



HAL
open science

Étude des mécanismes de résistance au gefitinib dans le cancer du poumon non-à petites cellules : rôle des HDAC

Victor Jeannot

► **To cite this version:**

Victor Jeannot. Étude des mécanismes de résistance au gefitinib dans le cancer du poumon non-à petites cellules : rôle des HDAC. Sciences pharmaceutiques. 2012. dumas-00708589

HAL Id: dumas-00708589

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00708589>

Submitted on 21 Aug 2012

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : thesebum@ujf-grenoble.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2012

Thèse N°

**ETUDE DES MECANISMES DE RESISTANCE AU GEFITINIB
DANS LE CANCER DU POUMON NON A PETITES CELLULES :
RÔLE DES HDAC**

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Présentée par **Victor JEANNOT**

Né le 13 septembre 1983 à Neuilly sur Seine (92)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 05 juin 2012 à 18 heures

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Monsieur le Professeur Michel SEVE

Membres : Madame le Docteur Amandine HURBIN

Monsieur le Docteur Jean BRETON

Directeur de l'UFR : **M. Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2011 – 2012

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

BAKRI	AZIZ	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	René	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH) (Eméritat)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n= 3)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radios pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Directeur de l'UFR : **M. Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2011 – 2012

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n=35)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie – Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et Génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ – DELPORTE	Martine	Droit pharmaceutique
DEMEILLERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I./MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)

JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie – Mycologie Médicale (CIB / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP form Adjoint UJF, D.P.M)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
VAN NOOLEN	Laëtitia	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	Professeur Certifié

ATER (n=6)

BIROS Camille	ATER	Anglais Master ISM (JR)
DEFENDI Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
ELBAKKALI Abdellatif	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La Serve)
HENRI Marion	ATER	Physiologie (HP2,LER)
NGOTOM Esther	½ ATER	Pharmacologie (HP2,LER)
REGENT Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)

MONITEURS ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=8)

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN,ESRF)
CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

IBS : Institut de Biologie Structurale

JR : Jean Roget

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

LR : Laboratoire des Radios pharmaceutiques

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

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

Au Président du jury Mr Michel Seve:

Je vous remercie de m'avoir permis d'intégrer la filière recherche et « Biohealth computing European Master ». L'expérience ainsi retirée marquera à jamais mon futur parcours. Je vous assure de ma gratitude et vous exprime mon respect.

Au directeur de thèse, Madame le Docteur Amandine Hurbin,

Je te remercie de m'avoir permis d'intégrer l'Institut Albert Bonniot. Merci pour ton aide ta disponibilité et ton soutien qui me permettent d'avancer dans mes travaux. En espérant que nos démarches nous permettront de collaborer ensemble encore longtemps.

À Monsieur le Docteur Jean Breton,

Je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

Remerciements au personnel de l'Institut Albert Bonniot-Grenoble

Au Docteur Jean-Luc Coll, (Chef de l'équipe n° 5, Institut Albert-Bonniot, Grenoble)

Monsieur, je vous remercie de votre accueil au sein de l'équipe. Les mois passés m'auront permis de découvrir la recherche et de réaliser les travaux nécessaires à la réalisation de cette thèse d'exercice. Je vous remercie sincèrement pour la confiance que vous me témoignez pour la suite.

A tout les membres de l'équipe 2 et 5,

Je remercie tous les chercheurs, ingénieurs, techniciens, pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie Myriam pour tout son amour et pour l'équilibre qu'elle a su m'apporter. Merci pour sa compréhension, son aide et sa patience.

Merci à mes parents qui m'ont donné les clés pour devenir ce que je suis aujourd'hui. Merci pour leur soutien et pour l'aide qu'ils m'ont apporté aux cours de ces études.

Merci à mes frères Matthieu et Anatole pour leur présence. Pour tous les moments passés ensemble et les moments que nous avons encore à partager. Vous êtes mes deux piliers.

Merci à mes grands-parents. Des exemples qui me servent de guide et qui m'orientent.

Merci à Maya pour toutes nos conversations sur les Barbapapas et nos débats sur les lapins. Aux nombreux autres « coucou » au train sur les quais de gares.

A toute ma famille : Tantes, Oncles, Cousins, Cousines... Pour toute ces années passées ensemble.

Je remercie Michèle Guérin et Patrick Fillon sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui.

A mes amis : Jonas, Rémy, Mathias, Anne-Sophie, Riadh, Raphael, Daniel, Chop, Mat-Mat Pascal, Pierrot...

SOMMAIRE

Remerciements	VI
Sommaire	VIII
Liste des figures et tableaux	XII
Liste des abréviations	XV
INTRODUCTION	1
<u>PARTIE I</u> : GENERALITES SUR LE CANCER : EXEMPLE DU CANCER BRONCHIQUE	
1. DEFINITION DU CANCER	3
2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES ET FACTEURS DE RISQUE.....	4
2.1. Epidémiologie.....	4
2.2. Facteurs de risque.....	7
3. PHYSIOPATHOLOGIE DU PROCESSUS TUMORAL.....	9
3.1. Principales caractéristiques de la cellule transformée.....	9
3.2. Mécanismes de la transformation tumorale.....	12
3.2.1. Les oncogènes.....	12
3.2.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	14
3.3. APOPTOSE.....	15
3.3.1. Généralités.....	15
3.3.2. Les voies de signalisation apoptotiques.....	16
3.3.3. Les Cysteinyl aspartic acid-protease : caspases.....	20
3.3.4. Apoptose et cancer.....	22
4. CLASSIFICATION DES CANCERS DU POU MON.....	22
4.1. Classification histologique selon l’OMS.....	23
4.2. Classification pathologique TNM (pTNM) selon l’UICC.....	24
5. DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DU CANCER BRONCHIQUE NON A PETITES CELLULES	25

PARTIE II : LE RECEPTEUR A L'EGF ET LE CANCER DU POU MON

1. LA FAMILLE DE L'EGFR : LIGANDS ET MECANISMES D'ACTIVATION	29
1.1. Les ligands	31
1.2. Les mécanismes d'activation.....	32
2. LES FONCTIONS DE L'EGFR	35
2.1. Rôles physiologiques	35
2.2. Rôles dans la tumorigénèse pulmonaire.....	35
3. LES THERAPIES ANTI-EGFR DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON A PETITES CELLULES.....	38
3.1. Relation structure activité.....	39
3.2. Le gefitinib.....	40
3.2.1. Paramètres pharmacocinétiques.....	40
3.2.2. Etudes cliniques.....	41
3.2.3. Effets indésirables.....	43
3.3. L'erlotinib.....	43
3.3.1. Paramètres pharmacocinétiques.....	44
3.3.2. Etudes cliniques	44
3.3.3. Effets indésirables.....	45
4. LA REPONSE AU TRAITEMENT PAR EGFR-TKI.....	46
4.1. Les principaux marqueurs prédictifs de réponse au traitement.....	46
4.2. L'Amphiréguline et son rôle dans la résistance aux EGFR TKI.....	47
4.2.1. L'Amphiréguline et son rôle dans la tumorigénese.....	49
4.2.2. L'Amphiréguline et la résistance aux EGFR-TKI.....	51

PARTIE III : LES HISTONES DEACETYLASES

1. LES HISTONES ACETYLETRANSFERASES.....	55
2. LES HISTONES DEACETYLASES.....	56
2.1. Les histones déacétylases de classe I.....	56
2.2. Les histones déacétylases de classe II.....	59
2.2.1. La classe IIa.....	59
2.2.2. La classe IIb.....	61
2.2.2.1. HDAC6.....	61
2.2.2.1.1. Présentation générale	61
2.2.2.1.2. Les substrats.....	62
2.2.2.1.3. Rôle dans le cancer du poumon.....	63

2.2.2.1.4. Les inhibiteurs d'HDAC6.....	63
2.2.2.2. HDAC10.....	64
2.3. Les histones déacétylases de classe III	65
ETUDE DES MECANISMES DE RESISTANCE AU GEFITINIB DANS LES CANCERS BRONCHIQUES NON A PETITES CELLULES : IMPLICATION DES HISTONES DEACETYLASES	66
1. INTRODUCTION.....	67
2. MATERIELS ET METHODES.....	69
2.1. La culture cellulaire	69
2.2. Le traitement	69
2.3. La transfection	70
2.4. Mesure de prolifération de l'apoptose.....	70
2.5. Immunoblotting.....	71
3. RESULTATS.....	73
4. DISCUSSION.....	79
CONCLUSION.....	83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85
ANNEXES.....	97
ANNEXE I. Classification OMS des tumeurs épithéliales malignes pulmonaires.....	98
ANNEXE II. 7ème édition de la classification pathologique TNM	99
ANNEXE III. Référentiels de prise en charges des CBNPC	101

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

FIGURES

Figure 1. Histogramme du taux de mortalité standardisé en fonction du site tumoral en Union Européenne pour 100 000 personnes pour l'année 2007 (gris foncé) et du taux prédictif pour 2012 avec un intervalle de confiance de 95% (gris clair)	5
Figure 2. Évolution du nombre de cas et de décès par cancer du poumon chez l'homme et chez la femme de 1990 à 2011 en France	6
Figure 3. Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse: exemple des CBNPC	11
Figure 4. Les deux grandes voies apoptotiques.	18
Figure 5. Structure et mode d'activation des caspases	21
Figure 6. Structure des récepteurs ERBB.....	30
Figure 7. Les récepteurs de la famille ERBB	32
Figure 8. Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR	34
Figure 9. Présentation de la relation structure-activité des 4-anilinoquinazolines	39
Figure 10. Rôle de l'Amphireguline dans la tumorigénèse	50
Figure 11. Mécanisme de résistance induite au gefitinib dans les cellules de CBNPC H358....	53
Figure 12. Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDAC de classe I et II.....	56
Figure 13. Organisation des HDAC de classe IIa.....	60
Figure 14. Structure d'HDAC6	61
Figure 15. Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDACs de classe III	65
Figure 16. La TSA restaure la sensibilité au gefitinib dans les cellules de CBNPC	74
Figure 17. L'inhibition d'HDAC6 par siRNA ne restaure pas l'apoptose induite par gefitinib dans les cellules de CBNPC	76
Figure 18. L'inhibition d'HDAC6 par TA ne restaure pas l'apoptose induite par gefitinib	77

Figure 19. L'inhibition d'HDAC6 module les voies MAPK et PI3K 79

Figure 20. Rôle d'HDAC6 dans le mécanisme de résistance au gefitinib dans les cellules de CBNPC 83

TABLEAUX

Tableau 1. Cancer du poumon non à petites cellules – Fréquence et survie par stade..... 7

Tableau 2. Correspondance entre la classification TNM et les stades anatomiques..... 25

Tableau 3. Modalité thérapeutique de prise en charge du cancer du poumon non à petites cellules. 26

Tableau 4. Caractéristiques des différents inhibiteurs utilisés..... 69

Tableau 5. Anticorps utilisés pour la détection des protéines cibles après électrophorèse..... 72

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM	A disintegrin and metalloproteinase domain
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (ou Protein kinase B) and Survival against Taxotere
AMM	Autorisation de mise sur le marché
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
AREG	Amphireguline
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	Bcl2-antagonist of cell death
BAK	BCL2-antagonist/killer
BAX	Bcl2-associated X protein
BCL-2	B cell lymphoma protein 2
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson
BH1/2/3	Bcl-2 homology domain 1/2/3
BID	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Albumine de sérum bovin
BTC	Bétacelluline
CARD	Caspase activation recruitment domain
Caspase	Cysteinylnl aspartic acid-protease
CBNPC	Cancer bronchique non à petites cellules
CBPC	Cancer bronchique à petites cellules
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
CtBP	C-terminal binding protein
CYP450	Cytochrome P450
DD	Death Domain
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complex

EGF	Epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Récepteur de l'EGF)
EGFR-TKI	Inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR
EPR	Epiréguline
ERBB	v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (= EGFR)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase ½
FADD	Fas associated death domain
FHIT	Fragile histidine triad gene
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
HAT	Histone acetyl transferase
HB-EGF	Héparin binding EGF
HDAC	Histone déacétylase
HDACi	Inhibiteurs d'histone-déacétylase
HER	Human epidermal growth factor receptor (= EGFR)
HGF	Hepatocyte growth factor
HP1	Protéine hétérochromatine P1
H-RAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
IDEAL	Essai clinique: Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer
IGF1-(R)	Insulin-like growth factor type 1 (receptor)
INTEREST	Essai clinique: IRESSA Non-small-cell lung cancer Trial Evaluating REsponse
iPASS	Essai clinique: IRESSA Pan-ASia Study
ISEL	Essai clinique: Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer
KO	Knock-out
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Ku70	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEF2	Myocytes enhancer factor 2
MET	Met proto-oncogene tyrosine kinase
NaBu	Butyrate de sodium
NAD	Nicotine adénine dinucléotide
N-RAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
NRG	Neuréguline
OMS	Organisation mondiale de la santé
P16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
P53	Protein 53
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PKC	Protéine kinase de type C
PKC	Protéine kinase de type C
PS	Performance status
PTB	Phospho Tyrosine Binding
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RARβ	Retinoic acid receptor
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RASSF1	Ras association domain family member 1
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid, ou vorinostat (ZOLINZA [®])
SH2	Src Homology domain 2
SHC	Src homology 2 domain containing
SIRT	Sirtuines
SRC	Sarcoma, Rous sarcoma oncogene
SVF	Sérum de veau fœtal
TA	Tubastatine

TACE	TNF- α converting enzyme
TGF-α	Transforming growth factor-alpha
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1
TNM	Classification histologique "Tumor Node Metastasis"
TP53	Tumor protein 53
TSA	Trichostatin A
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

L'introduction de ce travail sera composée de trois parties permettant de situer le sujet et de rappeler les principales connaissances nécessaires à sa compréhension.

PARTIE I : GENERALITES SUR LE CANCER : EXEMPLE DU CANCER BRONCHIQUE

PARTIE II : LE RECEPTEUR A L'EGF ET LE CANCER DU POUMON

PARTIE III : LES HISTONES DEACETYLASES

PARTIE I : GENERALITES SUR LE CANCER : EXEMPLE DU CANCER BRONCHIQUE

Dans ce chapitre après une brève présentation du cancer, des données épidémiologiques ainsi que des facteurs de risque, nous décrirons les principales caractéristiques du processus tumoral en se concentrant sur le cancer du poumon. Nous utiliserons ensuite ces données physiopathologiques dans la suite de ce travail.

Enfin nous nous attacherons à présenter les différents sous-types de cancer du poumon ainsi que leur diagnostic et leur prise en charge.

1. DEFINITION DU CANCER

Le terme de tumeur provient de « tumor », qui en latin signifie gonflé. Le processus tumoral conduisant à la formation d'une tumeur est caractérisé par la **multiplication** de cellules tumorales qui se divisent par mitose. Cette prolifération se fait de manière **autonome** et échappe aux facteurs qui régulent normalement le renouvellement du tissu. Une autre spécificité de la tumeur est son **caractère expansif** : la tumeur a tendance à s'étendre de manière illimitée aux dépens du tissu dans le lequel elle a pris naissance. La composition du tissu tumoral est partagée entre les cellules tumorales à proprement dites, et le stroma correspondant aux cellules et substances extra-cellulaires qui accompagnent les cellules tumorales (tissu de soutien). Les cellules du stroma n'ont pas les lésions génétiques présentes dans les cellules tumorales et sont principalement constituées de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, d'un infiltrat de cellules immunitaires (macrophages, mastocytes et lymphocytes). Elles sont incluses dans une matrice extra-cellulaire.

2. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES ET FACTEURS DE RISQUE

2.1. Epidémiologie

Le cancer fait parti des maladies non-transmissibles, responsables d'un fort taux de mortalité dans le monde chaque année (WHO, 2010). Sur la période de 1980 à 2005 la France a connu une augmentation des cas de cancer de 89%. Cependant, sur la même période le nombre de décès n'a augmenté que de 13% (Belot, Velten et al. 2008).

En 2011, le nombre de nouveaux diagnostics de cancer en France métropolitaine a été estimé à 207 000 chez l'homme et 158 500 chez la femme. Chez l'homme, le cancer de la prostate reste de loin le plus fréquent (71000/207000 nouveaux cas de cancer en 2011), suivi du cancer du poumon (27500/207000 nouveaux cas de cancers en 2011) et du cancer colorectal (21500/207000 nouveaux cas de cancers en 2011). Le cancer du poumon est cependant premier en termes de mortalité dans cette population.

Chez la femme, le cancer du sein est le plus fréquent (53000/158500 nouveaux cas en 2011), suivi du cancer colorectal (19000/158500 nouveaux cas en 2011) et du cancer du poumon (12000/158500 nouveaux cas en 2011). Même si le cancer de sein reste en tête en termes de mortalité, l'augmentation constante de l'incidence du cancer du poumon ainsi que sa mortalité restent une préoccupation importante (InVS, 2011).

A l'échelle européenne, concernant la mortalité par cancer, les estimations pour l'année 2012 montrent une diminution de celle-ci toutes localisations confondues, à l'exception du cancer du poumon chez la femme (Figure 1) (Malvezzi, Bertuccio et al. 2012).

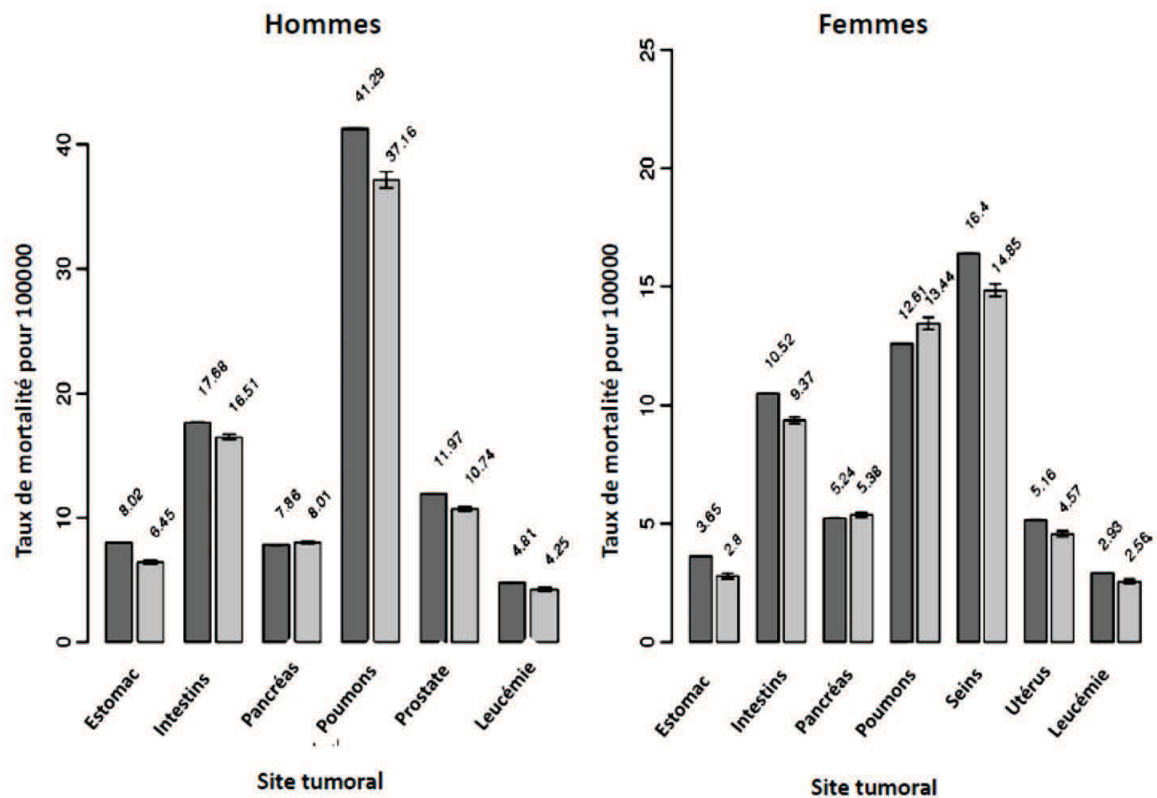


Figure 1. Histogramme du taux de mortalité standardisé en fonction du site tumoral en Union Européenne pour 100 000 personnes pour l'année 2007 (gris foncé) et du taux prédictif pour 2012 avec un intervalle de confiance de 95% (gris clair). Adaptée d'après (Malvezzi, Bertuccio et al. 2012).

A l'échelle mondiale, le cancer du poumon est aujourd'hui le premier en termes de mortalité et d'incidence avec 1,04 millions de nouveaux cas chaque année et 921000 décès imputables (Guessous, Cornuz et al. 2007). L'âge moyen du diagnostic est de 65 ans. Près de 85 % de ces cancers sont des formes dites « non à petites cellules » (CBNPC) qui représentent ainsi l'histologie prédominante (InCa, 2010).

En France en 2008, le cancer représentait la première cause de mortalité avec 30% des 543 139 décès enregistrés (Aouba, Eb et al. 2011). Il faut cependant noter des évolutions différentes de l'incidence ainsi que de la mortalité de ce cancer en fonction du sexe au cours des deux dernières décennies (Figure 2).

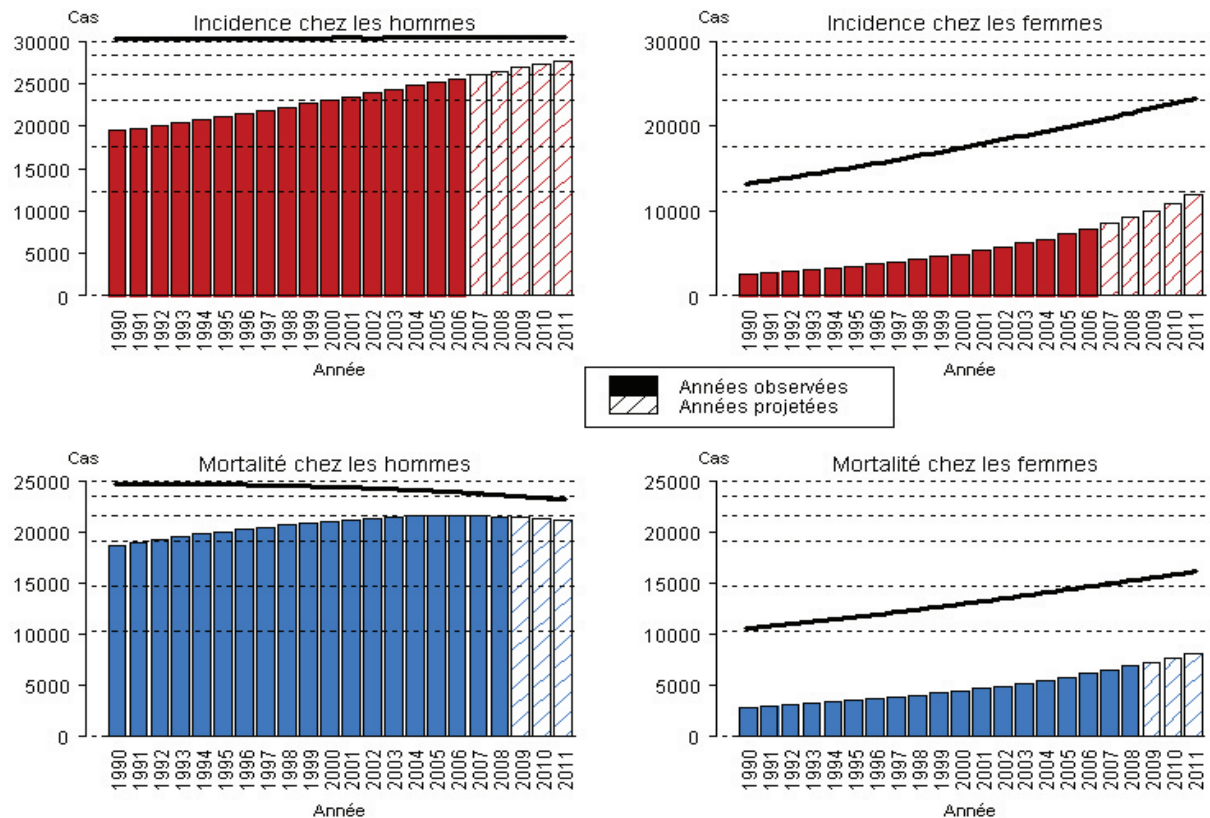


Figure 2. Évolution du nombre de cas et de décès par cancer du poumon chez l'homme et chez la femme de 1990 à 2011 en France. *Adaptée d'après (InVS 2011)*

Chez l'homme la mortalité par cancer du poumon a considérablement augmenté jusqu'en 1991 et diminue depuis de 0,9% par an, tandis qu'une augmentation constante de l'incidence et de la mortalité a été remarquée chez la femme depuis 2001 (Hill, Doyon et al. 2009). Ces données renforcent les préoccupations en termes de santé publique, d'autant que le taux de survie à 5 ans des patients atteints de cancer du poumon n'est que de 15% (Brambilla and Gazdar 2009). Ce faible taux de survie à 5 ans est lié au fait que le diagnostic de la maladie est posé à un stade avancé (Stade III/IV) dans plus de 50% cas (Lyrtzopoulos, Abel et al. 2012). A titre d'exemple les statistiques de la survie à 5 ans en fonction du stade de diagnostic des CBNPC sont présentées dans le Tableau 1 (INCa, 2010).

	Fréquence au diagnostic	Survie relative à 5 ans ¹
Cancer localisé Stades I et II	15 à 30 %	52,6 %
Cancer localement avancé Stade III	20 %	23,7 %
Cancer métastatique Stade IV	40 à 55 %	3,8 %

Tableau 1. Cancer du poumon non à petites cellules – Fréquence et survie par stade. (InCa , 2010).

2.2. Facteurs de risque

Divers facteurs de risque sont retrouvés dans les données épidémiologiques sur les cancers pulmonaires. La responsabilité de ces facteurs de risque dans le développement de cette pathologie est inégale, le tabagisme étant en tête.

2.2.1. Le tabac

De très nombreuses particules entrent dans la composition de la fumée de cigarette (Marcilla, Martinez et al. 2012). Ces particules sont responsables de nombreux dommages au niveau pulmonaire causés par le stress oxydatif qu'elles produisent lorsqu'elles sont en contact avec les poumons (Sangani and Ghio 2011).

Le lien de causalité entre la consommation de tabac et les cancers broncho-pulmonaires a été établi il y a de nombreuses années. En effet, le tabagisme est responsable à lui seul de plus de 90% des cancers broncho-pulmonaires. En France, 40,3 % des patients sont des ex-fumeurs et 52,5 % des fumeurs actifs au moment du diagnostic (Thiberville, Paris et al, 2004).

De plus, on observe que l'augmentation de l'incidence des cancers du poumon chez la femme est corrélée à l'augmentation du tabagisme dans cette population, tandis que la diminution de la consommation de tabac entraîne une diminution des cas chez l'homme (Eilstein, Uhry et al. 2008). La durée du tabagisme, la consommation cumulée, l'âge ainsi que la qualité du tabac

sont autant de facteurs à prendre en compte dans le développement des cancers pulmonaires. Chez certaines catégories professionnelles ou secteurs d'activité, la proportion de travailleurs tabagiques importante permet d'observer une augmentation du risque relatif de décès par cancer du poumon (Lauzeille, Marchand et al. 2010).

Hormis la consommation active de tabac, il est à noter que le tabagisme passif est responsable d'une élévation du risque de cancer bronchique de 20 à 30 % chez les conjoints de fumeurs (Zhong, Goldberg et al. 2000). Dans un tel contexte on comprendra facilement que la lutte contre le tabagisme, ainsi que le sevrage sont des enjeux majeurs en termes de prévention des cancers pulmonaires.

Toutefois ce bilan est à contraster. En effet seuls 10 à 20 % des fumeurs développent un cancer au niveau pulmonaire. Des facteurs génétiques jouent vraisemblablement un rôle dans la survenue de ce type de cancer (Brambilla and Gazdar 2009).

2.2.2. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle à des substances cancérigènes est la seconde cause de cancers bronchiques. Les agents mis en cause sont variables et leur implication dans le développement de la maladie peut être gradée en agents cancérigènes certains ou agents probablement cancérigènes. L'amiante, le nickel, le chrome, l'arsenic, les produits à base de pétrole ainsi que le radon sont fréquemment impliqués dans le développement de cancers bronchiques (Thiberville, Paris et al, 2004).

3. PHYSIOPATHOLOGIE DU PROCESSUS TUMORAL

Dans ce paragraphe nous présenterons les différentes étapes ainsi que les différents acteurs participant au développement tumoral. Pour illustrer ce processus et afin d'apporter une bonne compréhension des événements cellulaires, nous nous focaliserons sur le cancer bronchique non à petites cellules.

Notre étude portant sur les mécanismes de résistance à l'apoptose dans le CBNPC, nous détaillerons dans un deuxième temps ce processus cellulaire et développerons son rôle dans le cancer.

3.1. Principales caractéristiques de la cellule transformée

Pour se prévaloir d'un statut transformé une cellule doit posséder un certain nombre de caractéristiques. Six propriétés élémentaires vont en faire une cellule tumorale (Hanahan and Weinberg 2000) pour revue (Figure 3)

L'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance : une cellule normale ne peut pas proliférer en l'absence de signaux mitogènes. Dans le cas des cellules cancéreuses, cette dépendance est plus ou moins abolie. Cette propriété est généralement le fait de mutations génétiques sur les proto-oncogènes impliqués dans les voies de prolifération.

L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs : des gènes responsables de signaux antiprolifératifs permettent le contrôle de la prolifération des cellules normales. Dans le cas des cellules tumorales la délétion des allèles de ces gènes ou encore leur inactivation par mutation ponctuelle suppriment le blocage qui apparaît normalement lorsque les circonstances l'exigent.

L'acquisition d'une résistance à l'apoptose : cette propriété découle de la délétion ou de l'inactivation de gènes inducteurs de l'apoptose (Tumor Protein p53 : TP53) ou de l'expression de gènes inhibiteurs de l'apoptose tel que B-Cell lymphoma protein 2 (BCL2).

Le potentiel répliatif illimité : une cellule normale possède un potentiel répliatif limité. A l'inverse, les cellules tumorales possèdent un potentiel répliatif illimité. Le maintien des télomères par la télomérase en est le mécanisme principal.

La stimulation de l'angiogenèse : atteignant une certaine taille, la tumeur a besoin d'un réseau vasculaire pour subsister. L'angiogenèse permet l'obtention de ce réseau. Elle devient possible grâce à l'activation des voies de l'angiogenèse et l'inactivation des voies inhibitrices.

Phénotype invasif et métastasant : cette caractéristique est la conséquence de modifications des propriétés d'adhésion des cellules entre elles par inactivation des protéines d'adhésion, par expression d'enzymes protéasiques qui dégradent la matrice intercellulaire. Les cellules sont ainsi libres de quitter la tumeur et d'envahir l'organisme. Ce mécanisme est directement responsable de l'apparition de métastases.

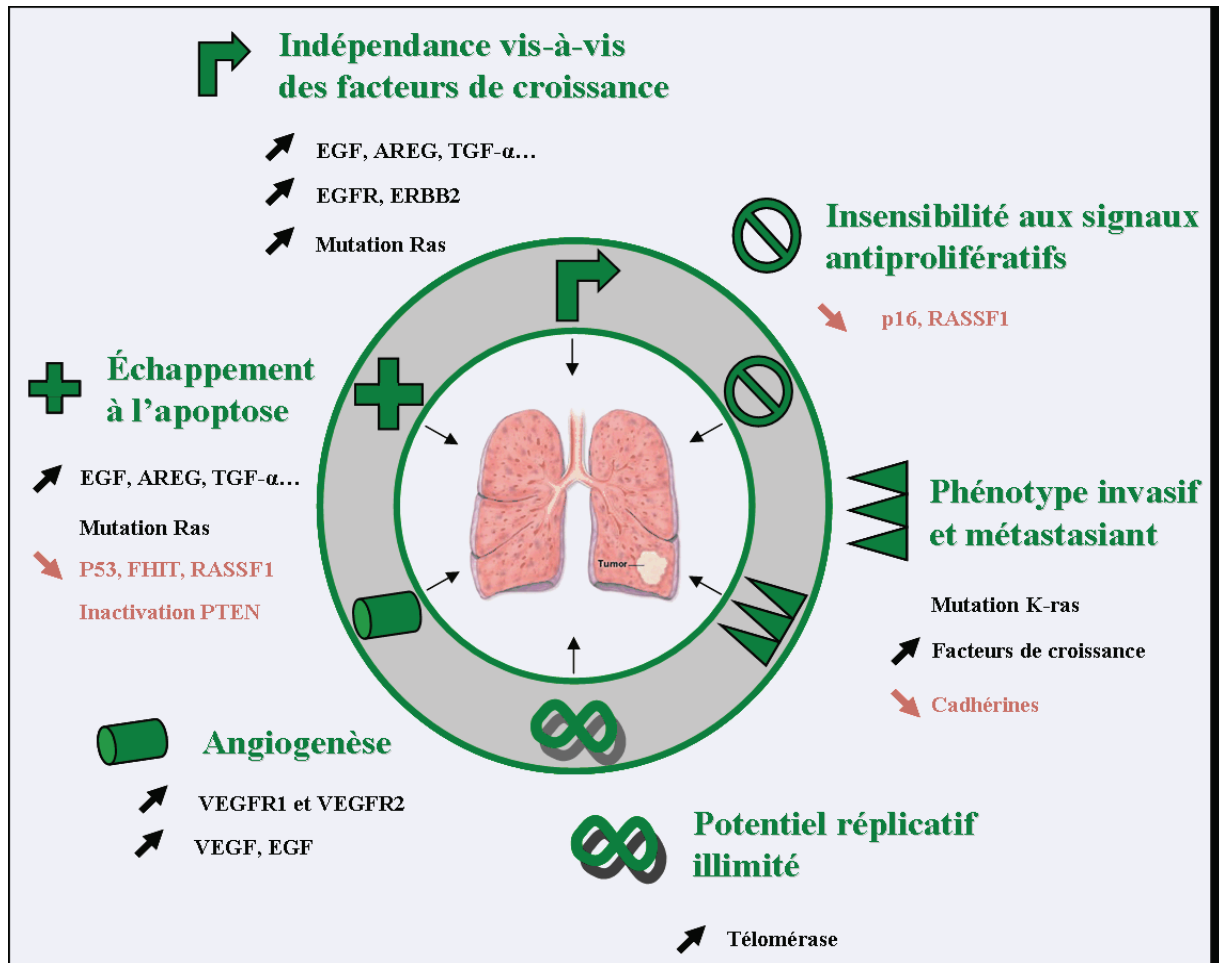


Figure 3. Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse: exemple des CBNPC. Il est suggéré que la plupart des tumeurs acquièrent le même ensemble de capacités fonctionnelles au cours de leur développement. En vert apparaissent les oncogènes, et en rouge les gènes suppresseurs de tumeurs. *Busser et al. adaptée d'après (Hanahan and Weinberg 2000).*

3.2. Mécanismes de la transformation tumorale

Le modèle de transformation cellulaire, d'une cellule normale en une cellule tumorale, est basé sur la notion d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur. Dans ce paragraphe nous allons présenter ces deux acteurs de la transformation cellulaire et leurs principaux représentants dans le CBNPC. Les principaux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur intervenant dans le CBNPC sont présentés et classés en fonction des propriétés qu'ils confèrent aux cellules dans la Figure 3.

3.2.1. Les oncogènes

Les oncogènes sont des versions altérées des proto-oncogènes normalement impliqués dans la prolifération ou la croissance cellulaire. Les oncogènes agissent sur le mode dominant et permettent à la cellule d'échapper aux mécanismes qui régulent sa prolifération.

La transformation d'un proto-oncogène en oncogène représente un gain de fonction par rapport à la cellule normale. Ceci les différencie de l'autre grande famille de gènes impliquée dans la transformation cellulaire, les gènes suppresseurs de tumeur, qui eux perdent leur fonction. Tout gène ayant un effet sur la prolifération, protégeant la cellule de l'apoptose et assurant sa survie, possédant des effets angiogéniques et facilitant la dissémination des cellules et l'apparition de métastases peut être considéré comme appartenant à cette famille (Sanchez-Cespedes 2003). La génération de ces oncogènes est la conséquence d'événements génétiques de plusieurs natures, dont les principaux sont les mutations ponctuelles, l'amplification génique (augmentation du nombre de copies d'un même gène entraînant généralement une augmentation du niveau de l'expression du gène), les anomalies chromosomiques (translocation), les défauts de régulation des niveaux d'expression génique ou encore l'insertion virale (Sanchez-Cespedes 2003). Parmi les principaux oncogènes on retrouve :

Les facteurs de croissance et stimuli extracellulaires :

Ces éléments jouent un rôle majeur dans la prolifération cellulaire. En effet ils permettent à une cellule normale de se diviser. En leur absence, la cellule normale ne peut pas entrer en division. De nombreuses cellules tumorales surexpriment des facteurs de croissance. On retiendra dans le cas du CBNPC les ligands de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) : Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor-alpha (TGF α) et l'Amphiréguline (AREG) (Sun, Behrens et al. 2009)

Les récepteurs membranaires :

Ce sont des récepteurs qui opèrent après la liaison de leur ligand une transduction de signal vers le cytoplasme. Une partie importante de ces récepteurs sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (Skorski 2002). Les événements à l'origine de leur activation dans la pathologie tumorale sont de trois types :

- les translocations chromosomiques (BCR-ABL translocation t(9-22) dans la leucémie myéloïde chronique) (Skorski 2012),
- les mutations ponctuelles (EGFR/ERBB1, activité constitutive capable d'induire la mitose sans fixation de son ligand) (Shigematsu, Lin et al. 2005),
- la surexpression du gène normal (surexpression de l'EGFR) (Garcia de Palazzo, Adams et al. 1993).

Les protéines des voies de signalisation :

Ces protéines interviennent dans la transmission du signal engendré par le récepteur après fixation de son ligand. La mutation de certaines de ces protéines peut entraîner l'activation de la voie signalisation. Un des exemples illustrant le mieux ce mécanisme est celui de la famille Rat sarcoma viral oncogene homolog (RAS) comprenant les gènes K-RAS, H-RAS and N-RAS (Barbacid 1987). Environ 30% des adénocarcinomes pulmonaires portent une mutation,

touchant dans 80% des cas K-RAS (Slebos and Rodenhuis 1992). Ils activent des voies de prolifération **Mitogen-Activated Protein Kinase** (MAPK), et des voies anti-apoptotiques Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI3K) (Downward 2003). Ces voies de signalisation sont sous la dépendance de l'EGFR. Elles nous intéresseront dans la suite de cette étude. K-RAS prédit la résistance au traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinase (Pao, Miller et al. 2005).

3.2.2. Gènes suppresseurs de tumeurs

Aussi appelés anti-oncogènes ils représentent une classe de gènes pour lesquels une perte d'expression normale est impliquée dans le développement d'une tumeur maligne (Comings 1973). Ces gènes sont responsables de régulation négative du cycle cellulaire et induisent l'apoptose. Dès lors leur inactivation va entraîner un dérèglement de ces mécanismes et une évolution tumorale. Contrairement aux proto-oncogènes une altération des 2 allèles est nécessaire à l'obtention d'une perte d'activité.

Comme pour les proto-oncogènes, les événements génétiques à l'origine de la perte de fonction peuvent être des mutations ponctuelles, des délétions, l'insertion.

Parmi les gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans les CBNPC on retrouve PTEN, P53, P16, FHIT, RASSF1, RAR β (Sanchez-Cespedes 2003).

Hormis les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur, on notera qu'une altération des deux allèles des gènes assurant le maintien de l'intégrité du génome (qui nous protègent des altérations génétiques provoquées par des agents toxiques ou rayons X, UV, hydrocarbures), entraîne une susceptibilité accrue aux cancers, par instabilité génétique (accumulation de mutations conduisant à l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation d'antioncogènes).

3.3. Apoptose

L'apoptose est essentielle à l'élimination des cellules mutées ou transformées. Dès lors il est impératif pour la cellule tumorale de développer des mécanismes lui permettant d'échapper à l'apoptose. L'échappement à l'apoptose est considéré comme une des caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg 2000). Nous décrirons dans ce paragraphe les principales étapes du processus apoptotique ainsi que les principaux acteurs et son rôle dans la pathologie tumorale.

3.3.1. Généralités

L'apoptose, ou suicide cellulaire, est une mort cellulaire programmée. Ce processus est hautement contrôlé par des mécanismes endogènes et exogènes. L'apoptose se traduit par une série de changements morphologiques comprenant, une rétraction cellulaire, une condensation cytoplasmique, une margination et condensation de la chromatine, puis une fragmentation nucléaire qui survient à un stade plus avancé. A un stade ultérieur, la cellule se morcelle et libère des corps apoptotiques (fragments de cytoplasme entourés de membrane plasmique et pouvant contenir de la chromatine) (Van Cruchten and Van Den Broeck 2002).

Le processus apoptotique est avant tout un processus physiologique. Il est impliqué, entre autres, dans la morphogenèse des doigts (Wood, Turmaine et al. 2000) dans la mise en place du système nerveux (Clarke, Posada et al. 1998) ou dans l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (renouvellement des kératinocytes de la peau) (Weil, Raff et al. 1999).

L'apoptose permettra aussi l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydatif ou oncogénique, par des altérations génétiques, par un choc thermique ou par des agents thérapeutiques cytotoxiques comme la chimiothérapie, l'irradiation aux rayons- γ ou l'immunothérapie (Kaufmann and Earnshaw 2000; Herr and Debatin 2001; Johnstone, Ruefli et al. 2002).

Concernant le cancer, l'apoptose intervient dans la réponse immune anti-tumorale qui permet l'élimination des cellules tumorales reconnues comme cellules du non-soi. Ce processus fait intervenir les lymphocytes T cytotoxiques (Barry and Bleackley 2002; Pinkoski and Green 2002; Catros-Quemener, Bouet et al. 2003)

Outre son intervention dans différents processus physiologiques et dans l'élimination des cellules altérées, l'apoptose peut être impliquée dans le développement de différentes pathologies par deux mécanismes.

- Un excès d'apoptose : peut provoquer des pathologies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Mattson 2004) ou la maladie de Parkinson (Tatton, Chalmers-Redman et al. 2003)

- Un déficit apoptose : peut favoriser la survie et la croissance de cellules anormales pouvant conduire au développement ou à la progression des tumeurs (Thompson 1995; Reed 1999).

3.3.2. Les voies de signalisation apoptotiques

Chez les mammifères, deux voies majeures de signalisation apoptotiques ont été décrites : la voie extrinsèque initiée par les récepteurs à domaine de mort, et la voie intrinsèque impliquant la mitochondrie.

La voie extrinsèque : Cette voie impliquée dans la réponse cellulaire immune (Ashkenazi and Dixit 1998) ou dans la réponse à un stress génotoxique (Micheau, Solary et al. 1999; Debatin and Krammer 2004) est aussi appelée voie des récepteurs de mort. Elle fait intervenir des récepteurs transmembranaires (TNF-R1, Fas/CD95/Apo-1/DR2, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5) appartenant à la famille des récepteurs au Tumor Necrosis Factor (TNF). Ces récepteurs possèdent une région intracytoplasmique appelée domaine de mort (DD pour Death Domain), qui permet le recrutement d'autres protéines et la propagation du signal de mort

(Ashkenazi and Dixit 1998; Bodmer, Holler et al. 2000; Peter and Krammer 2003).

L'activation de ces récepteurs se fait par leurs ligands respectifs et conduit à l'induction de l'apoptose. La fixation du ligand permet le recrutement par les domaines DD de la protéine adaptatrice Fas-Associated Death Domain (FADD). FADD, possède un domaine effecteur de mort (DED) au niveau de son extrémité N-terminale qui stimule le recrutement des caspases initiatrices -8 ou -10. Le complexe multiprotéique ligand, récepteur, FADD et caspase-8/-10 porte le nom de DeathInducingSignallingComplex (DISC). Le recrutement de la caspase 8 (ou caspase 10) au sein de DISC permet son activation par autoclivage. Ceci aura pour effet de provoquer le déclenchement de la cascade de caspases effectrices en aval.

La caspase 8 peut également cliver BH3 interacting domain death agonist (**BID** membre pro-apoptotique de la famille BCL2) (Li, Zhu et al. 1998). BID activé migre à la mitochondrie où, en s'associant avec BCL2-associated X protein (**BAX**, membre pro-apoptotique de la famille BCL2), elle active la voie intrinsèque mitochondriale (Yin 2000). Un résumé de ces évènements est présenté dans la Figure 4.

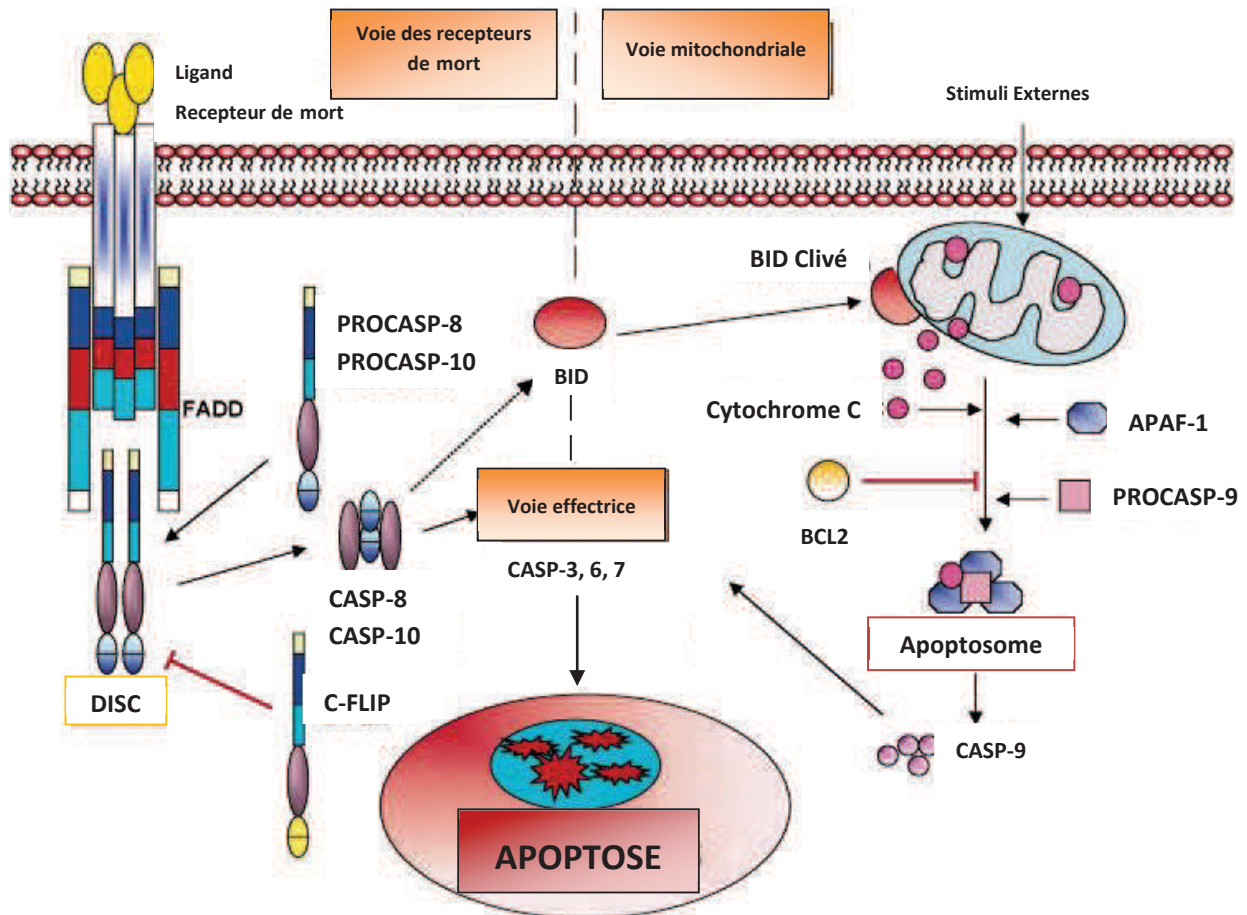


Figure 4. Les deux grandes voies apoptotiques. Deux voies alternatives conduisent à la mort cellulaire par apoptose. La voie extrinsèque passant par les récepteurs de mort et la voie intrinsèque mettant en jeu le relargage de facteurs proapoptotiques par la mitochondrie. L'activation de ces voies conduit à l'activation d'une voie effectrice commune. Dans la voie extrinsèque, des caspases initiatrices (-8 et -10 pour la voie extrinsèque et -9 pour la voie intrinsèque) sont activées en amont. Ces caspases initiatrices activent les caspases effectrices qui clivent à leur tour, différents substrats, induisant la mort cellulaire. Les deux grandes voies sont connectées par l'intermédiaire d'un membre proapoptotique de la famille BCL-2 (BID) et se rejoignent au niveau de l'activation de la caspase-3. *Adaptée d'après (Shivapurkar, Reddy et al. 2003).*

La voie intrinsèque mitochondriale : la voie mitochondriale fait intervenir des changements de perméabilité des membranes mitochondriales internes et externes.

Les modifications de perméabilité membranaire font appel aux protéines de la famille BCL-2 qui peuvent être pro-apoptotiques (BAX ou BCL2 homologous antagonist/killer **BAK**) ou anti-apoptotiques (BCL2) (Fesik 2005).

La survenue de divers événements intracellulaires (lésions de l'ADN, stress oxydant, choc thermique ou osmotique, lipides oxydés, calcium) provoque l'oligomérisation de **BAX** et **BAK**.

Le complexe s'insèrera dans la membrane mitochondriale pour former le pore de perméabilité transitoire. L'ouverture de ce pore conduit à la libération dans le cytoplasme de protéines mitochondriales. Le cytochrome *c* libéré par la mitochondrie s'associe avec la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) et la procaspase-9 pour former un complexe multiprotéique appelé apoptosome (Adrain and Martin 2001). Au sein de l'apoptosome, la procaspase-9 sera clivée. Ainsi activée, la caspase 9 va par clivage activer la caspase effectrice 3 à l'origine des dommages conduisant à la mort cellulaire (Riedl and Shi 2004) Figure 4.

Hormis le cytochrome *c*, la mitochondrie libérera aussi la protéine Apoptosis Inducing Factor (AIF) et l'endonucléase G (Susin, Lorenzo et al. 1999; Li, Luo et al. 2001) jouant un rôle dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Ces événements cellulaires induiront l'apoptose des cellules indépendamment des caspases.

Les membres de la famille BCL2 jouent un rôle clé dans le déroulement de cette voie mais aussi dans sa régulation. Cette famille comprend 20 membres contenant tous au moins un domaine BCL2 Homology (BH) (Cory and Adams 2002). Ces membres peuvent être regroupés selon leur activité anti-apoptotique (BCL2, BCL-XL, BCL-W, A1) ou pro apoptotique (**BAX**, BAK, Mtd/BokBik, BAD, BID et BIM).

Les facteurs anti-apoptotiques de la famille BCL2 empêcheront l'apoptose en formant des hétérodimères avec les membres pro-apoptotiques afin d'empêcher leur oligomérisation entre eux et donc leur insertion mitochondriale.

Hormis les membres anti-apoptotiques de la famille BCL2, d'autres protéines sont capables d'inhiber l'activité des membres pro-papoptotiques par interaction avec eux. Nous retiendrons pour la suite de ce travail l'interaction de la protéine « X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 » (**Ku70**) (Cohen, Lavu et al. 2004) avec BAX. Cette

interaction est responsable de la séquestration de BAX dans le cytosol, inhibant ainsi l'apoptose.

3.3.3. Les Cysteinyl aspartic acid-protease : caspases

Comme nous l'avons vu, les Cysteinyl Aspartic Acid-Protease (caspases) jouent un rôle clé dans le déroulement de l'apoptose. Elles sont caractérisées par trois domaines : une grande sous unité, qui porte le site actif (QACXG), une petite sous unité carboxyterminal et un prodomaine aminoterminal de taille variable permettant leur classement. Les caspases 1- 2- 4- 5- 8- 9- 10 portent un prodomaine long, tandis que les caspases 3-6-7 portent un prodomaine court (Stennicke and Salvesen 2000).

Ces protéases synthétisées sous forme de pro-caspases doivent être clivées au niveau de résidus aspartate pour générer une enzyme active. Ce clivage peut être le résultat d'une autoprotéolyse, de l'action d'une autre caspase ou encore de protéases avec une affinité pour ces résidus aspartate. (Creagh, Conroy et al. 2003).

On distingue deux groupes de caspases

- Les caspases initiatrices de l'apoptose (-2, -8, -9 et -10), qui portent un long prodomaine. Elle possèdent des motifs d'interaction protéine-protéine appelés « Caspase Activation and Recruitment Domain » (CARD) et des domaines effecteurs de mort « Death Effector Domain » (DED) aussi retrouvés chez les effecteurs activant les caspases (Earnshaw, Martins et al. 1999). Ces domaines jouent un rôle dans l'activation et la régulation des caspases.
- Les caspases effectrices (-3, -6, et -7) qui portent un prodomaine plus court sont responsables du « démantèlement » de la cellule (Creagh, Conroy et al. 2003).

L'activation des caspases passe par un double clivage de la procaspase au niveau de résidus aspartate. Après perte du prodomaine, deux grandes sous-unités vont pouvoir s'assembler en hétérodimères avec deux petites sous-unités, pour constituer la caspase active.

De façon générale, les caspases initiatrices sont capables de s'autoactiver et d'activer les caspases effectrices grâce à leurs domaines (Creagh, Conroy et al. 2003). De plus, certaines caspases effectrices, comme la caspase-3, sont capables en retour de cliver les caspases initiatrices, comme la caspase-9, suggérant l'existence d'une boucle d'autoamplification nécessaire au développement du processus apoptotique.

Une fois activées, les caspases vont cliver des substrats spécifiques. Cette protéolyse est responsable de modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques des cellules en apoptose (inactivation des protéines anti-apoptotiques, dégradation des protéines de structure, dégradation des protéines de jonction) (Adrain and Martin 2001).

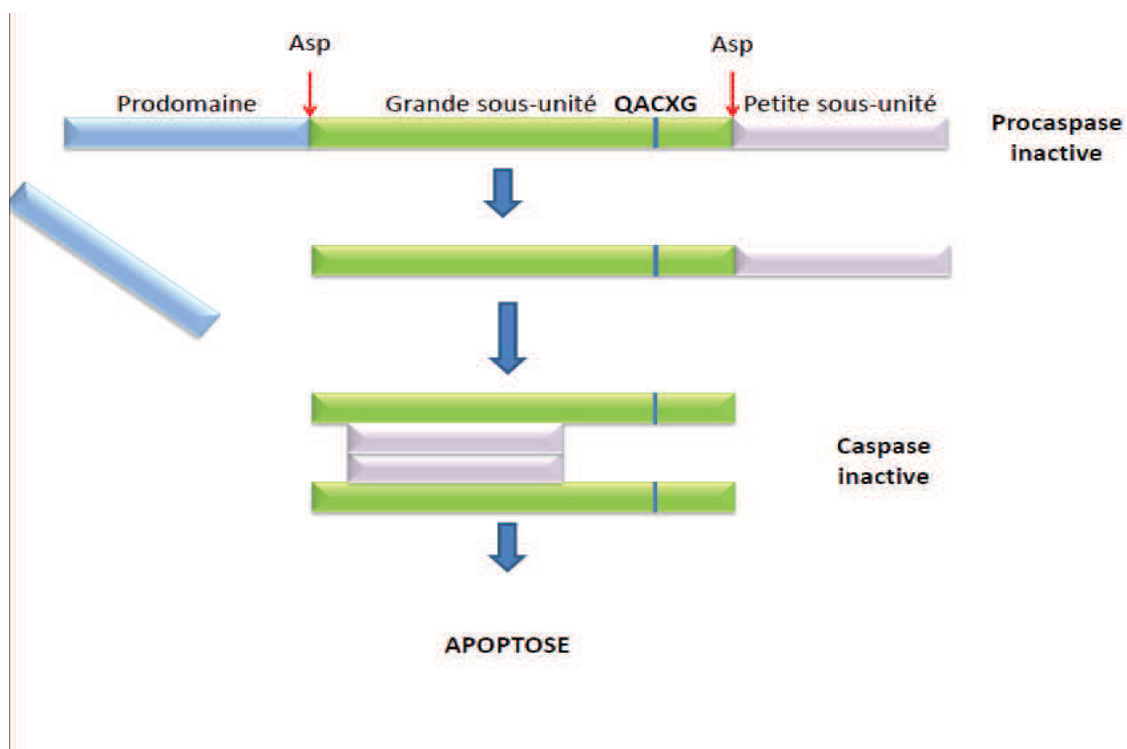


Figure 5. Structure et mode d'activation des caspases : Les procaspases sont constituées de trois parties : un prodomaine N-Terminal suivi d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité. Le site actif de l'enzyme (QACXG), se situe au niveau de la grande sous-unité. L'activation des caspases (auto-activation ou activation par les caspases effectrices) nécessite un clivage entre les deux sous-unités et l'élimination du prodomaine suivi de l'assemblage en hétérodimères qui vont former la caspase active. Les caspases sont des protéases hautement spécifiques qui clivent leurs substrats après un résidu aspartate (Asp).

3.3.4. Apoptose et cancer :

Comme nous l'avons décrit précédemment l'inhibition de l'apoptose est une étape clé dans le processus tumoral. Nous présenterons ici à l'aide d'un exemple (**P53**) le lien entre gène suppresseur de tumeur ou oncogène et inhibition de l'apoptose.

P53 joue un rôle prépondérant dans l'apoptose induite suite aux dommages irréparables de l'ADN produits par les agents cytotoxiques. En réponse à des stress génotoxiques, P53 subit des modifications post-transcriptionnelles. La protéine ainsi stabilisée va s'accumuler dans le noyau où elle régulera l'expression de divers gènes. Parmi ces cibles, on retrouve les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2 (BAX, BID, NOXA et PUMA) (Chipuk and Green 2006). En parallèle de ce mécanisme, P53 réalise l'activation de BAX au niveau du cytoplasme (Miyashita, Krajewski et al. 1994; Miyashita and Reed 1995). D'autre part, P53 possède un rôle inducteur pour APAF-1 et un rôle répresseur pour BCL2.

Dans un tel contexte nous comprendrons facilement que toute mutation du gène de la protéine P53 puisse provoquer un échappement de la cellule tumorale à l'apoptose.

4. CLASSIFICATION DES CANCERS DU POUMON

Il existe différentes classifications qui permettent de caractériser les cancers du poumon. Les deux organismes proposant une classification sont :

- L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : classification basée sur les caractéristiques histologiques de la tumeur.
- Union for International Cancer Control (UICC) : établissement de la classification TNM basée sur des caractéristiques pathologiques.

Depuis 2011, l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) propose une nouvelle classification spécifique des adénocarcinomes pulmonaires, ces derniers représentant

le type histologique le plus fréquemment rencontré (Travis, Brambilla et al. 2011). Ce travail s'inscrit dans la nécessité d'une approche pluridisciplinaire dans le diagnostic de la pathologie, notamment en prenant en compte les importantes avancées de ces dernières années dans la connaissance des adénocarcinomes bronchiques.

De telles classifications servent à choisir les protocoles thérapeutiques à mettre en place, à préciser le pronostic et à adapter la thérapeutique. Ces classifications permettent aussi la formation de groupes de malades homogènes utilisés lors d'études cliniques.

4.1. Classification histologique selon l'OMS

La classification de l'OMS est basée sur les résultats des examens anatomopathologiques. Elle permet de caractériser les différents cancers pulmonaires selon des critères histologiques simples, de manière à être reproductible et donc utilisable par tous les pathologistes (Beasley, Brambilla et al. 2005). Ces données seront ensuite associées et exprimées sous forme de grades de différenciation tumorale :

- GRADE I : tumeur peu différenciée
- GRADE II : tumeur moyennement différenciée
- GRADE III : tumeur fortement différenciée

Concernant les tumeurs pulmonaires, la classification de l'OMS de 2004 (Beasley, Brambilla et al. 2005) définit toutes les entités histologiques ainsi que les critères diagnostiques. Deux catégories de tumeurs malignes sont reconnues : les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC 15 à 25% des carcinomes broncho-pulmonaires) et les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC 75 à 85% des carcinomes broncho-pulmonaires) (Herbst, Heymach et al. 2008). Cette dernière catégorie est composée de plusieurs sous-types histologiquement définis (les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes, les carcinomes à grandes cellules) (ANNEXE I).

4.2. Classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC

La classification TNM (ANNEXE II) repose sur l'évaluation de 3 critères :

- T : taille de la tumeur primitive ou envahissement tissulaire local
- N : atteinte locorégionale ganglionnaire (« Nodes »)
- M : présence ou absence de métastase à distance

Elle permet d'apprécier le stade histopathologique d'extension d'une tumeur (pTNM) grâce à des examens anatopathologiques de la pièce tumorale et des ganglions, ainsi que des examens d'imagerie obtenus lors du bilan d'extension. Elle associe donc des éléments microscopiques et macroscopiques.

Contrairement à la classification OMS basée uniquement sur des critères du site primaire de la tumeur, la classification pTNM intègre l'atteinte tumorale à échelle de l'organisme.

Dans le but de simplifier son utilisation, les catégories peuvent être regroupées, ce qui donne lieu à une classification par stade anatomique. (Tableau 2)

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

	N0	N1	N2	N3
T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
T3	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
T4	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
M1		IV	IV	IV

Tableau 2. Correspondance entre la classification TNM et les stades anatomiques. *Adapté d'après (Goldstraw, Crowley et al. 2007).*

Cette classification a évolué au fil des années. Sa 7^{ème} édition datant de 2009 a permis de réviser la distribution des sous-groupes, de créer de nouveaux sous-groupes permettant une meilleure approche des données épidémiologiques. En effet, la comparaison de ces données basées sur la 6^{ème} édition et celles basées sur la 7^{ème} édition a permis de mettre en évidence des différences significatives, notamment en terme de survie (Klikovits, End et al. 2011), grâce à une meilleure caractérisation des atteintes néoplasiques des patients.

5. DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DU CANCER BRONCHIQUE NON A PETITES CELLULES

Les signes cliniques rencontrés chez les patients atteints de cancers ne sont pas constamment présents et sont non spécifiques de la pathologie cancéreuse pulmonaire. Sa découverte peut quelques fois se faire de manière fortuite au cours d'examens médicaux ou biologiques. Le diagnostic de cancer fait appel à des techniques d'imageries (radiodiagnostic, imagerie

nucléaire), ainsi qu'à la biologie (marqueurs tumoraux...). Ce sont les résultats des examens anapathologiques qui confirmeront le diagnostic.

Le traitement des CBNPC dépend tout d'abord du type histologique (classification OMS) ainsi que de la classification pTNM d'extension de la maladie. La prise en charge des CBNPC peut s'appuyer sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie. L'association ou non de ces traitements dépend du stade de la maladie (Tableau 3). Cependant d'autres critères tels que l'âge du patient, l'état général du patient (évalué par le score de performance (PS)), l'état de la fonction cardiaque, respiratoire ou encore rénale doivent être pris en compte dans la stratégie thérapeutique (InCa, 2010).

	Tnm	Chirurgie	Radiothérapie	Chimiothérapie ou thérapie ciblée
Stade IA	T1 N0	☑		
Stade IB	T2 N0	☑		○
Stade II	T1,2 N1 T3 N0	☑	○	☑
Stade I ou II Non opérable			☑	○
Stade IIIA	T3 N1	☑	○	○
	T1,3 N2	○	○	○
	T4 N0,1		☑	☑
Stade IIIB	Tous T, N3		☑	☑
	T4, N2		☑	☑
Stade IV ^B	Tous T, N, M1			☑

☑ Modalité thérapeutique de référence, systématique (sauf si contre-indication) ;

○ Selon les situations : peut être parfois envisagée, en association au traitement de référence.

Tableau 3. Modalité thérapeutique de prise en charge du cancer du poumon non à petites cellules.
(InCa, 2010).

La chirurgie :

La chirurgie est à l'heure actuelle le traitement des cancers bronchiques le plus efficace (Martini 1990; Shields 1993; Parente Lamelas, Abal Arca et al. 2012). Elle concerne environ un patient sur quatre. En fonction des cas on retrouve :

La lobectomie pour les cancers périphériques de stade N0 ou N1. Les résections limitées à moins d'un lobe sont considérées comme insuffisantes.

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

La radiothérapie :

La radiothérapie a montré son efficacité dans le traitement des CBNPC (Dautzenberg and Choukroun, 1998). Plusieurs indications sont envisageables :

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

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

La chimiothérapie anti-cancéreuse :

Son action systémique en fait un traitement de choix pour les cancers non opérables, dans les maladies disséminées ou à haut risque de dissémination.

La sensibilité à ces traitements varie de façon très importante en fonction du type histologique de la tumeur avec un taux de réponse moyen de l'ordre de 30% (Vignot and Besse 2007). De manière générale ces traitements présentent une forte toxicité. Dès lors, avant leur utilisation, le rapport entre la toxicité et le bénéfice attendu pour un patient doit être examiné.

La monochimiothérapie n'a que peu d'intérêt. Ces thérapeutiques anticancéreuses sont généralement associées au sein de protocoles de polychimiothérapie. Les molécules utilisées ont des mécanismes d'action différents.

Actuellement le traitement standard est une bithérapie associant un sel de platine, cisplatine (CISPLATYL®) ou carboplatine (PARAPLATINE®), à :

- La vinorelbine (NAVELBINE®) si une cure de radiothérapie concomitante est prévue,
- La gemcitabine (GEMZAR®) ou du paclitaxel (TAXOL®) en absence de radiothérapie (Schiller, Harrington et al. 2002).

De nombreux autres protocoles existent et permettent une prise en charge adaptée du patient.

Outre ces thérapies conventionnelles une nouvelle famille de molécules appelée « thérapies moléculaires ciblées" a vu le jour ces dernières années. Ces traitements ciblent spécifiquement les voies responsables de la croissance, de la prolifération ou encore de l'angiogenèse tumorale et épargnent le tissu sain. L'utilisation de ces nouveaux médicaments permet d'améliorer les taux de réponse et la survie (Vignot and Besse 2007).

Dans le traitement du CBNPC nous retiendrons l'utilisation bevacizumab (AVASTIN®) qui agit sur l'angiogenèse tumorale. Le bevacizumab (AVASTIN®) est un anticorps monoclonal anti-VEGF, utilisé dans le cancer bronchique en association avec une chimiothérapie par paclitaxel-carboplatine (Reck and Crino 2009; Stinchcombe and Socinski 2009).

L'EGFR, qui sera présenté dans la Partie II, est également une des cibles des thérapies moléculaires ciblées. Les traitements ciblant l'EGFR sont aujourd'hui utilisés dans les CBNPC. En effet aujourd'hui le gefitinib est indiqué en première intention chez les patients porteurs de mutations activatrices de l'EGFR dans le CBPNC. Cette classe thérapeutique sera détaillée dans la Partie II.

PARTIE II : LE RECEPTEUR DE L'EGF ET LE CANCER DU POUMON

L'EGFR joue un rôle prépondérant dans la prolifération cellulaire, la survie ou la migration, en faisant ainsi un oncogène majeur. Dès lors ce récepteur constitue une cible thérapeutique privilégiée en cancérologie, et notamment dans les cancers broncho-pulmonaires.

Dans ce chapitre, après une présentation de la famille de l'EGFR, des ligands et des mécanismes d'activation, nous détaillerons ses fonctions biologiques et son implication dans le développement tumoral. Sur la base de ces informations, nous présenterons ensuite les thérapies ciblant l'activité tyrosine kinase du récepteur et les mécanismes de résistances à ces traitements.

1. LA FAMILLE DE L'EGFR : LIGANDS ET MECANISMES D'ACTIVATION

L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDaltons à activité enzymatique de type tyrosine kinase faisant partie des récepteurs de la famille Human Epidermal growth factor Receptor (HER), encore appelé ERBB. Ces récepteurs jouent un rôle dans des processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, le contrôle du métabolisme cellulaire, la migration et la survie cellulaire. Chez les mammifères, cette famille comprend quatre récepteurs: ERBB1/HER1 ou EGFR, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 et ERBB4/HER4.

L'EGFR fut le premier représentant de cette famille découvert (Carpenter, King et al. 1978).

Les récepteurs ERBB sont composés de trois domaines (Figure 6) :

- un domaine extracellulaire de 621 acides aminés contenant le site de liaison pour le ligand (Warren and Landgraf 2006). Ce domaine extracellulaire est composé de 4 sous-domaines (I à IV) répétés 2 à 2, se succédant en alternance. Les domaines I et III,

sont analogues à ceux de l'Insulin-like Growth Factor type-1 Receptor (IGF1-R) et sont le siège de la fixation du ligand, d'où leur dénomination L1 et L3.

- un domaine intracellulaire (ou cytoplasmique) de 542 acides aminés. Ce domaine contient le **domaine catalytique tyrosine kinase** très conservé entre les différents récepteurs de la famille ERBB (59 à 81% d'homologie), un **domaine juxta-membranaire** et une **longue queue C-terminale** (Burgess, Cho et al. 2003).

Le domaine juxta-membranaire joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité des récepteurs ERBB (Wells 1999).

La queue c-terminale possède d'une part cinq sites de phosphorylation liant spécifiquement les protéines contenant les domaines SH2 (SrcHomologydomain 2) ou PTB (PhosphoTyrosineBinding), au moins trois motifs d'internalisation, et également des sites pour l'activation protéolytique et la dégradation (Wells 1999).

- Un domaine transmembranaire hydrophobe de 24 acides aminés (Wells 1999).

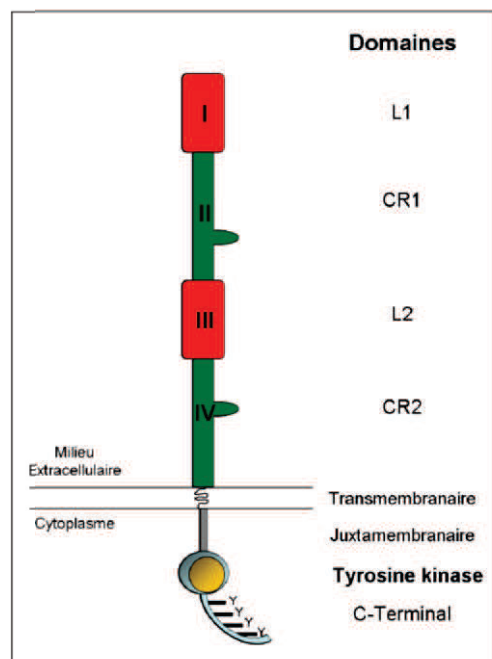


Figure 6. Structure des récepteurs ERBB : Les récepteurs ERBBs comportent une partie extracellulaire composée de 4 domaines, homologues deux à deux, (les domaines L1 et L2 (I et III), sont le siège de la fixation du ligand). On retrouve ensuite un domaine transmembranaire, un domaine juxtamembranaire suivi du domaine tyrosine kinase et le domaine C-terminal qui peut être phosphorylé sur plusieurs résidus tyrosine (Y). *Adaptée d'après (Burgess, Cho et al. 2003).*

1.1. Les ligands (Figure 7)

Les récepteurs de la famille ERBB sont activés par fixation de leurs ligands. Ces ligands, au nombre de douze, ont en commun de tous contenir une séquence EGF-like (Holbro and Hynes 2004). Ce sont de petits polypeptides d'environ 55 acides aminés qui sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires et qui seront ensuite clivés par protéolyse (Massague and Pandiella 1993). Cette protéolyse est réalisée par des métalloprotéases appartenant aux familles A Disintegrin and Metalloproteinase domain (**ADAM**), en réponse à divers stimuli. On retiendra ADAM 17, encore appelé TACE, qui permet la libération de l'AREG (Duffy, McKiernan et al. 2009).

Ces douze ligands sont regroupés en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs de la famille ERBB (Beerli and Hynes 1996). Dans le premier groupe on retrouve l'EGF, le TGF- α et l'AREG qui se lient spécifiquement à l'EGFR. Dans le second groupe les ligands (Betacelluline (BTC), l'Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF) et l'Epiréguline (EPR)) se lient à l'EGFR et à ERBB4. Enfin le troisième groupe de ligands comprend les neurégulines (NRG). Il est divisé en deux sous-groupes selon leur capacité à se lier d'une part à ERBB3 et ERBB4 (NRG-1 et NRG-2) ou seulement à ERBB4 (NRG-3 et NRG-4) (Hynes and Lane 2005). A l'heure actuelle aucun ligand du récepteur ERBB2 n'a pu être identifié (Citri, Skaria et al. 2003).

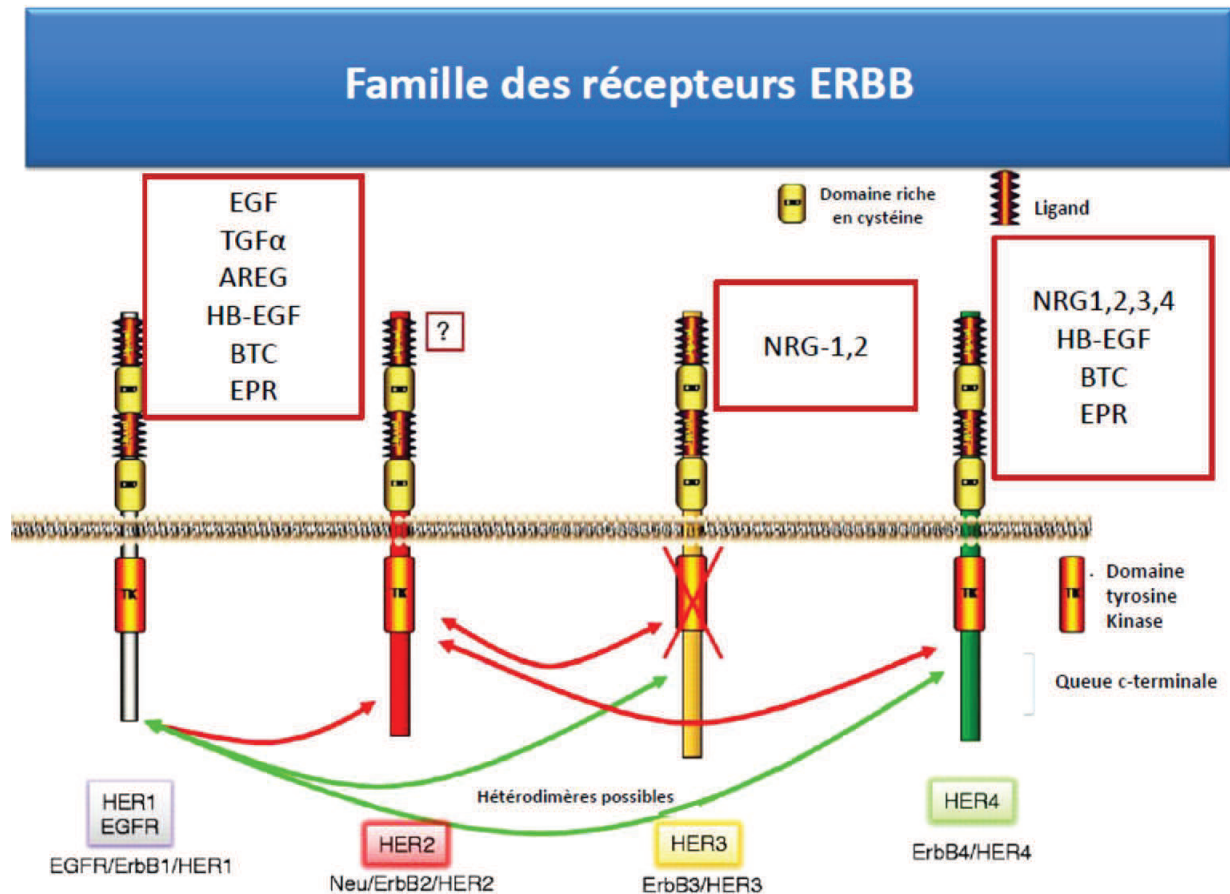


Figure 7. Les récepteurs de la famille ERBB. La famille des récepteurs ERBB regroupe 4 récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, EGFR, ERBB2, ERBB3 et ERBB4. La liaison des ligands induit la formation d'homodimères et d'hétérodimères. *Adaptée d'après (Cooper, Vlotides et al. 2011).*

1.2. Les mécanismes d'activation

L'activation des récepteurs ERBB se fait par dimérisation en présence de leurs ligands. La fixation du ligand va permettre l'association de deux monomères inactifs en un dimère actif. On distingue plusieurs types de dimères : ceux résultant de l'association de deux sous-unités de même nature appelée homodimère, et les hétérodimères résultant de l'association de deux monomères différents. Le nombre de dimères possibles, ainsi que le nombre de ligands existants, offrent une grande variété de signaux cellulaires.

L'activité biologique résulte de l'activité tyrosine kinase intracellulaire du récepteur. La dimérisation de ces derniers permet l'autophosphorylation des résidus tyrosine au niveau de

leur extrémité C-terminale (Olayioye, Neve et al. 2000). L'autophosphorylation des tyrosines des récepteurs ERBB est importante pour le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs. Les effecteurs recrutés sont de nature protéique, et peuvent être des protéines adaptatrices (SHC, CRK, GRB2) ou des kinases (SRC). Ces protéines grâce à leurs domaines SH2 ou PTB se lient au site d'autophosphorylation des récepteurs ERBB où elles seront à leur tour phosphorylées. De là va se produire, *via* une cascade phosphorylation, l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaire (Olayioye, Neve et al. 2000).

Parmi les différentes voies induites, les principales sont la voie RAS/MAPK et la voie des PI3K (Hynes and Lane 2005) (Figure 8). Dans la suite de ce travail nous étudierons leur rôle dans la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR.

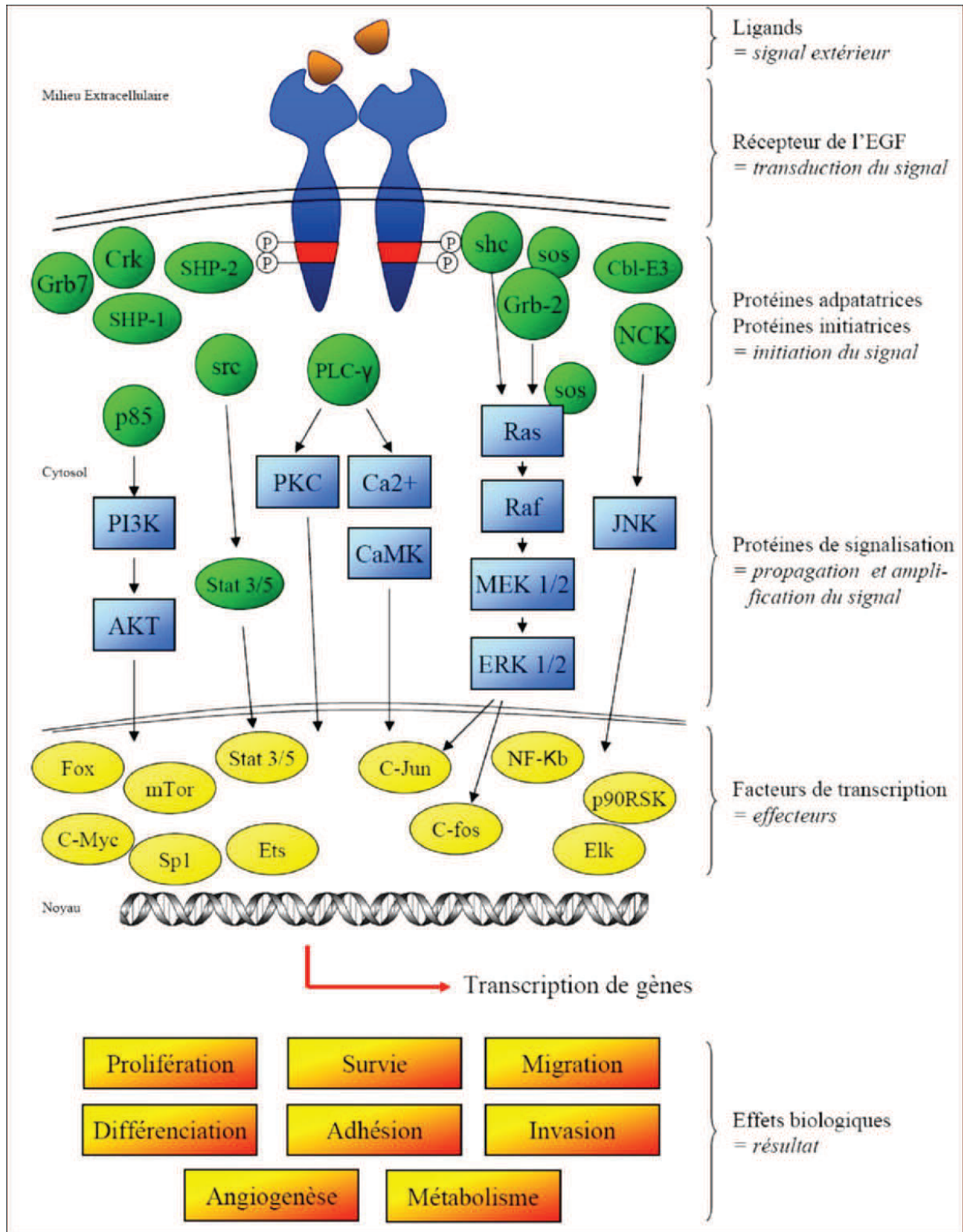


Figure 8. Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR.

Adaptée d'après (Busser, Sancey et al. 2011).

2. LES FONCTIONS DE L'EGFR

2.1. Rôles physiologiques

Comme décrit précédemment, l'activation des voies de signalisation va permettre le recrutement de nombreux facteurs de croissance impliqués dans la différenciation, la croissance ou encore le contrôle du métabolisme cellulaire. Des effets anti-apoptotiques ont également pu être mis en évidence (Normanno, De Luca et al. 2006) (Figure 8).

D'autre part, il a été montré qu'une perte de L'EGFR entraîne une mort embryonnaire ou périnatale avec des malformations dans divers organes tels que le cerveau, la peau, les poumons, les intestins (Olayioye et al 2000). Hormis son rôle dans le développement embryonnaire, l'EGF et son récepteur interviennent dans le renouvellement de cellules souches des tissus normaux tels que le foie, la peau ou les intestins.

Grâce à l'utilisation de souris Knock Out (KO), les rôles de l'EGFR dans le développement embryonnaire et dans la physiologie de l'adulte ont pu être mis en lumière. Une telle délétion provoque un retard du développement embryonnaire et un taux de mortalité élevé. Les nouveau-nés meurent alors souvent de problèmes respiratoires entre 8 et 21 jours. Ils présentent des signes de prématurité, des dysfonctionnements cérébraux, ainsi que de nombreuses anomalies épithéliales de la peau, des poumons, du tractus gastro-intestinal et des reins (Miettinen, Berger et al. 1995; Sibilio and Wagner 1995; Threadgill, Dlugosz et al. 1995).

2.2. Rôle dans la tumorigénèse pulmonaire

Etant impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que dans la motilité, on comprendra facilement que tout déséquilibre dans le système EGFR/ligand entraînant une augmentation du signal peut conduire à une transformation néoplasique.

L'EGFR contribue au développement tumoral *via* ces effets sur la progression dans le cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'induction de l'angiogénèse (Herbst and Bunn 2003). Des dérégulations du système EGFR sont fréquemment retrouvées dans différentes formes de cancer humain (Prenzel, Fischer et al. 2001; Arteaga 2002).

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la dérégulation de l'EGFR:

La surexpression des ligands (tel que le TGF α , l'EGF, l'AREG). Ces ligands sont surexprimés de manière autocrine par la tumeur aboutissant à une activation constitutive du récepteur (Salomon, Brandt et al. 1995). Ce mécanisme est retrouvé dans un grand nombre de tumeurs solides, y compris le poumon (Umekita, Ohi et al. 2000).

La surexpression de l'EGFR :

Près de 60 à 80% des CBNPC surexpriment l'EGFR à la surface des cellules (Garcia de Palazzo, Adams et al. 1993; Rusch, Baselga et al. 1993). Cette surexpression peut être due à une amplification génique ou encore à des modifications post-traductionnelles. Ce mécanisme engendrera une prolifération et une migration cellulaire incontrôlées. La relation entre la surexpression de l'EGFR et l'agressivité tumorale, a pu être mise en évidence dans de nombreux cancers comme les CBNPC, les cancers de la tête et du cou, du sein, de la vessie, de l'ovaire (Velu 1990; Strawn and Shawver 1998). Il a été montré que dans le cancer du poumon non à petites cellules la surexpression de l'EGFR est associée à une plus grande incidence des métastases ganglionnaires et à un mauvais pronostic (Volm, Drings et al. 1993; Hirsch, Varell-Garcia et al. 2003).

Des mutations de l'EGFR :

Des mutations du gène de l'EGFR dans les cancers humains sont retrouvées de façon fréquente. Ces mutations peuvent toucher le domaine extracellulaire, le domaine intracellulaire et des mutations dans le domaine tyrosine kinase.

Dans le cas du cancer du poumon, deux mutations fréquentes affectent la région codant pour le domaine à activité tyrosine kinase. Ces mutations consistent en une délétion touchant la séquence conservée de 4 acides aminés LREA dans l'exon 19 et la séquence L858R de l'exon 21 (Pao and Miller 2005; Shigematsu, Lin et al. 2005; Shigematsu, Takahashi et al. 2005). Ces mutations conduisent à une autophosphorylation du récepteur et ainsi une activation constitutive de ce dernier (Greulich, Chen et al. 2005; Okabe, Okamoto et al. 2007). Des mutations activatrices de la tyrosine kinase de l'EGFR ont été décrites dans 16% des adénocarcinomes.

L'hétérodimérisation EGFR :

Comme décrit précédemment, les récepteurs de la famille ERBB peuvent former des hétérodimères comme EGFR et ERBB2 par exemple. En comparaison des autres combinaisons possibles cet hétérodimère semble posséder la plus grande capacité à induire la transformation cellulaire et la mitose (Zandi, Larsen et al. 2007). Un hétérodimère EGFR/IGF1-R a été décrit comme étant impliqué dans la résistance aux traitements anti-EGFR (Morgillo, Woo et al. 2006)

La régulation défectueuse de l'EGFR :

Une signalisation aberrante de l'EGFR, due à des altérations des mécanismes de régulation, est liée à la transformation cellulaire. La régulation de l'EGFR est un mécanisme par lequel la signalisation de l'EGFR est atténuée. Elle implique l'internalisation et la dégradation du récepteur. Le domaine cytosolique possède des sites de liaison spécifiques à la protéine c-Cbl. Cette protéine se lie aux sites spécifiques phosphorylés et permet ainsi la dégradation lysosomale du récepteur. La perte des domaines de liaison de cette protéine entraîne un défaut du recyclage de l'EGFR (Zandi, Larsen et al. 2007).

3. Les thérapies anti-EGFR dans le cancer bronchique non à petites cellules : EGFR-TKI

L'implication de l'EGFR dans la tumorigénèse en fait une cible thérapeutique de choix pour le traitement des cancers.

Les études réalisées dans le but de développer des thérapies ciblant l'EGFR ont permis la mise sur le marché de deux familles thérapeutiques :

- Les anticorps monoclonaux, représentés par le cetuximab (ERBITUX®) et le panitumumab (VECTIBIX®), qui inhibent de façon compétitive la fixation du ligand. N'ayant pas d'indication dans le cancer du poumon cette famille ne sera pas présentée.
- Les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI), représentés par le gefitinib (IRESSA®) et l'erlotinib (TARCEVA®) qui inhibent l'activité tyrosine kinase du récepteur.

Les EGFR-TKI bloquent de façon réversible ou irréversible la fixation de l'ATP au sein de la poche à ATP du récepteur. L'ATP est utilisé par le récepteur comme cofacteur fournisseur de groupements phosphate dans l'étape de phosphorylation des différents substrats. Les EGFR-TKI empêchent donc la phosphorylation de l'EGFR et les cascades de phosphorylation en aval.

Ce travail portant sur les mécanismes de résistance aux EGFR-TKI, nous présenterons les deux représentants de cette famille (gefitinib, erlotinib), puis les mécanismes de résistance à ces traitements passant par l'AREG.

3.1. Relation structure activité

L'inhibition des récepteurs ERBB en tant qu'approche thérapeutique dans le cancer a été proposée il y a 15 ans. Lors des premiers travaux menés sur l'inhibition de ERBB1, la plupart des composés chimiques développés ne présentaient qu'une faible spécificité pour le récepteur et une faible activité antitumorale (Lawrence and Niu 1998; Fry 2003).

L'identification du pharmacophore 4-anilinoquinazoline fut une réelle avancée en termes d'activité et de spécificité (Ward, Cook et al. 1994). En effet des études *in vitro* permirent de démontrer la capacité du pharmacophore à inhiber l'activité tyrosine kinase de l'EGFR ainsi que la prolifération cellulaire (Ward, Cook et al. 1994). Par la suite des études de relation structure/activité du noyau quinazoline permirent d'améliorer les propriétés physico-chimiques, l'activité pharmacologique et de réduire l'instabilité métabolique (Figure 9)

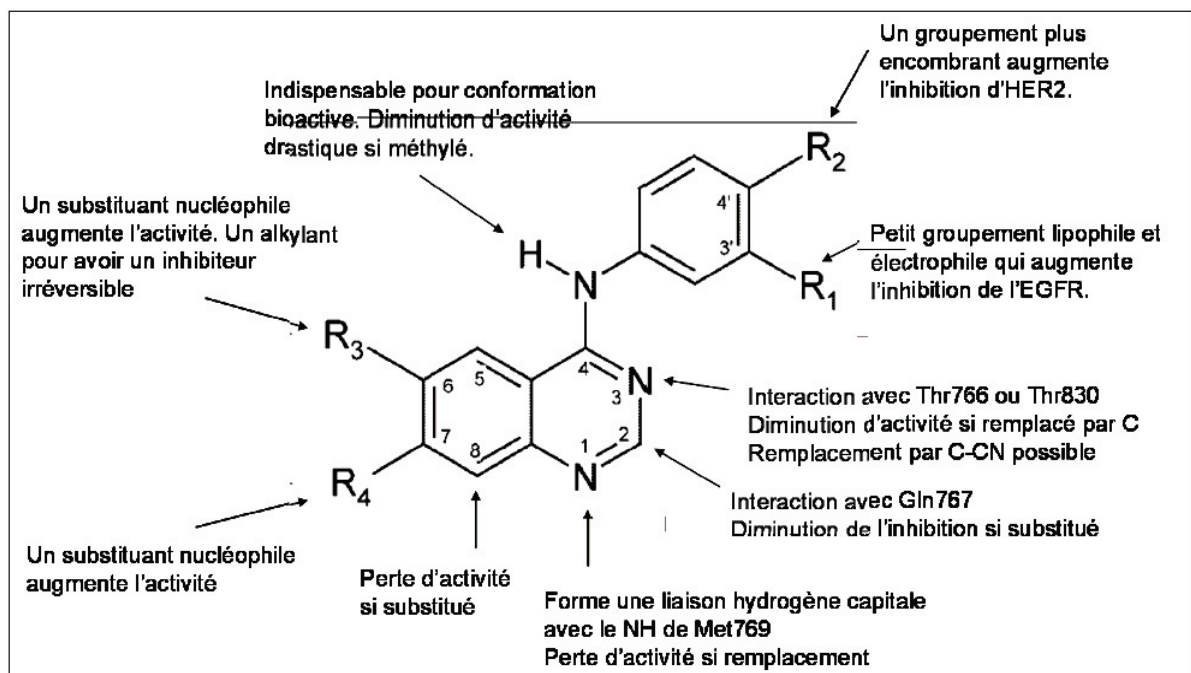


Figure 9. Présentation de la relation structure-activité des 4-anilinoquinazolines. Adaptée d'après (Fry 2003).

3.2. Le gefitinib

Le gefitinib (ZD 1839, IRESSA®) est un dérivé des 4-anilinoquinazolines administré par voie orale. Ce médicament est soumis à prescription hospitalière réservée aux spécialistes en oncologie ou en hématologie ou aux médecins compétents en cancérologie. Ce médicament, ayant obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) Européenne en juin 2009, est indiqué chez les adultes dans le traitement du CBNPC localement avancé ou métastatique avec une mutation activatrice de l'EGFR (HAS, 2009).

3.2.1. Paramètres pharmacocinétiques

Les études pharmacocinétiques chez le volontaire sain âgé de 18 à 62 ans ont montré un pic plasmatique (C_{max}) entre 3 et 7h après l'administration, avec une élimination complète à 28 h (Swaisland, Laight et al. 2001). La biodisponibilité absolue moyenne de cette molécule prise par voie orale est de 59 % chez les patients cancéreux.

Le gefitinib est excrété principalement *via* les fèces sous forme métabolisée avec une élimination rénale de seulement 4% de la dose administrée. Les études *in vitro* montrent que la voie principale d'élimination passe par le métabolisme hépatique du gefitinib par le cytochrome P450 (CYP450) (principalement par CYP3A4, avec un rôle mineur des CYP3A5 et CYP2D6) (Swaisland, Cantarini et al. 2006). Par conséquent les inducteurs ou inhibiteurs de ce cytochrome comme la rifampicine, l'itraconazole peuvent influencer la pharmacocinétique de cette drogue (Swaisland, Ranson et al. 2005).

La biodisponibilité plasmatique du gefitinib pourrait être réduite par les molécules augmentant le pH gastrique tels que les inhibiteurs de la pompe à protons ou les antagonistes des récepteurs H₂ à l'histamine (D'Incecco and Federico 2011)

3.2.2. Etudes cliniques

L'activité du gefitinib chez les patients présentant un CBNPC a été évaluée dans de nombreuses études. Nous retiendrons les essais de phase II (Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer: IDEAL 1 et 2). Ces études ont montré une importante activité anti-tumorale dans le CBNPC chez les patients ne répondant pas à une ou plusieurs lignes de chimiothérapie (à base de sels de platine et de docétaxel) (IDEAL Fukuoka, Yano et al. 2003) IDEAL-2 (Kris, Natale et al. 2003). Ces études mettent en avant l'efficacité et l'équivalence des posologies aux doses de 250 mg ou 500 mg par jour de gefitinib. En raison de la meilleure tolérance d'une dose plus faible, la posologie de 250mg par jour fut retenue pour l'AMM.

Les études INVITE et SIGN de phases II suggèrent une équivalence en termes d'efficacité du gefitinib comparé à une monothérapie conventionnelle. Dans l'étude INVITE 196 patients présentant un CBNPC à un stade avancé et n'ayant pas reçu de chimiothérapie au préalable furent traités par vinorelbine ou gefitinib (Crino, Cappuzzo et al 2008). Cette étude montre une équivalence en termes de survie et d'efficacité entre ces deux traitements avec une meilleure tolérance du gefitinib. L'étude SIGN, regroupant 141 patients, compare le gefitinib au docétaxel utilisé en deuxième ligne de traitement (Cuffer, Vrdoljak et al 2006). Les résultats de cette étude montraient une efficacité et une activité similaire du gefitinib et du docétaxel, avec une tolérance au traitement en faveur du gefitinib.

De nombreuses études de phase III utilisant le gefitinib seul ou en association ont été menées. Dans ces études les patients n'étaient pas sélectionnés sur la présence de mutation activatrice. L'étude INTEREST comparant le gefitinib au docétaxel chez 1466 patients atteints d'un CBNPC ne montre aucune différence en termes de survie entre les deux traitements dans la population générale. Toutefois cette étude mettait en avant un bénéfice chez les patients portant une mutation activatrice de l'EGFR (Kim, Hirsch et al 2008). Des résultats similaires ont été retrouvés dans l'étude japonaise V-15-32.

Une étude randomisée réalisée sur 1692 patients (ISEL) a comparé le gefitinib en 2e ou 3e ligne de traitement à des soins de support chez des patients atteints de CBNPC à un stade avancé. Cette étude n'a pas montré d'amélioration de la survie chez les patients traités par gefitinib (Thatcher, Changet al. 2005). L'analyse des sous-groupes de cette étude a révélé cependant une amélioration de la survie chez les femmes, les non-fumeurs, les patients d'origine asiatique. Des études prospectives de phase II ont montré chez les patients porteurs de mutation de l'EGFR et traités par gefitinib, un taux de survie sans progression dépassant 9 mois dans 90% des cas (Asahina, Yamazakiet al. 2006 ; Tamura, Okamoto et al. 2008). Ces résultats laissaient suggérer une réelle efficacité voire un bénéfice du traitement par gefitinib chez les patients porteurs de telles mutations.

Dans un tel contexte des études de phase III ont été menées comparant le gefitinib aux sels de platine utilisés en association chez des patients porteurs d'EGFR muté.

L'étude iPASS (Mok, Wu et al 2009) conduite sur 1217 patients incluant seulement des patients asiatiques atteints d'adénocarcinome, non-fumeurs, a montré une réduction significative du risque de progression pour les patients traités par gefitinib. L'étude First-SIGNAL (Lee, Park et al. 2009) menée sur 309 coréens non-fumeurs atteints d'adénocarcinome a montré une réelle amélioration de la survie sans progression et une meilleure qualité de vie pour les patients traités par gefitinib en comparaison de la chimiothérapie.

Un point remarquable de ces deux études iPASS et First-SIGNAL est que l'amélioration de la survie sans progression dans le groupe gefitinib n'a concerné que les patients porteurs de mutations activatrices contrairement aux patients dont l'EGFR est sauvage qui ont une meilleure survie sans progression sous chimiothérapie (Mok, Wu et al. 2009). Ces résultats montrent que les prédicteurs cliniques (femme, adénocarcinome, asiatique, non-fumeur) mis en avant lors d'étude de phase II ne peuvent pas être utilisés seuls pour prédire la réponse au traitement par gefitinib. La recherche des mutations comme biomarqueurs prédictifs

de la réponse au gefitinib reste donc indispensable.

Enfin, plus récemment deux études WJTOG et NEJ002 (Mitsudomi, Morita et al. 2010 ; Maemondo, Inoue et al.2010) ont confirmé le bénéfice du gefitinib chez les patients porteurs de mutation de l'EGFR. Les patients, tous porteurs de l'EGFR muté, furent traités soit par chimiothérapie à base de sels de platine ou gefitinib. Les résultats ont montré un taux de réponse supérieur et une survie sans progression plus longue dans le bras gefitinib. Ces études confirment l'intérêt des EGFR-TKI en première intention chez les patients mutés.

3.2.3. Effets indésirables

Dans les données regroupées des études de phase III iPASS, INTEREST et ISEL (2 462 patients traités par IRESSA), les événements indésirables les plus fréquemment rapportés, survenant chez plus de 20% des patients ont été une diarrhée et des réactions cutanées (éruption cutanée, acné, sécheresse cutanée et prurit). Les événements indésirables responsables d'un arrêt du traitement ont concerné 3% des patients. Des affections pulmonaires interstitielles souvent sévères avec des évolutions fatales sont survenues chez 1,3% des patients (HAS, 2009).

3.3. L'erlotinib

L'erlotinib (OSI-774, TARCEVA®) est un dérivé des 4-anilinoquinazolines ayant obtenu l'AMM européenne en septembre 2005 dans le cancer du poumon non à petites cellules. L'erlotinib est indiqué en monothérapie dans le traitement de maintenance des formes localement avancées ou métastatiques du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) chez les patients avec une maladie stable après 4 cycles d'une première ligne de chimiothérapie standard à base de sels de platine ou, dans le traitement des formes localement avancées ou métastatiques du CBNPC, après échec d'au moins une ligne de chimiothérapie.

L'erlotinib est aussi indiqué en association à la gemcitabine, dans le traitement du cancer du pancréas métastatique (HAS, 2011).

3.3.1. Paramètres pharmacocinétiques

L'administration de l'erlotinib se fait par voie orale. Le pic de concentration plasmatique est obtenu après environ 4 heures avec une biodisponibilité orale absolue de 59 % dans une étude chez des volontaires sains. L'erlotinib est métabolisé par les cytochromes hépatiques chez l'Homme, principalement par le CYP3A4 et, à un moindre degré, par le CYP1A. De ce fait on retrouve des interactions médicamenteuses avec les inhibiteurs ou inducteurs enzymatiques.

L'élimination de l'erlotinib comme celle du gefitinib se fait principalement sous forme de métabolites dans les fèces (> 90 %), l'élimination rénale ne représentant qu'une faible proportion (environ 9 %) de la dose administrée par voie orale. La demi-vie d'élimination étant de 36,2 heures, le temps d'obtention de l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques est de 7 à 8 jours. La posologie quotidienne recommandée d'erlotinib est de 150 mg à prendre au moins une heure avant ou deux heures après un repas.

Comme dans le cas du gefitinib, les médicaments qui modifient le pH gastrique tels les inhibiteurs de la pompe à protons ou les antagonistes H₂, peuvent modifier la biodisponibilité de l'erlotinib (Roche, 2011).

3.3.2. Etudes cliniques

L'erlotinib a fait l'objet d'un essai de phase II en 2^{ème} ou 3^{ème} ligne de traitement des CBNPC avancés ou métastatiques. Le taux de réponse observé était similaire à celui observé avec le gefitinib (Perez-Soler, 2004).

Une étude de phase III randomisée (étude BR21) versus placebo a été réalisée chez 731 patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique. Ces patients avaient déjà reçu une ou

deux lignes de chimiothérapie (Shepherd, Rodrigues Pereira et al. 2005). Cette étude a permis de montrer une survie médiane et une survie à 12 mois significativement supérieures dans le groupe erlotinib (6,7 mois et 31%) par rapport au placebo (4,7 mois et 21%), conduisant à une réduction significative de la probabilité de décès.

L'intérêt de l'erlotinib en première ligne de traitement a aussi été évalué. Cette étude n'a pas montré d'amélioration de la survie médiane ou du taux de réponse par rapport aux sels de platine. Cependant, comme pour le gefitinib les résultats en termes de toxicité s'avéraient en faveur de l'erlotinib (Gatzemeier, Pluzanska et al. 2007).

Plus récemment, en 2010 l'Etude B018192 de phase III randomisée (Cappuzzo, Ciuleanu et al. 2010) en double-aveugle comparait l'erlotinib au placebo en traitement de maintenance des patients atteints d'un CBNPC localement avancé ou métastatique (stade IIIb ou IV). Tous les patients avaient préalablement reçu 4 cycles de chimiothérapie à base de sels de platine et ne présentaient pas d'intolérance jugée inacceptable à l'issue du traitement et/ou de progression de la maladie. Les résultats obtenus montrent une médiane de survie sans progression de 12,1 semaines dans le groupe erlotinib versus 11,3 semaines dans le groupe placebo et une médiane de survie globale de 11,9 mois dans le groupe erlotinib versus 9,6 mois dans le groupe placebo, soit une différence absolue de 2,3 mois en faveur de l'erlotinib. Les résultats en termes de qualité de vie n'étaient pas significativement différents.

3.3.3. Effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquemment observés sont des éruptions cutanées (75 %) et des diarrhées (54 %). Comme pour le gefitinib des cas d'affections pulmonaires interstitielles graves ont été rapportées (Roche, 2011).

4. LA REPONSE AU TRAITEMENT PAR EGFR-TKI

Comme décrit précédemment, le taux de réponse au traitement par gefitinib n'est que de 10% à 15% chez les patients atteints de CBNPC. Un meilleur taux de réponse a toutefois été observé dans les adénocarcinomes, chez des personnes d'origine asiatique ou chez des non-fumeurs. Basés sur ces constatations, des marqueurs prédictifs de réponse au traitement ont été recherchés.

4.1. Les principaux marqueurs prédictifs de réponse au traitement

Les mutations de l'EGFR sensibilisant la tumeur au gefitinib : la présence des deux mutations activatrices LREA et L858R est très fortement corrélée à la réponse au traitement. Ces mutations se retrouvent plus fréquemment dans les sous-groupes de patients non-fumeurs, et plus fréquemment chez les femmes, dans la population d'origine asiatique et chez des patients porteurs d'adénocarcinomes (Sequist, Bell et al. 2007 ; Sequist, Martins et al. 2008). Plusieurs études prospectives de phase II réalisées avec le gefitinib ou l'erlotinib chez des patients porteurs de l'EGFR muté ont montré plus de 87% de réponses et une augmentation de la survie sans progression de 7,7 mois à 14 mois (Asahina, Yamazaki et al. 2006 ; Inoue, Suzuki 2006 ; Yoshida, Yatabe et al 2007 ; Paz-Ares, Sanchez et al. 2006 ; Sequist, Martins et al. 2008).

Les mutations de l'EGFR responsables d'une résistance au gefitinib :

Les mutations T790M, D761Y, L747S de l'EGFR, les insertions dans l'exon 20 sont associées à la résistance aux EGFR-TKI (Greulich, Chen et al. 2005; Kobayashi, Boggon et al. 2005; Pao, Miller et al. 2005; Balak, Gong et al. 2006; Costa, Halmos et al. 2007; Sasaki, Endo et al. 2007). La mutation T790M est située à une position clé de la poche à l'ATP. Cette mutation

augmente l'affinité des récepteurs pour l'ATP, atténuant ainsi celle des EFRG-TKI (Yun, Mengwasser et al. 2008). Cette mutation, principalement retrouvée dans les tumeurs ayant rechuté après une réponse initiale aux l'EGFR-TKI (Kobayashi, Boggon et al. 2005; Pao, Miller et al. 2005), représente environ la moitié de la résistance acquise au gefitinib ou erlotinib (Balak, Gong et al. 2006). Par conséquent, T790M est considéré comme un marqueur spécifique de la résistance acquise aux l'EGFR-TKI. Les mutations L747S, D761Y confèrent également une résistance aux EGFR-TKI. Cependant leur fréquence est beaucoup plus faible.

L'amplification de MET :

Met proto-oncogene tyrosine kinase (MET) est un récepteur à activité tyrosine kinase de haute affinité pour le HGF (Hepatocyte Growth Factor). La liaison de HGF provoque une autophosphorylation de MET qui comme pour l'EGFR, active de nombreuses voies de signalisation ayant un effet sur la motilité, la croissance, la survie, l'invasion et les métastases (Birchmeier, Birchmeier et al. 2003). Des atteintes de MET sont retrouvées dans de nombreux cancers humains (Jeffers, Schmidt et al. 1997; Miller, Lin et al. 2006; Smolen, Sordella et al. 2006). Cette amplification a été observée dans le CBNPC où elle est associée à la résistance aux EGFR TKI (Bean, Brennan et al. 2007; Engelman, Zejnullahu et al. 2007). Elle est retrouvée chez 21% des patients présentant une résistance acquise tandis qu'elle n'est retrouvée que chez 3% des patients non traités (Bean, Brennan et al. 2007).

La mutation K-RAS:

RAS est un des membres des cascades de signalisation présente sous l'EGFR (Figure 8). RAS est capable d'activer la serine / thréonine kinase RAF, ERK1 et ERK2 (voie des MAPK), et un nombre important de protéines nucléaires. Cette activation active la mitose et la prolifération cellulaire.

La mutation K-RAS est retrouvée chez 20~30% des patients atteints d'un CBNPC. La majorité de ces mutations aboutissent à une activation constitutive de la protéine K-RAS (Rodenhuis, van de Wetering et al. 1987; Keohavong, DeMichele et al. 1996). Ces mutations sont responsables d'une mauvaise réponse au traitement et d'une faible survie après un traitement (Eberhard, Johnson et al. 2005).

Augmentation de l'expression de l'EGFR:

La surexpression de l'EGFR par amplification génique est retrouvée dans environ 30% des CBNPC (Hirsch, Varella-Garcia et al. 2003). Un nombre de copies important du gène de l'EGFR est prédictif d'une meilleure réponse aux EGFR TKI (Cappuzzo, Hirsch et al. 2005; Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005; Takano, Ohe et al. 2005; Hirsch, Varella-Garcia et al. 2007). Chez les patients avec un nombre augmenté de copies, le traitement par EGFR-TKI apporte un bénéfice en termes de survie (Cappuzzo, Hirsch et al. 2005; Hirsch, Varella-Garcia et al. 2005)

On retiendra qu'un nombre de copies de l'EGFR est souvent corrélé avec la mutation somatique de l'EGFR (Amann, Kalyankrishna et al. 2005; Takano, Ohe et al. 2005).

L'Amphiréguline:

Une étude a montré qu'un taux élevé d'AREG circulante était corrélé à la résistance au gefitinib, suggérant son implication dans la résistance au traitement par EGFR-TKI (Ishikawa, Daigo et al. 2005). Les mécanismes impliquant l'AREG seront détaillés dans le paragraphe suivant.

4.2. L'amphiréguline et son rôle dans la résistance aux EGFR-TKI

Dans cette partie après avoir présenté brièvement l'amphiréguline et son rôle dans le cancer, nous décrirons le mécanisme de résistance aux EGFR-TKI décrit au laboratoire par (Busser, Sancey et al. 2010; Busser, Sancey et al. 2010)

4.2.1. L'Amphiréguline et son rôle dans la tumorigénèse

L'Amphiréguline humaine est une glycoprotéine de 84 acides-aminés découverte et caractérisée par (Shoyab, McDonald et al. 1988). L'Amphiréguline humaine est codée par le gène ID 374 situé sur le bras long du chromosome 4. L'AREG est synthétisée sous forme de précurseur membranaire de 252 acides aminés. Ce précurseur subira une protéolyse par le Tumor-necrosis factor-Alpha Converting Enzyme (TACE ou ADAM-17), membre de la famille des disintégrines et métalloprotéinases ADAM (Sunnarborg, Hinkle et al. 2002; Sahin, Weskamp et al. 2004).

L'Amphiréguline mature contient un domaine hydrophile liant l'héparine (N-glycosylatedheparinbindingdomain). Sur l'extrémité C-terminale se trouve un domaine EGF-like présentant une homologie avec les autres ligands de l'EGFR : EGF (38%) TGF- α 32%. (Busser, Sancey et al. 2011)

En comparaison des autres ligands naturels, l'AREG possède une efficacité moindre à induire la phosphorylation du récepteur (Beerli and Hynes 1996), sûrement due à une plus faible affinité pour le récepteur (Shoyab, McDonald et al. 1988)

L'AREG est impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques comme le développement des glandes mammaires (Kariagina, Xie et al. 2010), la morphogène de la prostate (Torrington, Sorensen et al. 1998), des reins (Sakurai, Tsukamoto et al. 1997) et des poumons (Schuger, Johnson et al. 1996) et le développement de neurones et du tissu osseux (Qin and Partridge 2005; Qin, Tamasi et al. 2005).

Concernant la tumorigénèse, l'AREG est un acteur de **l'autosuffisance en facteurs de croissance** décrite dans la partie I. Une dépendance à la voie de signalisation de l'EGFR induit la sécrétion d'AREG grâce à une boucle rétroactive d'autoamplification, appelée stimulation autocrine. L'AREG sécrétée par l'environnement tumoral peut aussi activer l'EGFR de cellules tumorales adjacentes (stimulation paracrine). L'AREG peut aussi être sécrétée dans la circulation sanguine. Cette sécrétion endocrine sera responsable de l'activation de l'EGFR à distance (Figure 10).

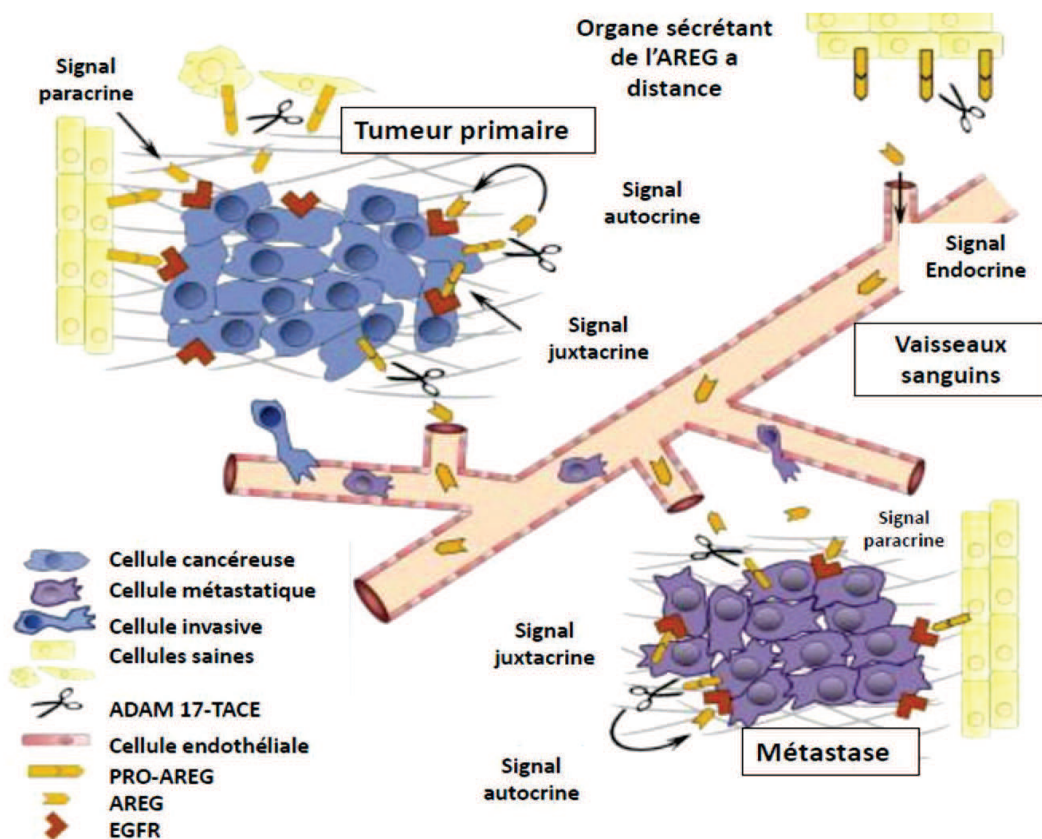


Figure 10. Rôle de l'Amphireguline dans la tumorigénèse. L'AREG est sécrétée dans le microenvironnement tumoral dans le lequel elle peut rester ou rejoindre la circulation sanguine. L'AREG peut activer l'EGFR par un signal autocrine dans les cellules de la tumeur primaire ou dans les cellules métastatiques. L'AREG peut aussi être produite par les cellules du stroma et activer l'EGFR des cellules tumorales environnantes par un signal paracrine. Un signal juxtacrine est aussi possible lorsque la pro-AREG membranaire active directement l'EGFR des cellules cancéreuses voisines. Enfin l'AREG peut être sécrétée dans la circulation sanguine et ainsi activer à distance de manière endocrine l'EGFR des tumeurs ou des métastases. *Adaptée d'après (Busser, Sancey et al. 2011)*

L'AREG intervient dans le potentiel replicatif illimité des cellules tumorales en participant à l'acquisition d'une activité télomérase (Blasco 2002).

L'AREG, par son action mitotique sur les cellules endothéliales vasculaires d'une part (Kato, Inazu et al. 2003) et son activation de la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (cytokine pro-angiogénique) d'autre part, active aussi l'angiogenèse tumorale.

Concernant la **résistance à l'apoptose** l'activité anti-apoptotique de l'AREG a été démontrée pour les carcinomes du sein (De Luca, Casamassimi et al. 1999) et du foie. D'autre part dans le CBNPC, il a pu être montré que l'AREG coopère avec l'IGF1 pour inhiber l'apoptose induite par privation de sérum (Hurbin, Dubrez et al. 2002). L'anticorps anti-AREG permettait de restaurer l'apoptose dans ces cellules. Enfin (Hurbin, Coll et al. 2005) a montré que la combinaison d'AREG et d'IGF1 activait une voie de survie dépendante des Proteines Kinase C (PKC) mais indépendante des MAPK et des PI3K aboutissant à l'inactivation des molécules pro-apoptotiques BAD et **BAX**.

Enfin l'AREG est impliqué dans **l'envahissement tissulaire et les métastases**, *via* une diminution des jonctions adhérentes (Chung, Cook et al. 2005), et d'une croissance cellulaire indépendante de l'ancrage (Adam, Chamberlin et al. 1996), deux mécanismes essentiels du processus métastatiques.

4.2.2. L'Amphiréguline et la résistance aux EGFR-TKI

Dans les CBNPC il a été montré chez les patients répondeurs au gefitinib que l'AREG était indétectable alors qu'elle était surexprimée chez les patients non répondeurs (Kakiuchi, Daigo et al. 2004). D'autre part il a été montré que des concentrations d'AREG sérique élevées chez les patients atteints de CBNPC était un facteur de mauvais pronostic (Ishikawa, Daigo et al. 2005).

Basé sur ces constatations, le laboratoire a émis l'hypothèse que l'AREG pourrait participer à la résistance aux anti-EGFR.

L'équipe a montré que des cellules de CBNPC (Busser, Sancey et al. 2010a; Busser, Sancey et al. 2010b) exprimant des niveaux importants d'AREG (H358), résistent à l'apoptose contrairement à des cellules dépourvues d'AREG (H322). L'inactivation de l'AREG dans les cellules H358 restaure la sensibilité au gefitinib tandis que l'ajout d'AREG aux cellules H322 les protège de l'apoptose induite par gefitinib. Ces données démontrent l'implication de l'AREG dans la résistance au gefitinib dans les CBNPC (Busser, Sancey et al. 2010a).

Il a été montré que l'AREG bloque l'apoptose induite par gefitinib en inactivant la protéine pro-apoptotique BAX. En présence de gefitinib, l'AREG diminue l'expression de BAX, inhibe son changement conformationnel et sa translocation à la mitochondrie bloquant ainsi la libération du cytochrome c et l'apoptose (Busser, Sancey et al. 2010a).

La séquestration cytoplasmique de BAX dépend de la protéine **Ku70**. En se liant à BAX, Ku70 empêche son activation et sa translocation à la mitochondrie. La séquestration de BAX par Ku70 dans le cytoplasme est un mécanisme dépendant de l'acétylation de Ku70. (Cohen, Lavu et al. 2004).

En effet lorsque Ku70 est acétylé il ne peut pas interagir avec BAX. Le laboratoire a montré que l'AREG, dans les cellules traitées par gefitinib, inhibe l'acétylation de Ku70, renforçant ainsi son interaction avec BAX et l'inhibition de l'apoptose (Busser, Sancey et al. 2010b).

L'inhibition des histones déacétylases (HDAC) ou la surexpression des histones acétyltransférases (HAT) sont responsables d'une augmentation de l'acétylation de Ku70, entraînant la libération de BAX et l'apoptose dans les cellules traitées par gefitinib (Figure 11).

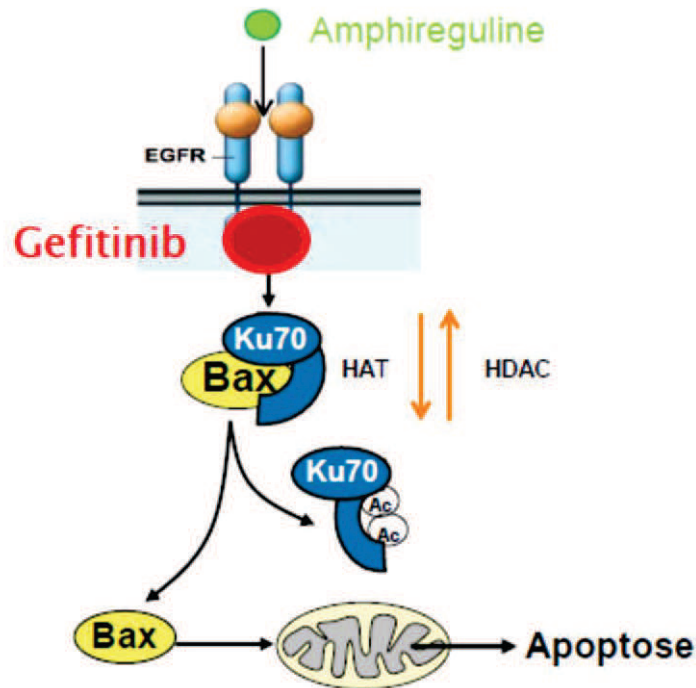


Figure 11. Mécanisme de résistance induite au gefitinib dans les cellules de CBNPC H358.

Ces résultats démontrent le rôle de l'AREG et de l'acetylation ainsi que l'implication des **HAT** et **HDAC** dans la résistance à l'apoptose induite par le gefitinib. Des inhibiteurs d'HDAC (HDACi) contrecarrent l'effet protecteur de l'AREG et sensibilisent les cellules de CBNPC au gefitinib.

Dans la suite de ce travail nous nous intéresserons à mettre en évidence les HDAC impliquées dans ce mécanisme de résistance et à mesurer l'effet de leur inhibition sur la résistance à l'apoptose induite par gefitinib passant par l'AREG.

PARTIE III : LES HISTONES DEACETYLASES

Dans ce chapitre nous présenterons les différentes classes d'HDAC, leurs caractéristiques ainsi que leurs principales fonctions. Nous nous appuyerons sur ces connaissances dans les parties suivantes : résultats, discussion et conclusion.

L'architecture locale de la chromatine est un facteur important de la régulation de l'expression des gènes. En effet, les changements de conformation de la chromatine, *via* des modifications post-traductionnelles des histones du nucléosome, rendent possible la fixation sur l'ADN des protéines nécessaires à la transcription. Parmi les modifications post-traductionnelles subies par les histones, on retrouve l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination et l'ADP-ribosylation (Berger 2001; Cosgrove, Boeke et al. 2004).

L'état d'acétylation du cœur d'histones résulte d'un équilibre entre l'action des HAT, responsable de l'acétylation des histones, et des HADC responsables du retrait du groupement acétylé (Wade 2001). D'une manière générale, une augmentation du niveau d'acétylation des histones est corrélée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle, tandis qu'une hypo-acétylation est souvent associée à une inhibition de l'expression des gènes. (Noma, Allis et al. 2001). Hormis les histones, ces enzymes possèdent une variété d'autres substrats intervenant dans différents processus cellulaires.

1. LES HISTONES ACETYLTRANSFERASES

Les HAT peuvent être regroupées en deux groupes en fonction de leur localisation cellulaire.

Les HAT A sont localisées au sein du noyau. Dans ce groupe, les membres peuvent être classés en 5 familles (GNAT, CBP/P300, MYST, TF-relatedHATs, NR co-activators) basées sur leurs homologies structurales et sur les mécanismes de transfert du groupement acétyle.

Les HAT B sont localisées dans le cytoplasme et sont responsables de l'acétylation des histones néosynthétisées. Cette acétylation est une étape nécessaire au transport des histones jusqu'au noyau et à leur inclusion au sein du nucléosome (Roth, Denu et al. 2001)

D'une manière générale, ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement acétyle de l'acétyl Coenzyme A (Acétyl CoA), aux résidus lysine des histones pour former un résidu ϵ -N-acétyl lysine. Le transfert de ce résidu acétyle conduit à la disparition de la charge positive du résidu aminé des ϵ -lysines (Smith and Denu 2009). Ceci a pour effet une diminution des interactions électrostatiques ADN/Histone au sein du nucléosome engendrant ainsi une forme relâchée de la chromatine transcriptionnellement active (euchromatine). À l'inverse la déacétylation des histones entraîne une augmentation des interactions électrostatiques aboutissant à une forme plus condensée transcriptionnellement inactive (hétérochromatine) (Noma, Allis et al. 2001).

Hormis leur action sur les histones et l'expression des gènes, un grand nombre de HAT ont une action sur d'autres protéines (Sternier and Berger 2000; Freiman and Tjian 2003). Il a été montré que CBP, une HAT impliquée dans l'acétylation de Ku70 (Cohen, Lavu et al. 2004), est impliquée dans la réponse au gefitinib contrôlée par l'AREG (Busser, Sancey et al. 2010b). D'autre part, l'investigation du rôle de Tip60, une autre HAT dont l'expression est perdue dans la carcinogenèse bronchique (Thèse Van Den Broeck, 3 sept. 2009), pourrait intervenir dans la régulation de l'acétylation de Ku70 et ainsi participer à la résistance au gefitinib.

2. LES HISTONES DEACETYLASES

Les HDAC catalysent la réaction inverse au HAT. Cette famille d'enzymes présente chez tous les eucaryotes catalyse le clivage du groupement acétylé des résidus ϵ -N-acétylé lysine. Cette réaction est responsable du retour des charges positives à la surface des lysines ce qui provoque une conformation plus compacte de la chromatine par augmentation des interactions électrostatiques. Les HDAC sont regroupées en trois classes en fonction de leurs homologies de séquence avec celles de la levure:

- classe I : HDAC1, -2, -3, -8 homologues à Rpd3
→HDAC11
- classe II : HDAC4, -5, -6, -7, -9 et 10, reliés à Hda1
- classe III : SIRT1, -2, -3, -4, -5, -6, et 7, similaires à Sir2 (Sirtuines)

2.1. Les histones déacétylases de classe I

Le domaine catalytique des HDAC de classe I et II est formé de 390 acides aminés conservés parmi les différentes espèces formant une légère poche tubulaire courbée (Finnin, Donigian et al. 1999). Le retrait du groupement acétylé s'opère *via* un système de transfert de charge constitué de deux histidines adjacentes, deux acides aspartiques et d'une tyrosine (Figure 12) (Finnin, Donigian et al. 1999; Buggy, Sideris et al. 2000).

L'élément essentiel de ce transfert de charge est un atome de zinc sous forme (Zn^{2+}) qui sera immobilisé sur un site de fixation du zinc en dessous de la poche catalytique. D'autres cofacteurs tels que le (Zn^{2+}) sont toutefois nécessaires au fonctionnement des HDAC (Carmen, Griffin et al. 1999; Hu, Chen et al. 2000; Lee, Hart et al. 2004). Les inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi) fonctionnent par déplacement de cet atome de zinc rendant ainsi impossible ce transfert de charge. Le SAHA (Vorinostat) et la TSA sont deux exemples de cette inhibition (Finnin, Donigian et al. 1999).

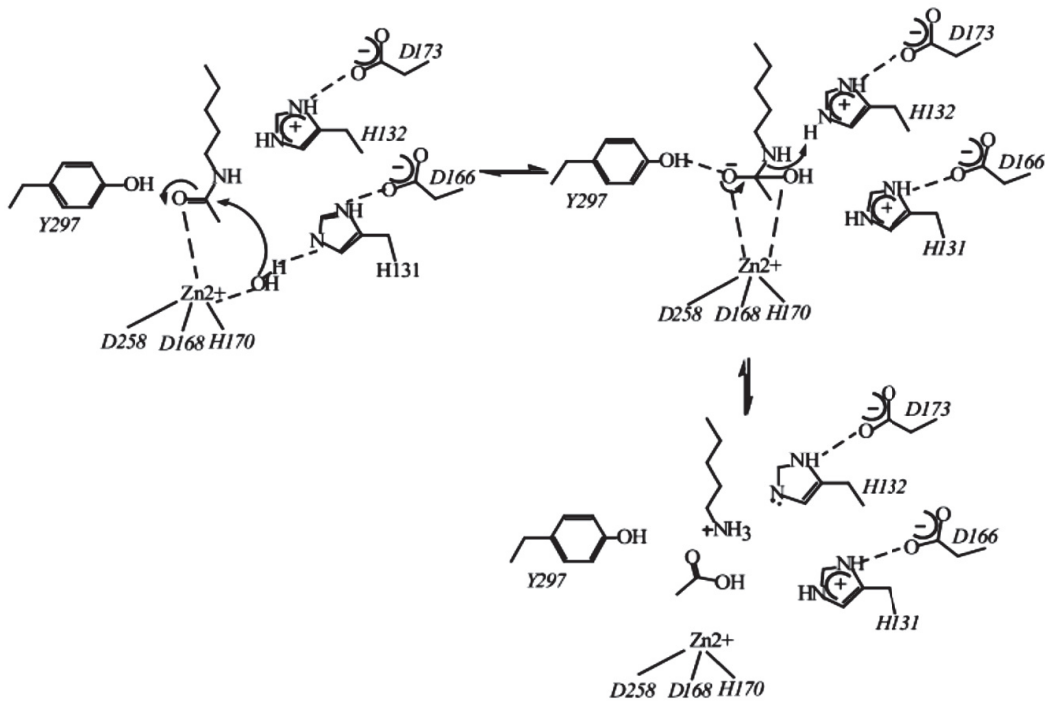


Figure12. Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDAC de classe I et II (Finnin, Donigian et al. 1999).

- HDAC1 et HDAC2 sont similaires à 82%. Leur domaine catalytique coté N-terminal forme la majeure partie de ces protéines (Cress and Seto 2000; Kao, Downes et al. 2000; Wade 2001; Li, Lin et al. 2002). Ces enzymes sont inactives lorsqu'elles sont produites de manière recombinante, indiquant que des cofacteurs sont nécessaires pour observer l'activité HDAC. *In vivo*, les protéines HDAC1 et HDAC2 ont une activité enzymatique lorsqu'elles sont complexées avec d'autres protéines. Ces complexes sont constitués de facteurs nécessaires pour moduler leur activité déacétylase, leur fixation à l'ADN et pour le recrutement des HDAC aux promoteurs des gènes (Zhang, Ng et al. 1999). Trois complexes protéiques contenant HDAC1 et HDAC2 ont été caractérisés : Sin3, NuRDet Co-REST (Heinzel, Lavinsky et al. 1997; Kao, Downes et al. 2000; You, Tong et al. 2001; Galasinski, Resing et al. 2002).

- HDAC3 est plus similaire à HDAC8 (34% de similarité) qu'aux deux premiers membres de cette classe. Cette HDAC possède des signaux d'exportation et de localisation nucléaire, ce qui

lui confère des fonctions potentielles dans le cytoplasme et le noyau. Ses fonctions nucléaires sont toutefois beaucoup mieux caractérisées (Karagianni and Wong 2007). HDAC3 est active au sein de complexes corépresseurs : N-CoR et SMRT. L'activité déacétylase de ces complexes joue un rôle important dans la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi que dans le processus d'apoptose (Karagianni and Wong 2007).

- HDAC8 est constituée d'un large domaine catalytique avec un signal de localisation nucléaire (Buggy, Sideris et al. 2000). Contrairement aux autres HDAC de classe I, celle-ci n'a toujours pas été associée à un complexe protéique. Quoique ses cibles soient encore inconnues, on sait qu'elle influe sur la régulation de certains mécanismes du développement (Oehme, Deubzer et al. 2009).

- HDAC11 doit être classée à part. Cette HDAC clonée et caractérisée en 2002 (Gao, Cueto et al. 2002), comporte 347 acides aminés avec des homologies de séquences sur le domaine catalytique des classes I et II d'HDAC. La taille de la protéine est du même ordre que celle des HDAC de classe I. Pourtant, sa localisation dans le cœur, le cerveau, le muscle squelettique et les reins, est typique des HDAC de classe II. Bien que sa fonction soit peu connue, on sait qu'elle est impliquée dans la tolérance immunitaire (Liu, Hu et al. 2009; Villagra, Cheng et al. 2009). Plus récemment, le rôle de HDAC11 dans le lymphome Hodgkinien a été proposé (Buglio, Khaskhely et al. 2011).

2.2. Les histones déacétylase de classe II

La classe II peut être divisée en deux sous-groupes.

- La classe IIa comprenant HDAC4, -5, -7 et -9. Ces enzymes possèdent des homologies de séquence importantes sur les domaines N- et C-terminaux. La partie N-terminale possède des motifs conservés jouant un rôle dans leur fonction et leur régulation.
- La classe IIb comprenant HDAC6 et 10.

2.2.1. La classe IIa

Les HDAC IIa portent au niveau C-terminal la région à activité déacétylase. Le pourcentage d'homologie de cette séquence entre les différents membres s'élève à 80%. D'autre part cette séquence montre un fort pourcentage d'homologie avec Hda1 présente chez la levure. Outre ce domaine, les HDAC IIA sont constituées d'une extension au niveau de leur extrémité N-terminale. L'homologie de séquence parmi les membres de cette famille est beaucoup plus faible (30-45%) que pour la région à activité déacétylase. Cette région N-terminale est porteuse de nombreux sites d'interactions protéiques conférant leurs fonctions biologiques aux HDAC. Parmi les protéines se liant au niveau N-terminal on retrouve des facteurs de transcription Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2), la protéine Hétérochromatine P1(HP1), et C-terminal-Binding Protein (CtBP). On y retrouve aussi des signaux d'importation et d'exportation nucléaire (Figure 13) (Martin, Kettmann et al. 2007).

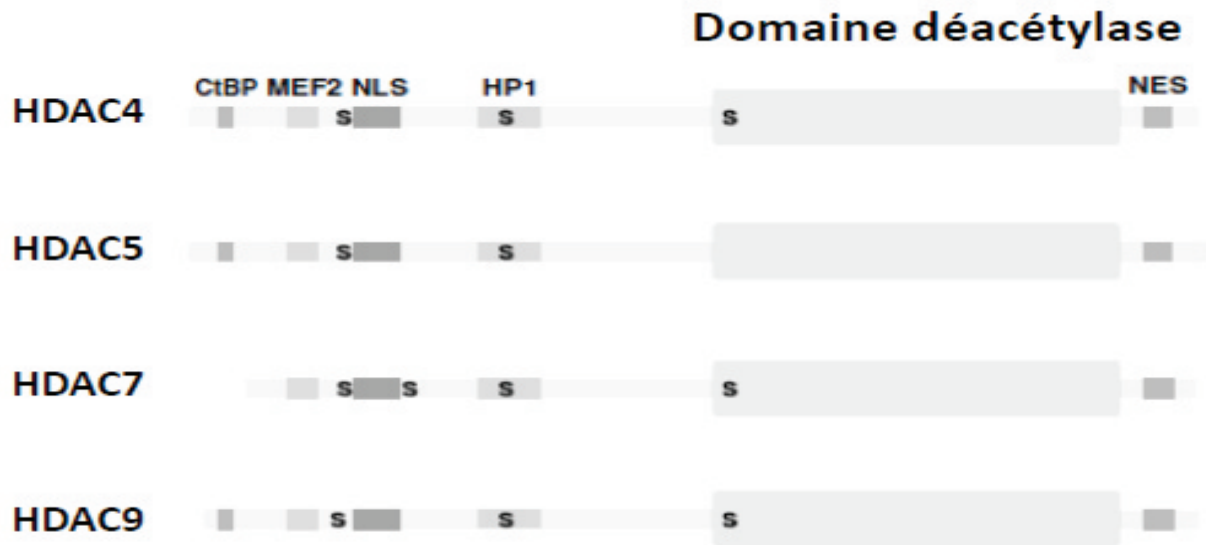


Figure 13. Organisation des HDAC de classe IIa. Adaptée d'après (Martin, Kettmann et al. 2007)

Les HDAC IIa ont montré leur rôle comme corépresseur transcriptionnel par la déacétylation des histones nucléosomales. Un des exemples qui illustre le mieux ce mode de fonctionnement est l'interaction des HDAC IIa avec les facteurs de transcription MEF2.

Les protéines MEF2 ont un rôle important de régulateur de la transcription durant la myogenèse (Black and Olson 1998; McKinsey, Zhang et al. 2002), la différenciation et le métabolisme cardiaque (McKinsey, Zhang et al. 2002), la différenciation et la survie neuronale (Heidenreich and Linseman 2004) et le développement vasculaire (Lu, McKinsey et al. 2000).

L'interaction des HDAC IIa et MEF2 se fait au niveau de l'extrémité N-terminale sur un petit motif conservé (Sparrow, Miska et al. 1999; Lu, McKinsey et al. 2000). Cette interaction est à l'origine d'une déacétylation des histones et ainsi d'une inhibition de la transcription. Ce mécanisme ferait des HDAC IIa des répresseurs de la transcription des promoteurs sous le contrôle des facteurs de transcription MEF (McKinsey, Zhang et al. 2002).

Les HDAC IIa peuvent interagir avec de nombreuses autres cibles que MEF2. Toutefois la plupart des fonctions biologiques attribuées à ces enzymes découlent de leur interaction avec MEF2 (Martin, Kettmann et al. 2007).

2.2.2. La classe IIb

2.2.2.1. HDAC6

2.2.2.1.1. Présentation Générale

HDAC6 a été découverte en 1999 (Verdel and Khochbin 1999). Cette protéine est localisée dans le cytoplasme *via* un mécanisme actif. Elle a la particularité de présenter deux domaines catalytiques homologues (Grozinger, Hassig et al. 1999). L'analyse initiale suggérait que les deux domaines fonctionnaient de manière indépendante l'un et l'autre (Grozinger, Hassig et al. 1999). Toutefois il a été montré que l'activité catalytique reposait soit sur la présence simultanée des deux domaines (Zhang, Gilquin et al. 2006), soit uniquement sur la présence du second domaine catalytique (Zou, Wu et al. 2006). Hormis les deux domaines catalytiques, HDAC6 possède en son extrémité C-terminale un motif en doigt de zinc conservé, appelé domaine ZnF-UBP (Seigneurin-Berny, Verdel et al. 2001) qui fixe les séquences mono ou poly-ubiquitinylées (Seigneurin-Berny, Verdel et al. 2001; Hook, Orian et al. 2002). Chez la souris, HDAC6 est maintenue dans le cytoplasme grâce à son signal d'export nucléaire (NES) localisé dans le premier domaine catalytique. Cependant dans certaines conditions, cette protéine peut être délocalisée dans le noyau (Verdel, Curtet et al. 2000). Une autre séquence appelée SE14, située entre ZnF-UBP et le second domaine déacétylase, permet l'encrage d'HDAC6 dans le cytoplasme (Bertos, Gilquin et al. 2004) (Figure 14).

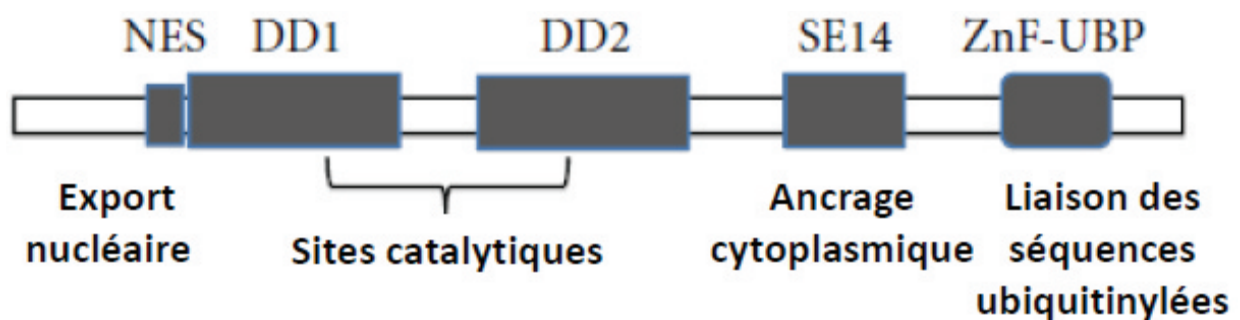


Figure 14. Structure d'HDAC6 (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011)

2.2.2.1.2. Les substrats

- Bien que la dénomination "histone déacétylase" soit utilisée dans un but de simplification pour la nomenclature, le premier substrat physiologique de HDAC6 découvert fut l' α -tubuline cytoplasmique et non les histones (Hubbert, Guardiola et al. 2002; Matsuyama, Shimazu et al. 2002).

- La protéine HSP90 a aussi été identifiée comme substrat d'HDAC6 (Bali, Pranpat et al. 2005). HSP90 fait partie d'un complexe de chaperonnes essentielles à la stabilité et la fonction des "protéines clientes". Cette protéine joue un rôle primordial dans l'homéostasie cellulaire (Bali, Pranpat et al. 2005). Son acétylation par HDAC6 régule l'activité chaperonne du complexe (Aoyagi and Archer 2005).

- Malgré sa rétention dans le cytoplasme, HDAC6 interagit avec des protéines nucléaires. En effet il a été montré que le recrutement d'HDAC6 à un promoteur réprime la transcription, suggérant que la présence d'HDAC6 dans le noyau a un impact sur l'activité de certains gènes (Girdwood, Bumpass et al. 2003). L'interaction entre facteur de transcription Runx2 et HDAC6 permet le recrutement de cette dernière sur la chromatine et réprime ainsi le promoteur de la protéine p21WAF1 dans les lignées fibroblastiques ou ostéoblastiques. (Westendorf, Zaidi et al. 2002). On retrouve également une interaction entre HDAC6 et le corépresseur transcriptionnel LCoR (pour ligand-dependent corepressor), localisé exclusivement dans le noyau et qui intervient dans les premiers stades du développement fœtal (Fernandes, Bastien et al. 2003).

D'autre part, des études réalisées *in vitro* ont montré que les queues N-terminales acétylées des histones H4 sont susceptibles d'être déacétylées par HDAC6 (Matsuyama, Shimazu et al. 2002).

- Enfin le recrutement de la protéine HDAC6 par l'HAT P300 sumoylée (exclusivement nucléaire) a été montré. HDAC6 contrôle ainsi la fonction de P300 et réprime son activité transcriptionnelle (Girdwood, Bumpass et al. 2003).

2.2.2.1.3. Rôle dans le cancer du poumon

Le rôle d'HDAC6 dans de nombreux cancers et processus tumoraux a déjà été montré. A titre d'exemple, il a été montré que la surexpression d'HDAC6 et la survie des patients atteints de CBNPC sont corrélées. D'autre part l'inhibition d'HDAC6 dans des cellules de myélome multiple provoque l'apoptose. Enfin HDAC6 contribue au processus métastatique par augmentation de la mobilité cellulaire dans le cancer du sein (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011) (pour revue 2009).

La perte d'HDAC6 dans le cancer du poumon favorise la dégradation de l'EGFR. Cette dégradation est due à une accélération de la captation du récepteur par les endosomes (Gao, Hubbert et al. 2010). De plus une diminution stable de l'expression d'HDAC6 diminue le niveau d'EGFR dans les cellules A549 de CBNPC en augmentant le recyclage de ce dernier. Cependant, malgré la diminution du taux d'EGFR, les cellules prolifèrent normalement grâce à une activation de la voie des MAPK. L'inhibition d'HDAC6 sensibilise ces cellules à l'inhibiteur de cette voie U0126 (Kamemura, Ito et al. 2008).

2.2.2.1.4. Les inhibiteurs d'HDAC6

HDAC6, comme toutes les autres HDACs de classe I et II est inhibée par la Trichostatine A (TSA). Cependant elle n'est pas sensible au sodium butyrate (NaBu).

Concernant les inhibiteurs spécifiques d'HDAC6, la tubacin (Tubulin acetylation inducer), a été isolée par screening. Elle permet l'inhibition de la déacétylation de l' α - tubuline ciblée par

HDAC6 (Haggarty, Koeller et al. 2003). Plus récemment un nouvel inhibiteur spécifique d'HDAC6 a été développé : la tubastatine A (Butler, Kalin et al. 2010).

2.2.2.2. HDAC10

HDAC10 est le dernier membre de la classe II des HDAC à avoir été découvert. HDAC10 appartient à la sous classe IIa, comme HDAC6 avec laquelle elle présente 37% de similitude (Guardiola and Yao 2002). L'extrémité N-terminale d'HDAC10 présente un niveau plus important de similitude avec le premier domaine catalytique d'HDAC6 qu'avec le second (Guardiola and Yao 2002). La partie C-terminale d'HDAC10 montre quant à elle des homologies de séquence moins fortes avec le deuxième domaine déacétylase d'HDAC6 (Guardiola and Yao 2002). HDAC10 renferme un domaine catalytique sur sa partie N-terminale, une séquence NES et un domaine incomplet du côté C-terminal.

HDAC10 reste peu étudiée. On sait cependant qu'elle est impliquée dans la répression de la mélanogénèse (Lai, Lin et al. 2010) et que son inhibition perturbe l'état redox des cellules de cancers gastriques (Lee, Jeong et al. 2010). De plus il a été montré qu'une diminution de l'expression d'HDAC10 était corrélée avec un mauvais pronostic dans le cancer du poumon.

La présence des deux domaines catalytiques confère à HDAC10 la résistance au NaBu observée pour HDAC6, avec une sensibilité conservée pour la TSA (Guardiola and Yao 2002).

2.3. Les histones déacétylases de classe III

La troisième classe d'HDAC, les sirtuines (SIRT), est reliée à Sir2 présente chez la levure (Imai and Guarente 2010). On retrouve sept membres chez l'humain nommés SIRT1 à SIRT7.

Sur ces sept membres, seulement trois sont retrouvés principalement au niveau nucléaire où ils

exercent une fonction déacétylase (SIRT1, 6 et 7). SIRT3, 4 et 5 sont retrouvés au niveau mitochondrial. Le dernier membre SIRT2 est quant à lui est principalement localisé dans le cytoplasme.

Le domaine catalytique de cette famille d'HDAC contient 275 acides aminés. La réaction enzymatique fait intervenir le clivage d'une liaison de haute énergie du nicotinate adénine dinucléotide (NAD). Une molécule de NAD et une molécule d'acétyl lysine sont catalysées en une molécule de lysine déacétylée, nicotinamide et un O-acétyl-ADP-ribose (Avalos, Bever et al. 2005). L'absence de Zn^{2+} dans la réaction enzymatique explique l'inefficacité des HDACi conventionnelles vis-à-vis de cette classe (Figure 15).

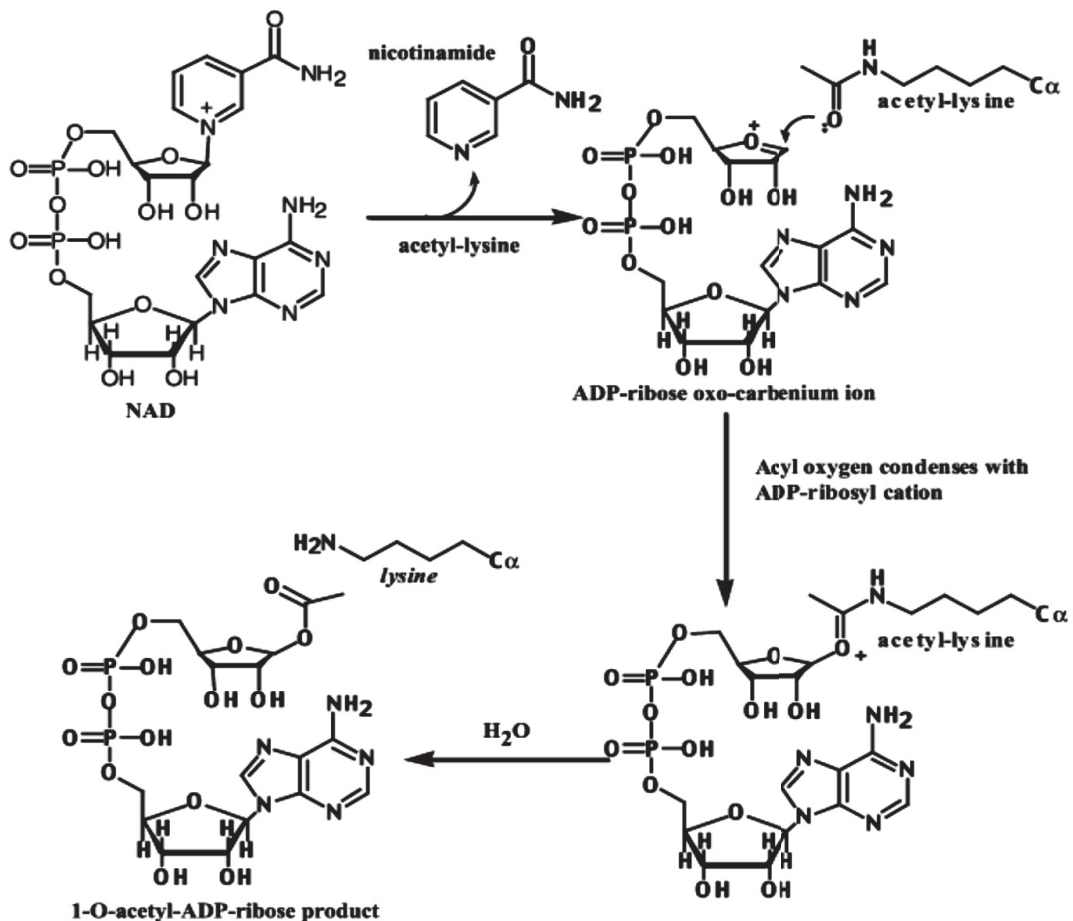


Figure 15. Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDACs de classe III (Avalos, Bever et al. 2005).

**ETUDE DES MECANISMES DE
RESISTANCE AU GEFITINIB DANS LES
CANCERS BRONCHIQUES NON A PETITES
CELLULES :
IMPLICATION DES HISTONES DEACETYLASES**

1. INTRODUCTION

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Le cancer bronchique non à petites cellules représente 80% des cancers du poumon avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 15%. Un des enjeux actuels de la recherche est d'adapter le traitement du CBNPC pour proposer des thérapies ciblées plus efficaces et moins agressives.

Dans un tel contexte, les EGFR-TKI tel que le gefitinib ont été développés. Cependant, une résistance intrinsèque aux EGFR-TKI est observée dans environ 25% des tumeurs mutées, et la quasi-totalité des tumeurs mutées rechutent après avoir présenté une réponse initiale aux EGFR-TKI. Des mécanismes de résistance primaire aux EGFR-TKI ont été proposés pour les tumeurs ayant des mutations activatrices (mutation de résistance de l'EGFR, perte de PTEN, mutation de PI3KCA), ainsi que pour les 80% des tumeurs sans mutation activatrice de l'EGFR : mutation K-RAS/BRAF (Massarelli, Varella-Garcia et al. 2007; Sharma, Bell et al. 2007), expression de IGF1-R (Morgillo, Kim et al. 2007) ou d'ERBB3 (Erjala, Sundvall et al. 2006), activation d'ERBB2 (Cappuzzo, Varella-Garcia et al. 2005), translocation d'ALK (Soda, Choi et al. 2007). Cependant, ces mécanismes n'ont pas démontré leur valeur prédictive en pratique clinique.

Il est donc primordial d'améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la carcinogénèse bronchique afin d'identifier 1/ des marqueurs pronostiques et prédictifs de la réponse aux traitements, et 2/ de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le laboratoire a montré que les cellules H358 de CBNPC exprimant un fort taux d'AREG sont résistantes aux EGFR-TKI contrairement à des cellules ne sécrétant pas d'AREG (H322), suggérant l'implication de l'AREG dans la résistance aux EGFR-TKI (Busser, Sancey et al. 2010a).

L'étude des mécanismes mis en œuvre par l'AREG a permis de mettre en évidence un

mécanisme original dépendant de l'acétylation. En effet, l'AREG inhibe l'acétylation de Ku70, en réponse au gefitinib, ce qui renforce l'interaction BAX/Ku70 (Busser, Sancey et al. 2010b).

L'acétylation de Ku70, *via* des inhibiteurs d'HDAC comme la TSA, permet la libération de BAX et l'apoptose dans les cellules traitées par EGFR-TKI. Ces résultats suggèrent de nouvelles applications thérapeutiques pour contourner la résistance au gefitinib dans les CBNPC.

Dans ce travail nous avons cherché à identifier les HDAC impliquées dans le mécanisme de résistance aux EGFR-TKI dans les cellules de CBNPC. A l'aide d'inhibiteurs spécifiques, nous avons pu montrer l'implication des HDAC de classe IIb dans la résistance à l'apoptose induite par gefitinib et médiée par l'AREG.

L'inhibition de l'expression d'HDAC6, candidate retenue lors de notre travail, ne permet pas de sensibiliser les cellules au gefitinib. Nous observons une activation des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK1/2. Le co-traitement des cellules de CBNPC avec du gefitinib et un inhibiteur d'HDAC6 diminue l'activation de la voie MAPK/ERK1/2, mais pas le niveau PI3K/AKT, suggérant que la voie de survie PI3K/AKT protège les cellules de l'inhibition d'HDAC6. Nos résultats suggèrent que l'inhibition d'HDAC6 n'est pas suffisante pour contrecarrer la résistance au gefitinib.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire H358 d'adénocarcinome bronchique humain est cultivée à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Les cellules sont implantées dans des plaques six puits (0,5.10⁶ cellules/puits) et cultivées dans 2ml de milieu. La viabilité cellulaire est estimée par la technique d'exclusion du bleu trypan.

2.2. Traitements

Les traitements sont effectués 24h après implantation en remplaçant le milieu de culture. Les cellules restent pendant 96 heures en contact avec ce milieu de culture contenant le traitement. Les inhibiteurs pharmacologiques utilisés sont listés dans le tableau 4.

Nom	Concentration utilisée	Cible
Gefitinib	0,5 µM	tyrosine-kinase de l'EGFR
TSA	200ng/ml	HDAC de classe I et II
NaBu	2mM	HDAC de Classe I et IIa
Tubastatine A	5 à 10µM	HDAC6

Tableau 4. Caractéristiques des différents inhibiteurs utilisés.

Le gefitinib est fourni par le laboratoire AstraZeneca France et stocké à -20°C avec une concentration de 10 mM en solution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

La Tubastatine (TA) provenant de chez Biovision est stockée à -20°C dans le DMSO (10 mM)

La TSA provenant de chez Sigma-Aldrich est stockée à une concentration 25 µg/ml. Enfin le

NaBu provenant de chez Sigma est stocké à -20°C dans l'eau à une concentration 1M.

Les différents inhibiteurs sont dissouts dans du RPMI à la concentration souhaitée. Cette solution remplacera le milieu de culture des plaques six puitsensemencées 24h plus tôt.

2.3 Transfections

Les siRNAs ciblant HDAC6 humaine sont synthétisés par Eurogentec, et le siRNA contrôle non spécifique par MWG Biotech. Les séquences des siRNAs ciblant HDAC6 sont:

5'-UCU-AGG-CUG-UGA-ACC-AAC-AUC-UU-3'

5'-CCC-AAG-AGU-GCU-UAU-UUA-AGU-UU -3'

La séquence du siRNA contrôle est :

5'-CUU-ACG-CUC-ACU-ACU-GCG-ATT-3'.

Les cellules à 70-80% de confluence sont transfectées soit avec les siRNA anti-HDAC6, soit avec le siRNA contrôle à une concentration finale de 2 nM, utilisant de l'Interferin (PolyPlus Transfection) suivant les instructions de fournisseur. 4h après la transfection les cellules sont traitées comme indiqué précédemment.

2.4 Mesure de la prolifération et de l'apoptose

96h après traitement, les cellules sont trypsinées (Trypsine/EDTA Invitrogen), rincées dans du Phosphate Buffer Saline 1X (PBS : 137 mMNaCl, 2,7 mMKCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KHPO₄, pH 7,4).

La mesure de la prolifération cellulaire est réalisée, après une étape de coloration au Bleu Trypan, par le compteur de cellules Invitrogen Countess®.

Les cellules sont ensuite centrifugées (1500g, 5 min à température ambiante) puis incubées 10 min à 37°C avec du Hoechst 33342, un intercalant fluorescent de l'ADN (5 µg/mL, Sigma Aldrich) dilué au 1/25^{ème} dans du PBS 1X. Les cellules sont ensuite déposées entre lame et lamelle. Les changements morphologiques caractéristiques des cellules apoptotiques sont détectés par microscopie de fluorescence. Le pourcentage de cellules en apoptose est déterminé après avoir compté au moins 500 cellules en utilisant le microscope Olympus.

2.5 Immunoblotting

Les cellules sont trypsinées, rincées deux fois dans du PBS 1X et culottées comme décrit précédemment. Après 45 min d'incubation dans la glace dans du tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, DOC 0,5%, NP40 1%, SDS 0,1%, H₂O) additionné avec des inhibiteurs de protéases (Complete EDTA-free, Roche) et de phosphatases (phoSTOP, Roche), les cellules sont centrifugées (16000g, 20 min, 4°C). Le contenu en protéines extraites dans le surnageant est dosé selon la méthode colorimétrique de Lowry (Biorad DC Protein assay kit). L'étalonnage est réalisé grâce à une gamme de concentrations croissantes d'Albumine de Serum Bovin (BSA) qui permet de calculer la concentration de l'échantillon après lecture de la densité optique DO à 620 nm. 40 µg de protéines sont reprises dans du tampon de charge Laemmli 2X (Glycérol 20%, β-Mercaptoéthanol 10%, SDS 4%, Tris-HCl-pH 6,8 125 mM, Urée 12 M et Bleu de Bromophénol), dénaturées pendant 5 min à 95°C et séparées sur un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) à 10%. Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidèneFluoride) : Hybond-P (Amersham). La membrane est saturée pendant 45 min dans un mélange de TBS (Tris Buffered Saline)-Tween 0,1%-BSA 5%,

puis est incubée avec l'anticorps primaire (Tableau 5) dans du TBS-Tween 0,1%-BSA 2% pendant toute la nuit à 4°C. La membrane est ensuite rincée avec du TBS-Tween 0,1% (3 fois 10 min) puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Tableau 5) dans du TBS-Tween 0,1%-BSA 2%. Après 3 lavages de 10 min avec du TBS-Tween 0,1%, la membrane est révélée à l'aide du substrat ECL (EnhancedChimio-Luminescence, Amersham).

Cible	Référence	Fournisseur	Dilution utilisée	IgG
phosphoAKT (pAKT)	phosphoAKT ser473 D9E (XP) #4060	Cellsignaling Technology	1/1000	Lapin
AKT	AKT pan (C67E7) #4691	Cellsignaling Technology	1/1000	Lapin
pERK	phospho P44/42 (thr202/tyr204) (E10) #9106	Cellsignaling Technology	1/1000	Souris
ERK	P44/42 ERK MAPK #9102	Cellsignaling Technology	1/1000	Lapin
pEGFR	phosphoEGFR tyr1068 (D7A5) XP #3777	Cellsignaling Technology	1/1000	Lapin
EGFR	EGFR #2232	Cellsignaling Technology	1/1000	Lapin
Tubuline (WB)	Tubuline clone B-5-1-2 T5168	Sigma Aldrich	1/1000	Souris
Tubuline α Acétylé		Abcam	1/1000	Souris
Anti-rabbit (WB)	IgG HRP rabbit	Cellsignaling Technology	1/2000	Chèvre
Anti-mouse	IgG HRP mousse	Cellsignaling Technology	1/2000	Chèvre

Tableau 5. Anticorps utilisés pour la détection des protéines cibles après électrophorèse

3. RESULTATS

Les HDAC de classe IIB sont impliquées dans les mécanismes de résistance au gefitinib.

Il a été mis en évidence dans la lignée cellulaire H358 de CBNPC qui surexprime l'AREG, un mécanisme original de résistance à l'apoptose induite par gefitinib (Busser, Sancey et al. 2010a; Busser, Sancey et al. 2010b). Lors du traitement par gefitinib de ces lignées, l'AREG provoque la séquestration de BAX dans le cytoplasme par interaction avec la protéine Ku70 rendant ainsi impossible l'apoptose. L'acétylation de Ku70 permet la libération de BAX qui va à la mitochondrie et déclenche l'apoptose. La lignée H358 a donc été retenue pour étudier l'effet des HDACi sur la prolifération cellulaire et l'apoptose.

Les cellules ont été traitées avec du NaBu 2mM, qui inhibe les HDAC de classes I et de classe IIa ou par la TSA à 200 ng/ml, qui inhibe les HDAC de classes I et II (Xu, Parmigiani et al. 2007). Le NaBu augmente le niveau d'expression de p21, tandis que le traitement par TSA augmente le niveau d'acétylation de la tubuline (Figure 16a). Ces marqueurs témoignent donc de l'activité des deux HDACi.

Comme attendu, le traitement de la lignée H358 par le gefitinib seul n'a pas affecté la prolifération de ces lignées cellulaires (Figure 16b) et n'a pas induit d'apoptose (Figure 16c). Par contre le traitement des cellules par NaBu ou TSA utilisé seul ou en association, entraîne une forte inhibition de la croissance cellulaire (Figure 16b).

Concernant l'apoptose, le traitement par HDACi seul n'induit pas d'apoptose. Cependant, le traitement par TSA, contrairement au NaBu, sensibilise fortement les cellules H358 à l'apoptose induite par gefitinib (Figure 16c). Ces résultats suggèrent une implication des HDAC de classe IIB dans la résistance au gefitinib dans les cellules H358.

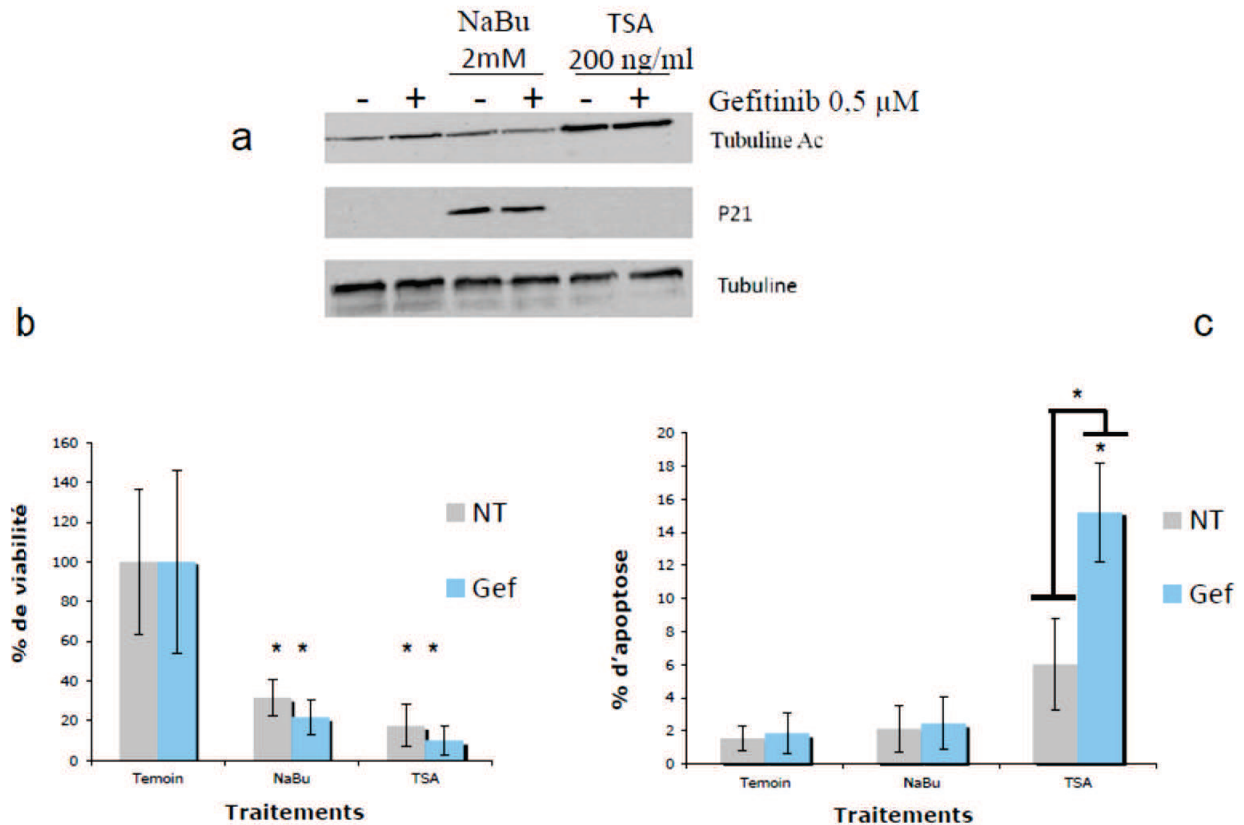


Figure 16. La TSA restaure la sensibilité au gefitinib dans les cellules de CBNPC : les cellules H358 sont traitées par NaBu 2mM ou TSA 200 ng/ml avec ou sans gefitinib 0.5μM. (a) Le lysat cellulaire est traité par Western blot et révélé en utilisant les anticorps anti-p21 ou anti-tubuline acétylé. La tubuline est utilisée comme témoin des dépôts protéiques. (b) La viabilité cellulaire est évaluée par comptages des cellules après coloration au bleu trypan. (c) le pourcentage d'apoptose est mesuré par comptage d'au moins 500 cellules colorées au Hoechst. * P < 0.05 (test de Mann et Whitney) (NT = non traitées Gef = gefitinib)

L'inhibition d'HDAC6 ne restaure pas l'apoptose induite par gefitinib.

Les HDAC de classe IIb regroupent HDAC6 et HDAC10. Nous nous sommes concentrés sur HDAC6 en raison de son rôle dans la prolifération cellulaire, la tumorigénèse et la réponse au stress (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011). Nous avons évalué l'effet de l'inhibition d'HDAC6 par siRNA sur la prolifération cellulaire, en présence ou en absence de gefitinib. Les siRNA anti-HDAC6 diminuent le niveau d'HDAC6 dans les cellules H358, spécialement après traitement par gefitinib, et augmentent le niveau de la tubuline acétylé (cible d'HDAC6) (Figure 17a).

L'inhibition d'HDAC6 n'a pas eu d'effet significatif en termes d'inhibition de la prolifération (Figure 17b) ou d'apoptose (Figure 17c) dans les cellules H358 en présence ou non de gefitinib. L'inhibition partielle de l'expression d'HDAC6 par les siRNA pourrait masquer le rôle de cette HDAC dans la résistance au gefitinib. Par conséquent nous avons choisi d'utiliser l'inhibiteur chimique spécifique d'HDAC6 la Tubastatine A (TA), de manière à inhiber complètement l'activité de cette enzyme. Dans les cellules H358 traitées avec des concentrations croissantes de TA nous avons observé une augmentation significative du niveau de la tubuline acétylée (témoignant de l'inhibition d'HDAC6), à partir d'une concentration de 1 μ M (Figure 18a). Cependant l'inhibition d'HDAC6 par Tubastatine A n'a montré aucun effet significatif sur la prolifération (Figure 18b) et sur l'apoptose (Figure 18c) dans les cellules H358 traitées ou non par gefitinib. Ces résultats laissent penser qu'HDAC6 ne serait pas impliquée dans la résistance au gefitinib dans les cellules H358.

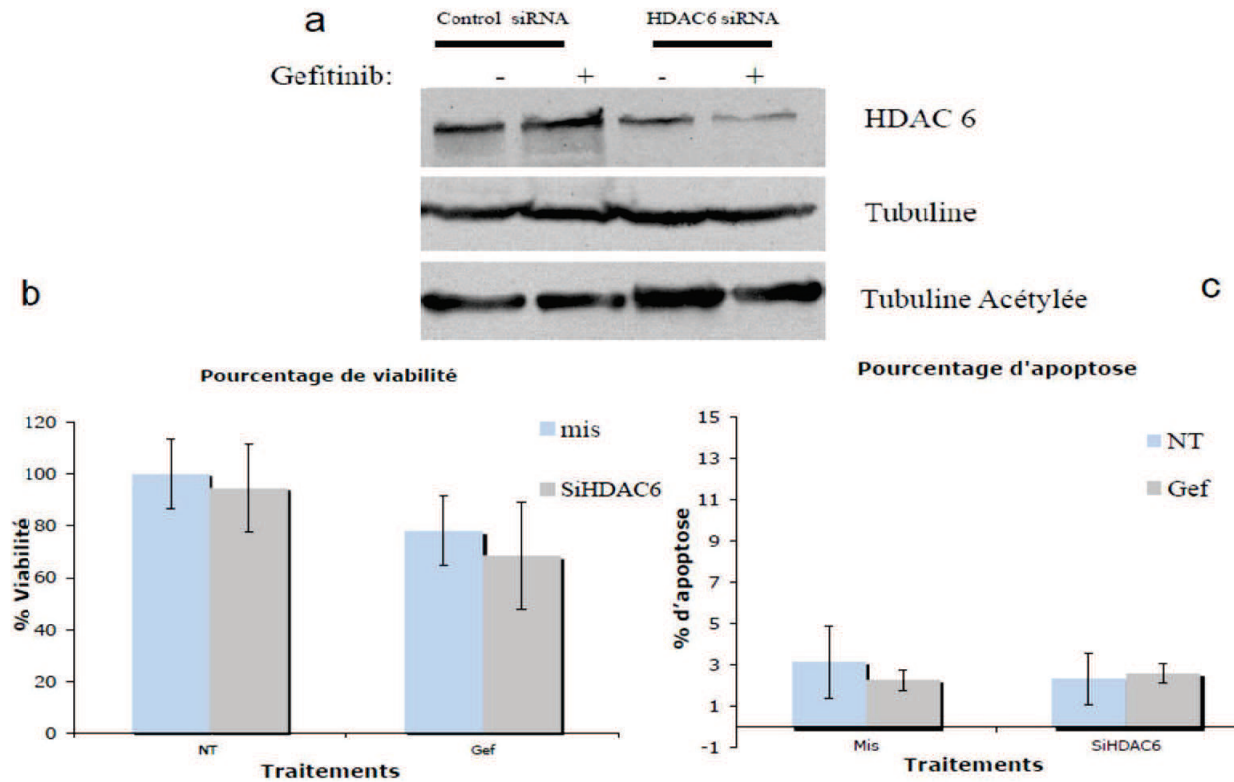


Figure 17. L'inhibition d'HDAC6 par siRNA ne restaure pas l'apoptose induite par gefitinib dans les cellules de CBNPC: Les cellules H358 sont transfectées par siRNA anti-HDAC6 ou siRNA controle avec ou sans gefitinib. (a) Le lysat cellulaire est séparé par Western blot et révélé en utilisant un anticorps anti-HDAC6. La tubuline est utilisée comme témoin des dépôts protéiques, et la tubuline acétylée comme témoin de l'inhibition d'HDAC6. (b) La viabilité cellulaire est évaluée par comptages des cellules après coloration au bleu trypan. (c) Le pourcentage d'apoptose est mesuré par comptage d'au moins 500 cellules colorées au Hoechst. (NT = non traitées Gef = gefitinib)

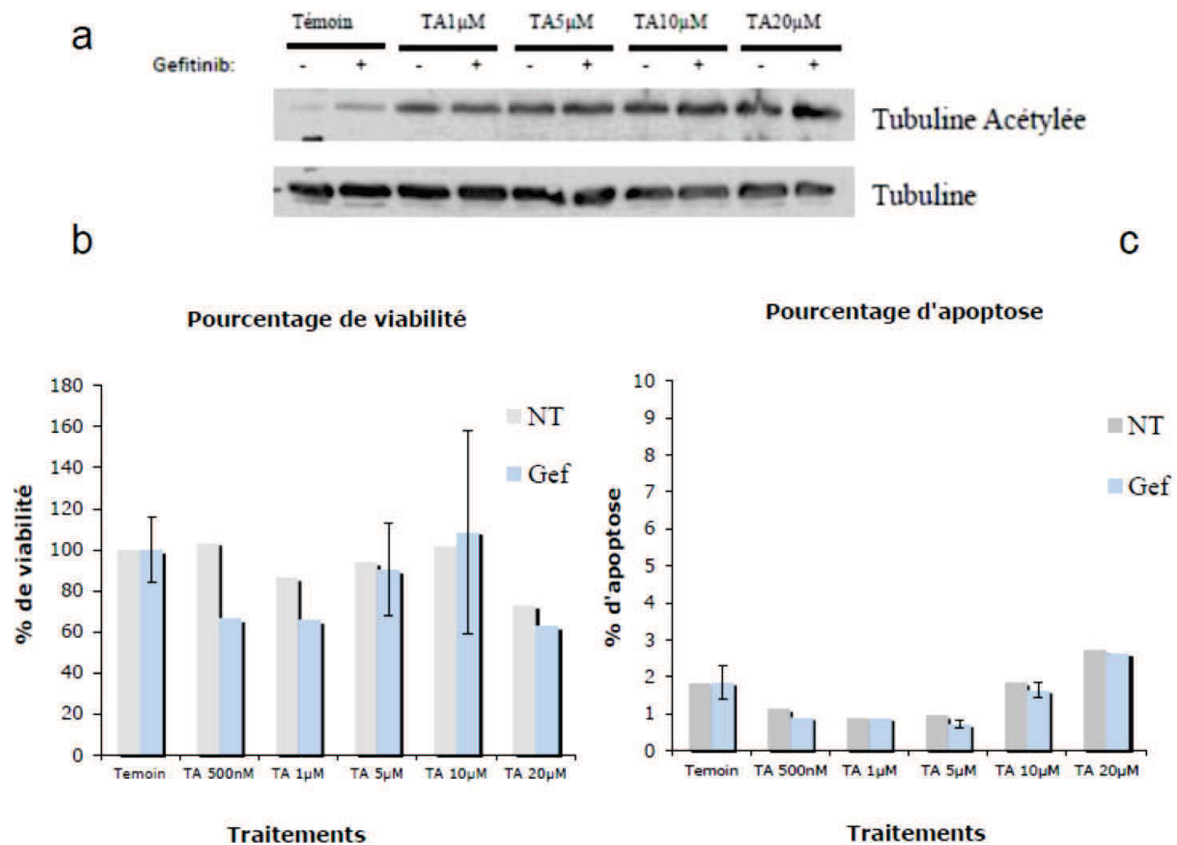


Figure 18. L'inhibition d'HDAC6 par TA ne restaure pas l'apoptose induite par gefitinib: Les cellules H358 sont traitées avec des doses croissantes de TA avec ou sans gefitinib 0.5 μ M. (a) Le lysat cellulaire est séparé par Western blot et révélé en utilisant un anticorps anti-tubuline acétylé. La tubuline est utilisée comme témoin des dépôts protéiques. (b) La viabilité cellulaire est évaluée par comptages des cellules après coloration au bleu trypan. (c) Le pourcentage d'apoptose est mesuré par comptage d'au moins 500 cellules colorées au Hoechst. (NT = non traitées **Gef** = gefitinib)

HDAC6 est impliqué dans la régulation des voies de signalisation

De l'activation de l'EGFR résulte l'activation des voies de signalisation intracellulaires PI3K, MAPK, STAT3 et PKC, impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Holbro, Civenni et al. 2003). De nombreuses études rapportent le rôle d'HDAC6 dans la régulation de ces voies de signalisation. En effet, l'inhibition des voies PI3K et MAPK augmente l'effet des HDACi (Ozaki, Kosugi et al. 2010). D'autre part, l'inhibition d'HDAC6 est aussi connue pour activer la voie des MAPK (Kamemura, Ito et al. 2008). Enfin, HDAC6 est nécessaire à l'activation des cascades de signalisation MAPK and PI3K (Lee, Lim et al. 2008). Nous appuyant sur les liens

étroits entre HDAC6 et les voies de signalisation de l'EGFR décrit dans la littérature, nous avons émis l'hypothèse que l'activation des voies de survie pourrait protéger les cellules H358 de l'inhibition d'HDAC6. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué l'effet de l'inhibition d'HDAC6, en présence ou non de gefitinib, sur les voies de signalisation MAPK/ERK1/2 et PI3K/AKT.

Dans les cellules H358 traitées par gefitinib nous avons observé une augmentation du niveau pAKT et pERK (Figure 19a, b), suggérant que la résistance au traitement de ces cellules ferait intervenir les voies MAPK/ERK1/2 et PI3K/AKT. L'inhibition d'HDAC6 par TA seule augmentait aussi le niveau de pAKT et pERK (Figure 19a). Cependant la combinaison de traitements TA et gefitinib prévenait l'activation induite par le gefitinib de pERK, mais pas celle pAKT. Ces résultats ont été confirmés à l'aide de siRNA anti-HDAC6 (Figure 19b). Ensembles, ces données indiquent qu'HDAC6 pourrait être impliquée dans la régulation de la voie MAPK/ERK1/2 dans la résistance au gefitinib. De plus, l'activation permanente de la voie PI3K/AKT dans les cellules traitées par siRNA anti HDAC6 ou par TA pourrait expliquer l'absence d'apoptose dans les cellules traitées par gefitinib.

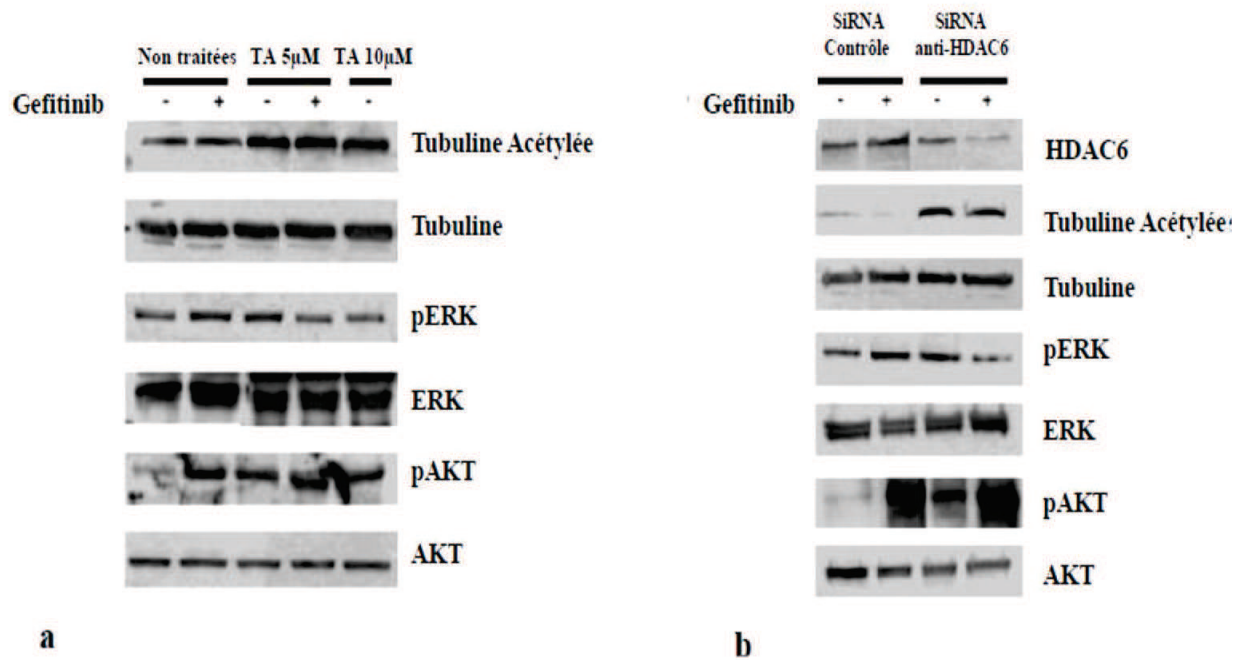


Figure 19. L'inhibition d'HDAC6 module les voies MAPK et PI3K : les cellules H358 sont traitées par (a) TA avec ou sans gefitinib (b) transfectées avec des siRNA anti- HDAC6 ou contrôle et traitées ou non par gefitinib. Le lysat cellulaire total est séparé par Western Blot et révélé en utilisant des anticorps anti-tubuline acétylée, anti-pERK, anti-ERK, anti-pAKT ou anti-AKT. La tubuline est utilisée comme témoin des dépôts protéiques.

4. DISCUSSION

L'AREG induit la résistance au gefitinib dans les CBNPC par un mécanisme dépendant de l'acétylation. Dans cette étude, nous montrons l'implication des HDAC de classe IIB dans cette résistance aux EGFR-TKI. Nous avons précédemment établi que l'AREG intervient dans la résistance au gefitinib dans les CBNPC. Ceci passe par un mécanisme original dépendant de l'acétylation (Busser, Sancey et al. 2010a; Busser, Sancey et al. 2010b). L'AREG réduit l'acétylation de Ku70 renforçant ainsi l'inhibition fonctionnelle de BAX. De cela résulte l'inhibition de la toxicité du gefitinib dans les cellules de CBNPC. L'implication des mécanismes d'acétylation dans la résistance à l'apoptose induite par gefitinib et dépendante de l'AREG nous a encouragé à investiguer le rôle des HDAC.

Nos résultats obtenus avec les HDCAi, TSA et NaBu suggèrent que les HDAC de classe IIb sont impliquées dans ces mécanismes de résistance. Parmi les HDAC de classe IIb nous avons choisi d'étudier le rôle d'HDAC6 en raison de ses implications dans la transformation cellulaire, le cycle cellulaire, la réponse cellulaire au stress ainsi que la mobilité cellulaire (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011). L'inhibition d'HDAC6 entraîne l'apoptose des cellules de myélome multiple (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011). De plus, nous savons que HDAC6 est une HDAC cytosolique (Lee, Lim et al. 2008) et que la séquestration de BAX impliquée dans le mécanisme de résistance au gefitinib se produit dans le cytoplasme (Busser, Sancey et al. 2010). Toutes ces informations sont autant de données qui font d'HDAC6 le candidat idéal.

Cependant nous n'avons pas été capables de démontrer le rôle d'HDAC6 dans ce mécanisme de résistance à l'apoptose induite par gefitinib. Les siRNA anti HDAC6 n'ont pas permis de restaurer l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules H358. Toutefois, l'inhibition de l'expression d'HDAC6 par les siRNA est relativement faible dans nos cellules, même si celle-ci est effective, comme le montre l'augmentation de tubuline acétylée, cible principale d'HDAC6 (Zhang, Li et al. 2003). Le niveau résiduel d'HDAC6 pourrait masquer l'effet des siRNA sur l'apoptose induite par gefitinib.

L'inhibition d'HDAC6 par la TA, décrite comme très spécifique (Butler, Kalin et al. 2010), nous a permis d'observer une augmentation du taux de tubuline acétylée à partir d'une concentration d'1 μM . L'utilisation de cette inhibiteur nous permet de contourner les problèmes rencontrés avec les siRNA. Cependant, même pour de fortes concentrations (20 μM), la TA n'a pas pu rétablir l'apoptose induite par gefitinib dans les cellules H358.

Il a été montré qu' HDAC6 jouait un rôle important dans la régulation de la voie MAPK ainsi que dans la régulation de la cascade de signalisation de PI3K (Kamemura, Ito et al. 2008; Lee, Lim et al. 2008). Ces données nous ont poussé à étudier l'impact de l'inhibition d'HDAC6 sur

ces voies de signalisation dans les cellules résistantes au gefitinib. Nous avons observé que le gefitinib activait les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK1/2 dans nos cellules de CBNPC. L'inhibition d'HDAC6 diminue l'activation ERK1/2 induite par le gefitinib, mais pas celle d'AKT. L'activation maintenue de la voie PI3K/AKT pourrait expliquer le faible taux d'apoptose observé dans les cellules H358, en réponse à l'association de traitement anti-EGFR et anti-HDAC6. Cette voie de résistance au gefitinib pourrait être activée par un autre récepteur tel que l'IGF1-R, impliqué dans la résistance aux ERGF-TKI dans les cellules de CBNPC (Morgillo, Woo et al. 2006; Hurbin, Wislez et al. 2011).

Un autre argument en faveur d'une action de la voie PI3K/AKT est apporté par l'étude menée par (Subramanian, Jarzembowski et al. 2011). Ces travaux montrent, dans les cellules de neuroblastome, qu'HDAC6 lie le complexe Ku70/BAX dans le cytoplasme et que l'utilisation d'inhibiteur spécifique ou de siRNA anti-HDAC6 restaure la mort cellulaire dépendante de BAX. Les résultats montrent qu'HDAC6 régule l'interaction entre Ku70 et BAX en diminuant l'acétylation de Ku70 dans les cellules de neuroblastome (Subramanian, Jarzembowski et al. 2011).

Nos résultats devraient encourager la poursuite de cette étude. En particulier il serait intéressant d'étudier si l'inhibition d'HDAC6 combinée à celle d'AKT ou de l'IGF1-R, permet de surmonter la résistance au gefitinib dans les cellules de CBNPC. Cependant, la seule inhibition d'HDAC6 permet d'augmenter l'activation pERK et pAKT suggérant qu'HDAC6 pourrait inhiber ces voies. Ces données contradictoires sur l'effet de l'inhibition d'HDAC6 en présence ou absence de gefitinib restent à élucider.

Pour confirmer ces résultats, il sera important d'investiguer l'effet de l'inhibition de HDAC6 sur le niveau d'acétylation de Ku70.

Nos données suggèrent aussi qu'HDAC10 pourrait être impliquée dans les mécanismes de résistance au gefitinib. Peu de choses sont connues au sujet de cette HDAC. Cependant, des

études rapportent le rôle d'HDAC10 dans des cancers gastriques (Lee, Jeong et al. 2010), ainsi que des cancers pulmonaires (Osada, Tatematsu et al. 2004). En effet, il a été montré que le taux d'expression d'HDAC10 est un facteur prédictif de mauvais pronostic dans les CBNPC (Osada, Tatematsu et al. 2004). De plus, HDAC10 est présent dans la cellule au niveau du cytoplasme et du noyau (Lee, Jeong et al. 2010). Par conséquent, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition d'HDAC10 sur la viabilité, l'apoptose ainsi que l'acétylation de Ku70 dans les cellules H358 résistantes au gefitinib.

THESE SOUTENUE PAR : Victor JEANNOT

TITRE : Etude des mécanismes de résistance au gefitinib dans le cancer du poumon non-à petites cellules : rôle des HDAC.

Conclusion

Le cancer du poumon est un problème de santé publique majeur. Devant l'ampleur et la gravité de l'épidémie il est urgent de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques. Dans un tel contexte, les EGFR-TKI tels que le gefitinib ont été développés.

Ce travail a porté sur l'étude de ces mécanismes de résistance au gefitinib, et plus particulièrement le rôle des HDAC. Nous avons pu démontrer le rôle des HDAC de classe IIb dans la résistance à l'apoptose induite par le gefitinib dans les CBNPC surexprimant l'AREG.

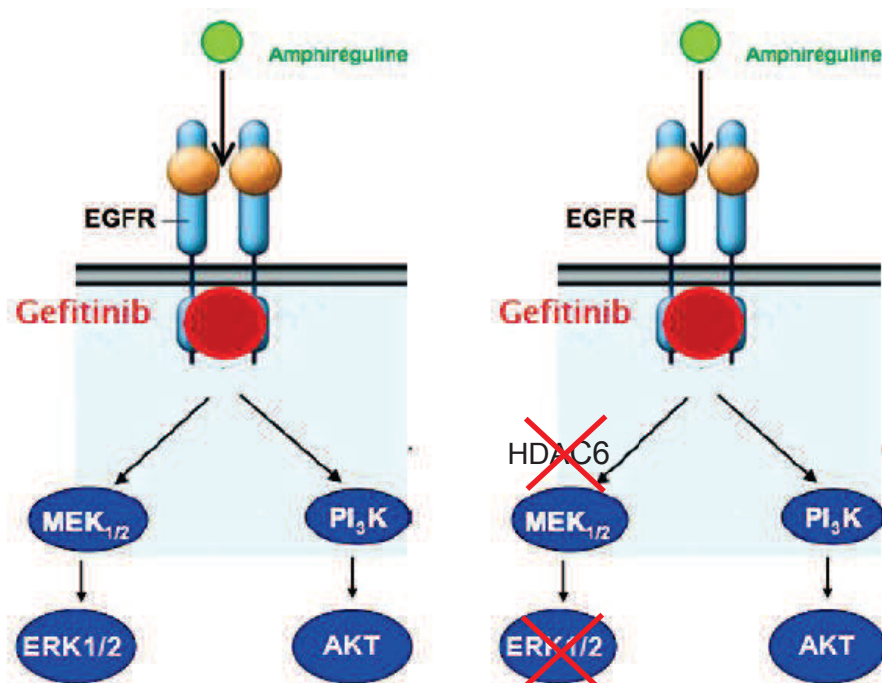


Figure 20. Rôle d'HDAC6 dans le mécanisme de résistance au gefitinib dans les cellules de CBNPC.

Le traitement des cellules H358 de CBNPC provoque l'activation de voies de signalisation ERK1/2 et PI3K. L'inhibition d'HDAC6 dans ces cellules empêche l'activation de la voie ERK1/2 induite par le gefitinib. Cependant la seule inhibition de cette voie ne permet pas de restaurer l'apoptose dans ces cellules.

L'inhibition spécifique d'HDAC6, un candidat prometteur, n'a pas permis de restaurer la sensibilité au traitement. Les résultats nous laissent penser que l'inhibition de cette enzyme pourrait être compensée par la voie de signalisation des PI3K.

Les mécanismes d'activation de cette voie restent inconnus mais les résultats suggèrent que l'utilisation de molécules l'inhibant ou inhibant des récepteurs à l'origine de son activation pourrait permettre de surmonter la résistance.

Ces hypothèses, si elles étaient confirmées, offriraient de nouvelles perspectives pour la prise en charge thérapeutique du CBNPC, en particulier pour les patients résistants au gefitinib.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 9 mai 2012

LE DOYEN


Professeur Christophe RIBUOT

LE PRESIDENT DE THESE


UFR Pharmacie
Département Mécanismes Biologiques
des Maladies et Traitements
Université Joseph Fourier
Grenoble

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aouba, A., and E. Eb, et al. (2008). "Données sur la mortalité en France : principales causes de décès en 2008 et évolutions depuis 2000 Bulletin épidémiologique hebdomadaire" Institut de Veille Sanitaire **22**: 249-255. Disponible sur: www.invs.santé.fr
- Adam, R. M., S. G. Chamberlin, et al. (1996). "Induction of anchorage-independent growth by amphiregulin." Growth Factors **13**(3-4): 193-203.
- Adrain, C. and S. J. Martin (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas." Trends Biochem Sci **26**(6): 390-397.
- Aldana-Masangkay, G. I. and K. M. Sakamoto (2011). "The role of HDAC6 in cancer." J Biomed Biotechnol **2011**: 875824.
- Amann, J., S. Kalyankrishna, et al. (2005). "Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer." Cancer Res **65**(1): 226-235.
- Aoyagi, S. and T. K. Archer (2005). "Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation." Trends Cell Biol **15**(11): 565-567.
- Arteaga, C. L. (2002). "Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?" Oncologist **7 Suppl 4**: 31-39.
- Asahina, H., K. Yamazaki, et al. (2006). "A phase II trial of gefitinib as first-line therapy for advanced non small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations." Br J Cancer **95**:998-1004
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Avalos, J. L., K. M. Bever, et al. (2005). "Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme." Mol Cell **17**(6): 855-868.
- Balak, M. N., Y. Gong, et al. (2006). "Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors." Clin Cancer Res **12**(21): 6494-6501.
- Bali, P., M. Pranpat, et al. (2005). "Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors." J Biol Chem **280**(29): 26729-26734.
- Barbacid, M. (1987). "ras genes." Annu Rev Biochem **56**: 779-827.
- Barry, M. and R. C. Bleackley (2002). "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." Nat Rev Immunol **2**(6): 401-409.
- Bean, J., C. Brennan, et al. (2007). "MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20932-20937.
- Beasley, M. B., E. Brambilla, et al. (2005). "The 2004 World Health Organization classification of lung tumors." Semin Roentgenol **40**(2): 90-97.
- Belot, A., M. Velten, et al. (2008) "Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005." Institut de veille sanitaire 132p. Disponible sur: www.invs.santé.fr
- Berli, R. R. and N. E. Hynes (1996). "Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities." J Biol Chem **271**(11): 6071-6076.
- Berger, S. L. (2001). "Molecular biology. The histone modification circus." Science **292**(5514): 64-65.
- Bertos, N. R., B. Gilquin, et al. (2004). "Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention." J Biol Chem **279**(46): 48246-48254.
- Birchmeier, C., W. Birchmeier, et al. (2003). "Met, metastasis, motility and more." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 915-925.
- Black, B. L. and E. N. Olson (1998). "Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 167-196.
- Blasco, M. A. (2002). "Telomerase beyond telomeres." Nat Rev Cancer **2**(8): 627-633.
- Bodmer, J. L., N. Holler, et al. (2000). "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." Nat Cell Biol **2**(4): 241-243.
- Brambilla, E. and A. Gazdar (2009). "Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies." Eur Respir J **33**(6): 1485-1497.

- Buggy, J. J., M. L. Sideris, et al. (2000). "Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8." *Biochem J* **350 Pt 1**: 199-205.
- Buglio, D., N. M. Khaskhely, et al. (2011). "HDAC11 plays an essential role in regulating OX40 ligand expression in Hodgkin lymphoma." *Blood* **117**(10): 2910-2917.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, et al. (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." *Mol Cell* **12**(3): 541-552.
- Busser, B., L. Sancey, et al. (2011). "The multiple roles of amphiregulin in human cancer." *Biochim Biophys Acta* **1816**(2): 119-131.
- Busser, B., L. Sancey, et al. (2010). "Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers." *Mol Ther* **18**(3): 528-535.
- Busser, B., L. Sancey, et al. (2010). "Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation." *Mol Ther* **18**(3): 536-543.
- Butler, K. V., J. Kalin, et al. (2010). "Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A." *J Am Chem Soc* **132**(31): 10842-10846.
- Cappuzzo, F., F. R. Hirsch, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* **97**(9): 643-655.
- Cappuzzo, F., M. Varella-Garcia, et al. (2005). "Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients." *J Clin Oncol* **23**(22): 5007-5018.
- Cappuzzo, F., T. Ciuleanu, et al. (2010). "Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicenter, randomised, placebo-controlled phase 3 study." *Lancet Oncology* **11**(6): 521-529.
- Carmen, A. A., P. R. Griffin, et al. (1999). "Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12356-12361.
- Carpenter, G., L. King, Jr., et al. (1978). "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro." *Nature* **276**(5686): 409-410.
- Catros-Quemener, V., F. Bouet, et al. (2003). "[Antitumor immunity and cellular cancer therapies]." *Med Sci (Paris)* **19**(1): 43-53.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2006). "Dissecting p53-dependent apoptosis." *Cell Death Differ* **13**(6): 994-1002.
- Chung, E., P. W. Cook, et al. (2005). "Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis." *J Invest Dermatol* **124**(6): 1134-1140.
- Citri, A., K. B. Skaria, et al. (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." *Exp Cell Res* **284**(1): 54-65.
- Clarke, P. G., A. Posada, et al. (1998). "Neuronal death in the central nervous system during development." *Biomed Pharmacother* **52**(9): 356-362.
- Cohen, H. Y., S. Lavu, et al. (2004). "Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis." *Mol Cell* **13**(5): 627-638.
- Comings, D. E. (1973). "A general theory of carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(12): 3324-3328.
- Cooper, O., G. Vlotides, et al. (2011). "Expression and function of ErbB receptors and ligands in the pituitary." *Endocr Relat Cancer* **18**(6): R197-211.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* **2**(9): 647-656.
- Cosgrove, M. S., J. D. Boeke, et al. (2004). "Regulated nucleosome mobility and the histone code." *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1037-1043.
- Costa, D. B., B. Halmos, et al. (2007). "BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations." *PLoS Med* **4**(10): 1669-1679; discussion 1680.
- Creagh, E. M., H. Conroy, et al. (2003). "Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity." *Immunol Rev* **193**: 10-21.

- Cress, W. D. and E. Seto (2000). "Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer." *J Cell Physiol* **184**(1): 1-16.
- Crino, L., F. Cappuzzo, et al. (2008). "Gefitinib versus vinorelbine in chemotherapy-naïve elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer (INVITE) a randomized, phase II study." *J Clin Oncol* **26**(26):4253-4260
- Cufer, T., E. Vrdoljak, et al. (2006). "SIGN Study Group. Phase II, open-label, randomized study (SIGN) of single-agent gefitinib (IRESSA) or docetaxel as second-line therapy in patients with advanced (stage IIIB or IV) non-small-cell lung cancer." *Anticancer Drugs* **17**:401-409
- Dautzenberg, B. and G. Choukroun (1998). "Cancers bronchopulmonaires primitifs non à petites cellules et tumeurs à malignité réduite." *EMC-pneumologie* (6-002-H- 20): 16 p
- D'Incecco, A. and F. Cappuzzo (2011). "Gefitinib for non-small-cell lung cancer treatment." *Expert Opin Drug Saf* **10**(6):987-96
- De Luca, A., A. Casamassimi, et al. (1999). "EGF-related peptides are involved in the proliferation and survival of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells." *Int J Cancer* **80**(4): 589-594.
- Debatin, K. M. and P. H. Krammer (2004). "Death receptors in chemotherapy and cancer." *Oncogene* **23**(16): 2950-2966.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(1): 11-22.
- Duffy, M. J., E. McKiernan, et al. (2009). "Role of ADAMs in cancer formation and progression." *Clin Cancer Res* **15**(4): 1140-1144.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424.
- Eberhard, D. A., B. E. Johnson, et al. (2005). "Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib." *J Clin Oncol* **23**(25): 5900-5909.
- Eilstein, D., Z. Uhry, et al. (2008). "Lung cancer mortality in France. Trend analysis and projection between 1975 and 2012, using a Bayesian age-period-cohort model." *Lung Cancer* **59**(3): 282-290.
- Engelman, J. A., K. Zejnullahu, et al. (2007). "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." *Science* **316**(5827): 1039-1043.
- Erjala, K., M. Sundvall, et al. (2006). "Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Clin Cancer Res* **12**(13): 4103-4111.
- Fernandes, I., Y. Bastien, et al. (2003). "Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms." *Mol Cell* **11**(1): 139-150.
- Fesik, S. W. (2005). "Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery." *Nat Rev Cancer* **5**(11): 876-885.
- Finnin, M. S., J. R. Donigian, et al. (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." *Nature* **401**(6749): 188-193.
- Freiman, R. N. and R. Tjian (2003). "Regulating the regulators: lysine modifications make their mark." *Cell* **112**(1): 11-17.
- Fry, D. W. (2003). "Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors." *Exp Cell Res* **284**(1): 131-139.
- Fukuoka, M., S. Yano, et al. (2003). "Multiinstitutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]." *J Clin Oncol* **21**(12): 2237-2246
- Galasinski, S. C., K. A. Resing, et al. (2002). "Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions." *J Biol Chem* **277**(22): 19618-19626.

- Gatzemeier, U., A. Pluzanska, A, et al. (2007). "Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial." *J Clin Oncol* **25**(12): 1545-52
- Gao, L., M. A. Cueto, et al. (2002). "Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family." *J Biol Chem* **277**(28): 25748-25755.
- Gao, Y. S., C. C. Hubbert, et al. (2010). "The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation." *J Biol Chem* **285**(15): 11219-11226.
- Garcia de Palazzo, I. E., G. P. Adams, et al. (1993). "Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas." *Cancer Res* **53**(14): 3217-3220.
- Girdwood, D., D. Bumpass, et al. (2003). "P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification." *Mol Cell* **11**(4): 1043-1054.
- Goldstraw, P., J. Crowley, et al. (2007). "The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours." *J Thorac Oncol* **2**(8): 706-714.
- Greulich, H., T. H. Chen, et al. (2005). "Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants." *PLoS Med* **2**(11): e313.
- Grozinger, C. M., C. A. Hassig, et al. (1999). "Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 4868-4873.
- Guardiola, A. R. and T. P. Yao (2002). "Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10." *J Biol Chem* **277**(5): 3350-3356.
- Guessous, I., J. Cornuz, et al. (2007). "Lung cancer screening: current situation and perspective." *Swiss Med Wkly* **137**(21-22): 304-311.
- Haggarty, S. J., K. M. Koeller, et al. (2003). "Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4389-4394.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- HAS, (2009). "IRESSA (gefitinib) commission de la transparence." *Haute Autorité de Santé* 12p. Disponible sur www.has-sante.fr
- HAS, (2011). "TARCEVA (erlotinib) commission de la transparence." *Haute Autorité de Santé* 9p. Disponible sur www.has-sante.fr
- Heidenreich, K. A. and D. A. Linseman (2004). "Myocyte enhancer factor-2 transcription factors in neuronal differentiation and survival." *Mol Neurobiol* **29**(2): 155-166.
- Heinzel, T., R. M. Lavinsky, et al. (1997). "A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression." *Nature* **387**(6628): 43-48.
- Herbst, R. S. and P. A. Bunn, Jr. (2003). "Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **9**(16 Pt 1): 5813-5824.
- Herbst, R. S., J. V. Heymach, et al. (2008). "Lung cancer." *N Engl J Med* **359**(13): 1367-1380.
- Herr, I. and K. M. Debatin (2001). "Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy." *Blood* **98**(9): 2603-2614.
- Hill, C., F. Doyon, et al. (2009). Évolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 2006. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire. 272p. Disponible sur: www.invs.santé.fr
- Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, et al. (2003). "Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis." *J Clin Oncol* **21**(20): 3798-3807.
- Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, et al. (2007). "Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib." *Ann Oncol* **18**(4): 752-760.
- Hirsch, F. R., M. Varella-Garcia, et al. (2005). "Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study." *J Clin Oncol* **23**(28): 6838-6845.

- Holbro, T., G. Civenni, et al. (2003). "The ErbB receptors and their role in cancer progression." *Exp Cell Res* **284**(1): 99-110.
- Holbro, T. and N. E. Hynes (2004). "ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 195-217.
- Hook, S. S., A. Orian, et al. (2002). "Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13425-13430.
- Hu, E., Z. Chen, et al. (2000). "Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor." *J Biol Chem* **275**(20): 15254-15264.
- Hubbert, C., A. Guardiola, et al. (2002). "HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase." *Nature* **417**(6887): 455-458.
- Hurbin, A., J. L. Coll, et al. (2005). "Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells." *J Biol Chem* **280**(20): 19757-19767.
- Hurbin, A., L. Dubrez, et al. (2002). "Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines." *J Biol Chem* **277**(51): 49127-49133.
- Hurbin, A., M. Wislez, et al. (2011). "Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma." *J Pathol* **225**(1): 83-95.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* **5**(5): 341-354.
- Imai, S. and L. Guarente (2010). "Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases." *Trends Pharmacol Sci* **31**(5): 212-220.
- INCa, (2010). Cancer du poumon Prise en charge thérapeutique du cancer du poumon non à petites cellules. Institut Nationale du Cancer 30p. Disponible sur: www.e-cancer.fr
- Inoue, A., T. Suzuki, et al. (2006). "Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations." *J Clin Oncol* **24**(21): 3340-3346.
- InVS, (2011). "Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. Rapport technique." *Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire* 78 p. Disponible sur: www.invs.santé.fr
- Ishikawa, N., Y. Daigo, et al. (2005). "Increases of amphiregulin and transforming growth factor- α in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers." *Cancer Res* **65**(20): 9176-9184.
- Jeffers, M., L. Schmidt, et al. (1997). "Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11445-11450.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, et al. (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* **108**(2): 153-164.
- Kakiuchi, S., Y. Daigo, et al. (2004). "Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839)." *Hum Mol Genet* **13**(24): 3029-3043.
- Kamemura, K., A. Ito, et al. (2008). "Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **374**(1): 84-89.
- Kao, H. Y., M. Downes, et al. (2000). "Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression." *Genes Dev* **14**(1): 55-66.
- Karagianni, P. and J. Wong (2007). "HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression." *Oncogene* **26**(37): 5439-5449.
- Kariagina, A., J. Xie, et al. (2010). "Amphiregulin mediates estrogen, progesterone, and EGFR signaling in the normal rat mammary gland and in hormone-dependent rat mammary cancers." *Horm Cancer* **1**(5): 229-244.
- Kato, M., T. Inazu, et al. (2003). "Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(4): 1109-1115.
- Kaufmann, S. H. and W. C. Earnshaw (2000). "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." *Exp Cell Res* **256**(1): 42-49.

- Keohavong, P., M. A. DeMichele, et al. (1996). "Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis." *Clin Cancer Res* **2**(2): 411-418.
- Kim, E. S., V. Hirsh, et al. (2008). "Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial." *Lancet* **372**(9652): 1809-1818
- Klikovits, T., A. End, et al. (2011). "Effects of reclassification from the TNM-6 into the TNM-7 staging system in bronchoplastic resection for non-small cell lung cancer." *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **13**(1): 29-34.
- Kobayashi, S., T. J. Boggon, et al. (2005). "EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* **352**(8): 786-792.
- Kris, M. G., R.B. Natale, et al. (2003). "Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial." *Jama* **290**(16): 2149-2158
- Lai, I. L., T. P. Lin, et al. (2010). "Histone deacetylase 10 relieves repression on the melanogenic program by maintaining the deacetylation status of repressors." *J Biol Chem* **285**(10): 7187-7196.
- Lauzeille, D., J. L. Marchand et al. (2010). "Consommation de tabac par catégorie socioprofessionnelle et secteur d'activité." *Institut de veille sanitaire* 52p. Disponible sur: www.invs.santé.f
- Lawrence, D. S. and J. Niu (1998). "Protein kinase inhibitors: the tyrosine-specific protein kinases." *Pharmacol Ther* **77**(2): 81-114.
- Lee, J. H., S. R. Hart, et al. (2004). "Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation." *Genesis* **38**(1): 32-38.
- Lee, J. H., E. G. Jeong, et al. (2010). "Inhibition of histone deacetylase 10 induces thioredoxin-interacting protein and causes accumulation of reactive oxygen species in SNU-620 human gastric cancer cells." *Mol Cells* **30**(2): 107-112.
- Lee, J.S., K. Park, et al. (2009). "A randomized phase III study of gefitinib versus standard chemotherapy (gemcitabine plus cisplatin) as a first-line treatment for never-smokers with advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung." *J Thorac Oncol* **4 Suppl 1**: S283
- Lee, Y. S., K. H. Lim, et al. (2008). "The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis." *Cancer Res* **68**(18): 7561-7569.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Li, J., Q. Lin, et al. (2002). "Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression." *Genes Dev* **16**(6): 687-692.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* **412**(6842): 95-99.
- Liu, H., Q. Hu, et al. (2009). "Histone deacetylase 11 regulates oligodendrocyte-specific gene expression and cell development in OL-1 oligodendroglia cells." *Glia* **57**(1): 1-12.
- Lu, J., T. A. McKinsey, et al. (2000). "Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4070-4075.
- Lyratzopoulos, G., G. A. Abel, et al. (2012). "Variation in advanced stage at diagnosis of lung and female breast cancer in an English region 2006-2009." *Br J Cancer* **106**(6): 1068-1075.
- Malvezzi, M., P. Bertuccio, et al. (2012). "European cancer mortality predictions for the year 2012." *Ann Oncol* **23**(4): 1044-1052.
- Marcilla, A., I. Martinez, et al. (2012). "Comparative study of the main characteristics and composition of the mainstream smoke of ten cigarette brands sold in Spain." *Food Chem Toxicol* **50**(5): 1317-1333.
- Martin, M., R. Kettmann, et al. (2007). "Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators." *Oncogene* **26**(37): 5450-5467.
- Martini, N. (1990). "Surgical treatment of non-small cell lung cancer by stage." *Semin Surg Oncol* **6**(5): 248-254.
- Maemondo, M., A. Inoue, et al. (2010). "North-East Japan Study Group. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR." *N Engl J Med* **362**:2380-2388

- Massague, J. and A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." *Annu Rev Biochem* **62**: 515-541.
- Massarelli, E., M. Varella-Garcia, et al. (2007). "KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **13**(10): 2890-2896.
- Matsuyama, A., T. Shimazu, et al. (2002). "In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation." *EMBO J* **21**(24): 6820-6831.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." *Nature* **430**(7000): 631-639.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang, et al. (2002). "MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death." *Trends Biochem Sci* **27**(1): 40-47.
- Micheau, O., E. Solary, et al. (1999). "Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs." *J Biol Chem* **274**(12): 7987-7992.
- Miettinen, P. J., J. E. Berger, et al. (1995). "Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor." *Nature* **376**(6538): 337-341.
- Miller, C. T., L. Lin, et al. (2006). "Genomic amplification of MET with boundaries within fragile site FRA7G and upregulation of MET pathways in esophageal adenocarcinoma." *Oncogene* **25**(3): 409-418.
- Miyashita, T., S. Krajewski, et al. (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* **9**(6): 1799-1805.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* **80**(2): 293-299.
- Mok, T.S., Y.L. Wu, et al. (2009). "Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma." *N Engl J Med* **361**:947-957
- Morgillo, F., W. Y. Kim, et al. (2007). "Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib." *Clin Cancer Res* **13**(9): 2795-2803.
- Morgillo, F., J. K. Woo, et al. (2006). "Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib." *Cancer Res* **66**(20): 10100-10111.
- Mitsudomi, T., S. Morita, et al. (2010). "Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial." *Lancet Oncol* **11**(2):121-128
- Noma, K., C. D. Allis, et al. (2001). "Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries." *Science* **293**(5532): 1150-1155.
- Normanno, N., A. De Luca, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." *Gene* **366**(1): 2-16.
- Oehme, I., H. E. Deubzer, et al. (2009). "Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma." *Expert Opin Investig Drugs* **18**(11): 1605-1617.
- Okabe, T., I. Okamoto, et al. (2007). "Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification." *Cancer Res* **67**(5): 2046-2053.
- Olayioye, M. A., R. M. Neve, et al. (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *EMBO J* **19**(13): 3159-3167.
- Osada, H., Y. Tatematsu, et al. (2004). "Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients." *Int J Cancer* **112**(1): 26-32.
- Ozaki, K., M. Kosugi, et al. (2010). "Blockade of the ERK or PI3K-Akt signaling pathway enhances the cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors in tumor cells resistant to gefitinib or imatinib." *Biochem Biophys Res Commun* **391**(4): 1610-1615.

- Pao, W. and V. A. Miller (2005). "Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions." *J Clin Oncol* **23**(11): 2556-2568.
- Pao, W., V. A. Miller, et al. (2005). "Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain." *PLoS Med* **2**(3): e73.
- Parente Lamelas, I., J. Abal Arca, et al. (2012). "Directed Therapies in Lung Cancer: New Hope?" *Arch Bronconeumol*.
- Paz-Ares, L., J. Sanchez, et al. (2006). "A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR)." *ASCO annual Meeting*. 2006
- Peter, M. E. and P. H. Krammer (2003). "The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond." *Cell Death Differ* **10**(1): 26-35.
- Perez-Soler, R. (2004). "HER1/EGFR targeting: refining the strategy." *Oncologist* **9**(1): 58-67
- Pinkoski, M. J. and D. R. Green (2002). "Lymphocyte apoptosis: refining the paths to perdition." *Curr Opin Hematol* **9**(1): 43-49.
- Prenzel, N., O. M. Fischer, et al. (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." *Endocr Relat Cancer* **8**(1): 11-31.
- Qin, L. and N. C. Partridge (2005). "Stimulation of amphiregulin expression in osteoblastic cells by parathyroid hormone requires the protein kinase A and cAMP response element-binding protein signaling pathway." *J Cell Biochem* **96**(3): 632-640.
- Qin, L., J. Tamasi, et al. (2005). "Amphiregulin is a novel growth factor involved in normal bone development and in the cellular response to parathyroid hormone stimulation." *J Biol Chem* **280**(5): 3974-3981.
- Reck, M. and L. Crino (2009). "Advances in anti-VEGF and anti-EGFR therapy for advanced non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* **63**(1): 1-9.
- Reed, J. C. (1999). "Dysregulation of apoptosis in cancer." *J Clin Oncol* **17**(9): 2941-2953.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 897-907.
- Roche (2011). "Resumé des caractéristiques du produit". Roche 21p. Disponible sur www.roche.fr
- Rodenhuis, S., M. L. van de Wetering, et al. (1987). "Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung." *N Engl J Med* **317**(15): 929-935.
- Roth, S. Y., J. M. Denu, et al. (2001). "Histone acetyltransferases." *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.
- Rusch, V., J. Baselga, et al. (1993). "Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung." *Cancer Res* **53**(10 Suppl): 2379-2385.
- Sahin, U., G. Weskamp, et al. (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." *J Cell Biol* **164**(5): 769-779.
- Sakurai, H., T. Tsukamoto, et al. (1997). "EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney." *Am J Physiol* **273**(3 Pt 2): F463-472.
- Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* **19**(3): 183-232.
- Sanchez-Céspedes, M. (2003). "Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis." *Lung Cancer* **40**(2): 111-121.
- Sangani, R. G. and A. J. Ghio (2011). "Lung injury after cigarette smoking is particle related." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **6**: 191-198.
- Sasaki, H., K. Endo, et al. (2007). "EGFR exon 20 insertion mutation in Japanese lung cancer." *Lung Cancer* **58**(3): 324-328.
- Sequist, L. V., D. W. Bell, et al. (2007). "Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **25**(5): 587-595
- Sequist L.V., R.G. Martins RG, et al. (2008). "First-Line Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Somatic EGFR Mutations." *J Clin Oncol*. **26**(15): 2442-2449

- Schiller, J. H., D. Harrington, et al. (2002). "Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer." *N Engl J Med* **346**(2): 92-98.
- Schuger, L., G. R. Johnson, et al. (1996). "Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation." *Development* **122**(6): 1759-1767.
- Seigneurin-Berny, D., A. Verdel, et al. (2001). "Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways." *Mol Cell Biol* **21**(23): 8035-8044.
- Sharma, S. V., D. W. Bell, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer." *Nat Rev Cancer* **7**(3): 169-181.
- Shepherd, F.A., J. Rodrigues Pereira, et al. (2005). "Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer." *N Engl J Med* **353**(2): 123-132.
- Shields, T. W. (1993). "Surgical therapy for carcinoma of the lung." *Clin Chest Med* **14**(1): 121-147.
- Shigematsu, H., L. Lin, et al. (2005). "Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers." *J Natl Cancer Inst* **97**(5): 339-346.
- Shigematsu, H., T. Takahashi, et al. (2005). "Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas." *Cancer Res* **65**(5): 1642-1646.
- Shivapurkar, N., J. Reddy, et al. (2003). "Apoptosis and lung cancer: a review." *J Cell Biochem* **88**(5): 885-898.
- Shoyab, M., V. L. McDonald, et al. (1988). "Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(17): 6528-6532.
- Sibilia, M. and E. F. Wagner (1995). "Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor." *Science* **269**(5221): 234-238.
- Skorski, T. (2002). "Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response." *Nat Rev Cancer* **2**(5): 351-360.
- Skorski, T. (2012). "Genetic mechanisms of chronic myeloid leukemia blastic transformation." *Curr Hematol Malig Rep* **7**(2): 87-93.
- Slebos, R. J. and S. Rodenhuis (1992). "The ras gene family in human non-small-cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst Monogr* **13**: 23-29.
- Smith, B. C. and J. M. Denu (2009). "Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications." *Biochim Biophys Acta* **1789**(1): 45-57.
- Smolen, G. A., R. Sordella, et al. (2006). "Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2316-2321.
- Soda, M., Y. L. Choi, et al. (2007). "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer." *Nature* **448**(7153): 561-566.
- Sparrow, D. B., E. A. Miska, et al. (1999). "MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR." *EMBO J* **18**(18): 5085-5098.
- Stennicke, H. R. and G. S. Salvesen (2000). "Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation." *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 299-306.
- Sterner, D. E. and S. L. Berger (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459.
- Stinchcombe, T. E. and M. A. Socinski (2009). "Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer." *Proc Am Thorac Soc* **6**(2): 233-241.
- Strawn, L. M. and L. K. Shawver (1998). "Tyrosine kinases in disease: overview of kinase inhibitors as therapeutic agents and current drugs in clinical trials." *Expert Opin Investig Drugs* **7**(4): 553-573.
- Subramanian, C., J. A. Jarzembowski, et al. (2011). "HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma." *Neoplasia* **13**(8): 726-734.

- Sun, M., C. Behrens, et al. (2009). "HER family receptor abnormalities in lung cancer brain metastases and corresponding primary tumors." Clin Cancer Res **15**(15): 4829-4837.
- Sunnarborg, S. W., C. L. Hinkle, et al. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability." J Biol Chem **277**(15): 12838-12845.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-446.
- Swaissland, H., A. Laight, et al. (2001). "Pharmacokinetics and tolerability of the orally active selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in healthy volunteers." Clin Pharmacokinet **40**(4): 297-306.
- Swaissland, H. C., M. V. Cantarini, et al. (2006). "Exploring the relationship between expression of cytochrome P450 enzymes and gefitinib pharmacokinetics." Clin Pharmacokinet **45**(6): 633-644.
- Swaissland, H. C., M. Ranson, et al. (2005). "Pharmacokinetic drug interactions of gefitinib with rifampicin, itraconazole and metoprolol." Clin Pharmacokinet **44**(10): 1067-1081.
- Takano, T., Y. Ohe, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **23**(28): 6829-6837.
- Tamura, K., I. Okamoto et al. (2008). "West Japan Thoracic Oncology Group. Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG0403)." Br J cancer **98**:907-914
- Thatcher, N., A. Chang, et al. (2005). "Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)." Lancet **366**(9496): 1527-1537
- Thèse Van Den Broeck, A. (3 sept. 2009). "Aspects épigénétiques des cancers broncho-pulmonaires et implication de l'histone acétyltransférase Tip60." Mémoire de Thèse d'Université (Ph.D.); (Université Joseph Fourier):Grenoble
- Tatton, W. G., R. Chalmers-Redman, et al. (2003). "Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation." Ann Neurol **53 Suppl 3**: S61-70; discussion S70-62.
- Thiberville, L. and C. Paris (2004). "Epidémiologie et facteurs de risque des cancers bronchiques primitifs." EMCpneumologie **1**(1): 7-18
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-1462.
- Threadgill, D. W., A. A. Dlugosz, et al. (1995). "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype." Science **269**(5221): 230-234.
- Torring, N., B. S. Sorensen, et al. (1998). "Amphiregulin is expressed in primary cultures of prostate myofibroblasts, fibroblasts, epithelial cells, and in prostate tissue." Prostate Cancer Prostatic Dis **1**(5): 262-267.
- Travis, W. D., E. Brambilla, et al. (2011). "International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma." J Thorac Oncol **6**(2): 244-285.
- Umekita, Y., Y. Ohi, et al. (2000). "Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients." Int J Cancer **89**(6):484-7
- Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck (2002). "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis." Anat Histol Embryol **31**(4): 214-223.
- Velu, T. J. (1990). "Structure, function and transforming potential of the epidermal growth factor receptor." Mol Cell Endocrinol **70**(3): 205-216.
- Verdel, A., S. Curtet, et al. (2000). "Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm." Curr Biol **10**(12): 747-749.

- Verdel, A. and S. Khochbin (1999). "Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers." J Biol Chem **274**(4): 2440-2445.
- Vignot, S. and B. Besse (2007). "[Gemcitabine and non small-cell lung cancer]." Bull Cancer **94 Spec No Actualites**: S95-103.
- Villagra, A., F. Cheng, et al. (2009). "The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance." Nat Immunol **10**(1): 92-100.
- Volm, M., P. Drings, et al. (1993). "Prognostic significance of the expression of c-fos, c-jun and c-erbB-1 oncogene products in human squamous cell lung carcinomas." J Cancer Res Clin Oncol **119**(9): 507-510.
- Wade, P. A. (2001). "Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin." Hum Mol Genet **10**(7): 693-698.
- Ward, W. H., P. N. Cook, et al. (1994). "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor." Biochem Pharmacol **48**(4): 659-666.
- Warren, C. M. and R. Landgraf (2006). "Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control." Cell Signal **18**(7): 923-933.
- Weil, M., M. C. Raff, et al. (1999). "Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes." Curr Biol **9**(7): 361-364.
- Wells, A. (1999). "EGF receptor." Int J Biochem Cell Biol **31**(6): 637-643.
- Westendorf, J. J., S. K. Zaidi, et al. (2002). "Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter." Mol Cell Biol **22**(22): 7982-7992.
- WHO, (2011). "Global status report on noncommunicable diseases." World Health Organization 176p
- Wood, W., M. Turmaine, et al. (2000). "Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos." Development **127**(24): 5245-5252.
- Xu, W. S., R. B. Parmigiani, et al. (2007). "Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action." Oncogene **26**(37): 5541-5552.
- Yin, X. M. (2000). "Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways." Cell Res **10**(3): 161-167.
- Yoshida, K., Y. Yatabe, et al. (2007). "Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer." J Thorac Oncol **2**(1): 22-8.
- You, A., J. K. Tong, et al. (2001). "CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1454-1458.
- Yun, C. H., K. E. Mengwasser, et al. (2008). "The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(6): 2070-2075.
- Zandi, R., A. B. Larsen, et al. (2007). "Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor." Cell Signal **19**(10): 2013-2023.
- Zhang, Y., B. Gilquin, et al. (2006). "Two catalytic domains are required for protein deacetylation." J Biol Chem **281**(5): 2401-2404.
- Zhang, Y., N. Li, et al. (2003). "HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo." EMBO J **22**(5): 1168-1179.
- Zhang, Y., H. H. Ng, et al. (1999). "Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation." Genes Dev **13**(15): 1924-1935.
- Zhong, L., M. S. Goldberg, et al. (2000). "Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis." Lung Cancer **27**(1): 3-18.
- Zou, H., Y. Wu, et al. (2006). "Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6." Biochem Biophys Res Commun **341**(1): 45-50.

ANNEXES

ANNEXE I – Classification OMS des tumeurs épithéliales malignes pulmonaires

Adaptée d'après (Beasley, Brambilla, et al. 2005)

- Carcinome épidermoïde
 - Papillaire
 - A cellules claires
 - A petites cellules
 - Basaloïde
- Carcinome à petites cellules
- Carcinome à petites cellules combiné
- Adénocarcinome
 - Adénocarcinome sous-type mixte
- Adénocarcinome acineux
 - Adénocarcinome papillaire
 - Carcinome bronchioalvéolaire
 - Non-mucineux
 - Mucineux
 - Mixte mucineux et non-mucineux ou indéterminé
 - Adénocarcinome solide avec formation de mucine
 - Adénocarcinome fœtal
 - Adénocarcinome mucineux (colloïde)
 - Cystadénocarcinome mucineux
 - Adénocarcinome à cellules en bague à chaton
 - Adénocarcinome à cellules claires
- Carcinome à grandes cellules
 - Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
 - Carcinome neuroendocrine à grandes cellules combiné
 - Carcinome basaloïde
 - Carcinome de type lymphoépithélial
 - Carcinome à cellules claires
 - Carcinome à grandes cellules avec phénotype rhabdoïde
- Carcinome adénoquameux
- Carcinome sarcomatoïde
 - Carcinome pléomorphe
 - Carcinome à cellules fusiformes
 - Carcinome à cellules géantes
 - Carcinosarcome
 - Blastome pulmonaire
- Tumeur carcinoïde
 - Carcinoïde typique
 - Carcinoïde atypique
- Carcinome de type carcinome des glandes salivaires
 - Carcinome mucoépidermoïde
 - Carcinome adénoïde kystique
 - Carcinome épithélial-myoépithélial

ANNEXE II. 7^{ème} édition de la classification pathologique TNM

(Goldstraw, Crowley et al. 2007)

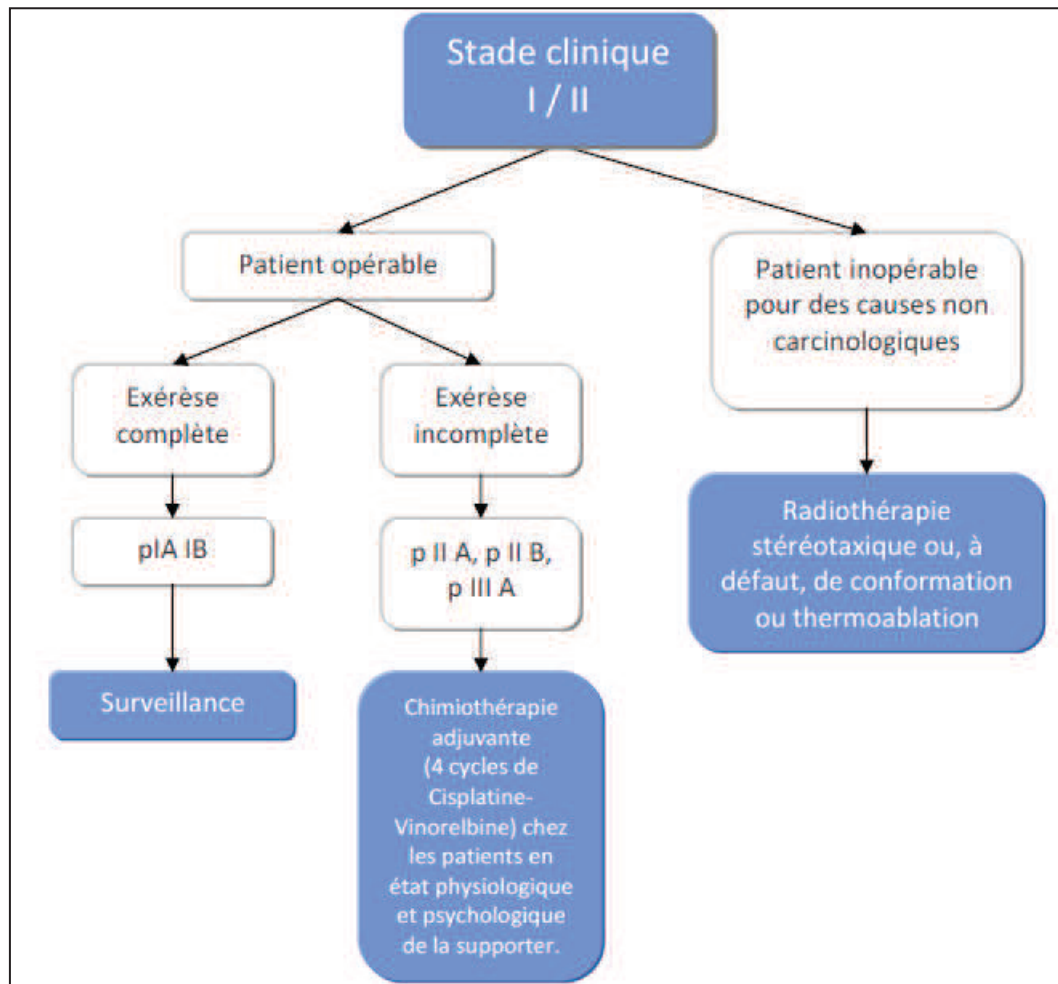
- **TX** : Tumeur ne peut être évaluée ou est démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie.
- **T0** : Pas d'évidence de tumeur primitive.
- **Tis** : Carcinome in situ.
- **T1** : Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronchique lobaire (c'est-à-dire pas la bronche souche).
 - T1a : Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension
 - T1b : Tumeur de plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension
- **T2** : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes :
 - atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène
 - invasion de la plèvre viscérale
 - présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre l'ensemble du poumon.
 - T2a : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension
 - T2b: Tumeur de plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension
- **T3** : Tumeur de plus de 7 cm ; ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleurale ou pariétale ou le péricarde ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; ou associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe.

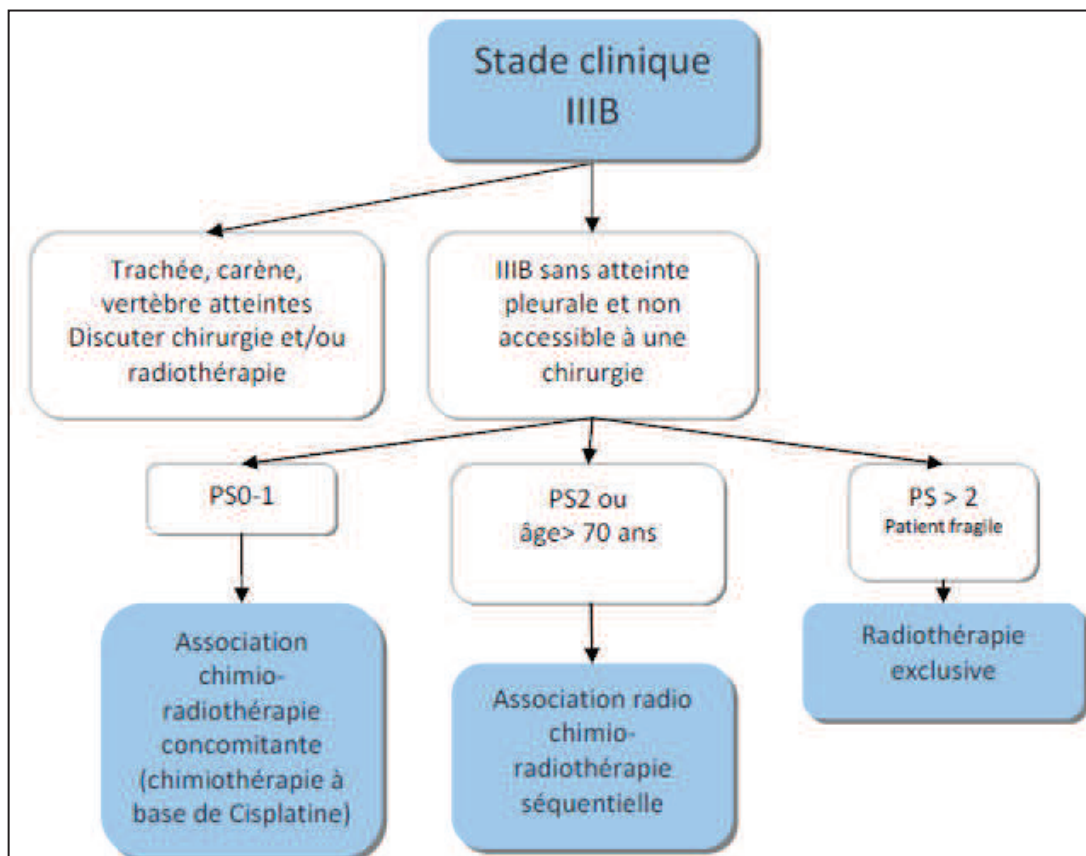
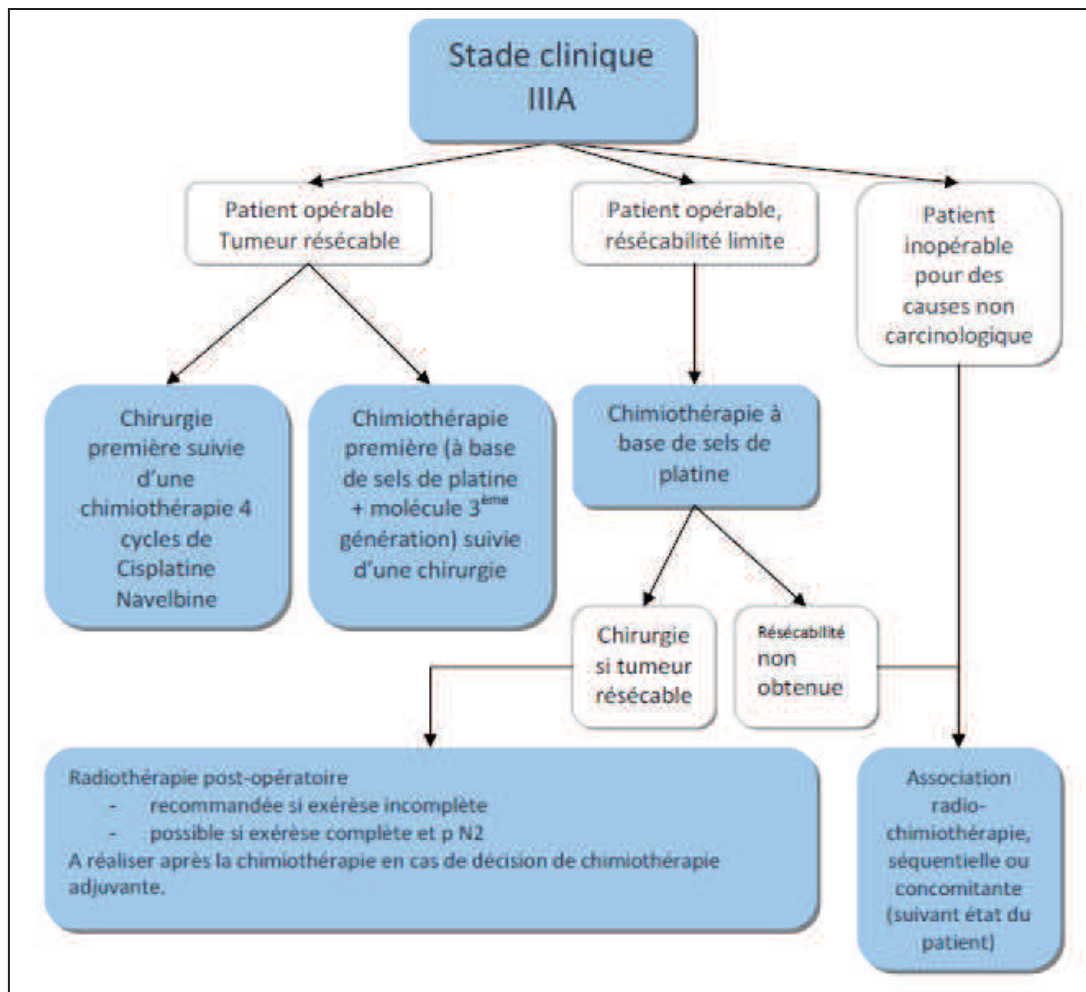
- **T4** : Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, coeur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, oesophage, corps vertébral, carène; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint.
- **NX** : les ganglions ne peuvent pas être évalués
- **N0** : pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale
- **N1** : métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct
- **N2** : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou souscarinaires
- **N3** : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou controlatéraux

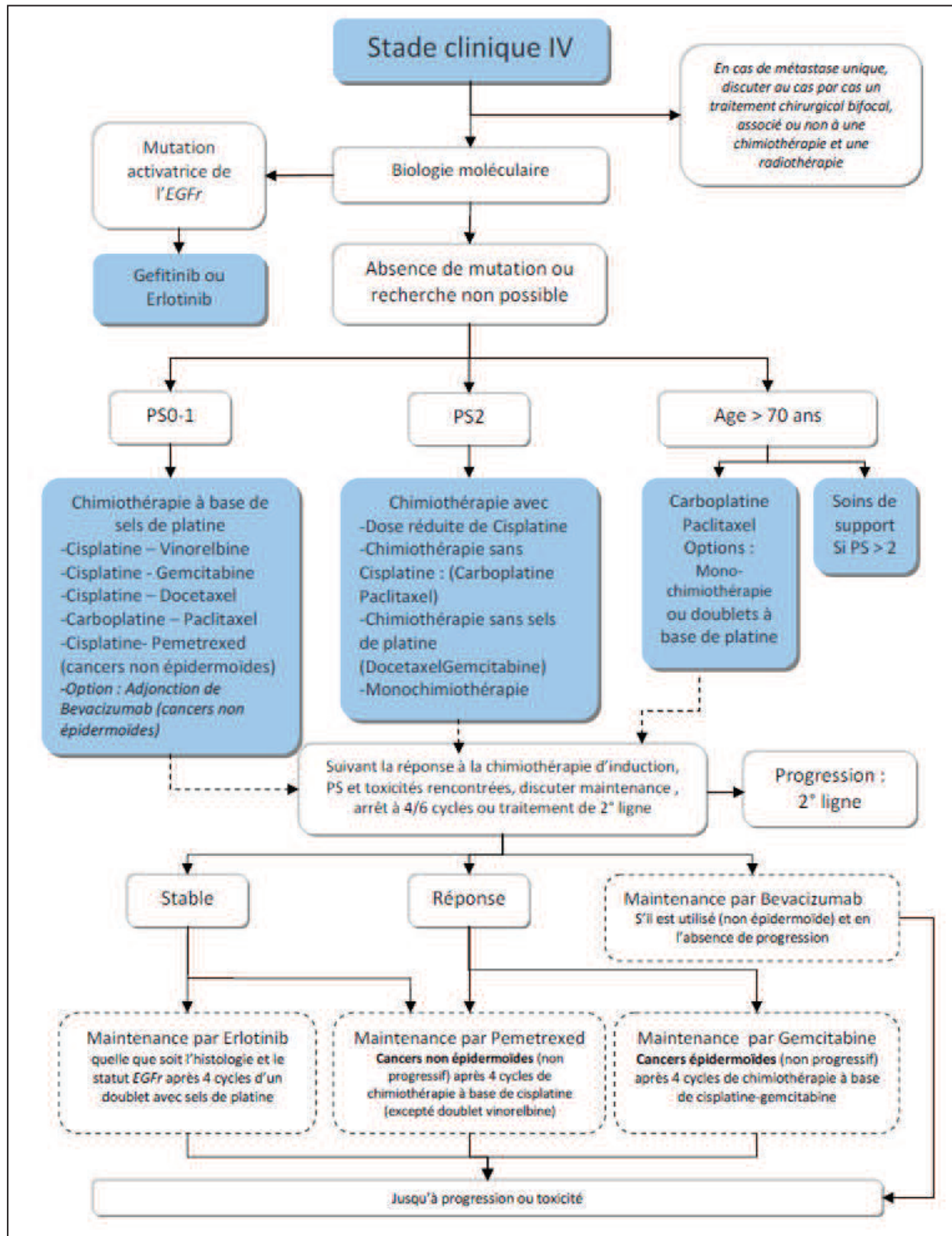
- **MX** : les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées
- **M0** : absence de métastase à distance
- **M1** : métastase à distance
 - M1a : Nodule(s) tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin
 - M1b : Metastases à distance

ANNEXE III. Référentiels de prise en charges des CBNPC.

Tiré du Référentiel Rhône-Alpes-Auvergne ; Cancer bronchique non à petites cellules. Mise à jour Octobre 2011.







*Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :



D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.



D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.



De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.



Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».



Thèse soutenue par Victor JEANNOT
Le 5 juin 2012

**ETUDE DES MECANISMES DE RESISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CANCER
DU POUMON NON A PETITES CELLULES :
RÔLE DES HDAC.**

L'incidence et la mortalité du cancer du poumon en font un problème de santé publique majeur. De nouvelles solutions thérapeutiques doivent donc être rapidement proposées. Dans ce contexte, les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur au facteur de croissance épidermique tel que le gefitinib ont été développés. Toutefois de nombreuses résistances à ces thérapeutiques sont observées. Les mécanismes de résistance moléculaire affectant leur efficacité dans les cellules de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), ne sont pas pleinement connus. L'implication de l'amphiréguline dans la résistance au sein des cellules de CBNPC par un mécanisme dépendant de l'acétylation a été préalablement montrée. Au cours de notre travail, nous avons étudié l'implication des histones déacétylases (HDAC) dans ce mécanisme. En utilisant des inhibiteurs d'HDAC, nous avons montré l'implication des HDAC de classe IIb dans l'inhibition de l'apoptose induite par gefitinib et médiée par l'amphiréguline dans les cellules de CBNPC. L'inhibition d'HDAC6, HDAC de classe IIb, par la Tubastatine A ou par les siRNA n'arrive pas à restaurer l'apoptose induite par gefitinib. Nous avons observé que l'inhibition d'HDAC6 augmente le niveau d'activation des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK1/2. Le co-traitement des cellules de CBNPC avec le gefitinib et l'inhibition d'HDAC6 diminue l'activation de MAPK/ERK1/2, mais pas le taux de PI3K/AKT, suggérant que la voie de survie PI3K/AKT pourrait protéger les cellules de l'inhibition de HDAC6. Au final, nos résultats suggèrent que l'inhibition d'HDAC6 ne peut pas prévenir la résistance au gefitinib dans les cellules de CBNPC et que la voie de survie PI3K/AKT peut compenser l'inhibition d'HDAC6.

Mots clés : Cancer bronchique non à petites cellules, Inhibiteur de tyrosine-kinase, Histones déacétylases, Gefitinib.

Président du jury : Monsieur le Professeur Michel SEVE

Membres : Madame le Docteur Amandine HURBIN

Monsieur le Docteur Jean BRETON