.021>
24. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 2008; 10:676-87; PMID:18454141; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1730>
25. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:726-34; PMID: 16148885; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1692>
26. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:9363-7; PMID: 7568133; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] K. W. Kinzler and B. Vogelstein, “Lessons from Hereditary Colorectal Cancer,” *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 159–170, Oct. 1996.
- [2] H. T. Lynch, T. Smyrk, and J. F. Lynch, “Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome),” *Int. J. Cancer*, vol. 69, no. 1, pp. 38–43, février 1996.
- [3] T. Reya and H. Clevers, “Wnt signalling in stem cells and cancer,” *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–850, avril 2005.
- [4] A. Leslie, F. A. Carey, N. R. Pratt, and R. J. C. Steele, “The colorectal adenoma–carcinoma sequence,” *Br. J. Surg.*, vol. 89, no. 7, pp. 845–860, juillet 2002.
- [5] A. Morán, “Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance,” *World J. Gastrointest. Oncol.*, vol. 2, no. 3, p. 151, 2010.
- [6] F. Binder-Foucard, N. Bossard, P. Delafosse, A. Belot, A.-S. Woronoff, and L. Remontet, “Cancer incidence and mortality in France over the 1980–2012 period: Solid tumors,” *Rev. Épidémiologie Santé Publique*, vol. 62, no. 2, pp. 95–108, avril 2014.
- [7] D. Papamichael, “The Use of Thymidylate Synthase Inhibitors in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: Current Status,” *The Oncologist*, vol. 4, no. 6, pp. 478–487, Dec. 1999.
- [8] T. M.-A. G. in Cancer, “Modulation of Fluorouracil by Leucovorin in Patients With Advanced Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 18, pp. 3766–3775, Sep. 2004.
- [9] E. Raymond, S. G. Chaney, A. Taamma, and E. Cvitkovic, “Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies,” *Ann. Oncol.*, vol. 9, no. 10, pp. 1053–1071, Oct. 1998.
- [10] E. Diaz-Rubio, J. Sastre, A. Zaniboni, R. Labianca, H. Cortés-Funes, F. de Braud, C. Boni, M. Benavides, G. Dallavalle, and M. Homerin, “Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients: A phase II multicentric study,” *Ann. Oncol.*, vol. 9, no. 1, pp. 105–108, Jan. 1998.
- [11] G. Binefa, F. Rodríguez-Moranta, A. Teule, and M. Medina-Hayas, “Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine,” *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 20, no. 22, pp. 6786–6808, Jun. 2014.
- [12] G. Fiorentini, C. Aliberti, M. Tilli, L. Mulazzani, F. Graziano, P. Giordani, A. Mambrini, F. Montagnani, P. Alessandroni, V. Catalano, and P. Coschiera, “Intra-arterial Infusion of Irinotecan-loaded Drug-eluting Beads (DEBIRI) versus Intravenous Therapy (FOLFIRI) for Hepatic Metastases from Colorectal Cancer: Final Results of a Phase III Study,” *Anticancer Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 1387–1395, Apr. 2012.
- [13] C. Aliberti, M. Tilli, G. Benea, and G. Fiorentini, “Trans-arterial Chemoembolization (TACE) of Liver Metastases from Colorectal Cancer Using Irinotecan-Eluting Beads: Preliminary Results,” *Anticancer Res.*, vol. 26, no. 5B, pp. 3793–3795, Sep. 2006.
- [14] A. Falcone, S. Ricci, I. Brunetti, E. Pfanner, G. Allegrini, C. Barbara, L. Crinò, G. Benedetti, W. Evangelista, L. Fanchini, E. Cortesi, V. Picone, S. Vitello, S. Chiara, C. Granetto, G. Porcile, L. Fioretto, C. Orlandini, M. Andreuccetti, and G. Masi, “Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 13, pp. 1670–1676, May 2007.

- [15] Y. Fong, J. Fortner, R. L. Sun, M. F. Brennan, and L. H. Blumgart, "Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer: Analysis of 1001 Consecutive Cases," *Ann. Surg.*, vol. 230, no. 3, p. 309, Sep. 1999.
- [16] J. Folkman, "Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications," *N. Engl. J. Med.*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186, 1971.
- [17] A. Vilorio-Petit, "Contrasting effects of VEGF gene disruption in embryonic stem cell-derived versus oncogene-induced tumors," *EMBO J.*, vol. 22, no. 16, pp. 4091–4102, Aug. 2003.
- [18] L. M. Ellis and D. J. Hicklin, "VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 579–591, Aug. 2008.
- [19] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar, "Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, 2004.
- [20] L. B. Saltz, S. Clarke, E. Díaz-Rubio, W. Scheithauer, A. Figer, R. Wong, S. Koski, M. Lichinitser, T.-S. Yang, F. Rivera, F. Couture, F. Sirzén, and J. Cassidy, "Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin-Based Chemotherapy As First-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Study," *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 12, pp. 2013–2019, Apr. 2008.
- [21] E. V. Cutsem, J. Tabernero, R. Lakomy, H. Prenen, J. Prausová, T. Macarulla, P. Ruff, G. A. van Hazel, V. Moiseyenko, D. Ferry, J. McKendrick, J. Polikoff, A. Tellier, R. Castan, and C. Allegra, "Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 28, pp. 3499–3506, Oct. 2012.
- [22] B. Escudier, T. Eisen, W. M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T. E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, R. M. Bukowski, and TARGET Study Group, "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 356, no. 2, pp. 125–134, Jan. 2007.
- [23] J. M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.-F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J.-L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J.-F. Seitz, I. Borbath, D. Häussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix, and SHARP Investigators Study Group, "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 4, pp. 378–390, Jul. 2008.
- [24] S. M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag, and P. A. Trail, "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 19, pp. 7099–7109, Oct. 2004.
- [25] S. M. Wilhelm, L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J. M. Llovet, and M. Lynch, "Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, no. 10, pp. 3129–3140, Oct. 2008.
- [26] I. Alroy and Y. Yarden, "The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions," *FEBS Lett.*, vol. 410, no. 1, pp. 83–86, Jun. 1997.

- [27] P. J. Roberts and C. J. Der, "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer," *Oncogene*, vol. 26, no. 22, pp. 3291–3310, 2007.
- [28] B. M. T. Burgering and P. J. Coffey, "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction," *Nature*, vol. 376, no. 6541, pp. 599–602, Aug. 1995.
- [29] J.-Y. Yang, C. S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J.-Y. Lang, C.-C. Lai, C.-J. Chang, W.-C. Huang, H. Huang, H.-P. Kuo, D.-F. Lee, L.-Y. Li, H.-C. Lien, X. Cheng, K.-J. Chang, C.-D. Hsiao, F.-J. Tsai, C.-H. Tsai, A. A. Sahin, W. J. Muller, G. B. Mills, D. Yu, G. N. Hortobagyi, and M.-C. Hung, "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 138–148, Feb. 2008.
- [30] D. R. Plas and C. B. Thompson, "Akt Activation Promotes Degradation of Tuberin and FOXO3a via the Proteasome," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 14, pp. 12361–12366, Apr. 2003.
- [31] W. H. Biggs, J. Meisenhelder, T. Hunter, W. K. Cavenee, and K. C. Arden, "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 13, pp. 7421–7426, Jun. 1999.
- [32] S. Subramaniam and K. Unsicker, "Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death," *Neuroscience*, vol. 138, no. 4, pp. 1055–1065, 2006.
- [33] T. Wada and J. M. Penninger, "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation," *Oncogene*, vol. 23, no. 16, pp. 2838–2849, 2004.
- [34] H. Huang, K. M. Regan, F. Wang, D. Wang, D. I. Smith, J. M. A. van Deursen, and D. J. Tindall, "Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 5, pp. 1649–1654, Feb. 2005.
- [35] Y. Kashii, M. Uchida, K. Kirito, M. Tanaka, K. Nishijima, M. Toshima, T. Ando, K. Koizumi, T. Endoh, K. Sawada, M. Momoi, Y. Miura, K. Ozawa, and N. Komatsu, "A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction," *Blood*, vol. 96, no. 3, pp. 941–949, Aug. 2000.
- [36] C. Wolfrum, D. Besser, E. Luca, and M. Stoffel, "Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 20, pp. 11624–11629, Sep. 2003.
- [37] K. Du and M. Montminy, "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 49, pp. 32377–32379, Dec. 1998.
- [38] S. Basu, N. F. Totty, M. S. Irwin, M. Sudol, and J. Downward, "Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 11–23, Jan. 2003.
- [39] R. A. Campbell, P. Bhat-Nakshatri, N. M. Patel, D. Constantinidou, S. Ali, and H. Nakshatri, "Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 13, pp. 9817–9824, Mar. 2001.
- [40] M. Sanchez, K. Sauvé, N. Picard, and A. Tremblay, "The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 7, pp. 4830–4840, Feb. 2007.
- [41] Z. Kadri, L. Maouche-Chretien, H. M. Rooke, S. H. Orkin, P.-H. Romeo, P. Mayeux, P. Leboulch, and S. Chretien, "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by

- erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 17, pp. 7412–7422, Sep. 2005.
- [42] Y.-H. Han, X. Cao, B. Lin, F. Lin, S. K. Kolluri, J. Stebbins, J. C. Reed, M. I. Dawson, and X.-K. Zhang, “Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt,” *Oncogene*, vol. 25, no. 21, pp. 2974–2986, May 2006.
- [43] C.-H. Jeong, Y.-Y. Cho, M.-O. Kim, S.-H. Kim, E.-J. Cho, S.-Y. Lee, Y.-J. Jeon, K. Y. Lee, K. Yao, Y.-S. Keum, A. M. Bode, and Z. Dong, “Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells,” *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 28, no. 12, pp. 2141–2150, Dec. 2010.
- [44] A. Palamarchuk, A. Efanov, V. Maximov, R. I. Aqeilan, C. M. Croce, and Y. Pekarsky, “Akt phosphorylates Tal1 oncoprotein and inhibits its repressor activity,” *Cancer Res.*, vol. 65, no. 11, pp. 4515–4519, Jun. 2005.
- [45] A. Vichalkovski, E. Gresko, D. Hess, D. F. Restuccia, and B. A. Hemmings, “PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage,” *Oncogene*, vol. 29, no. 24, pp. 3554–3565, Jun. 2010.
- [46] A. Brunet, A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, and M. E. Greenberg, “Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor,” *Cell*, vol. 96, no. 6, pp. 857–868, Mar. 1999.
- [47] T. Mitsudomi and Y. Yatabe, “Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 2, pp. 301–308, Jan. 2010.
- [48] R. B. Roberts, L. Min, M. K. Washington, S. J. Olsen, S. H. Settle, R. J. Coffey, and D. W. Threadgill, “Importance of epidermal growth factor receptor signaling in establishment of adenomas and maintenance of carcinomas during intestinal tumorigenesis,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 3, pp. 1521–1526, Feb. 2002.
- [49] J. Mendelsohn, “Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 3, no. 12, pp. 2703–2707, Dec. 1997.
- [50] Z. Fan, H. Masui, I. Altas, and J. Mendelsohn, “Blockade of Epidermal Growth Factor Receptor Function by Bivalent and Monovalent Fragments of 225 Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 18, pp. 4322–4328, Sep. 1993.
- [51] S. Untawale, M. A. Zorbas, C. P. Hodgson, R. J. Coffey, G. E. Gallick, S. M. North, D. M. Wildrick, M. Olive, M. Blick, L. C. Yeoman, and B. M. Boman, “Transforming Growth Factor- α Production and Autoinduction in a Colorectal Carcinoma Cell Line (DiFi) with an Amplified Epidermal Growth Factor Receptor Gene,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 7, pp. 1630–1636, Apr. 1993.
- [52] G. Dolf, R. E. Meyn, D. Curley, N. Prather, M. D. Story, B. M. Boman, M. J. Siciliano, and R. R. Hewitt, “Extrachromosomal amplification of the epidermal growth factor receptor gene in a human colon carcinoma cell line,” *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 48–54, Jan. 1991.
- [53] M. Olive, S. Untawale, R. J. Coffey, M. J. Siciliano, D. M. Wildrick, H. Fritsche, S. Pathak, L. M. Cherry, M. Blick, and P. Lointier, “Characterization of the DiFi rectal carcinoma cell line derived from a familial adenomatous polyposis patient,” *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.*, vol. 29A, no. 3 Pt 1, pp. 239–248, Mar. 1993.
- [54] N. I. Goldstein, M. Prewett, K. Zuklys, P. Rockwell, and J. Mendelsohn, “Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 1, no. 11, pp. 1311–1318, Nov. 1995.

- [55] Z. Fan, B. Y. Shang, Y. Lu, J. L. Chou, and J. Mendelsohn, "Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 3, no. 11, pp. 1943–1948, Nov. 1997.
- [56] B. Liu, M. Fang, M. Schmidt, Y. Lu, J. Mendelsohn, and Z. Fan, "Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity," *Br. J. Cancer*, vol. 82, no. 12, pp. 1991–1999, Jun. 2000.
- [57] P. Perrotte, T. Matsumoto, K. Inoue, H. Kuniyasu, B. Y. Eve, D. J. Hicklin, R. Radinsky, and C. P. N. Dinney, "Anti-epidermal Growth Factor Receptor Antibody C225 Inhibits Angiogenesis in Human Transitional Cell Carcinoma Growing Orthotopically in Nude Mice," *Clin. Cancer Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 257–264, Feb. 1999.
- [58] J. Mendelsohn and J. Baselga, "The EGF receptor family as targets for cancer therapy," *Oncogene*, vol. 19, no. 56, pp. 6550–6565, Dec. 2000.
- [59] J. Kurai, H. Chikumi, K. Hashimoto, K. Yamaguchi, A. Yamasaki, T. Sako, H. Touge, H. Makino, M. Takata, M. Miyata, M. Nakamoto, N. Burioka, and E. Shimizu, "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mediated by Cetuximab against Lung Cancer Cell Lines," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 5, pp. 1552–1561, Mar. 2007.
- [60] W. Zhang, M. Gordon, A. M. Schultheis, D. Y. Yang, F. Nagashima, M. Azuma, H.-M. Chang, E. Borucka, G. Lurje, A. E. Sherrod, S. Iqbal, S. Groshen, and H.-J. Lenz, "FCGR2A and FCGR3A Polymorphisms Associated With Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Expressing Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated With Single-Agent Cetuximab," *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 24, pp. 3712–3718, Aug. 2007.
- [61] F. Bibeau, E. Lopez-Crapez, F. Di Fiore, S. Thezenas, M. Ychou, F. Blanchard, A. Lamy, F. Penault-Llorca, T. Frébourg, P. Michel, J.-C. Sabourin, and F. Boissière-Michot, "Impact of Fc γ RIIa-Fc γ RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1122–1129, Mar. 2009.
- [62] X. Yang, X. Zhang, E. D. Mortenson, O. Radkevich-Brown, Y. Wang, and Y.-X. Fu, "Cetuximab-mediated Tumor Regression Depends on Innate and Adaptive Immune Responses," *Mol. Ther.*, vol. 21, no. 1, pp. 91–100, Jan. 2013.
- [63] E. Aboud-Pirak, E. Hurwitz, M. E. Pirak, F. Bellot, J. Schlessinger, and M. Sela, "Efficacy of Antibodies to Epidermal Growth Factor Receptor Against KB Carcinoma In Vitro and in Nude Mice," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 80, no. 20, pp. 1605–1611, Dec. 1988.
- [64] J. Baselga, L. Norton, H. Masui, A. Pandiella, K. Coplan, W. H. Miller, and J. Mendelsohn, "Antitumor Effects of Doxorubicin in Combination With Anti-epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 85, no. 16, pp. 1327–1333, Aug. 1993.
- [65] F. Ciardiello, R. Bianco, V. Damiano, S. D. Lorenzo, S. Pepe, S. D. Placido, Z. Fan, J. Mendelsohn, A. R. Bianco, and G. Tortora, "Antitumor Activity of Sequential Treatment with Topotecan and Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody C225," *Clin. Cancer Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 909–916, Apr. 1999.
- [66] D. Cunningham, Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau, and E. Van Cutsem, "Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 4, pp. 337–345, 2004.

- [67] D. J. Jonker, C. J. O’Callaghan, C. S. Karapetis, J. R. Zalcborg, D. Tu, H.-J. Au, S. R. Berry, M. Krahn, T. Price, R. J. Simes, N. C. Tebbutt, G. van Hazel, R. Wierzbicki, C. Langer, and M. J. Moore, “Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 20, pp. 2040–2048, 2007.
- [68] E. Van Cutsem, M. Peeters, S. Siena, Y. Humblet, A. Hendlisz, B. Neyns, J.-L. Canon, J.-L. Van Laethem, J. Maurel, G. Richardson, M. Wolf, and R. G. Amado, “Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 13, pp. 1658–1664, May 2007.
- [69] K. Y. Chung, J. Shia, N. E. Kemeny, M. Shah, G. K. Schwartz, A. Tse, A. Hamilton, D. Pan, D. Schrag, L. Schwartz, D. S. Klimstra, D. Fridman, D. P. Kelsen, and L. B. Saltz, “Cetuximab Shows Activity in Colorectal Cancer Patients With Tumors That Do Not Express the Epidermal Growth Factor Receptor by Immunohistochemistry,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 9, pp. 1803–1810, Mar. 2005.
- [70] C. Montagut, A. Dalmases, B. Bellosillo, M. Crespo, S. Pairet, M. Iglesias, M. Salido, M. Gallen, S. Marsters, S. P. Tsai, A. Minoche, S. Seshagiri, S. Serrano, H. Himmelbauer, J. Bellmunt, A. Rovira, J. Settleman, F. Bosch, and J. Albanell, “Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer,” *Nat. Med.*, vol. 18, no. 2, pp. 221–223, Feb. 2012.
- [71] M. Scartozzi, I. Bearzi, A. Mandolesi, C. Pierantoni, F. Loupakis, A. Zaniboni, F. Negri, A. Quadri, F. Zorzi, E. Galizia, R. Berardi, T. Biscotti, R. Labianca, G. Masi, A. Falcone, and S. Cascinu, “Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gene copy number (GCN) correlates with clinical activity of irinotecan-cetuximab in K-RAS wild-type colorectal cancer: a fluorescence in situ (FISH) and chromogenic in situ hybridization (CISH) analysis,” *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 303, 2009.
- [72] N. Personeni, S. Fieuws, H. Piessevaux, G. D. Hertogh, J. D. Schutter, B. Biesmans, W. D. Roock, A. Capoen, M. Debiec-Rychter, J.-L. V. Laethem, M. Peeters, Y. Humblet, E. V. Cutsem, and S. Tejpar, “Clinical Usefulness of EGFR Gene Copy Number as a Predictive Marker in Colorectal Cancer Patients Treated with Cetuximab: A Fluorescent In situ Hybridization Study,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 18, pp. 5869–5876, Sep. 2008.
- [73] A. Lièvre, J.-B. Bachet, D. L. Corre, V. Boige, B. Landi, J.-F. Emile, J.-F. Côté, G. Tomasic, C. Penna, M. Ducreux, P. Rougier, F. Penault-Llorca, and P. Laurent-Puig, “KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 8, pp. 3992–3995, Apr. 2006.
- [74] A. Lièvre, J.-B. Bachet, V. Boige, A. Cayre, D. L. Corre, E. Buc, M. Ychou, O. Bouché, B. Landi, C. Louvet, T. André, F. Bibeau, M.-D. Diebold, P. Rougier, M. Ducreux, G. Tomasic, J.-F. Emile, F. Penault-Llorca, and P. Laurent-Puig, “KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 3, pp. 374–379, Jan. 2008.
- [75] F. Loupakis, A. Ruzzo, C. Cremolini, B. Vincenzi, L. Salvatore, D. Santini, G. Masi, I. Stasi, E. Canestrari, E. Rulli, I. Floriani, K. Bencardino, N. Galluccio, V. Catalano, G. Tonini, M. Magnani, G. Fontanini, F. Basolo, A. Falcone, and F. Graziano, “KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 101, no. 4, pp. 715–721, Jul. 2009.
- [76] C. A. Gerdes, V. G. Nicolini, S. Herter, E. van Puijenbroek, S. Lang, M. Roemmele, E. Moessner, O. Freytag, T. Friess, C. H. Ries, B. Bossenmaier, H. J. Mueller, and P.

- Umaña, “GA201 (RG7160): A Novel, Humanized, Glycoengineered Anti-EGFR Antibody with Enhanced ADCC and Superior In Vivo Efficacy Compared with Cetuximab,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 5, pp. 1126–1138, Mar. 2013.
- [77] Y. Guo, J. J. Parry, R. Laforest, B. E. Rogers, and C. J. Anderson, “The Role of p53 in Combination Radioimmunotherapy with ⁶⁴Cu-DOTA-Cetuximab and Cisplatin in a Mouse Model of Colorectal Cancer,” *J. Nucl. Med.*, vol. 54, no. 9, pp. 1621–1629, Sep. 2013.
- [78] S. Khambata-Ford, C. R. Garrett, N. J. Meropol, M. Basik, C. T. Harbison, S. Wu, T. W. Wong, X. Huang, C. H. Takimoto, A. K. Godwin, B. R. Tan, S. S. Krishnamurthi, H. A. Burris, E. A. Poplin, M. Hidalgo, J. Baselga, E. A. Clark, and D. J. Mauro, “Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras Mutation Status Predict Disease Control in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated With Cetuximab,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 22, pp. 3230–3237, Aug. 2007.
- [79] K.-L. G. Spindler, N. Pallisgaard, A. A. Rasmussen, J. Lindebjerg, R. F. Andersen, D. Crüger, and A. Jakobsen, “The importance of KRAS mutations and EGF61A>G polymorphism to the effect of cetuximab and irinotecan in metastatic colorectal cancer,” *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 5, pp. 879–884, May 2009.
- [80] T. Troiani, E. Martinelli, S. Napolitano, D. Vitagliano, L. P. Ciuffreda, S. Costantino, F. Morgillo, A. Capasso, V. Sforza, A. Nappi, R. D. Palma, E. D’Aiuto, L. Berrino, R. Bianco, and F. Ciardiello, “Increased TGF- α as a Mechanism of Acquired Resistance to the Anti-EGFR Inhibitor Cetuximab through EGFR–MET Interaction and Activation of MET Signaling in Colon Cancer Cells,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 24, pp. 6751–6765, Dec. 2013.
- [81] W. De Roock, B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilas, K. T. Kalogerias, V. Kotoula, D. Papamichael, P. Laurent-Puig, F. Penault-Llorca, P. Rougier, B. Vincenzi, D. Santini, G. Tonini, F. Cappuzzo, M. Frattini, F. Molinari, P. Saletti, S. De Dosso, M. Martini, A. Bardelli, S. Siena, A. Sartore-Bianchi, J. Tabernero, T. Macarulla, F. Di Fiore, A. O. Gangloff, F. Ciardiello, P. Pfeiffer, C. Qvortrup, T. P. Hansen, E. Van Cutsem, H. Piessevaux, D. Lambrechts, M. Delorenzi, and S. Tejpar, “Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis,” *Lancet Oncol.*, vol. 11, no. 8, pp. 753–762, Aug. 2010.
- [82] E. Razis, E. Briasoulis, E. Vrettou, D. V. Skarlos, D. Papamichael, I. Kostopoulos, E. Samantas, I. Xanthakis, M. Bobos, E. Galanidi, M. Bai, I. Gikonti, A. Koukouma, G. Kafiri, P. Papakostas, K. T. Kalogerias, P. Kosmidis, and G. Fountzilas, “Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: An exploratory study,” *BMC Cancer*, vol. 8, no. 1, p. 234, 2008.
- [83] F. D. Nicolantonio, M. Martini, F. Molinari, A. Sartore-Bianchi, S. Arena, P. Saletti, S. D. Dosso, L. Mazzucchelli, M. Frattini, S. Siena, and A. Bardelli, “Wild-Type BRAF Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 35, pp. 5705–5712, Dec. 2008.
- [84] J. Tol, I. D. Nagtegaal, and C. J. A. Punt, “BRAF Mutation in Metastatic Colorectal Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 1, pp. 98–99, 2009.
- [85] A. Sartore-Bianchi, M. Martini, F. Molinari, S. Veronese, M. Nichelatti, S. Artale, F. D. Nicolantonio, P. Saletti, S. D. Dosso, L. Mazzucchelli, M. Frattini, S. Siena, and A. Bardelli, “PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer Are Associated with Clinical Resistance to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 5, pp. 1851–1857, Mar. 2009.

- [86] H. Prenen, J. D. Schutter, B. Jacobs, W. D. Roock, B. Biesmans, B. Claes, D. Lambrechts, E. V. Cutsem, and S. Tejpar, "PIK3CA Mutations Are Not a Major Determinant of Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 9, pp. 3184–3188, May 2009.
- [87] F. Perrone, A. Lampis, M. Orsenigo, M. D. Bartolomeo, A. Gevorgyan, M. Losa, M. Frattini, C. Riva, S. Andreola, E. Bajetta, L. Bertario, E. Leo, M. A. Pierotti, and S. Pilotti, "PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients," *Ann. Oncol.*, vol. 20, no. 1, pp. 84–90, Jan. 2009.
- [88] L. J. Mekenkamp, J. Tol, J. R. Dijkstra, I. de Krijger, M. Vink-Börger, S. van Vliet, S. Teerenstra, E. Kamping, E. Verwiel, M. Koopman, G. A. Meijer, J. H. J. van Krieken, R. Kuiper, C. J. Punt, and I. D. Nagtegaal, "Beyond KRAS mutation status: influence of KRAS copy number status and microRNAs on clinical outcome to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients," *BMC Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 292, 2012.
- [89] A. Custodio and J. Feliu, "Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: Beyond KRAS mutations," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 85, no. 1, pp. 45–81, Jan. 2013.
- [90] M. Daneshmand, D. A. E. Parolin, H. W. Hirte, P. Major, G. Goss, D. Stewart, G. Batist, W. H. Miller, S. Matthews, L. Seymour, and I. A. J. Lorimer, "A Pharmacodynamic Study of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 in Metastatic Colorectal Cancer Patients," *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 7, pp. 2457–2464, Jul. 2003.
- [91] J. Chen, M. Smith, K. Kolinsky, V. Adames, N. Mehta, L. Fritzky, M. Rashed, E. Wheeldon, M. Linn, and B. Higgins, "Antitumor activity of HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib, alone and in combination with CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer xenograft models," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 59, no. 5, pp. 651–659, Apr. 2007.
- [92] L. Tang, Y. Wang, A. Strom, J.-Å. Gustafsson, and X. Guan, "Lapatinib induces p27(Kip1)-dependent G₁ arrest through both transcriptional and post-translational mechanisms," *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 12, no. 16, pp. 2665–2674, Aug. 2013.
- [93] F. Ciardiello, R. Caputo, R. Bianco, V. Damiano, G. Pomato, S. De Placido, A. R. Bianco, and G. Tortora, "Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 2053–2063, May 2000.
- [94] J. D. Moyer, E. G. Barbacci, K. K. Iwata, L. Arnold, B. Boman, A. Cunningham, C. DiOrio, J. Doty, M. J. Morin, M. P. Moyer, M. Neveu, V. A. Pollack, L. R. Pustilnik, M. M. Reynolds, D. Sloan, A. Theleman, and P. Miller, "Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest by CP-358,774, an Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 21, pp. 4838–4848, Nov. 1997.
- [95] Y. Zhou, S. Li, Y. P. Hu, J. Wang, J. Hauser, A. N. Conway, M. A. Vinci, L. Humphrey, E. Zborowska, J. K. V. Willson, and M. G. Brattain, "Blockade of EGFR and ErbB2 by the Novel Dual EGFR and ErbB2 Tyrosine Kinase Inhibitor GW572016 Sensitizes Human Colon Carcinoma GEO Cells to Apoptosis," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 1, pp. 404–411, Jan. 2006.
- [96] S. Ganesan, B. L. Unger, A. T. Comstock, K. A. Angel, P. Mancuso, F. J. Martinez, and U. S. Sajjan, "Aberrantly activated EGFR contributes to enhanced IL-8 expression in COPD airways epithelial cells via regulation of nuclear FoxO3A," *Thorax*, vol. 68, no. 2, pp. 131–141, Feb. 2013.

- [97] U. B. McGovern, R. E. Francis, B. Peck, S. K. Guest, J. Wang, S. S. Myatt, J. Krol, J. M.-M. Kwok, A. Polychronis, R. C. Coombes, and E. W.-F. Lam, "Gefitinib (Iressa) represses FOXM1 expression via FOXO3a in breast cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 8, no. 3, pp. 582–591, Mar. 2009.
- [98] C. A. Townsley, P. Major, L. L. Siu, J. Dancey, E. Chen, G. R. Pond, T. Nicklee, J. Ho, D. Hedley, M. Tsao, M. J. Moore, and A. M. Oza, "Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with metastatic colorectal cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 94, no. 8, pp. 1136–1143, Apr. 2006.
- [99] M. L. Rothenberg, B. LaFleur, D. E. Levy, M. K. Washington, S. L. Morgan-Meadows, R. K. Ramanathan, J. D. Berlin, A. B. Benson, and R. J. Coffey, "Randomized phase II trial of the clinical and biological effects of two dose levels of gefitinib in patients with recurrent colorectal adenocarcinoma," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 36, pp. 9265–9274, Dec. 2005.
- [100] S. Pyronnet, H. Imataka, A.-C. Gingras, R. Fukunaga, T. Hunter, and N. Sonenberg, "Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E," *EMBO J.*, vol. 18, no. 1, pp. 270–279, Jan. 1999.
- [101] Z. Xia, M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg, "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis," *Science*, vol. 270, no. 5240, pp. 1326–1331, Nov. 1995.
- [102] A. Cuenda and S. Rousseau, "p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 8, pp. 1358–1375, Aug. 2007.
- [103] P. A. Eyers, M. Craxton, N. Morrice, P. Cohen, and M. Goedert, "Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution," *Chem. Biol.*, vol. 5, no. 6, pp. 321–328, Jun. 1998.
- [104] Z. Li, Y. Jiang, R. J. Ulevitch, and J. Han, "The Primary Structure of p38 γ : A New Member of p38 Group of MAP Kinases," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 228, no. 2, pp. 334–340, Nov. 1996.
- [105] S. Kumar, P. C. McDonnell, R. J. Gum, A. T. Hand, J. C. Lee, and P. R. Young, "Novel Homologues of CSBP/p38 MAP Kinase: Activation, Substrate Specificity and Sensitivity to Inhibition by Pyridinyl Imidazoles," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 235, no. 3, pp. 533–538, Jun. 1997.
- [106] K. Ono and J. Han, "The p38 signal transduction pathway Activation and function," *Cell. Signal.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2000.
- [107] S. Zhang, J. Han, M. A. Sells, J. Chernoff, U. G. Knaus, R. J. Ulevitch, and G. M. Bokoch, "Rho Family GTPases Regulate p38 Mitogen-activated Protein Kinase through the Downstream Mediator Pak1," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 41, pp. 23934–23936, Oct. 1995.
- [108] B. Ge, H. Gram, F. D. Padova, B. Huang, L. New, R. J. Ulevitch, Y. Luo, and J. Han, "MAPKK-Independent Activation of p38 α Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38 α ," *Science*, vol. 295, no. 5558, pp. 1291–1294, Feb. 2002.
- [109] J. M. Salvador, P. R. Mittelstadt, T. Guszczynski, T. D. Copeland, H. Yamaguchi, E. Appella, A. J. Fornace, and J. D. Ashwell, "Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases," *Nat. Immunol.*, vol. 6, no. 4, pp. 390–395, Apr. 2005.
- [110] L. R. Coulthard, D. E. White, D. L. Jones, M. F. McDermott, and S. A. Burchill, "p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics," *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 8, pp. 369–379, Aug. 2009.
- [111] A. Cuadrado and A. R. Nebreda, "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling," *Biochem. J.*, vol. 429, no. 3, pp. 403–417, Aug. 2010.

- [112] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C. J. Hastie, H. Mclachlan, I. Klevernic, J. S. C. Arthur, D. R. Alessi, and P. Cohen, "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update," *Biochem. J.*, vol. 408, no. 3, p. 297, Dec. 2007.
- [113] J. Zhang, B. Shen, and A. Lin, "Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 28, no. 6, pp. 286–295, Jun. 2007.
- [114] N. W. Freshney, L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala, "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of hsp27," *Cell*, vol. 78, no. 6, pp. 1039–1049, Sep. 1994.
- [115] Y. Zeng, H. Sankala, X. Zhang, and P. R. Graves, "Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies," *Biochem. J.*, vol. 413, no. 3, p. 429, Aug. 2008.
- [116] V. Lafarga, A. Cuadrado, I. L. de Silanes, R. Bengoechea, O. Fernandez-Capetillo, and A. R. Nebreda, "p38 Mitogen-Activated Protein Kinase- and HuR-Dependent Stabilization of p21Cip1 mRNA Mediates the G1/S Checkpoint," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 16, pp. 4341–4351, Aug. 2009.
- [117] R. Winzen, G. Gowrishankar, F. Bollig, N. Redich, K. Resch, and H. Holtmann, "Distinct Domains of AU-Rich Elements Exert Different Functions in mRNA Destabilization and Stabilization by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase or HuR," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 4835–4847, Jun. 2004.
- [118] J. S. C. Arthur, "MSK activation and physiological roles," *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 13, pp. 5866–5879, 2008.
- [119] S. Llanos, A. Cuadrado, and M. Serrano, "MSK2 Inhibits p53 Activity in the Absence of Stress," *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 89, pp. ra57–ra57, Sep. 2009.
- [120] M. Mahalingam and J. A. Cooper, "Phosphorylation of mammalian eIF4E by Mnk1 and Mnk2: tantalizing prospects for a role in translation," *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, vol. 27, pp. 132–142, 2001.
- [121] Y. Zwang and Y. Yarden, "p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy," *EMBO J.*, vol. 25, no. 18, pp. 4195–4206, Sep. 2006.
- [122] A. Swat, I. Dolado, J. M. Rojas, and A. R. Nebreda, "Cell Density-Dependent Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling by p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase via Sprouty2 Downregulation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 12, pp. 3332–3343, Jun. 2009.
- [123] P. Xu and R. Derynck, "Direct Activation of TACE-Mediated Ectodomain Shedding by p38 MAP Kinase Regulates EGF Receptor-Dependent Cell Proliferation," *Mol. Cell*, vol. 37, no. 4, pp. 551–566, Feb. 2010.
- [124] X. Huang, S. Chen, L. Xu, Y. Liu, D. K. Deb, L. C. Plataniias, and R. C. Bergan, "Genistein Inhibits p38 Map Kinase Activation, Matrix Metalloproteinase Type 2, and Cell Invasion in Human Prostate Epithelial Cells," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 8, pp. 3470–3478, Apr. 2005.
- [125] M. Kundu, S. K. Pathak, K. Kumawat, S. Basu, G. Chatterjee, S. Pathak, T. Noguchi, K. Takeda, H. Ichijo, C. B. F. Thien, W. Y. Langdon, and J. Basu, "A TNF- and c-Cbl-dependent FLIPS-degradation pathway and its function in Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage apoptosis," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 8, pp. 918–926, Aug. 2009.
- [126] C. Feijoo, D. G. Campbell, R. Jakes, M. Goedert, and A. Cuenda, "Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38 δ at Thr50 promotes microtubule assembly," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. 2, pp. 397–408, Jan. 2005.
- [127] C. G. Parker, J. Hunt, K. Diener, M. McGinley, B. Soriano, G. A. Keesler, J. Bray, Z. Yao, X. S. Wang, T. Kohno, and H. S. Lichenstein, "Identification of Stathmin as a

- Novel Substrate for p38 Delta,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 249, no. 3, pp. 791–796, Aug. 1998.
- [128] E. Perdiguero and P. Muñoz-Cánoves, “Transcriptional regulation by the p38 MAPK signaling pathway in mammalian cells,” in *Stress-Activated Protein Kinases*, F. Posas and A. R. Nebreda, Eds. Springer Berlin Heidelberg, 2008, pp. 51–79.
- [129] K.-K. Ho, V. A. McGuire, C.-Y. Koo, K. W. Muir, N. de Olano, E. Maifoshie, D. J. Kelly, U. B. McGovern, L. J. Monteiro, A. R. Gomes, A. R. Nebreda, D. G. Campbell, J. S. C. Arthur, and E. W.-F. Lam, “Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 Promotes Its Nuclear Localization in Response to Doxorubicin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 2, pp. 1545–1555, Jan. 2012.
- [130] S. Sacconi, S. Pantano, and G. Natoli, “p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 1, pp. 69–75, Jan. 2002.
- [131] Q. Zhao, B. M. Barakat, S. Qin, A. Ray, M. A. El-Mahdy, G. Wani, E.-S. Arafa, S. N. Mir, Q.-E. Wang, and A. A. Wani, “The p38 Mitogen-activated Protein Kinase Augments Nucleotide Excision Repair by Mediating DDB2 Degradation and Chromatin Relaxation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 47, pp. 32553–32561, Nov. 2008.
- [132] I. del Barco Barrantes and A. R. Nebreda, “Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 40, no. 1, pp. 79–84, Feb. 2012.
- [133] G. Huang, L. Z. Shi, and H. Chi, “Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination,” *Cytokine*, vol. 48, no. 3, pp. 161–169, Dec. 2009.
- [134] S. Kostenko, G. Dumitriu, K. J. Læg Reid, and U. Moens, “Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase,” *World J. Biol. Chem.*, vol. 2, no. 5, pp. 73–89, May 2011.
- [135] A. Shiryayev and U. Moens, “Mitogen-activated protein kinase p38 and MK2, MK3 and MK5: ménage à trois or ménage à quatre?,” *Cell. Signal.*, vol. 22, no. 8, pp. 1185–1192, Aug. 2010.
- [136] J. C. Lee, J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, and S. W. Landvatter, “A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis,” *Nature*, vol. 372, no. 6508, pp. 739–746, Dec. 1994.
- [137] Z. Guan, S. Y. Buckman, A. P. Pentland, D. J. Templeton, and A. R. Morrison, “Induction of Cyclooxygenase-2 by the Activated MEKK1 \rightarrow SEK1/MKK4 \rightarrow p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 21, pp. 12901–12908, May 1998.
- [138] A. M. Badger, M. N. Cook, M. W. Lark, T. M. Newman-Tarr, B. A. Swift, A. H. Nelson, F. C. Barone, and S. Kumar, “SB 203580 Inhibits p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, Nitric Oxide Production, and Inducible Nitric Oxide Synthase in Bovine Cartilage-Derived Chondrocytes,” *J. Immunol.*, vol. 161, no. 1, pp. 467–473, Jul. 1998.
- [139] A. V. Timoshenko, C. Chakraborty, G. F. Wagner, and P. K. Lala, “COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 94, no. 8, pp. 1154–1163, Mar. 2006.
- [140] K. Xu and H.-K. G. Shu, “EGFR Activation Results in Enhanced Cyclooxygenase-2 Expression through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Activation of the Sp1/Sp3 Transcription Factors in Human Gliomas,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 13, pp. 6121–6129, Jul. 2007.
- [141] J.-I. Park, M.-G. Lee, K. Cho, B.-J. Park, K.-S. Chae, D.-S. Byun, B.-K. Ryu, Y.-K. Park, and S.-G. Chi, “Transforming growth factor- β 1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF- κ B,

- JNK, and Ras signaling pathways,” *Oncogene*, vol. 22, no. 28, pp. 4314–4332, Jul. 2003.
- [142] A. Pietersma, B. C. Tilly, M. Gaestel, N. de Jong, J. C. Lee, J. F. Koster, and W. Sluiter, “P38 Mitogen Activated Protein Kinase Regulates Endothelial VCAM-1 Expression at the Post-transcriptional Level,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 230, no. 1, pp. 44–48, Jan. 1997.
- [143] A. Craxton, G. Shu, J. D. Graves, J. Saklatvala, E. G. Krebs, and E. A. Clark, “p38 MAPK Is Required for CD40-Induced Gene Expression and Proliferation in B Lymphocytes,” *J. Immunol.*, vol. 161, no. 7, pp. 3225–3236, Oct. 1998.
- [144] R. Beyaert, A. Cuenda, W. V. Berghe, S. Plaisance, J. C. Lee, G. Haegeman, P. Cohen, and W. Fiers, “The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor.,” *EMBO J.*, vol. 15, no. 8, p. 1914, Apr. 1996.
- [145] C. Russo and R. Polosa, “TNF- α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis,” *Clin. Sci.*, vol. 109, no. 2, p. 135, Aug. 2005.
- [146] G. A. MacGowan, D. L. Mann, R. L. Kormos, A. M. Feldman, and S. Murali, “Circulating Interleukin-6 in Severe Heart Failure,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 79, no. 8, pp. 1128–1131, Apr. 1997.
- [147] T. A. Gardiner, D. S. Gibson, T. E. de Gooyer, V. F. de la Cruz, D. M. McDonald, and A. W. Stitt, “Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α Improves Physiological Angiogenesis and Reduces Pathological Neovascularization in Ischemic Retinopathy,” *Am. J. Pathol.*, vol. 166, no. 2, pp. 637–644, Feb. 2005.
- [148] R. Takeda, E. Suzuki, H. Satonaka, S. Oba, H. Nishimatsu, M. Omata, T. Fujita, R. Nagai, and Y. Hirata, “Blockade of Endogenous Cytokines Mitigates Neointimal Formation in Obese Zucker Rats,” *Circulation*, vol. 111, no. 11, pp. 1398–1406, Mar. 2005.
- [149] J. N. Lavoie, G. L’Allemain, A. Brunet, R. Müller, and J. Pouyssegur, “Cyclin D1 Expression Is Regulated Positively by the p42/p44MAPK and Negatively by the p38/HOGMAPK Pathway,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 34, pp. 20608–20616, Aug. 1996.
- [150] X. Z. Wang and D. Ron, “Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase,” *Science*, vol. 272, no. 5266, pp. 1347–1349, May 1996.
- [151] A. Philips, P. Roux, V. Coulon, J.-M. Bellanger, A. Vié, M.-L. Vignais, and J. M. Blanchard, “Differential Effect of Rac and Cdc42 on p38 Kinase Activity and Cell Cycle Progression of Nonadherent Primary Mouse Fibroblasts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 8, pp. 5911–5917, Feb. 2000.
- [152] D. V. Bulavin, S. Saito, M. C. Hollander, K. Sakaguchi, C. W. Anderson, E. Appella, and A. J. Fornace, “Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 23, pp. 6845–6854, Dec. 1999.
- [153] Q. B. She, N. Chen, and Z. Dong, “ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 27, pp. 20444–20449, Jul. 2000.
- [154] S. Wang, “Regulation of Rb and E2F by signal transduction cascades: divergent effects of JNK1 and p38 kinases,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 6, pp. 1559–1570, Mar. 1999.
- [155] X. Wang, C. H. McGowan, M. Zhao, L. He, J. S. Downey, C. Fearn, Y. Wang, S. Huang, and J. Han, “Involvement of the MKK6-p38 γ Cascade in γ -Radiation-Induced Cell Cycle Arrest,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 13, p. 4543, Jul. 2000.

- [156] D. V. Bulavin, Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella, and A. J. Fornace, "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase," *Nature*, vol. 411, no. 6833, pp. 102–107, May 2001.
- [157] R. Haq, J. D. Brenton, M. Takahashi, D. Finan, R. Rottapel, and B. Zanke, "Constitutive p38HOG Mitogen-activated Protein Kinase Activation Induces Permanent Cell Cycle Arrest and Senescence," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 17, pp. 5076–5082, Sep. 2002.
- [158] C. Ambrosino, G. Mace, S. Galban, C. Fritsch, K. Vintersten, E. Black, M. Gorospe, and A. R. Nebreda, "Negative Feedback Regulation of MKK6 mRNA Stability by p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 370–381, Jan. 2003.
- [159] D. Faust, I. Dolado, A. Cuadrado, F. Oesch, C. Weiss, A. R. Nebreda, and C. Dietrich, "p38 α MAPK is required for contact inhibition," *Oncogene*, vol. 24, no. 53, pp. 7941–7945, Jul. 2005.
- [160] D. V. Bulavin and A. J. Fornace Jr., "p38 MAP Kinase's Emerging Role as a Tumor Suppressor," in *Advances in Cancer Research*, vol. Volume 92, Academic Press, 2004, pp. 95–118.
- [161] P. L. Puri, Z. Wu, P. Zhang, L. D. Wood, K. S. Bhakta, J. Han, J. R. Feramisco, M. Karin, and J. Y. J. Wang, "Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells," *Genes Dev.*, vol. 14, no. 5, pp. 574–584, Mar. 2000.
- [162] J. J. Ventura, S. Tenbaum, E. Perdiguero, M. Huth, C. Guerra, M. Barbacid, M. Pasparakis, and A. R. Nebreda, "p38 α MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation," *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 6, pp. 750–758, Jun. 2007.
- [163] P. Juo, C. J. Kuo, S. E. Reynolds, R. F. Konz, J. Raingeaud, R. J. Davis, H. P. Biemann, and J. Blenis, "Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 24–35, Jan. 1997.
- [164] J. L. Kummer, P. K. Rao, and K. A. Heidenreich, "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 33, pp. 20490–20494, Aug. 1997.
- [165] M. A. Cahill, M. E. Peter, F. C. Kischkel, A. M. Chinnaiyan, V. M. Dixit, P. H. Kramer, and A. Nordheim, "CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases," *Oncogene*, vol. 13, no. 10, pp. 2087–2096, Nov. 1996.
- [166] S. Huang, Y. Jiang, Z. Li, E. Nishida, P. Mathias, S. Lin, R. J. Ulevitch, G. R. Nemerow, and J. Han, "Apoptosis Signaling Pathway in T Cells Is Composed of ICE/Ced-3 Family Proteases and MAP Kinase Kinase 6b," *Immunity*, vol. 6, no. 6, pp. 739–749, Jun. 1997.
- [167] P. Schwenger, P. Bellosta, I. Viator, C. Basilico, E. Y. Skolnik, and J. Vilček, "Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 7, pp. 2869–2873, Apr. 1997.
- [168] P. Schwenger, D. Alpert, E. Y. Skolnik, and J. Vilček, "Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase by Sodium Salicylate Leads to Inhibition of Tumor Necrosis Factor-Induced I κ B α Phosphorylation and Degradation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 1, pp. 78–84, Jan. 1998.

- [169] H.-Q. Bu, D.-L. Liu, W.-T. Wei, L. Chen, H. Huang, Y. Li, and J.-H. Cui, "Oridonin induces apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells via p53- and caspase-dependent induction of p38 MAPK," *Oncol. Rep.*, vol. 31, no. 2, pp. 975–982, Feb. 2014.
- [170] X. Sui, N. Kong, L. Ye, W. Han, J. Zhou, Q. Zhang, C. He, and H. Pan, "p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents," *Cancer Lett.*, vol. 344, no. 2, pp. 174–179, Mar. 2014.
- [171] S.-J. Chiu, J.-I. Chao, Y.-J. Lee, and T.-S. Hsu, "Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells," *Toxicol. Lett.*, vol. 179, no. 2, pp. 63–70, Jun. 2008.
- [172] S. Paillas, F. Boissière, F. Bibeau, A. Denouel, C. Mollevi, A. Causse, V. Denis, N. Vezzio-Vié, L. Marzi, C. Cortijo, I. Ait-Arsa, N. Askari, P. Pourquier, P. Martineau, M. Del Rio, and C. Gongora, "Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 1041–1049, Feb. 2011.
- [173] S. Yang, "Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment," *Int. J. Oncol.*, Mar. 2011.
- [174] S. Paillas, A. Causse, L. Marzi, P. de Medina, M. Poirot, V. Denis, N. Vezzio-Vie, L. Espert, H. Arzouk, A. Coquelle, P. Martineau, M. Del Rio, S. Pattingre, and C. Gongora, "MAPK14/p38 α confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy," *Autophagy*, vol. 8, no. 7, pp. 1098–1112, Jul. 2012.
- [175] T. M. Thornton, "Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival," *Int. J. Biol. Sci.*, pp. 44–52, 2009.
- [176] Q. Cui, S. Tashiro, S. Onodera, M. Minami, and T. Ikejima, "Oridonin Induced Autophagy in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells Through Ras, JNK, and P38 Regulation," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 105, no. 4, pp. 317–325, 2007.
- [177] Y.-C. Ye, L. Yu, H.-J. Wang, S. Tashiro, S. Onodera, and T. Ikejima, "TNF α -Induced Necroptosis and Autophagy via Suppression of the p38–NF κ B Survival Pathway in L929 Cells," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 117, no. 3, pp. 160–169, 2011.
- [178] E. Keil, R. Höcker, M. Schuster, F. Essmann, N. Ueffing, B. Hoffman, D. A. Liebermann, K. Pfeffer, K. Schulze-Osthoff, and I. Schmitz, "Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45 β –MEKK4–p38 pathway inhibits autophagy," *Cell Death Differ.*, vol. 20, no. 2, pp. 321–332, Feb. 2013.
- [179] S. Kumar, J. Boehm, and J. C. Lee, "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 9, pp. 717–726, Sep. 2003.
- [180] C. Simon, H. Goepfert, and D. Boyd, "Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion," *Cancer Res.*, vol. 58, no. 6, pp. 1135–1139, Mar. 1998.
- [181] G. Pagès, E. Berra, J. Milanini, A. P. Levy, and J. Pouyssegur, "Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 34, pp. 26484–26491, Aug. 2000.
- [182] S. Rousseau, F. Houle, H. Kotanides, L. Witte, J. Waltenberger, J. Landry, and J. Huot, "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 14, pp. 10661–10672, Apr. 2000.
- [183] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris, "p53 mutations in human cancers," *Science*, vol. 253, no. 5015, pp. 49–53, Jul. 1991.

- [184] D. P. Lane, "Cancer. p53, guardian of the genome," *Nature*, vol. 358, no. 6381, pp. 15–16, Jul. 1992.
- [185] B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine, "Surfing the p53 network," *Nature*, vol. 408, no. 6810, pp. 307–310, Nov. 2000.
- [186] A. M. Bode and Z. Dong, "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 10, pp. 793–805, Oct. 2004.
- [187] F. Teyssier, J.-O. Bay, C. Dionet, and P. Verrelle, "Régulation du cycle cellulaire des cellules exposées aux radiations ionisantes," *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 86, no. 4, pp. 345–57, May 1999.
- [188] B. M. Sirbu, S. J. Lachmayer, V. Wülfing, L. M. Marten, K. E. Clarkson, L. W. Lee, L. Gheorghiu, L. Zou, S. N. Powell, J. Dahm-Daphi, and H. Willers, "ATR-p53 Restricts Homologous Recombination in Response to Replicative Stress but Does Not Limit DNA Interstrand Crosslink Repair in Lung Cancer Cells," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 8, p. e23053, Aug. 2011.
- [189] W. S. El-Deiry, J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietsenpol, M. Burrell, D. E. Hill, Y. Wang, K. G. Wiman, W. E. Mercer, M. B. Kastan, K. W. Kohn, S. J. Elledge, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "WAF1/CIP1 Is Induced in p53-mediated G1 Arrest and Apoptosis," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 5, pp. 1169–1174, Mar. 1994.
- [190] G. Xiao, A. Chicas, M. Olivier, Y. Taya, S. Tyagi, F. R. Kramer, and J. Bargonetti, "A DNA Damage Signal Is Required for p53 to Activate gadd45," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 6, pp. 1711–1719, Mar. 2000.
- [191] W. R. Taylor and G. R. Stark, "Regulation of the G2/M transition by p53," *Oncogene*, vol. 20, no. 15, pp. 1803–1815, Apr. 2001.
- [192] D. Zink, C. Mayr, C. Janz, and L. Wiesmüller, "Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase," *Oncogene*, vol. 21, no. 31, pp. 4788–4800, Jul. 2002.
- [193] S. Sengupta and C. C. Harris, "p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 1, pp. 44–55, Jan. 2005.
- [194] C. Yin, C. M. Knudson, S. J. Korsmeyer, and T. V. Dyke, "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo," *Nature*, vol. 385, no. 6617, pp. 637–640, Feb. 1997.
- [195] L. B. Owen-Schaub, W. Zhang, J. C. Cusack, L. S. Angelo, S. M. Santee, T. Fujiwara, J. A. Roth, A. B. Deisseroth, W. W. Zhang, E. Kruzel, and E. Al, "Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression.," *Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, p. 3032, Jun. 1995.
- [196] G. S. Wu, T. F. Burns, E. R. McDonald, W. Jiang, R. Meng, I. D. Krantz, G. Kao, D.-D. Gan, J.-Y. Zhou, R. Muschel, S. R. Hamilton, N. B. Spinner, S. Markowitz, G. Wu, and W. S. El-Deiry, "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene," *Nat. Genet.*, vol. 17, no. 2, pp. 141–143, Oct. 1997.
- [197] Y. Yin, Y. Terauchi, G. G. Solomon, S. Aizawa, P. N. Rangarajan, Y. Yazaki, T. Kadowaki, and J. C. Barrett, "Involvement of p85 in p53-dependent apoptotic response to oxidative stress," *Nature*, vol. 391, no. 6668, pp. 707–710, Feb. 1998.
- [198] M. Prisco, A. Hongo, M. G. Rizzo, A. Sacchi, and R. Baserga, "The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal," *Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 3, pp. 1084–1092, Mar. 1997.
- [199] K. Nakano and K. H. Vousden, "PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53," *Mol. Cell*, vol. 7, no. 3, pp. 683–694, Mar. 2001.

- [200] A. G. Yakovlev, S. Di Giovanni, G. Wang, W. Liu, B. Stoica, and A. I. Faden, "BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 27, pp. 28367–28374, Jul. 2004.
- [201] K. Polyak, Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "A model for p53-induced apoptosis," *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 300–305, Sep. 1997.
- [202] M. Murphy, A. Hinman, and A. J. Levine, "Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein," *Genes Dev.*, vol. 10, no. 23, pp. 2971–2980, Dec. 1996.
- [203] J. P. Roperch, V. Alvaro, S. Prieur, M. Tuynnder, M. Nemani, F. Lethrosne, L. Piouffre, M. C. Gendron, D. Israeli, J. Dausset, M. Oren, R. Amson, and A. Telerman, "Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression," *Nat. Med.*, vol. 4, no. 7, pp. 835–838, Jul. 1998.
- [204] S. Erster, M. Mihara, R. H. Kim, O. Petrenko, and U. M. Moll, "In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 15, pp. 6728–6741, Aug. 2004.
- [205] K. H. Vousden, "p53: Death Star," *Cell*, vol. 103, no. 5, pp. 691–694, Nov. 2000.
- [206] S. W. Lowe, E. Cepero, and G. Evan, "Intrinsic tumour suppression," *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 307–315, Nov. 2004.
- [207] X. Chen, L. J. Ko, L. Jayaraman, and C. Prives, "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells," *Genes Dev.*, vol. 10, no. 19, pp. 2438–2451, Oct. 1996.
- [208] T. Minamoto, T. Buschmann, H. Habelhah, E. Matusevich, H. Tahara, A. L. Boerresen-Dale, C. Harris, D. Sidransky, and Z. Ronai, "Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors," *Oncogene*, vol. 20, no. 26, pp. 3341–3347, Jun. 2001.
- [209] V. O. Melnikova, A. B. Santamaria, S. V. Bolshakov, and H. N. Ananthaswamy, "Mutant p53 is constitutively phosphorylated at Serine 15 in UV-induced mouse skin tumors: involvement of ERK1/2 MAP kinase," *Oncogene*, vol. 22, no. 38, pp. 5958–5966, Sep. 2003.
- [210] D. B. S. Yap, J.-K. Hsieh, S. Zhong, V. Heath, B. Gusterson, T. Crook, and X. Lu, "Ser392 Phosphorylation Regulates the Oncogenic Function of Mutant p53," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 14, pp. 4749–4754, Jul. 2004.
- [211] P. M. O'Connor, J. Jackman, I. Bae, T. G. Myers, S. Fan, M. Mutoh, D. A. Scudiero, A. Monks, E. A. Sausville, J. N. Weinstein, S. Friend, A. J. Fornace, and K. W. Kohn, "Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 19, pp. 4285–4300, Oct. 1997.
- [212] P. M. O'Connor and K. W. Kohn, "A fundamental role for cell cycle regulation in the chemosensitivity of cancer cells?," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 409–416, Dec. 1992.
- [213] P. M. O'Connor and S. Fan, "DNA damage checkpoints: implications for cancer therapy," *Prog. Cell Cycle Res.*, vol. 2, pp. 165–173, 1996.
- [214] C. A. Schmitt, "Cellular senescence and cancer treatment," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1775, no. 1, pp. 5–20, Jan. 2007.
- [215] V. Zuckerman, K. Wolynec, R. V. Sionov, S. Haupt, and Y. Haupt, "Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence," *J. Pathol.*, vol. 219, no. 1, pp. 3–15, Sep. 2009.

- [216] M. Martinez-Rivera and Z. H. Siddik, "Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 83, no. 8, pp. 1049–1062, Apr. 2012.
- [217] S. Strano, S. Dell'Orso, A. M. Mongioli, O. Monti, E. Lapi, S. Di Agostino, G. Fontemaggi, and G. Blandino, "Mutant p53 proteins: between loss and gain of function," *Head Neck*, vol. 29, no. 5, pp. 488–496, May 2007.
- [218] H. Song and Y. Xu, "Gain of function of p53 cancer mutants in disrupting critical DNA damage response pathways," *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 6, no. 13, pp. 1570–1573, Jul. 2007.
- [219] A. Naccarati, V. Polakova, B. Pardini, L. Vodickova, K. Hemminki, R. Kumar, and P. Vodicka, "Mutations and polymorphisms in TP53 gene—an overview on the role in colorectal cancer," *Mutagenesis*, vol. 27, no. 2, pp. 211–218, Mar. 2012.
- [220] A. J. Munro, S. Lain, and D. P. Lane, "P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review," *Br. J. Cancer*, vol. 92, no. 3, pp. 434–444, Feb. 2005.
- [221] W. L. Ince, A. M. Jubb, S. N. Holden, E. B. Holmgren, P. Tobin, M. Sridhar, H. I. Hurwitz, F. Kabbinavar, W. F. Novotny, K. J. Hillan, and H. Koeppen, "Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 97, no. 13, pp. 981–989, Jul. 2005.
- [222] S. Huang, S. Benavente, E. A. Armstrong, C. Li, D. L. Wheeler, and P. M. Harari, "p53 Modulates Acquired Resistance to EGFR Inhibitors and Radiation," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 22, pp. 7071–7079, Nov. 2011.
- [223] A. Oden-Gangloff, F. Di Fiore, F. Bibeau, A. Lamy, G. Bougeard, F. Charbonnier, F. Blanchard, D. Tougeron, M. Ychou, F. Boissière, F. Le Pessot, J.-C. Sabourin, J.-J. Tuech, P. Michel, and T. Frebourg, "TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy," *Br. J. Cancer*, vol. 100, no. 8, pp. 1330–1335, 2009.
- [224] F. Sclafani, D. Gonzalez, D. Cunningham, S. Hulkki Wilson, C. Peckitt, J. Taberero, B. Glimelius, A. Cervantes, A. Dewdney, A. Wotherspoon, G. Brown, D. Tait, J. Oates, and I. Chau, "TP53 mutational status and cetuximab benefit in rectal cancer: 5-year results of the EXPERT-C trial," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 106, no. 7, Jul. 2014.
- [225] Q. Zuo, M. Shi, J. Chen, and W. Liao, "The Ras signaling pathway mediates cetuximab resistance in nasopharyngeal carcinoma," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 65, no. 3, pp. 168–174, Jun. 2011.
- [226] E. V. M. Fletcher, L. Love-Homan, A. Sobhakumari, C. R. Feddersen, A. T. Koch, A. Goel, and A. L. Simons, "EGFR Inhibition Induces Proinflammatory Cytokines via NOX4 in HNSCC," *Mol. Cancer Res.*, vol. 11, no. 12, pp. 1574–1584, Dec. 2013.
- [227] I. Eke, K. Storch, M. Krause, and N. Cordes, "Cetuximab Attenuates Its Cytotoxic and Radiosensitizing Potential by Inducing Fibronectin Biosynthesis," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 19, pp. 5869–5879, Oct. 2013.
- [228] P. C. Mack, W. S. Holland, M. Redman, P. N. Lara, L. J. Snyder, F. R. Hirsch, W. A. Franklin, E. S. Kim, R. S. Herbst, and D. R. Gandara, "KRAS mutation analysis in cetuximab-treated advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC): SWOG experience with S0342 and S0536," *ASCO Meet. Abstr.*, vol. 27, no. 15S, p. 8022, May 2009.
- [229] K. Ohashi, L. V. Sequist, M. E. Arcila, T. Moran, J. Chmielecki, Y.-L. Lin, Y. Pan, L. Wang, E. de Stanchina, K. Shien, K. Aoe, S. Toyooka, K. Kiura, L. Fernandez-Cuesta, P. Fidias, J. C.-H. Yang, V. A. Miller, G. J. Riely, M. G. Kris, J. A. Engelman, C. L. Vnencak-Jones, D. Dias-Santagata, M. Ladanyi, and W. Pao, "Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but

- lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 31, pp. E2127–E2133, Jul. 2012.
- [230] E. Tzahar, H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunakaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin, and Y. Yarden, “A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 10, pp. 5276–5287, Oct. 1996.
- [231] D. Patel, R. Bassi, A. Hooper, M. Prewett, D. J. Hicklin, and X. Kang, “Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation,” *Int. J. Oncol.*, vol. 34, no. 1, pp. 25–32, Jan. 2009.
- [232] C. C. S. Chini, M. D. Boos, C. J. Dick, R. A. Schoon, and P. J. Leibson, “Regulation of p38 mitogen-activated protein kinase during NK cell activation,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 30, no. 10, pp. 2791–2798, Oct. 2000.
- [233] F. Chiacchiera, A. Matrone, E. Ferrari, G. Ingravallo, G. Lo Sasso, S. Murzilli, M. Petruzzelli, L. Salvatore, A. Moschetta, and C. Simone, “p38 α blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1 α - to FoxO-dependent transcription,” *Cell Death Differ.*, vol. 16, no. 9, pp. 1203–1214, Apr. 2009.
- [234] F. Chiacchiera, V. Grossi, M. Cappellari, A. Peserico, M. Simonatto, A. Germani, S. Russo, M. P. Moyer, N. Resta, S. Murzilli, and C. Simone, “Blocking p38/ERK crosstalk affects colorectal cancer growth by inducing apoptosis in vitro and in preclinical mouse models,” *Cancer Lett.*, vol. 324, no. 1, pp. 98–108, Nov. 2012.
- [235] N. Gaborit, C. Larbouret, J. Vallaghe, F. Peyrusson, C. Bascoul-Mollevi, E. Crapez, D. Azria, T. Chardès, M.-A. Poul, G. Mathis, H. Bazin, and A. Pèlerin, “Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) to analyze the disruption of EGFR/HER2 dimers: a new method to evaluate the efficiency of targeted therapy using monoclonal antibodies,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 13, pp. 11337–11345, Apr. 2011.
- [236] Y. Liu and W. F. Bodmer, “Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 4, pp. 976–981, Jan. 2006.
- [237] G. Dicuonzo, S. Angeletti, J. Garcia-Foncillas, A. Brugarolas, Y. Okrouzhnov, D. Santini, G. Tonini, G. Lorino, M. D. Cesaris, and A. Baldi, “Colorectal Carcinomas and PTEN/MMAC1 Gene Mutations,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. 12, pp. 4049–4053, Dec. 2001.
- [238] M. Jhawer, S. Goel, A. J. Wilson, C. Montagna, Y.-H. Ling, D.-S. Byun, S. Nasser, D. Arango, J. Shin, L. Klampfer, L. H. Augenlicht, R. P. Soler, and J. M. Mariadason, “PIK3CA Mutation/PTEN Expression Status Predicts Response of Colon Cancer Cells to the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Cetuximab,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 6, pp. 1953–1961, Mar. 2008.
- [239] A. M. Keuling, S. E. Andrew, and V. A. Tron, “Inhibition of p38 MAPK enhances ABT-737-induced cell death in melanoma cell lines: novel regulation of PUMA,” *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 23, no. 3, pp. 430–440, Jun. 2010.
- [240] G. Ferrari, V. Terushkin, M. J. Wolff, X. Zhang, C. Valacca, P. Poggio, G. Pintucci, and P. Mignatti, “TGF- β 1 Induces Endothelial Cell Apoptosis by Shifting VEGF Activation of p38MAPK from the Prosurvival p38 β to Proapoptotic p38 α ,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 10, no. 5, pp. 605–614, May 2012.
- [241] H. Liu, A. Pedram, and J. K. Kim, “Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 α -mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 β ,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 89, no. 1, pp. 119–128, Jan. 2011.
- [242] S. Bouali, A.-S. Chrétien, C. Ramacci, M. Rouyer, S. Marchal, T. Galenne, P. Juin, P. Becuwe, and J.-L. Merlin, “P53 and PTEN expression contribute to the inhibition of

- EGFR downstream signaling pathway by cetuximab,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 16, no. 6, pp. 498–507, Jan. 2009.
- [243] A. Huether, M. Höpfner, V. Baradari, D. Schuppan, and H. Scherübl, “EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 70, no. 11, pp. 1568–1578, Nov. 2005.
- [244] T. J. George and M. J. O’Connell, “A New Predictive Molecular Marker for Cetuximab Benefit in Rectal Cancer?,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 106, no. 7, p. dju154, Jul. 2014.
- [245] M. Olivier, M. Hollstein, and P. Hainaut, “TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 1, p. a001008, Jan. 2010.
- [246] G. A. Lang, T. Iwakuma, Y.-A. Suh, G. Liu, V. A. Rao, J. M. Parant, Y. A. Valentin-Vega, T. Terzian, L. C. Caldwell, L. C. Strong, A. K. El-Naggar, and G. Lozano, “Gain of Function of a p53 Hot Spot Mutation in a Mouse Model of Li-Fraumeni Syndrome,” *Cell*, vol. 119, no. 6, pp. 861–872, Dec. 2004.
- [247] P. Dong, M. Karaayvaz, N. Jia, M. Kaneuchi, J. Hamada, H. Watari, S. Sudo, J. Ju, and N. Sakuragi, “Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis,” *Oncogene*, vol. 32, no. 27, pp. 3286–3295, Jul. 2013.
- [248] K. Takeuchi, “JNK-Mediated FOXO Expression Plays a Critical Role in EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced BIM Expression and Apoptosis,” *J. Cancer Ther.*, vol. 03, no. 04, pp. 424–434, 2012.

Résumé

Le cetuximab est une thérapie ciblée dirigée contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) utilisée dans le cancer colorectal (CCR) en combinaison avec des chimiothérapies (5-FU, irinotécan et oxaliplatine). Sa fixation inhibe les voies de signalisation en aval du récepteur conduisant à une diminution de la prolifération et de la survie des cellules ciblées. Cependant, chez les patients atteints de CCR présentant une protéine KRAS mutée, le cetuximab est inefficace, de plus, la moitié des patients présentant une protéine KRAS wild-type ne répond pas non plus au cetuximab. Afin de découvrir des nouveaux biomarqueurs de sélection des patients qui pourraient bénéficier de ce traitement ou d'améliorer la réponse des patients, une meilleure connaissance des mécanismes d'action du cetuximab est nécessaire. Par exemple récemment, des études ont montré que la protéine p53 participait à la réponse au cetuximab. Il serait intéressant de savoir si le statut de cette protéine peut constituer un bon marqueur de réponse.

Précédemment, nous avons montré que l'activation de la « mitogen activated protein kinase » p38 (MAPK p38) induit une résistance à l'irinotécan *in vitro* et *in vivo* et est un marqueur de non réponse à cette drogue. De plus, d'autres équipes ont montré que la MAPK p38 bloque également la réponse au 5-FU et participe à la cytotoxicité de l'oxaliplatine. Il semble alors que la MAPK p38 soit impliquée dans les mécanismes d'action des anti-tumoraux. Il est donc intéressant de savoir si la MAPK p38 participe également à la cytotoxicité des thérapies ciblées comme le cetuximab.

Pour répondre à ces questions nous avons choisi de comparer deux lignées cellulaires de CCR KRAS wild-type mais au statut *TP53* différent et qui répondent différemment au cetuximab: la lignée Caco2 (30% d'inhibition de la survie, *TP53* muté) et la lignée DiFi (80% d'inhibition de la survie, *TP53* sauvage). Nous avons effectué des tests de cytotoxicité combinant le cetuximab et l'inhibition transcriptionnelle ou pharmacologique de p38 ou l'inhibition transcriptionnelle de p53. Nous avons également testé l'apoptose et la prolifération induite par le cetuximab en l'absence de la MAPK p38 ou de p53. Enfin nous avons testé l'expression des gènes *BIM*, *p27* et *PUMA* impliqués dans l'apoptose et la prolifération.

Dans cette étude, nous avons démontré que la MAPK p38 et p53 participent à l'effet cytotoxique du cetuximab dans les cellules DiFi. En revanche, dans les cellules Caco2, la MAPK p38 bloque partiellement l'effet du cetuximab. Nous avons également montré l'implication de p38 et p53 dans l'apoptose induite par le cetuximab et l'implication de p38 dans l'inhibition de la prolifération. La protéine p38 est impliquée dans la régulation de ERK et dans la localisation nucléaire de FOXO3a responsable de l'expression des gènes *BIM* et *p27*. Enfin, nous avons montré que p38 a également un rôle dans le mécanisme d'action d'inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR (lapatinib et erlotinib).

Pour conclure, nous avons déterminé que p38 et p53 sont impliquées dans le mécanisme d'action du cetuximab. Nous avons décrit l'implication de la voie p38-FOXO3a dans le mécanisme d'action du cetuximab. Enfin, p38 et p53 semblent être de bons biomarqueurs de réponse au cetuximab.