Rôle de l'amphiréguline dans la résistance du cancer du poumon non-à petites cellules au gefitinib

Benoît Busser

▶ **To cite this version:**

Benoît Busser. Rôle de l'amphiréguline dans la résistance du cancer du poumon non-à petites cellules au gefitinib. Sciences pharmaceutiques. 2008. dumas-01394344

HAL Id: dumas-01394344

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01394344

Submitted on 9 Nov 2016

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

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

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

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 SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

B.U.M. GRENOBLE
D 115 103565 0

Ex2

Université JOSEPH FOURIER
Faculté de PHARMACIE de GRENOBLE

Année : 2008

Thèse n° 7034

Rôle de l'amphiréguline dans la résistance du cancer du poumon non-à petites cellules au gefitinib

Mémoire du Diplôme d'Études Spécialisées
Discipline Pharmacie Spécialisée

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble
Et soutenue publiquement le 13 Novembre 2008

Par **Benoît BUSSER**

[Données à caractère personnel]

Devant le jury interrégional composé de :

Président : Monsieur le Professeur A. Favier
Membres : Madame le Professeur P. Cohen
Monsieur le Professeur M. Sève
Madame le Docteur M.J. Richard
Madame le Docteur A. Hurbin (directeur de thèse)

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE - PHARMACIE

Université JOSEPH FOURIER

Faculté de PHARMACIE de GRENOBLE

Année : 2008 Thèse n°

Rôle de l'amphiréguline dans la résistance du cancer du poumon non-à petites cellules au gefitinib

Mémoire du Diplôme d'Études Spécialisées

Discipline Pharmacie Spécialisée

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Et soutenue publiquement le 13 Novembre 2008

Par **Benoît BUSSER**

[Données à caractère personnel]

Devant le jury interrégional composé de :

Président : Monsieur le Professeur A. Favier

Membres : Madame le Professeur P. Cohen

Monsieur le Professeur M. Sève

Madame le Docteur M.J. Richard

Madame le Docteur A. Hurbin (directeur de thèse)

UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009
Mise à jour : le 6 octobre 2008

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (CHU)
DANEL	Vincent	Toxicologie (CHU SAMU-SMUR)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (DBI / CHU)
FAVIER	Alain	Professeur Emérite
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR et CHU)
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie (D.P.M.)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biotechnologie (CHU / CRI IAB)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

GRENOBLE
MÉDECINE - PHARMACIE

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie officine
RIEU	Isabelle	Qualitologie (CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

GAUCHARD	Pierre Alexis	Chimie Inorganique (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

UFR
de PHARMACIE
de GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / CHU)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A / CHU)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique Economie Santé
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (N.V.M.C)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique (D.P.M.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (I.V.H.C.I. / CHU)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie –Pharmacologie (HP2)
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 (LE.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / CHU)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RICHARD	Jean Michel	Service Accueil Handicap (Direction)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (D.P.M.)

ENSEIGNANTS ANGLAIS

COLLE Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
FITE Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER Laurence	Professeur Certifié

ATER

1 ATER	**RECHOUM** Yassine	Immunologie / DMBMT
1 ATER	**GLADE** Nicolas	Biophysique
½ ATER	**RUTA** Joséphine	Chimie Analytique
1 ATER	**NZENGUE** Yves	Biologie cellulaire / DMBMT
1 ATER	**ELAZZOUZI** Samira	Pharmacie Galénique
1 ATER	**VERON** Jean Baptiste	Chimie Organique
1 ATER	**HADJ SALEM** Jamila	Pharmacognosie
½ ATER	**REINICKE** Anne Teresa	Pharmacologie
1 ATER	**CHENAU** Jérôme	DMBMT
1 ATER	**NASER EDDINE** Abeer	Anglais

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
DMBMT : Département Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
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, Monsieur le Professeur Émérite Alain Favier,

Je vous remercie d'avoir immédiatement accepté d'être le Président du jury de ma thèse. Tout au long de mon cursus, j'ai apprécié la qualité de votre enseignement, riche de la grande expérience que vous avez acquise de la recherche. Je vous remercie pour votre esprit d'ouverture et votre disponibilité auprès des étudiants et des internes. Vous m'avez conseillé dans mon cursus et accueilli au sein du Département de Biologie Intégrée du CHU de Grenoble pour de nombreux semestres. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.

Au directeur de Thèse, Madame le Docteur Amandine Hurbin,

Je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer au sein de l'équipe "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer bronchique non-à petites cellules" de l'unité Inserm U823. Tu as su m'enseigner la méthodologie et la rigueur requises en recherche fondamentale. Merci pour tout le temps que tu consacres à ma formation, et pour ton aide dans la correction de ce mémoire.

À Madame le Professeur Pascale Cohen,

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à mon jury pour juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Michel Sève,

Je te remercie d'avoir accepté de participer à mon jury. J'ai commencé mon internat dans ton secteur et je suis heureux de te compter parmi les examinateurs. Tu trouveras ici l'expression de ma gratitude.

À Madame le Docteur Marie-Jeanne Richard,

Je vous remercie d'avoir eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon jury et de consacrer du temps pour examiner ce mémoire. Merci également pour m'avoir initié à la thérapie cellulaire.

Ensuite, je voudrais témoigner ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail :

Aux Dr Lucie Sancey et Dr Claire Rome,
Je vous remercie infiniment pour votre disponibilité et vos précieux conseils, pour le tout le temps que vous avez consacré "au transfert de vos connaissances". Ce travail ne serait pas le même sans votre aide.

À Mmes Carole Niang et Corinne Tenaud,
Vous possédez de grandes compétences techniques et avez eu la patience de m'encadrer pour me les enseigner. Pour cela je vous remercie profondément.

Aux membres des équipes 2 et 5,
Chercheurs, techniciens, étudiants, merci pour tous vos conseils tant sur le plan technique que méthodologique. Merci pour votre bonne humeur et les bons moments passés en votre compagnie.

À l'Association pour la Recherche sur le Cancer, pour l'allocation pré-doctorale de 2ème année de master recherche, qui m'a permis d'initier ce travail sereinement.

Je remercie vivement tous **mes amis** -qui se reconnaîtront- ainsi que toute personne qui cherche désespérément son nom dans ces lignes.

Je remercie tout particulièrement **ma famille** pour son inconditionnel soutien et ce malgré la distance qui peut nous séparer. Merci à Pierre Gras et Claudine Busser pour leurs encouragements constants. Une pensée pour Marie-Jeanne, Madeleine et Charles qui veillent sur moi.

Je tiens à remercier ma sœur **Amandine**, pour tout ce que nous avons vécu ensemble et pour tout ce qu'il nous reste à partager.

Enfin, je remercie **Isabelle.** Tu as la patience de me supporter et la gentillesse de tolérer la pratique de mes trop nombreuses passions. La vie avec toi rime avec bonheur.

Je dédie ce travail à mes parents.

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas
fait sur la route de la découverte. ».

Louis Pasteur

Avant-propos

Ce travail a été effectué à l'institut Albert Bonniot de Grenoble, au sein de l'équipe "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer bronchique non-à petites cellules" de l'unité Inserm U823.
La thématique du laboratoire est principalement tournée vers la résistance à l'apoptose du cancer bronchique non-à petites cellules. Après avoir identifié l'amphiréguline, un facteur de croissance, comme partie prenante de la résistance à l'apoptose de ces cancers, nous avons continué à investiguer le rôle de cette protéine, notamment dans la résistance à certains traitements, cause majeure de rechute, entraînant invariablement un assombrissement du pronostic pour le patient.

Il a été montré que les concentrations circulantes d'amphiréguline sont élevées dans le sérum de patients qui résistent au gefitinib, une molécule récente qualifiée de "thérapie ciblée" utilisée dans le traitement de certains cancers bronchiques. Nous avons cherché à démontrer l'implication de l'amphiréguline dans cette résistance et à décrire le mécanisme moléculaire sous-jacent. De nombreuses applications diagnostiques et/ou thérapeutiques découlent de ce travail. Nous poursuivons actuellement ces recherches pour compléter la caractérisation moléculaire de la résistance au gefitinib de cellules de cancer bronchique *in vitro* et *in vivo*.

Ce mémoire présente tout d'abord une revue bibliographique décrivant le cancer du poumon, puis les récepteurs au facteur de croissance épidermique et enfin l'amphiréguline. Un chapitre est ensuite consacré à l'apoptose. La seconde partie du mémoire contient une présentation de l'article scientifique soumis à une revue internationale de recherche en cancérologie, suivie des principaux résultats obtenus et de l'article lui-même. Enfin, une discussion des résultats fait place aux perspectives qui découlent de ces travaux.

Sommaire

Remerciements

Avant-Propos

Sommaire I

Index des Illustrations.....IV

Liste des abréviations.....V

INTRODUCTION.....1

PARTIE I. CARCINOGENESE BRONCHOPULMONAIRE : RAPPELS ÉPIDÉMIOLOGIQUES, HISTO-PATHOLOGIQUES, MOLÉCULAIRES ET THÉRAPEUTIQUES.....2

1. ÉPIDEMIOLOGIE DES CANCERS PULMONAIRES 2

1.1 Données Chiffrées 2

1.2 Facteurs étiologiques 3

2. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE ET PTNM DES CANCERS PULMONAIRES 4

2.1 Classification histologique selon l'OMS.....4

a) Les Carcinomes Bronchopulmonaires à Petites Cellules.....5

b) Les Carcinomes Bronchopulmonaires Non-à Petites Cellules.....5

i) Les carcinomes malpighiens.....5

ii) Les adénocarcinomes.....6

iii) Les carcinomes à grandes cellules.....6

2.2 Classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC.....7

3. LE CANCER BRONCHIQUE NON-A PETITES CELLULES (CBNPC).....8

3.1 Caractéristiques moléculaires de la carcinogenèse du CBNPC.....8

3.2 Oncogènes et signaux prolifératifs.....9

3.3 Gènes suppresseurs de tumeurs et signaux inhibiteurs de croissance.....10

3.4 Prise en charge thérapeutique du CBNPC.....12

a) La chirurgie.....12

b) La radiothérapie.....13

c) La chimiothérapie anti-cancéreuse.....13

PARTIE II. LE RECEPTEUR DE L'EGF EN CANCEROLOGIE PULMONAIRE 15

1. LA FAMILLE DE L'EGFR ET LEURS LIGANDS 15
1.1 La famille ERBB 15
1.2 Les ligands de la famille de l'EGF 15
1.3 Les voies de signalisation intracellulaires de l'EGFR 16
2. LES FONCTIONS DE L'EGFR 17
2.1 Rôle physiologique de l'EGFR 17
2.2 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse 18
2.3 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse pulmonaire 18
3. EGFR: UNE CIBLE PRIVILEGIEE DANS LE CBNPC 19
3.1 Les anticorps monoclonaux 19
a) Le cetuximab 20
b) Le panitumab 20
3.1 Les inhibiteurs de tyrosine-kinase de l'EGFR 21
a) Le gefitinib 21
b) L'erlotinib 22
c) Autres inhibiteurs de tyrosine-kinase 23
d) Facteurs de sensibilité ou de résistance aux EGFR-TKI 23

PARTIE III. L'AMPHIRÉGULINE DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON-À PETITES CELLULES 25

1. L'AMPHIREGULINE: DECOUVERTE, STRUCTURE ET FONCTION 25
2. ROLE DE L'AMPHIREGULINE DANS LA CARCINOGENESE GENERALE 26
2.1 Autosuffisance en facteurs de croissance 26
2.2 Résistance à l'apoptose 27
2.3 Angiogenèse tumorale 27
2.4 Envahissement tissulaire et métastase 27
2.5 Potentiel réplicatif illimité 28
2.6 Résistance au traitement 28
2.7 Effets antitumoraux des traitements anti-amphiréguline 29
3. ROLE DE L'AMPHIREGULINE DANS LE CBNPC 29
3.1 Amphiréguline et résistance à l'apoptose 30
3.2 Amphiréguline et résistance aux inhibiteurs de tyrosine-kinase de l'EGFR 30

PARTIE IV. L'APOPTOSE 32

1. GENERALITES SUR L'APOPTOSE 32

1.1 Définition et rôles 32

1.2 Modifications morphologiques au cours de l'apoptose 34

1.3 Principaux effecteurs 35

a) Les caspases et leurs cofacteurs 35

b) Les facteurs antiapoptotiques 36

2. DEUX GRANDES VOIES DE SIGNALISATION 37

2.1 La voie mitochondriale 37

2.2 La voie des récepteurs de mort 38

TRAVAIL DE THÈSE 40

I. OBJECTIFS 41

II. PRINCIPAUX RÉSULTATS 42

III. MANUSCRIT 43

DISCUSSION 52

CONCLUSIONS 55

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 57

ANNEXES 73

ANNEXE I 73

ANNEXE II 74

ANNEXE III 75

ANNEXE IV 76

Index des Illustrations

Figures

Figure 1. Evolution des taux de décès par grande catégorie de causes de décès, 1980-2004, France métropolitaine, deux sexes ..... 2'
Figure 2. Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006 ..... 2'
Figure 3. Corrélation entre consommation de cigarettes et cancer du poumon ..... 3'
Figure 4. Histogenèse du cancer bronchique ..... 8'
Figure 5. Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse de CBNPC ..... 8'
Figure 6. Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR ..... 17'
Figure 7. Modifications ultrastructurales séquentielles de l'apoptose et de la nécrose ..... 34'
Figure 8. Structure et mode d'activation des caspases ..... 35'
Figure 9. Les deux grandes voies apoptotiques ..... 37'
Figure 10. La famille des récepteurs de mort ..... 38'
Figure 11. Mécanisme de résistance au gefitinib des cellules de cancer bronchique non-à petites cellules au gefitinib 52

Figures du Manuscrit

Fig 1. AR inhibits gefitinib-induced apoptosis. ..... 46'
Fig 2. AR inactivates BAX ..... 47'
Fig 3. Ku70 inhibits gefitinib-induced apoptosis ..... 48'
Fig 4. AR inhibits Ku70 acetylation ..... 49'

Tableaux

Tableau 1. Classification TNM des cancers bronchopulmonaires selon l'UICC (2002) ..... 7'
Tableau 2. Principaux oncogènes impliqués dans la carcinogenèse des CBNPC ..... 9'
Tableau 3. Principaux gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la carcinogenèse des Cancers Bronchiques Non-à Petites Cellules. ..... 10'
Tableau 4. Les récepteurs de la famille ERBB et leurs ligands ..... 16'
Tableau 5. Stimuli endogènes ou non capables d'induire la sécrétion d'AREG ..... 26'
Tableau 6. Localisations cancéreuses pour lesquelles l'AREG est impliquée ..... 26'
Tableau 7. Caractéristiques de sous-groupes de patients sensibles ou résistants au gefitinib 31'

Liste des Abréviations

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase Domain
ADC	Adénocarcinome
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMM	Autorisation de mise sur le marché
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
AR	Amphiregulin
AREG	Amphiréguline
ARF	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	Bcl2-antagonist of cell death
BAX	Bcl2-associated X protein
BCL2	B-Cell lymphoma protein 2
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson
BH1/2/3	Bcl-2 homology domain 1/2/3
Carc.	Carcinome
CARD	Caspase activation recruitment domain
Caspase	Cysteinyl aspartic acid-protease
CBNPC	Cancer bronchique non-à petites cellules
CBP	Creb-binding protein
CBPC	Cancer bronchique à petites cellules
CDK	Cyclin-dependent kinase
c-FLIP	FADD-ICE like inhibitory protein
CHU	Centre hospitalo-universitaire
c-MYC	voir MYC
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complex
DR4/5	Death receptor 4/5
EGF	Epidermal growth factor receptor (facteur de croissance épidermique)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Récepteur de l'EGF)
EGFR-TKI	Inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR

ELISA	Enzyme-linked immunoSorbent assay
ErbB	v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (voir EGFR)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ETS	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
FADD	Fas asociated death domain
FASL	Fas ligand
FHIT	Fragile histidine triad gene
FISH	Fluorescent *in situ* hybridization
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral (v-fos) oncogene homolog
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
HAT	Histone acetyl transferase
hcG	Chorionic gonadotropin
HDAC	Histone déacétylase
HDACi	Inhibiteurs d'histone-déacétylase
HER	Human epidermal growth factor receptor (voir EGFR)
hTERT	Human telomerase catalytic subunit
IAP	Inhibitor of apoptosis
IFCT	Intergroupe français de cancérologie thoracique
IGF1-(R)	Insulin like growth factor type 1 (receptor)
JUN	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
KO	Knock-out
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Ku70	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Murin double minute 2
MET	Met proto-oncogene tyrosine kinase (hepatocyte growth factor receptor)
MMP	Matrix metalloproteinase
MYC	Myelocytomatosis oncogene
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NRG	Neuréguline

NSCLC	Non-small cell lung cancer
OMS	Organisation mondiale de la santé
P53	Protein 53
p90RSK	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCR	Polymerase chain reaction
P-ERK	Phosphorylated ERK
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PKC	Protéine kinase de type C
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
RB	Retinoblastoma
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SHC	Src homology 2 domain containing
SHP1/2	Small heterodimer partner
SiRNA	Small interfering ARN (petit ARN interférant)
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOS	Son of sevenless
SRC	Sarcoma, Rous sarcoma oncogene
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TACE	TNF-α converting enzyme
TGF	Transforming growth factor
TKI	Inhibiteurs de tyrosine kinase
TNF	Tumor necrosis factor
TNM	Classification histologique "Tumor Node Metastasis"
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAF2	TNF receptor associated factor 2
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF(R)	Vascular endothelial growth factor (receptor)

Introduction

Partie I. CARCINOGENESE BRONCHOPULMONAIRE : RAPPELS ÉPIDÉMIOLOGIQUES, HISTO-PATHOLOGIQUES, MOLÉCULAIRES ET THÉRAPEUTIQUES

Partie II. LE RECEPTEUR DE L'EGF EN CANCEROLOGIE PULMONAIRE

Partie III. L'AMPHIRÉGULINE DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON-À PETITES CELLULES

Partie IV. L'APOPTOSE

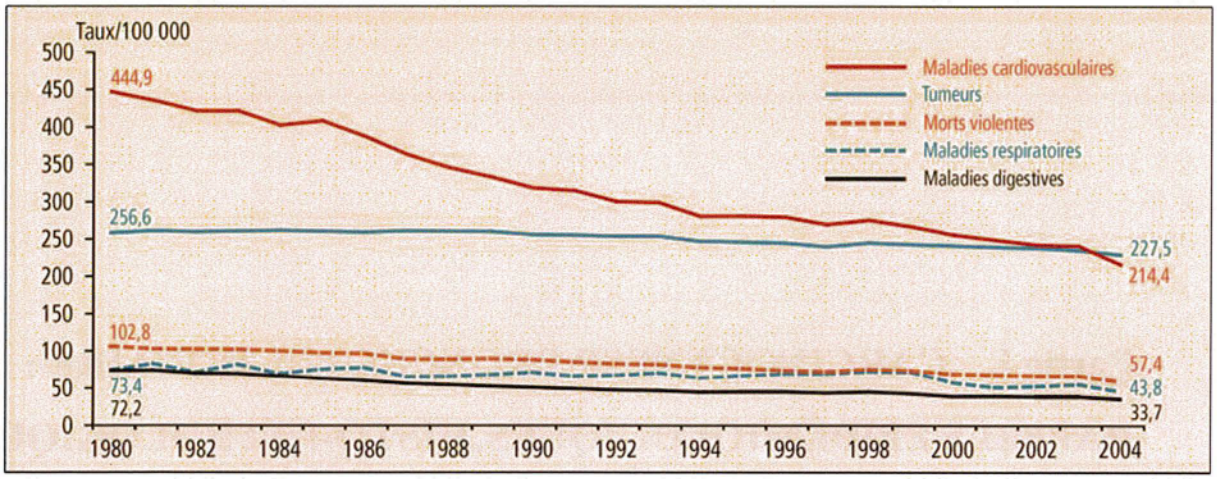


Figure 1. Evolution des taux* de décès par grande catégorie de causes de décès, 1980-2004, France métropolitaine, deux sexes (* Taux de décès standardisé pour 100000)

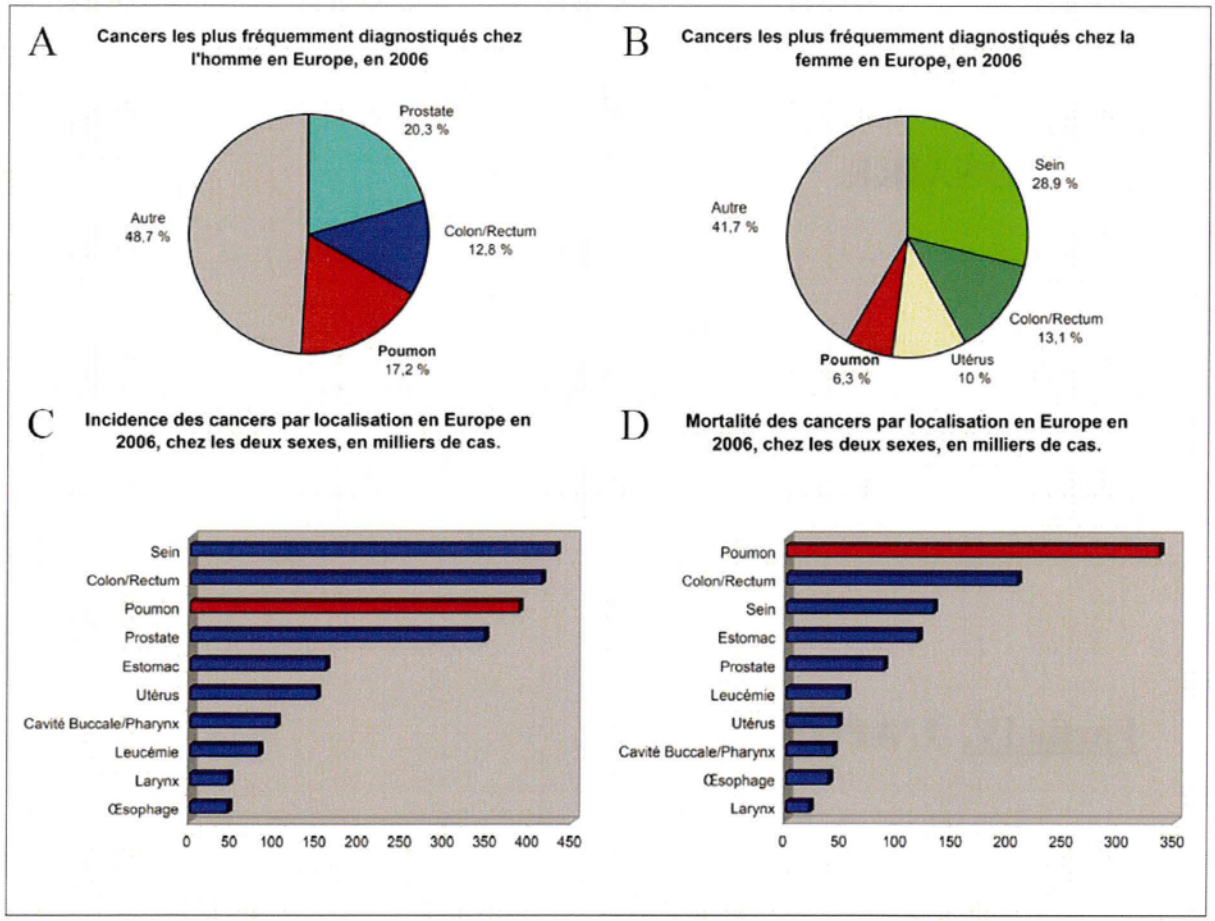


Figure 2. Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006

Incidence des cancers les plus fréquents chez l'homme (A) et chez la femme (B)

Incidence (C) et mortalité (D) des cancers, chez les deux sexes confondus.

Adapté d'après Ferlay et al., 2007

Partie I. CARCINOGENESE BRONCHOPULMONAIRE : RAPPELS ÉPIDÉMIOLOGIQUES, HISTO-PATHOLOGIQUES, MOLÉCULAIRES ET THÉRAPEUTIQUES

1. Épidémiologie des cancers pulmonaires

1.1 Données Chiffrées

Longtemps deuxième cause de mortalité en France derrière les maladies cardiovasculaires, le cancer est aujourd'hui la principale cause de mortalité (**Figure 1**) puisque 30% des décès toutes causes confondues sont liés au cancer (Aouba *et al.,* 2007). De nos jours le cancer du poumon représente un cinquième des décès par cancer. En conséquence, 1 décès sur 15 est attribuable au cancer bronchopulmonaire, ce qui fait de cette pathologie un problème majeur de santé publique. En Europe (**Figure 2**), le cancer du poumon est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué (386000 cas, soit 12,1% de tous les cas de cancer), après le cancer du sein (13,5%) et le cancer colorectal (12,9%) et il y est la première cause de mortalité par cancer (Ferlay *et al.,* 2007). En France, chaque année, 25000 à 30000 patients vont décéder d'un cancer du poumon, soit plus que les cancers du sein, du pancréas et de la prostate réunis (Hill and Doyon 2006). Depuis quelques années, le nombre de nouveaux cas de cancers bronchopulmonaires tend à se stabiliser dans la population masculine, alors qu'une augmentation préoccupante est constatée dans la population féminine qui fume de plus en plus (Eilstein *et al.,* 2008).

Une étude récente indique que le taux de survie relative à 5 ans du cancer du poumon reste inférieur à 15% (Jemal *et al.,* 2008), ce qui le place au second rang des cancers les plus agressifs, derrière le cancer du pancréas (5% de survie à 5 ans). La survie à 5 ans est étroitement liée au stade auquel le cancer bronchopulmonaire est diagnostiqué. En effet, 50% des patients possédant une tumeur pulmonaire localisée, et donc opérable, sont encore en vie 5 ans après le diagnostic. Inversement, pour une tumeur métastatique (Stade IV), moins de 3% des patients seront encore en vie 5 années après le diagnostic.

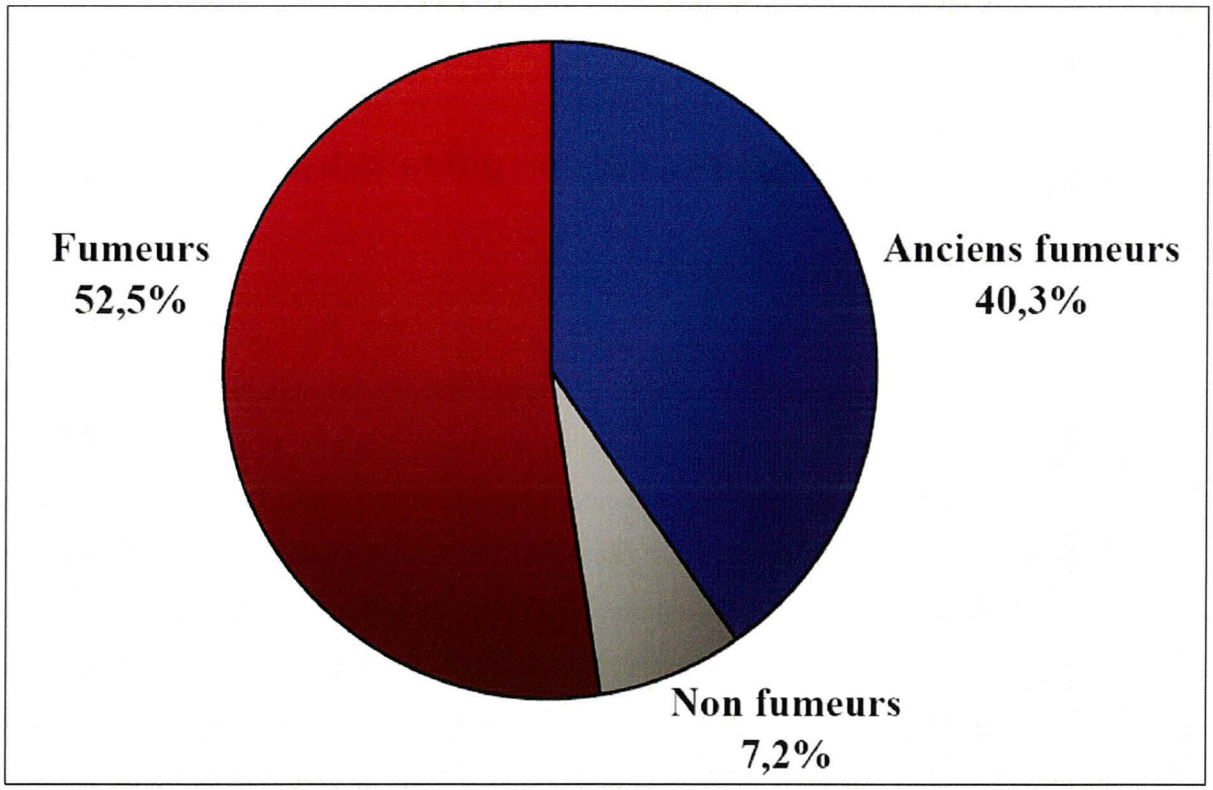


Figure 3. Corrélation entre consommation de cigarettes et cancer du poumon

Au moment du diagnostic, 71% des patients présentent déjà une tumeur de stade avancé (régionale ou métastatique) qui est alors inopérable. Ce diagnostic tardif est en partie responsable du mauvais pronostic des cancers du poumon.

1.2 Facteurs étiologiques

Le cancer bronchopulmonaire est l'une des premières maladies pour lesquelles un lien causal avec la consommation de tabac a été montré. Les fumeurs ont un risque de développer un cancer du poumon 20 fois plus élevé que les non-fumeurs. Le tabac est ainsi responsable de plus de 90 % des cancers du poumon (**Figure 3**). Trois facteurs importants liés au tabagisme sont associés au risque de survenue d'un cancer bronchopulmonaire : la durée du tabagisme, le nombre de cigarettes fumées quotidiennement et l'âge de début du tabagisme (Le Faou and Scemama 2005). Selon le modèle développé par Doll et Peto, un triplement du nombre de cigarettes fumées par jour multiplie par trois le risque de cancer, alors qu'un triplement de la durée du tabagisme multiplie par 100 le risque de développer un cancer du poumon (Peto *et al.*, 2000)

Enfin, le risque de survenue d'un cancer broncho-pulmonaire diminue après arrêt du tabac, sans pour autant s'annuler. Ainsi, par rapport aux non-fumeurs, le risque relatif de développer un cancer du poumon est égal à 16 en cas d'arrêt inférieur à 5 ans, 5 en cas d'arrêt datant de 10 à 19 ans et 1,5 au-delà de 40 ans.

D'autres facteurs peuvent accroître le risque de cancer du poumon, notamment l'exposition professionnelle (Thiberville and Paris 2004) à des agents toxiques minéraux tels l'amiante, ou à des métaux comme l'arsenic, le chrome et le nickel (Alberg and Samet 2003). L'exposition à un gaz souterrain appelé radon est également responsable d'une petite partie des carcinomes bronchiques, chez les mineurs notamment. D'autres études mentionnent d'autres facteurs de risques comme la pollution atmosphérique ou une exposition à des radiations ionisantes. Les produits à base de pétrole sont également associés au cancer du poumon, surtout chez les fumeurs.

Parmi les nombreuses substances chimiques retrouvées dans la fumée de cigarette, plus de 60 sont qualifiées de carcinogènes, puisque capables de provoquer l'apparition de cancers du poumon (Hecht 2003). Citons par exemple la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques, dont le benzo-α-pyrène est le chef de file, ou celle des nitrosamines.

2. Classification histologique et pTNM des cancers pulmonaires

Différentes classifications coexistent pour caractériser les cancers pulmonaires. On distinguera la classification histologique de la classification pathologique. Dans tous les cas, de telles classifications servent à préciser le pronostic, à adapter la thérapeutique à la clinique, ainsi qu'à comparer les résultats thérapeutiques entre groupes de malades relativement homogènes.

2.1 Classification histologique selon l'OMS

Cette classification anatomopathologique sert à caractériser les différents cancers pulmonaires selon des critères histologiques simples, de manière à être reproductibles et donc utilisable par tous les pathologistes. C'est le seul examen indispensable au diagnostic de cancer, il conditionne le traitement du patient, et sert également de base aux études biologiques et épidémiologiques (Beasley *et al.,* 2005). La classification des tumeurs fait souvent intervenir l'histologie sous forme de grades :

grade I : tumeur très différenciée
grade II : tumeur moyennement différenciée
grade III : tumeur totalement indifférenciée

La récente classification de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2004 (Travis *et al.,* 2004) définit toutes les entités histologiques des tumeurs pulmonaires, ainsi que les critères diagnostiques (**Annexe I**). A ce jour, deux principales catégories de tumeurs malignes sont reconnues, notamment en terme de prise en charge thérapeutique : les Carcinomes Bronchopulmonaires à Petites Cellules (CBPC) et les Carcinomes Bronchopulmonaires Non-à Petites Cellules (CBNPC).

a) Les Carcinomes Bronchopulmonaires à Petites Cellules

Pratiquement toujours liés au tabagisme, ce sont des tumeurs neuroendocrines de haut grade de malignité, dont la forme bénigne est la ***tumeur carcinoïde***, et la forme intermédiaire la ***tumeur carcinoïde atypique***. Le CBPC est très invasif, et est constitué de cellules de petite taille, au rapport nucléo-cytoplasmique très élevé. Les CBPC expriment tous au moins un des trois marqueurs suivants de différenciation neuroendocrine : synaptophysine, chromogranine, N-CAM. Ils représentent 15% des carcinomes bronchiques et constituent une entité anatomo-clinique bien individualisée. Ces cancers sont souvent diagnostiqués à un stade avancé dans 70% des cas et sont traités par chimiothérapie. Le pronostic de ces CBPC est très mauvais, puisque la survie de ces patients n'excède pas 2,5 années.

b) Les Carcinomes Bronchopulmonaires Non-à Petites Cellules

Cette famille de cancers bronchiques représente 85% des cancers bronchiques (Herbst *et al.*, 2008) et contient plusieurs sous-types histologiques forts différents : les carcinomes malpighiens, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules, ou plus généralement, toute entité ne présentant pas de caractéristiques "à petites cellules" (Beasley, *et al.* 2005). Seule une homologie dans la prise en charge thérapeutique justifie leur association au sein d'une même catégorie.

i) Les carcinomes malpighiens

Egalement appelés carcinomes épidermoïdes ou carcinomes squameux, ces tumeurs malignes d'origine épithéliale sont caractérisées par la présence de cellules présentant des ponts d'union inter-cellulaires et/ou des signes de kératinisation. Ce type histologique représente 40% des CBNPC, rassemblant les carcinomes malpighiens peu, moyennement et bien différenciés. Ce cancer est également très corrélé à la consommation de tabac (Spiro and Porter 2002).

ii) Les adénocarcinomes

Le terme adénocarcinome vient du grec adeno- (qui se rapporte à une glande) et de carcinome, qui désigne un cancer qui s'est développé dans les cellules épithéliales. Ce groupe de tumeurs épithéliales malignes présente des signes de différenciation glandulaire ou de production de mucine. Les adénocarcinomes bronchiques représentent le type histologique le plus fréquemment diagnostiqués, soit 40% des cancers bronchiques. Son incidence croissante en Europe correspond à l'augmentation du tabagisme. Il s'agit de la forme histologique la plus fréquente de l'homme jeune (moins de 50 ans), de la femme de tout âge et du non-fumeur. La forme ***bronchioloalvéolaire*** correspond à un adénocarcinome présentant une forme non invasive pure, dont les cellules colonisent les parois alvéolaires sans envahir l'interstitium alvéolaire, ni les vaisseaux, ni la plèvre. Cette définition a une grande valeur pronostique avec une survie de 100% des patients à 5 ans.

iii) Les carcinomes à grandes cellules

Il s'agit de tumeurs malignes ne présentant pas de critères de différenciation des carcinomes épidermoïdes, glandulaires ou à petites cellules. Il s'agit donc d'un diagnostic d'exclusion, représentant 20% des patients porteurs de CBNPC. Au sein de cette famille comprenant cinq membres, deux ont un impact direct sur le pronostique. Le ***carcinome neuro-endocrine à grandes cellules*** et le ***carcinome basaloïde***, qui possèdent respectivement le meilleur pronostic et le pronostic le plus péjoratif.

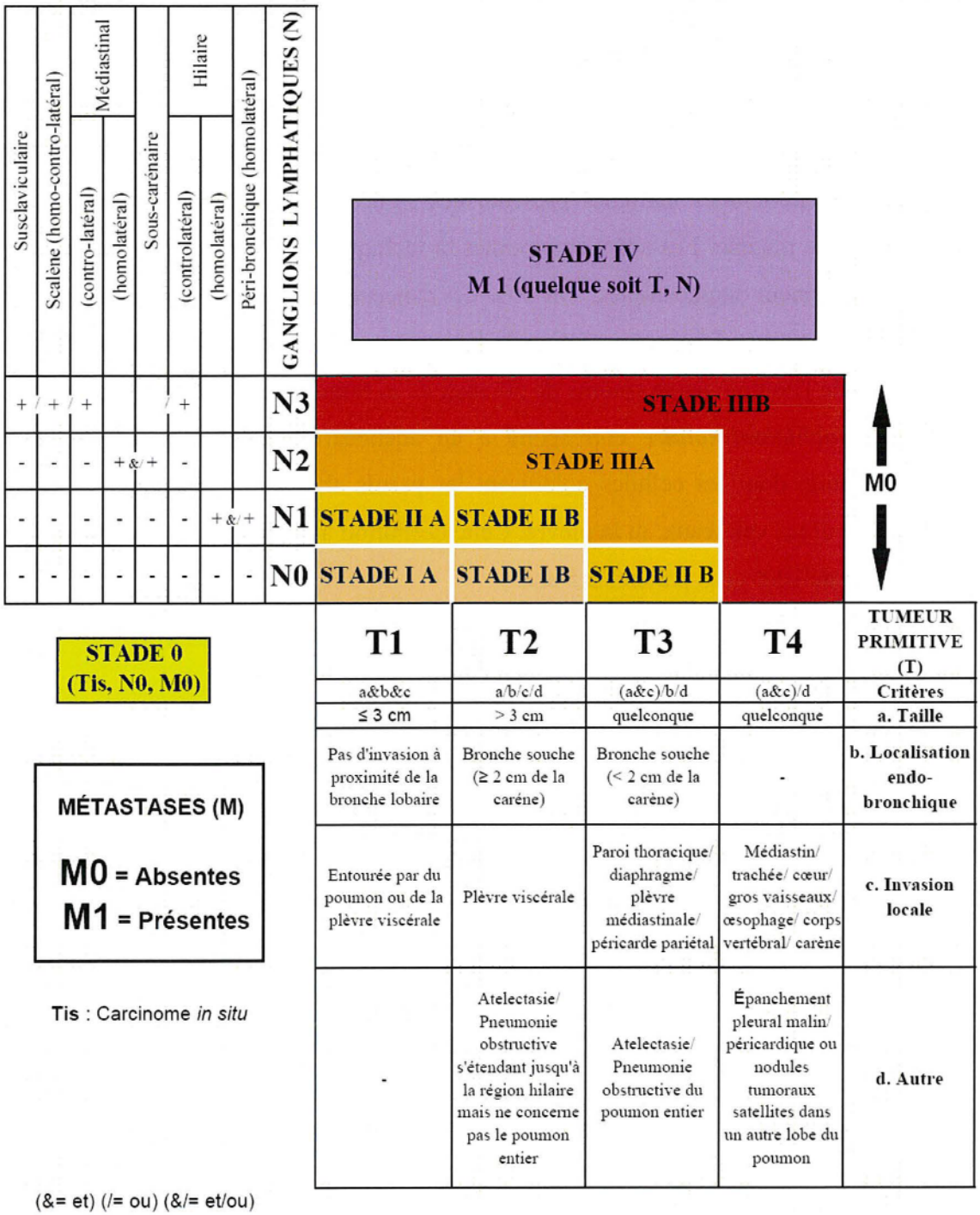


Tableau 1. Classification TNM des cancers bronchopulmonaires selon l'UICC (2002)

Adapté d'après (Lababede *et al.*, 1999)

2.2 Classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC

C'est la classification d'extension tumorale, qui intervient après le diagnostique histologique sert de référence pour le clinicien pour adapter la thérapeutique et constitue la base pour toute étude épidémiologique. Elle permet d'apprécier le stade histopathologique d'extension d'une tumeur (pTNM) après examen macroscopique et microscopique de la pièce de résection par le pathologiste.

L'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) a établi la 6ème classification pTNM du cancer bronchique en 2002 (**Tableau 1**)

Le stade histopathologique reflète le degré d'invasion tumorale. La classification pTNM est basée sur la prise en compte de trois éléments :

T = **T**aille et/ou extension de la tumeur primitive
N = présence ou absence de métastase ganglionnaire (ganglions locorégionaux ou " **N**odes ")
M = présence ou absence de **M**étastase(s) à distance

La classification pTNM permet alors d'évaluer l'avancement de la tumeur par stades, et d'après le **Tableau 1**, on retrouve :

- 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)

Le CBNPC est la forme de cancer bronchique diagnostiquée dans la plus grande majorité des cas (85%), à des stades souvent avancés. Cette famille histologique sera essentiellement étudiée dans la suite de ce mémoire.

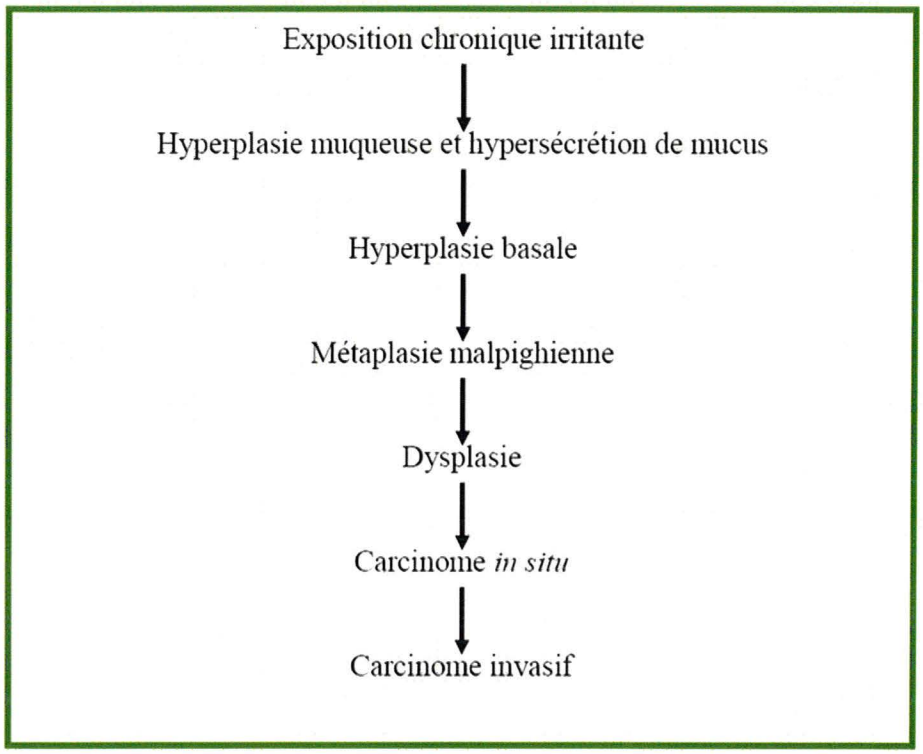


Figure 4. Histogenèse du cancer bronchique, *adapté d'après* (Madelaine & Zalcman 2005)

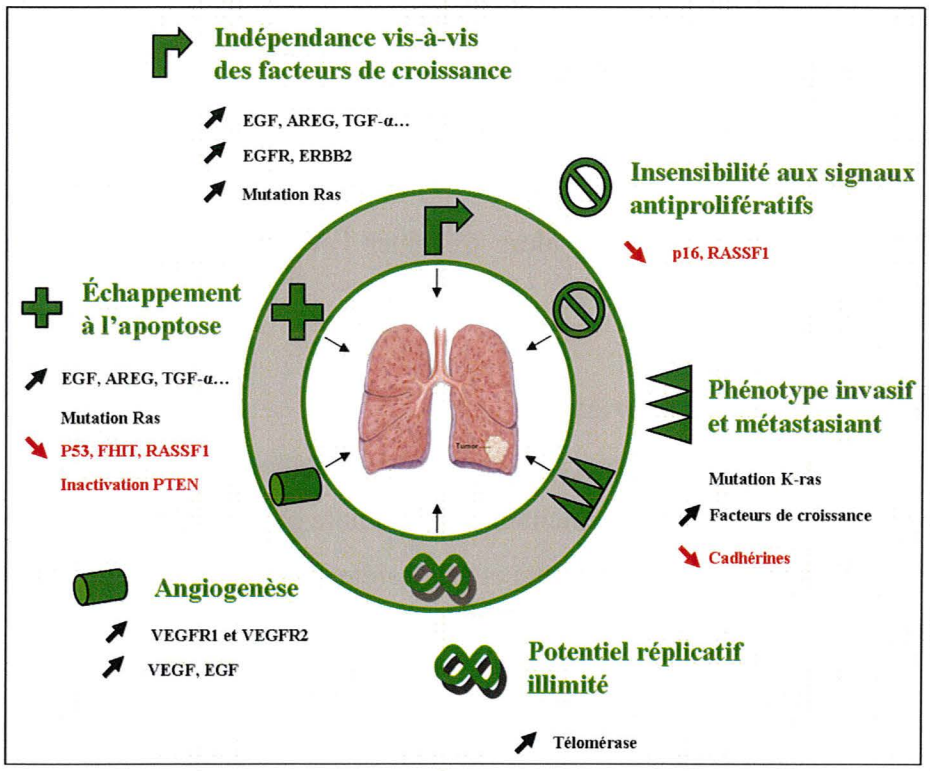


Figure 5. Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse de CBNPC (*adapté d'après* (Hanahan and Weinberg 2000)) En vert apparaissent les oncogènes, et en rouge les gènes suppresseurs de tumeurs. Il est possible d'obtenir un phénotype tumoral complet à partir de l'activation d'un nombre réduit à trois ou quatre de ces gènes.

3. Le Cancer Bronchique Non-à Petites Cellules (CBNPC)

3.1 Caractéristiques moléculaires de la carcinogenèse du CBNPC

La transformation d'une cellule épithéliale bronchique normale en cellule cancéreuse résulte de la rupture de l'équilibre entre l'expression de gènes "prolifératifs", favorisant le déroulement de la division ou de la différenciation cellulaire (proto-oncogènes), et de gènes "antiprolifératifs" (gènes suppresseurs de tumeurs), freinant le cycle cellulaire ou induisant la mort cellulaire programmée (apoptose). Cette accumulation séquentielle, sur une période relativement longue, d'anomalies génétiques et épigénétiques dérégule l'homéostasie de la cellule épithéliale de l'arbre respiratoire. Ces anomalies se traduisent par des mutations ponctuelles à l'échelle nucléotidique, ou par des anomalies qualitatives (réarrangements, délétions, amplification génique) ou quantitatives (aneuploïdie) à l'échelle chromosomique. Le concept de carcinogenèse par étapes successives (carcinogenèse bronchique multi-étapes) s'illustre ainsi parfaitement dans le cancer du poumon. En effet, les études histologiques ont révélé un véritable continuum lésionnel au niveau de l'épithélium bronchique, allant de l'hyperplasie basale au carcinome invasif, en passant par des stades de métaplasie malpighienne, de dysplasies légères à sévères, puis de carcinome *in situ* (**Figure 4**).

Le modèle de carcinogenèse bronchique (**Figure 5**) correspond au modèle de carcinogenèse générale décrit par Hanahan et coll. selon lequel les anomalies génétiques accumulées sont responsables de l'acquisition par la cellule bronchique normale, des six propriétés élémentaires qui vont en faire un cellule tumorale (Hanahan and Weinberg 2000) :

- l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance (ou autosuffisance) qui permet aux cellules de rester dans un état de prolifération active et soutenue,
- l'insensibilité vis-à-vis des signaux inhibiteurs de croissance
- la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée ou apoptose
- l'acquisition d'un potentiel réplicatif illimité par division illimitée des chromosomes (échappement à la sénescence réplicative)
- la capacité à induire un réseau de néovascularisation (pour les apports de nutriments ou d'oxygène)
- l'acquisition d'un phénotype "mobile" et invasif, donnant à la cellule tumorale la capacité de s'implanter à distance de son tissu d'origine (pouvoir métastasiant).

Nom	Fonction	Mécanisme d'activation	Fréquence de surexpression
EGFR	Récepteur membrannaire à tyrosine kinase	. Mutations somatiques pour 31% des adénocarcinomes . Autres : dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle	45-90% de CBNPC
ERBB2	Récepteur membrannaire à tyrosine kinase	. Amplification génique . Mutation dans 4% des ADC	20% adénocarcinomes
K-Ras	Protéine G sous-membranaire Transduction du signal de croissance	. Mutations somatiques des codons 12, 13 et 16	15-30% des CBNPC
c-Myc	Facteur de transcription	. Amplification génique . Dérégulation transcriptionnelle	50% des cancers bronchiques
PI3 kinase	Protéine kinase sous-membranaire Transduction du ignal de croissance	. Amplification génique . Mutation somatique	4% des CBNPC

Tableau 2. Principaux oncogènes impliqués dans la carcinogenèse des CBNPC

D'après (Risch and Plass 2008), (Sanchez-Cespedes 2003) and (Breuer *et al.*, 2005)

3.2 Oncogènes et signaux prolifératifs

Les proto-oncogènes codent pour des gènes intervenant dans l'une des étapes de transmission d'un signal de croissance stimulant la division cellulaire. Ils comportent entre autres, des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des protéines transductrices associées aux membranes, des protéines nucléaires impliquées dans le contrôle de la transcription et ou de la réplication du cycle cellulaire. Dans les cellules tumorales, la modification de structures (altération qualitative) ou d'expression (altération quantitative) de ces gènes en réponse à des mutations, amplifications géniques, translocations chromosomiques mais aussi d'anomalies épigénétiques conduit à leur activation constitutive sous la forme d'oncogènes. Ces modifications confèrent aux oncogènes leur capacité d'induire (seuls ou en coopération), le phénomène de transformation tumorale, certains étant capables d'immortaliser les cellules (*c-myc*), ou d'induire l'acquisition d'un phénotype tumoral (*ras*). Par ailleurs ces gènes sont dits dominants au niveau cellulaire car leur pouvoir transformant repose sur la modification d'un seul de leurs allèles (paternel ou maternel).
De nombreux oncogènes ont été identifiés à ce jour, la liste des oncogènes les mieux caractérisés au cours de la carcinogenèse bronchique apparaît dans le **Tableau 2.**

Certains oncogènes sont de faibles marqueurs pronostiques mais sont impliqués dans la réponse aux traitements. C'est le cas du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) dont les mutations prédisent la réponse au traitement par les inhibiteurs de tyrosine-kinase, gefitinib (Iressa®) et erlotinib (Tarceva®) utilisés dans la prise en charge thérapeutique de certains adénocarcinomes pulmonaires (Sharma *et al.,* 2007). A l'inverse, la mutation de *K-ras* prédit la résistance aux traitements par les inhibiteurs de tyrosine-kinase (Pao *et al.,* 2005) mais également une activation constitutive et non régulée des cascades en aval des récepteurs membranaires des facteurs de croissance conduisant à l'indépendance vis-à vis de facteurs de croissance et favorisant la survie et la prolifération cellulaire.
Outre les oncogènes cités ci-dessus, les facteurs de croissances tels que l'amphiréguline (AREG), l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) ou le TGF-α (Transforming Growth Factor alpha) sont également impliqués dans la tumorigenèse bronchopulmonaire. Leur surexpression ainsi que celle de leurs récepteurs par les cellules tumorales sont à l'origine de boucles de croissance autocrines ou paracrines qui permettent d'acquérir une indépendance en facteurs de croissance par rapport au milieu extracellulaire.

GRENOBLE · MED · B.U.

Nom	Fonction	Mécanisme d'inactivation	Fréquence d'altération
p53	"Gardien du génome" Facteur de transcription Contrôle le cycle cellulaire Réparation ADN/Apoptose	. Transversion G→T (tabac) . Délétions . Petites insertions	75 à 100% des CBPC 42%CBNPC 75% c. epidermoïdes 50% adénocarcinomes
p16	Kinase dép. des cyclines ou CDK Régule transition G1/S	. Hyperméthylation promoteur . LOH ou mutations ponctuelles . Délétions homozygotes	50% cancers poumon
PTEN	Tyrosine-phosphatase	. Hyperméthylation promoteur . Délétions homozygotes . Mutations ponctuelles	20% cancers poumon
FHIT	Dinucleoside hydrolase Rôle proapoptotique	. LOH par perte du bras court 3p . Délétions homozygotes	40 % CBNPC
RASSF1	Régulateur négatif de G1/S et rôle proapototique	. LOH par perte du bras court 3p . Hyperméthylation promoteur	60% CBPC 30-40% CBNPC
RAR-β	Récepteur nucléaire	. Hyperméthylation promoteur	40-60% CBNPC

Tableau 3. Principaux gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la carcinogenèse des CBNPC. D'après (Risch & Plass 2008), (Sanchez-Cespedes 2003) and (Breuer, *et al.* 2005)

La surexpression de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse incluant les cytokines VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factor) (Merrick *et al.,* 2005) et de leurs récepteurs VEGFR1, VEGFR2, neuropillines 1 et 2 (Lantuejoul *et al.,* 2003) interviennent également de manière non négligeable dans le développement de ces cancers.
Enfin l'activation d'un mécanisme de maintien de la longueur des télomères est indispensable à l'immortalisation des cellules humaines et semble constituer une étape nécessaire de la transformation néoplasique pulmonaire. En ce sens, l'acquisition d'une activité télomérase élevée est observée dans la quasi-totalité des carcinomes à petites cellules et dans 85% des CBNPC (Lantuejoul *et al.,* 2007).

3.3 Gènes suppresseurs de tumeurs et signaux inhibiteurs de croissance

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur est l'une des étapes les plus précoces de la carcinogenèse bronchique. Ces gènes exercent à l'état normal une fonction régulatrice négative sur la prolifération cellulaire. Les produits de ces gènes sont capables de contrecarrer l'effet des oncogènes et d'inhiber le phénotype tumoral d'où leur nom de gènes suppresseurs de tumeur (ou anti-oncogènes). Leur inactivation lève donc une contrainte critique sur la prolifération cellulaire et contribue à la tumorigénicité. Ils sont dits récessifs au niveau cellulaire car leurs deux allèles, paternel et maternel, doivent être altérés pour inactiver leurs fonctions. En règle générale, deux évènements moléculaires sont nécessaires à leur activation: 1) La délétion d'un large fragment d'ADN chromosomique sur un allèle ou perte d'hétérozygotie (LOH=loss of heterozygosity), 2) L'inactivation de l'allèle restant par mutation ou altération épigénétique.
Le **Tableau 3** représente les principaux gènes suppresseurs de tumeur dont l'expression est altérée ou perdue dans les CBNPC.

Au cours du processus de tumorigenèse bronchopulmonaire, les gènes suppresseurs de tumeur précocement et préférentiellement inactivés codent pour des protéines qui appartiennent aux deux grandes voies de signalisation *P16*^{INK4a}*/RB-E2F* et *P53/P14ARF-MDM2*.
Ces voies contribuent au bon déroulement du cycle cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome en raison de leur implication au niveau des points de contrôle activés lors des points

de passage entre les phases G1-S et G2-M du cycle cellulaire. Ces points de contrôle (check-points) sont des centres décisionnels dictant à la cellule son devenir, selon les signaux qu'elle reçoit (altération de l'ADN par exemple). Ces check-points décident d'une progression à travers le cycle, d'un arrêt du cycle pour réparer l'ADN endommagé et/ou d'une mort par apoptose si la cellule est incapable de réparer les lésions génomiques.

Dans les cancers bronchiques, la voie de signalisation *RB/P16* ^{INK4a} est quasiment toujours altérée. Dans les CBPC, *RB* n'est pas exprimé. Dans les CBNPC, *RB* est présent mais est inactivé par hyperphosphorylation suite à la perte de la protéine p16 ^{INK4a} (50% des cas), délétion du locus Ink4a (1/3 des cas) ou hyperméthylation du promoteur de *RB* (Gazzeri *et al.*, 1998).

La voie antiproliférative de signalisation dépendant de la protéine p53 est inactivée dans 50% des CBNPC (Zochbauer-Muller *et al.*, 2002). L'inactivation de ce facteur de transcription a lieu dans 80% des cas par délétion d'un premier allèle suivie d'une mutation ponctuelle sur l'allèle du chromosome restant. *P53* induit l'expression d'effecteurs variés qui conduisent à un arrêt du cycle cellulaire pour permettre, soit la réparation de l'ADN, soit la mort cellulaire programmée, son inactivation constitue un facteur majeur d'échappement à l'apoptose.

A coté des anomalies touchant les voies RB/p53, la très haute fréquence de la perte allélique au niveau du bras court du chromosome 3 (90% des CBPC et 70% des CBNPC) a permis d'identifier plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs dans cette région du génome, parmi lesquels *FHIT* (Fragile Histidin Triad), *RARβ* (Retinoic Acid Receptor β), *RASSF1* (Ras Association domain Family protein 1A, dont l'expression est perdue dans 30 à 40% des CBNPC), *ROBBO1/DUTT1* (Roundabout 1/Deleted in U Twenty Twenty), *SEMA 3F* (Semaphorin 3F), et *SEMA 3B* (Semaphorin 3B). D'autres gènes suppresseurs de tumeurs sont potentiellement impliqués mais de manière moins fréquente tels que *PTEN/MMAC1* (Phosphatase and Tensin homolog/Mutated in Multiple Advanced Cancer 1), *hOGG1* (Human 8-oxoguanine DNA glycosylase), *CDH-1* (E-Cadhérine) dont la perte d'activité (20% des CBNPC) favorise le potentiel invasif (Herbst *et al.*, 2000), et *CDH-13* (H-Cadhérine).
Les phénomènes épigénétiques tels l'hyperméthylation des promoteurs entraînent la perte d'expression du gène concerné. Dans le cas de Pten, protéine qui régule négativement la voie antiapoptotique de *PI3K-AKT*, l'hyperméthylation de son promoteur (6% des CBNPC) entraîne un signal de survie constitutif (Soria *et al.*, 2002).

3.4 Prise en charge thérapeutique du CBNPC

Le traitement des CBNPC va dépendre du type histologique et de la classification TNM d'extension de la maladie. Cependant d'autres critères secondaires comme l'état général du patient ou son âge peuvent contre-indiquer certains traitements, et contraindre le clinicien à opter pour des alternatives thérapeutiques, voire instaurer un traitement palliatif.

De nombreux traitements coexistent dans la prise en charge du CBNPC. Cette diversité traduit leur efficacité limitée, rappelant que le cancer du poumon est plus facile à prévenir (cessation du tabagisme) qu'à traiter. Seules les méthodes de traitement à visée curative seront décrites ci-après.

a) La chirurgie

La chirurgie est à la fois le plus ancien traitement des cancers bronchiques et le plus efficace (Martini 1990 ; Shields 1993). De nos jours, deux grandes alternatives chirurgicales sont offertes au chirurgien selon l'indication du type d'exérèse :

i) ***La pneumectomie***, pour les cancers centraux avec atteinte hilaire ou scissurale, ainsi que pour les cancers périphériques avec dépassement scissural et/ou métastases ganglionnaires hilaires ou scissurales.

ii) ***La lobectomie simple, élargie*** ainsi que ***la bilobectomie***, pour les cancers périphériques de stade N0 ou N1.
Les résections limitées à moins d'un lobe sont considérées comme insuffisantes. Un curage ganglionnaire est systématiquement réalisé en peropératoire.

b) La radiothérapie

La radiothérapie est la deuxième thérapeutique qui a fait la preuve de son efficacité dans le traitement des CBNPC (Dautzenberg and Choukroun 1998). On retrouve plusieurs indications pour la radiothérapie :

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

ii) ***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.

Les doses de radiothérapie sont exprimées en grays (Gy). Pour les cancers bronchiques, on délivre souvent 60 Gy en 30 fraction de 2 Gy car les doses faibles (40 Gy) sont jugées inefficaces. L'effet secondaire le plus constant de la radiothérapie est l'œsophagite, suivi par la fibrose pulmonaire des zones irradiées.

c) La chimiothérapie anti-cancéreuse

Il s'agit d'un traitement systémique, par opposition aux traitements loco-régionaux, donc particulièrement indiquée, pour les cancers non-opérables, dans les maladies disséminées ou à haut risque de dissémination.

i) *Les chimiothérapies conventionnelles.*

L'usage de drogues cytotoxiques pour traiter le CBNPC est conditionné par le stade de la maladie, l'état général du patient, et la présence éventuelle de comorbidités. Les nombreux effets indésirables, dont la nature et la puissance sont dose- et drogue-dépendants (**Annexe II**), peuvent contraindre le clinicien à abandonner le traitement. Le maniement des agents anticancéreux est souvent difficile en raison de leurs toxicités parfois létales. Les indications thérapeutiques doivent toujours tenir compte du rapport entre la toxicité et le bénéfice attendu pour un patient.

La monochimiothérapie n'a que peu d'intérêt mais certaines indications peuvent la justifier. On associe fréquemment deux ou trois molécules, ayant des mécanismes d'action différents au sein de protocoles de **polychimiothérapie**. La sensibilité à la chimiothérapie est d'une

extrême variabilité en fonction du type histologique, le taux de réponse moyen étant de l'ordre de 30 % (Vignot and Besse 2007).

Le traitement standard actuel est la bithérapie basée sur un doublet contenant un sel de platine (cisplatine ou carboplatine). Ce sel est alors associé à une molécule de troisième génération telle la vinorelbine (si une cure de radiothérapie concomitante est prévue), la gemcitabine (en absence de radiothérapie) ou le paclitaxel (Schiller *et al.,* 2002). Cependant de nombreux protocoles coexistent (**Annexe III**) et permettent aux cliniciens d'adapter au mieux le traitement en fonction du patient et de sa pathologie.

ii) ***Les thérapies ciblées.***

Face aux mauvais succès des traitements conventionnels, un besoin urgent de nouvelles thérapies efficaces s'est fait cruellement ressentir. Une des approches les plus prometteuses est l'utilisation de "thérapies moléculaires ciblées", traitements destinés à cibler de façon sélective un agent responsable de la croissance tumorale appartenant à la tumeur elle-même, ou à son micro-environnement, afin d'épargner le tissu sain. L'utilisation de ces nouveaux médicaments permet d'améliorer les taux de réponses et la survie (Vignot and Besse 2007). Le première cible développée avec succès dans le cancer bronchique fut l'angiogenèse tumorale. La récente évaluation de l'étude clinique de Phase III AVAiL (Avastin for Lung Cancer) montre l'efficacité du bevacizumab (AVASTIN®), un anticorps monoclonal anti-VEGF, en première ligne du CBNPC en association à la chimiothérapie. Ce traitement, déjà utilisé dans le cancer colorectal, améliore de 30% la survie sans progression et de 70% le taux de réponse à la chimiothérapie du CBNPC.

De la même façon, l'EGFR est également une des cibles privilégiées des thérapies moléculaires ciblées, validée dans de nombreux cancers, y compris le CBNPC. Le Chapitre II est consacré à ce récepteur dont le ciblage thérapeutique a démontré un bénéfice sur la survie des CBNPC en 2ème ligne dès 2005 (Shepherd *et al.,* 2005).

Partie II. LE RECEPTEUR DE L'EGF EN CANCEROLOGIE PULMONAIRE

Le EGFR est un intervenant majeur de la signalisation cellulaire. Il participe à de nombreux processus physiologiques tels la prolifération cellulaire, la survie ou la migration, que la cellule soit normale ou cancéreuse.

1. La famille de l'EGFR et leurs ligands

1.1 La famille ERBB

La sous-classe I de la superfamille des récepteurs tyrosine kinase est constituée des récepteurs ERBB qui est composée de quatre membres. Cette famille multigénique et ubiquitaire comprend l'EGFR (également connu sous le nom d'ERBB1), ERBB2 (également connu sous le nom d'HER2, ou *neu*), ERBB3 et ERBB4. Les quatre ERBB possèdent un domaine extracellulaire où se trouve le site de fixation des ligands (excepté pour ERBB2, qualifié de récepteur "sourd"), un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire porteur de l'activité tyrosine kinase (excepté pour ERBB3, qualifié de récepteur "muet" (Citri *et al.*, 2003)). L'EGFR est le premier récepteur pour lequel on a pu démontrer une activité tyrosine kinase induite par ses ligands. L'EGFR est une glycoprotéine de 170 kDa, retrouvé sous forme de monomère inactif en l'absence de ligand. La fixation d'un ligand entraîne un changement conformationnel du récepteur qui va permettre l'association de deux monomères, formant ainsi un dimère actif (Beerli and Hynes 1996).

1.2 Les ligands de la famille de l'EGF

Les ligands de la famille de l'EGF peuvent être classés en fonction de leur sélectivité pour les récepteurs (Beerli and Hynes 1996). L'EGF, le tumor growth factor-alpha (TGF-α), l'amphiréguline (AREG), et l'épigène (EPG) se lient préférentiellement à l'EGFR.

Récepteurs de facteurs de croissance	Ligands reconnus	Année de découverte
EGFR (EGF receptor) = ERBB1 = HER1	Tous sauf NRG	1978, cloné en 1984
ERBB2 = HER2 = *neu*	Aucun	cloné en 1985
ERBB3 = HER3	NRG 1 et 2	cloné en 1989
ERBB4 = HER4	BTC, HB-EGF, EPC et NRG 1 à 4	cloné en 1993
Facteurs de croissance	**Récepteurs reconnus**	**Récepteurs hétérodimérisés**
EGF = epidermal growth factor	EGFR	ERBB 1+2, 1+3, 1+4
TGF-α = tumor growth factor	EGFR	ERBB 1+2, 1+3, 1+4
AR = Amphiréguline	EGFR	ERBB 1+2, 1+3, 1+4
EPG = Épigène	EGFR	ERBB 1+2, 2+4
HB-EGF = Heparin binding EGF like growth factor	EGFR, ERBB4	ERBB 1+2, 2+4
BTC = Bêtacelluline	EGFR, ERBB4	ERBB 1+2, 1+3, 1+4, 2+4
EPR = Épiréguline	EGFR, ERBB4	ERBB 1+2, 2+4
NRG = Neurégulines (4 gènes, nombreux isoformes)	ERBB3, ERBB4	ERBB 1+3, 1+4, 2+3, 2+4, 3+4

Tableau 4. Les récepteurs de la famille ERBB et leurs ligands

La bêtacelluline (BTC), l'heparin-binding EGF like growth factor (HB-EGF) et l'épiréguline (EPR) se lient à l'EGFR et ERBB4. Les neurégulines (NRG) 1 et 2 se fixent à ERBB3 et/ou ERBB4, tandis que NRG 3 et 4 ne se fixent qu'à ERBB4. Aucun ligand capable de se lier à ERBB2 n'a pu être trouvé (Citri, *et al.* 2003). Tous ces ligands sont de petites protéines solubles qui dérivent de précurseurs membranaires clivés par des protéases membranaires. Cette étape est fondamentale pour le contrôle des stocks de ligands disponibles et l'activation des récepteurs.

Une complexité supplémentaire de la signalisation cellulaire médiée par les récepteurs ERBB réside dans le fait qu'un ligand spécifique peut induire la formation d'homodimères (*i.e.* deux monomères d'un même récepteur) mais également d'hétérodimères (*i.e.* deux monomères différents). Par exemple, certains ligands exclusifs de l'EGFR induisent la transactivation d'ERBB2, d'ERBB3 et d'ERBB4 *via* la formation d'hétérodimères avec l'EGFR (Riese *et al.*, 1996). Similairement, les NRG peuvent activer les quatre ERBB bien qu'en étant ligands spécifiques d'ERBB3 et ERBB4 (Riese, *et al.* 1996) *via* ces phénomènes d'hétérodimérisation.

Une grande variabilité de signaux cellulaires résulte donc des nombreuses combinaisons entre une dizaine de ligands et dix dimères possibles. Un récapitulatif des récepteurs, des ligands, et des associations en dimères est présenté dans le **Tableau 4**.

1.3 Les voies de signalisation intracellulaires de l'EGFR

Les effets biologiques résultant de la stimulation par les ligands dépendent uniquement de l'activité tyrosine-kinase de l'EGFR. Après fixation d'un ligand, les récepteurs se dimérisent et s'autoactivent. Cette activation de la kinase des récepteurs conduit à la phosphorylation des résidus tyrosine de l'extrémité –COOH terminale (Olayioye *et al.*, 2000). Ces tyrosines phosphorylées sont reconnues et liées par des protéines possédant des séquences consensus d'acides aminées de type SH2 (src homology 2) et PTB (phosphotyrosine binding). Ce recrutement de protéines dites adaptatrices permet l'activation des signaux intracellulaires car ces dernières ont de nombreuses fonctions notamment celle de concentrer les substrats auprès des sites kinase, de recruter des enzymes cytoplasmiques, ou d'adapter des protéines à la membrane cellulaire. Quelques secondes après l'autophosphorylation du récepteur, les tyrosines des protéines de signalisation recrutées au contact du récepteur sont phosphorylées

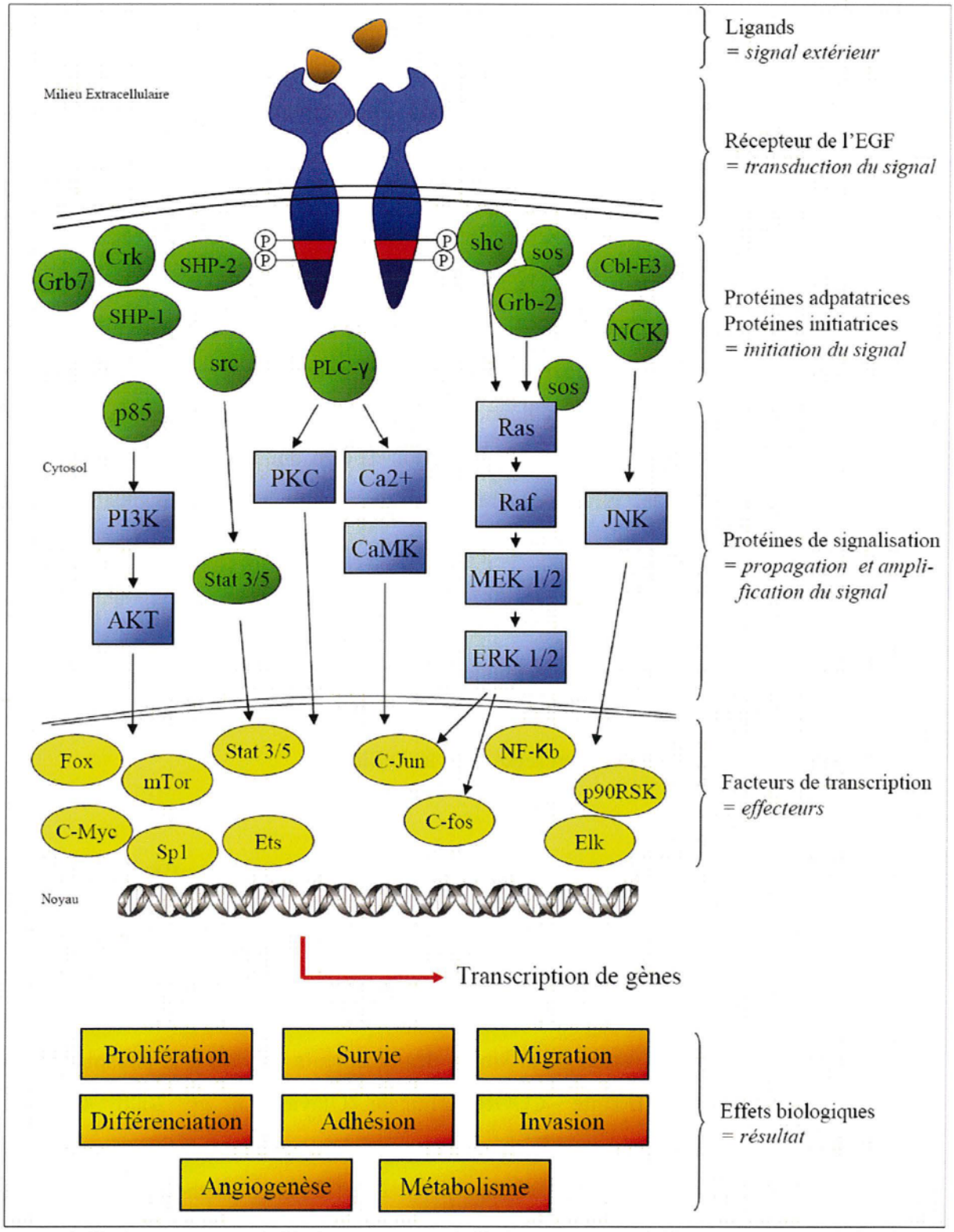


Figure 6. Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR. *D'après* (Holbro *et al.*, 2003)

par la tyrosine kinase activée du récepteur. Citons les protéines Shc, Grb7, Grb2, Crk, Nck, la phospholipase Cγ (PLCγ), les kinases intracellulaires Src et PI3K, les tyrosines phosphatases SHP1 et SHP2 et l'ubiquitine-ligase Cbl E3. A leur tour ces protéines adaptatrices vont stimuler les voies de signalisation en aval. Tous les ligands induisent l'activation de la voie ras/raf/MEK/MAPK *via* les protéines adaptatrices Grb2-sos ou Shc (Jorissen *et al.,* 2003). Le recrutement de la sous-unité régulatrice p85 va permettre l'activation de la voie PI3K/Akt. Enfin, ces cascades de signalisation vont activer en bout de chaîne différents facteurs de transcription, dont c-fos, c-Jun, c-myc, p90RSK, STAT (signal transducer and activator of transcription), NF-κB, et les membres de la famille Ets (Biswas *et al.,* 2000 ; Cutry *et al.,* 1989 ; O'Hagan and Hassell 1998 ; Olayioye *et al.,* 1999 ; Quantin and Breathnach 1988).
Cette diversification, ou "redistribution de l'information avec amplification de signal" est illustrée de façon simplifiée dans la **Figure 6.**

2. Les Fonctions de l'EGFR

2.1 Rôle physiologique de l'EGFR

L'EGFR va permettre le recrutement de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la croissance, la différenciation et le contrôle du métabolisme cellulaire. L'EGFR est également capable de véhiculer des signaux cellulaires activateurs de prolifération ou favorisant le potentiel de migration et/ou d'invasion pour beaucoup de types cellulaires. Des effets anti-apoptotiques lui sont également attribués (Normanno *et al.,* 2006)
L'EGF et son récepteur sont également impliqués dans le développement embryonnaire et dans le renouvellement de cellules souches des tissus normaux tels la peau, le foie ou les intestins. L'importance de ce récepteur pour la prolifération et la différenciation cellulaire au cours du développement et pour la physiologie de l'adulte normal a été mise à jour grâce à des modèles de souris génétiquement modifiées. Des souris *knock-out* (KO) pour l'EGFR présentent un taux de mortalité élevée et un retard embryonnaire. La plupart des nouveaux-nés meurent souvent de problèmes respiratoires entre 8 et 21 jours. Ils présentent des signes de prématurité, des dysfonctions cérébrales, ainsi que de nombreuses anomalies épithéliales de la peau, des poumons, du tractus gastro-intestinal et des reins (Miettinen *et al.,* 1995 ; Sibilia and Wagner 1995 ; Threadgill *et al.,* 1995).

2.2 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse

Cette signalisation complexe basée sur l'amplification de signal permet à l'EGFR d'être impliqué dans le développement de nombreux cancers humains. En effet, les patients dont les tumeurs présentent des altérations dans la signalisation de l'EGFR ont tendance à avoir une progression tumorale plus agressive, et on associe souvent ces modifications à un mauvais pronostic (Hynes and Lane 2005 ; Krause and Van Etten 2005 ; Nicholson *et al.,* 2001).
Historiquement, l'EGFR a été l'un des premiers proto-oncogènes cellulaires caractérisés (Downward *et al.,* 1984 ; Ushiro and Cohen 1980) et la première tyrosine kinase directement impliquée dans la carcinogenèse humaine (Gschwind *et al.,* 2004). Depuis, l'implication de tous les membres de la famille ERBB a été constatée dans de nombreux cancers, et notamment les carcinomes (Normanno *et al.,* 2001). Divers mécanismes perturbant la voie de l'EGFR ont été décrits en cancérologie fondamentale parmi lesquels des mutations de l'*EGFR*, des surexpressions (avec ou sans amplification du gène) ou une stimulation anormale par les ligands (Gschwind, *et al.* 2004). Dans les gliomes, une amplification de l'EGFR est souvent accompagnée de réarrangements structuraux qui induisent des délétions dans la partie extracellulaire de l'EGFR, dont la plus fréquente génère le variant EGFRvIII (Ekstrand *et al.,* 1992). Les carcinomes du sein, des ovaires et du poumon expriment aussi ce variant (Moscatello *et al.,* 1995). Dans de nombreux cancers, tels les cancers digestifs, pulmonaires, urinaires, les ligands EGF-like sont produits par la tumeur elle-même, induisant une activation constitutive de l'EGFR ((Salomon *et al.,* 1995) pour revue). Toutes ces altérations aboutissent soit à une activité kinase augmentée, soit à une activité kinase constitutive. De très nombreux travaux visent ainsi à inhiber cette activité anormale afin de contrecarrer la progression tumorale (Hynes and Lane 2005 ; Schlessinger 2000).

2.3 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse pulmonaire

Soixante à 80 % des CBNPC (et près de 100% des carcinomes malpighiens) surexpriment l'EGFR à la surface des cellules (Garcia de Palazzo *et al.,* 1993 ; Rusch *et al.,* 1995). L'amplification génique du gène EGFR, analysée par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) est retrouvée dans 30 à 50 % des CBNPC.

Beaucoup de ces tumeurs sécrètent les ligands de l'EGFR tels l'EGF, l'AREG, l'HB-EGF de façon autocrine, afin de devenir indépendants vis-à-vis de facteurs de croissance présents dans l'environnement tumoral. Cette stimulation autonome et continue de l'EGFR entraîne un signal constitutif de prolifération cellulaire. De plus, des mutations activatrices de la tyrosine kinase de l'EGFR ont également été décrites dans 16% des carcinomes épidermoïdes bronchiques et 40% des cas avec hyperexpression du récepteur (Garcia de Palazzo, *et al.* 1993).
Ces données montrent l'intérêt de cibler spécifiquement l'EGFR dans les CBNPC afin d'enrayer son activation constitutive.

3. EGFR: une cible privilégiée dans le CBNPC

Une approche ciblée assure une meilleure sélectivité thérapeutique, et permet d'atténuer les effets toxiques d'autres approches moins sélectives telles que la chimiothérapie conventionnelle. Cette révolution thérapeutique concerne également les carcinomes bronchiques où de nombreuses cibles et molécules sont aujourd'hui en cours développement et de validation. A l'heure actuelle, deux familles de molécules "de thérapie ciblée anti-EGFR" sont disponibles sur le marché, les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI).

3.1 Les anticorps monoclonaux

Les premiers anticorps monoclonaux spécifiques de l'EGFR ont été isolés à partir de récepteurs partiellement purifiés (Sato *et al.,* 1983) et de la lignée A431 qui surexprime l'EGFR (Schreiber *et al.,* 1981). Ces anticorps se fixent sur la partie extracellulaire de l'EGFR empêchant la fixation du ligand. Un deuxième avantage fondamental de cette stratégie anti-EGFR est la possibilité de cibler la cellule tumorale par le système immunitaire, *via* l'activité cytotoxique médiée par les anticorps. Par ailleurs, la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux est moins sujette à la forte variabilité interindividuelle observée avec les EGFR-TKI. Actuellement, quelques anticorps monoclonaux administrés par voie intraveineuse et ciblant l'EGFR sont testés dans le CBNPC, parmi lesquels le cetuximab et le panitumab.

a) Le cetuximab

Le cetuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique murin/humain qui se lie spécifiquement au domaine extracellulaire de l'EGFR. Il dérive du mAb225 isolé par Mendelsohn and coll. (Sato, *et al.* 1983) et est un inhibiteur puissant des cellules cancéreuses qui présentent une activation autocrine de l'EGFR ou pour les cellules qui le surexpriment (Goldstein *et al.,* 1995). Le cetuximab est capable d'induire l'internalisation de l'EGFR suivie de sa dégradation, ce qui n'est pas le cas des EGFR-TKI (Lilenbaum 2006).
Le cetuximab a reçu son Autorisation de Mise sur le Marché américaine (AMM) en 2003 pour une utilisation dans le traitement de patients avec un cancer colorectal métastatique en association avec la chimiothérapie. Il est également indiqué pour le cancer épidermoïde de la tête et du cou en association avec la radiothérapie. Il fait l'objet de nombreux essais cliniques dans le CBNPC. En première ligne de traitement, le cetuximab a montré des résultats encourageants en association avec la chimiothérapie (cisplatine-vinorelbine) dans un essai de phase II randomisé non publié, avec un taux de réponses objectives de 35 % versus 18 % en faveur du bras cetuximab. Par ailleurs, les résultats de l'étude de phase III cisplatine-vinorelbine plus cetuximab versus cisplatine-vinorelbine chez des patients présentant un CBNPC avec surexpression tumorale de l'EGFR (étude FLEX) sont fortement attendus par la communauté des oncologues. En seconde ligne de traitement, les premiers essais évaluant le cetuximab, seul ou en association avec la chimiothérapie, sont plutôt décevants (Hanna *et al.,* 2006). En revanche, son utilisation en association avec la radiothérapie dans les stades localement avancés semble tout à fait prometteuse.

b) Le panitumab

Le panitumumab (ABX-EGF) fait partie de la nouvelle génération d'anticorps monoclonaux en développement à savoir un anticorps anti-EGFR complètement humanisé, qui possède une affinité importante pour l'EGFR. Ils est actuellement en cours d'évaluation en association avec la chimiothérapie dans les CBNPC (Wu *et al.,* 2008).

3.1 Les inhibiteurs de tyrosine-kinase de l'EGFR

La famille des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) est très vaste. On utilise ces petites molécules inhibitrices dans de nombreuses pathologies tumorales. Les TKI ont une spécificité variable selon la cible moléculaire qu'ils inhibent. Ils bloquent de façon réversible ou irréversible la poche de fixation de l'ATP, empêchant l'activation de l'enzyme et celle des voies sous-jacentes. La première application thérapeutique de ce concept fut l'imatinib, dans la leucémie myéloïde chronique, qui cible la kinase de la protéine de fusion Bcr-Abl, née de la translocation (9;22) également appelée chromosome Philadelphie (Kantarjian *et al.,* 2002). La même approche thérapeutique a par la suite été appliquée pour le traitement du CBNPC, et certaines molécules inhibitrices spécifiques de la tyrosine kinase de l'EGFR ont vu le jour. Sans la phosphorylation du récepteur et celle des molécules adaptatrices, c'est toute la cascade de signalisation en aval qui est bloquée, aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire, et/ou à l'apoptose de la cellule.

Deux molécules administrées *per os* sont principalement utilisées aujourd'hui, le gefitinib et l'erlotinib. Toutes deux appartiennent à la classe des anilinoquinazolines et agissent en se fixant de manière compétitive à la poche de fixation de l'ATP, ce qui provoque l'inactivation transitoire de l'activité tyrosine kinase.

a) Le gefitinib

Le gefitinib (ZD 1839, Iressa®) a reçu son AMM aux Etats-Unis en 2003 pour le traitement des CBNPC à un stade avancé en progression après deux lignes de chimiothérapie sur la base de deux essais de phase II, IDEAL 1 (2^e et 3^e lignes thérapeutiques) (Fukuoka *et al.,* 2003) et IDEAL 2 (3^e ligne thérapeutique) (Kris *et al.,* 2003). Ces études ont montré un meilleur profil de toxicité comparé aux chimiothérapies et de bons résultats en terme de taux de réponse objective et de survie médiane. Cependant, l'étude ISEL (Iressa survival advantage in lung cancer) qui comparait le gefitinib en 2^e ou 3^e ligne de traitement à des soins de support chez 1692 patients atteints de CBNPC à un stade avancé n'a pas démontré de bénéfice de survie dans le bras gefitinib (Thatcher *et al.,* 2005). Deux autres essais de phase III évaluant l'intérêt de l'association en première ligne du gefitinib à une chimiothérapie n'ont pas non plus

démontré de bénéfice sur la survie (Giaccone *et al.,* 2004 ; Herbst *et al.,* 2004). Ces études ont contraint la Food and Drug Administration à restreindre l'AMM du gefitinib aux seuls patients en cours de traitement et qui tirent un bénéfice de la molécule. Malgré ces résultats décevants, le gefitinib est encore en cours d'évaluation dans deux essais cliniques en cancérologie en France (voir **Annexe IV**), les inclusions des patients sont terminées à ce jour, et les résultats sont à paraître. Au niveau mondial et dans le CBNPC, le gefitinib est évalué dans plus de quatre-vingts essais cliniques (*d'après* clinicaltrials.gov, 2008) afin de pouvoir, d'ici quelques années, mieux préciser la place du gefitinib en thérapeutique du CBNPC. Cependant l'efficacité de cette molécule pour certains sous-groupes de patients fait qu'il reste toujours commercialisé en Asie suite à son AMM obtenue au japon en 2002. De très nombreux essais thérapeutiques utilisent encore le gefitinib, dans le but de valider son efficacité dans de nombreuses pathologies tumorales où l'EGFR joue un rôle oncogène. Le site http://clinicaltrials.gov recense plus de 200 essais thérapeutiques basés sur l'administration de gefitinib, toutes pathologies et stades tumoraux confondus (consultation octobre 2008).

b) L'erlotinib

L'erlotinib (OSI-774, Tarceva®) est la première des thérapeutiques moléculaires ciblées à avoir obtenu une AMM aux Etats-Unis puis en Europe, en seconde ligne des CBNPC, suite aux résultats de l'étude BR21 (Shepherd, *et al.* 2005). Cette étude comparait l'activité de l'erlotinib en monothérapie à un placebo en 2^{e} ou 3^{e} ligne de traitement pour des CBNPC. Pour 731 patients inclus, la médiane de survie était significativement supérieure de 2 mois pour les patients traités avec l'erlotinib (6,7 mois pour le bras erlotinib versus 4,7 mois pour le bras placebo). Une analyse translationnelle rétrospective de l'étude BR21 a révélé deux biomarqueurs prédictifs d'une réponse et d'un avantage de survie avec l'erlotinib: une immunohistochimie positive pour l'EGFR et un nombre élevé de copies du gène *EGFR* par FISH (Tsao *et al.,* 2005).

c) Autres inhibiteurs de tyrosine-kinase

Une nouvelle génération d'inhibiteurs de tyrosine kinase est actuellement en voie de développement.

On peut citer, tout d'abord, les inhibiteurs pan-HER, qui sont des EGFR-TKI capables d'inhiber plusieurs membres de la famille HER (**Tableau 3**). Ainsi, le lapatinib est une molécule qui inhibe à la fois l'activité kinase de l'EGFR et d'HER2. Il a montré une certaine efficacité en association avec la chimiothérapie (capecitabine) dans les cancers du sein métastatiques HER2+. Il est actuellement en cours d'évaluation dans le CBNPC (Ross *et al.,* 2005).

Le canertinib (CI-1033) est un autre inhibiteur pan-HER, qui inhibe l'activité tyrosine kinase d'EGFR, HER2 et HER4. Les études de phase I ont montré un profil de toxicité comparable à celui observé avec l'erlotinib (Rinehart *et al.,* 2003). Les résultats des essais de phase II testant le canertinib, seul ou en association avec la chimiothérapie, sont en attente.

Citons enfin la molécule BMS 599626, qui est un inhibiteur de l'EGFR, d'HER2, et, dans une moindre mesure, d'HER4, et qui a été testé en phase I (Soria *et al.,* 2005).

Parmi les EGFR-TKI de nouvelle génération, il faut également parler des TKI irréversibles. Comme leur nom l'indique, ils empêchent de façon irréversible la fixation de l'ATP, entraînant l'internalisation et la dégradation du récepteur. Ces TKI irréversibles ont notamment démontré, *in vitro*, leur capacité à inhiber les cellules porteuses de la mutation de résistance aux EGFR-TKI : T790M (Kwak *et al.,* 2005).

d) Facteurs de sensibilité ou de résistance aux EGFR-TKI

Quelque soit l'EGFR-TKI utilisé, certains facteurs moléculaires semblent conférer une sensibilité ou une résistance à ces traitements. La résistance aux TKI devient un réel problème clinique, c'est pourquoi de nombreuses études tentent actuellement de déterminer les facteurs prédictifs de réponse aux TKI, afin de mieux identifier les patients à traiter. La découverte d'une forte corrélation entre sensibilité au gefitinib et/ou à l'erlotinib avec l'apparition de mutations somatiques activatrices de la kinase de l'EGFR permet de prédire une réponse à ces molécules. Ces mutations se retrouvent notamment dans les sous-groupes de patients non-fumeurs, et plus fréquemment chez les femmes, dans la population d'origine et asiatique et

chez des patients porteurs de tumeurs d'histologie adénocarcinomateuses ou bronchioloalvéolaires (voir (Sequist *et al.,* 2007) pour revue). En plus de fournir un marqueur génétique de CBNPC "hyper-sensibles" aux EGFR-TKI, cette corrélation souligne l'importance cruciale de choisir des kinases hyper-activées comme cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer (Skorski 2002). Les mutations décrites concernent les exons 18 à 21 du gène de l'EGFR et favorisent une liaison de haute affinité entre la molécule TKI et la kinase (Sharma, *et al.* 2007). La présence de ces mutations est non seulement prédictive d'une meilleure réponse au traitement par EGFR-TKI, mais aussi par chimiothérapie (Eberhard *et al.,* 2005). Cependant, toutes les mutations de l'EGFR ne confèrent pas une sensibilité aux TKI, comme le montre la mutation T790M dans l'exon 20, qui induit la résistance à ces molécules (Greulich *et al.,* 2005). D'autres mutations activatrices, comme celles survenant dans les exons 12 et 13 du gène *Kras* sont corrélées à une résistance aux EGFR-TKI, et sont toujours associées à un *EGFR* non muté (Massarelli *et al.,* 2007). Par ailleurs, l'IGF1-R, ERBB3, ou une activation d'HER2 sont aussi corrélées à une résistance aux EGFR-TKI (Engelman *et al.,* 2007 ; Erjala *et al.,* 2006 ; Morgillo *et al.,* 2007). D'autres facteurs prédictifs de la réponse aux TKI sont à l'étude, tels que la surexpression d'EGFR en immunohistochimie et l'amplification génique du gène EGFR par FISH.

Enfin, une étude clinique décrit la relation existante entre la résistance au gefitinib et des concentrations circulantes d'**AREG** élevée, suggérant l'implication de l'AREG dans la non-réponse au traitement par EGFR-TKI (Ishikawa *et al.,* 2005).

Partie III. L'AMPHIRÉGULINE DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON-À PETITES CELLULES

1. L'amphiréguline: découverte, structure et fonction

L'Amphireguline (AREG) est une protéine de 84 acides aminés découverte à la fin des années 1980 par M. Shoyab *et al.* L'AREG a d'abord été isolée dans le milieu de culture de cellules de cancer du sein humain MCF-7 traitées par du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Shoyab *et al.,* 1988). Le gène de l'AREG (Gene ID 374) est situé sur le bras long du chromosome 4, en position q13-q21, et est composé de 6 exons. L'AREG est synthétisée sous forme d'un précurseur membranaire, composé de 252 acides aminés (pro-AREG), qui est soumis à un clivage protéolytique au niveau de la membrane plasmique libérant ainsi la partie mature et diffusible de la protéine AREG. Ce clivage est médié essentiellement par le tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE, ou ADAM-17), membre de la famille des disintégrines et métalloprotéinases ADAM (Sahin *et al.,* 2004 ; Sunnarborg *et al.,* 2002).
Elle se fixe et active l'EGFR *via* des mécanismes autocrines (Li *et al.,* 1992), paracrines (Sternlicht *et al.,* 2005) et/ou juxtacrines (Willmarth and Ethier 2006).

L'AREG est constitutivement exprimée dans de nombreux tissus, principalement dans le système génito-urinaire et reproductif, ainsi que dans le tractus gastro-intestinal, la moelle osseuse, le foie et le tractus respiratoire.

Les principaux effets de l'AREG ont été décrits après création d'animaux transgéniques knock-out (KO) pour l'AREG. Les souris KO AREG sont viables et fertiles, et peuvent allaiter leur progéniture. Cependant, ces animaux montrent une immaturité du système d'allaitement, prouvant le rôle central joué par l'AREG dans le développement et la morphogenèse mammaire lors de la puberté et la maturation des glandes mammaires. Ceci entraîne une activité de lactation inefficace, avec des répercussions importantes sur la génération suivante, par malnutrition post-partum (Ciarloni *et al.,* 2007 ; Luetteke *et al.,* 1999).

Stimuli endogènes	Cellules / Tissu étudiés	Références
vitamine D3	carcinome mammaire	*Akutsu et al., 2001*
interleukine-1α et TNF-α	épith. et carc. cervical (utérus)	*Woodworth et al., 1995*
TGF-beta	adénocarcinome bronchique	*Bennett et al., 1992*
gastrine	estomac de rat	*Tsutsui et al., 1997 ;*
	cell. squameuse carc. tête et cou	*Zhang et al., 2006*
prostaglandines	cellules épith. intestinales	*Shao et al., 2006*
progestérone	utérus murin	*Das et al., 1995*
	utérus hamster	*Khatua et al.,2006*
estrogènes	glande mammaire	*Ciarloni et al., 2007 ; Huh et al., 2007*
	carcinome mammaire	*Martinez-Lacaci et al., 1995*
	carcinome mammaire	*LaMarca and Rosen 2007*
hCG	cellules de la granulosa humaine	*Negishi et al., 2007*
hormone parathyroïde	ostéoblastes	*Qin et al., 2005*
adénosine 3'-5' monophosphate	carcinome du sein, des ovaires	*Johansson et al., 2004*
insuline	carcinome de prostate	*Ornskov et al., 2007*
IGF-1	kératinocytes humains	*Vardy et al., 1995*
hypoxie	cellules épith. Coliques	*O'Reilly et al., 2006*
stress oxydatif	cellules epith. gastriques murines	*Miyazaki et al., 1996*

Stimuli exogènes	Tissu	Références
esters de phorbol	carcinome mammaire humain	*Shoyab et al., 1988*
fine particules	cellule épithéliale bronchique	*Blanchet et al., 2004 ; Rumelhard et al., 2007*
dioxine	uretère murin	*Choi et al., 2006*
fumée de tabac	cellules épithéliales buccales	*Du et al., 2005*
	cellules epithéliales pulmonaires	*Lemjabbar et al., 2003*
pervanadate	keratinocytes NIH 3T3	*Vecchi et al., 1998*

Tableau 5. Stimuli endogènes ou non capables d'induire la sécrétion d'AREG

Cancers d'origine épithéliale	Références
Cancer de la prostate	*Sehgal et al., 1994 ; Torring et al., 2000*
Hépatocarcinome	*Berasain et al., 2007 ; Castillo et al., 2006*
Cancer du sein	*Ma et al., 2001 ; Martinez-Lacaci et al., 1996*
	McBryan et al., 2008 ; Salomon et al., 1995
Cancer du poumon	*Bennett et al., 1992 ; Fontanini et al., 1998*
Carcinome ovarien	*D'Antonio et al., 2002 ; Johnson et al., 1991*
Cancer colorectal	*Damstrup et al., 1999 ; Johnson et al., 1992*
Carcinome de la tête et du cou	*P et al., 2000*
Cancer gastrique	*Akagi et al., 1995*
Cancers d'origine hématologique	**Références**
Myélome multiple	*Mahtouk et al., 2005*
Cancers d'origine mésenchymateuse	**Références**
Histiocytome malin fibreux	*Yamamoto et al., 2004*

Tableau 6. Localisations cancéreuses pour lesquelles l'AREG est impliquée

L'AREG possède une activité mitogénique pour les cellules (Schuger *et al.,* 1996) et joue un rôle dans plusieurs processus biologiques incluant la formation nerveuse et osseuse (Qin *et al.,* 2005), la formation des canaux lactifères dans le système mammaire (Sternlicht, *et al.* 2005), ainsi que dans l'embryogenèse, en stimulant la croissance et les ramifications de différents tissus comme la prostate (Torring *et al.,* 1998), le rein (Sakurai *et al.,* 1997) ou le poumon (Schuger, *et al.* 1996).
La sécrétion d'AREG peut être induite par de nombreux stimuli, endogènes ou non, présentés dans le **Tableau 5**.

Le nom "amphiréguline" vient du fait qu'à coté de ses effets sur la prolifération et la différenciation cellulaire, l'AREG est également capable d'inhiber la croissance de cellules normales ou cancéreuses (Plowman *et al.,* 1990). Cependant, une vingtaine d'années de recherche ont conduit la majorité de la communauté scientifique à considérer l'AREG comme ayant un rôle principalement oncogénique en faveur de la prolifération.

2. Rôle de l'amphiréguline dans la carcinogenèse générale

L'AREG est impliquée dans le développement de nombreux cancers d'origine épithéliale, mais aussi dans les pathologies tumorales hématologiques et dans les pathologies mésenchymateuses malignes d'origine fibro-histiocytiques (**Tableau 6**).

L'AREG est impliquée dans l'acquisition des altérations nécessaires au développement tumoral, dans différents cancers (Hanahan and Weinberg 2000) (voir § 3.1 de la partie I) et à différents stades de développement.

2.1 Autosuffisance en facteurs de croissance

Les cellules cancéreuses produisent des facteurs de croissance pour stimuler leur développement et permettre leur survie de façon autonome.
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. Une fois sécrétée, l'AREG peut aussi activer l'EGFR de cellules tumorales adjacentes, selon le processus de

paracrinie. De nombreuses études montrent que les cancers du sein et du colon secrètent leur propre AREG, réduisant ainsi leur dépendance en facteurs de croissance issus du microenvironnement tumoral. (Berquin *et al.,* 2001 ; Damstrup *et al.,* 1999 ; Johnson *et al.,* 1992 ; Ma *et al.,* 2001 ; Normanno *et al.,* 1994 ; Picihard *et al.,* 2006). Cependant, l'implication de l'AREG dans plusieurs autres boucles d'activation autocrines a été décrite dans d'autres cancers humains (**Tableau 6**).

2.2 Résistance à l'apoptose

La cellule cancéreuse acquiert la résistance à l'apoptose par différentes stratégies, comme l'inactivation de p53 ou la transmission de signaux antiapoptotiques. Dans le CBNPC l'AREG coopère avec l'IGF1-R pour conférer la résistance à l'apoptose induite par privation sérique (Hurbin *et al.,* 2005 ; Hurbin *et al.,* 2002). [Voir § 3.1 de la partie III.]

2.3 Angiogenèse tumorale

Les tumeurs doivent développer leur propre vascularisation pour être approvisionnées en oxygène et en nutriments, selon un processus appelé néoangiogenèse (Folkman 2006). L'AREG est un facteur mitogène puissant pour les cellules endothéliales vasculaires (Kato *et al.,* 2003). Elle induit également la sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), une cytokine proangiogénique très puissante (Soh *et al.,* 2007). Enfin, dans le cancer du sein, un traitement anti-AREG diminue la vascularisation intratumorale (Adam *et al.,* 1999), confirmant le rôle spécifique de l'AREG comme facteur pro-angiogénique.

2.4 Envahissement tissulaire et métastase

Les cellules cancéreuses acquièrent souvent la possibilité d'envahir et de coloniser les tissus adjacents, ou de migrer vers des tissus éloignés afin d'y recréer une tumeur, selon un processus appelé métastase. L'AREG peut être responsable d'une diminution des jonctions adhérentes (Chung *et al.,* 2005), mais également à l'origine d'une croissance cellulaire

indépendante de l'ancrage (Adam *et al.,* 1996), deux phénomènes nécessaires à l'essaimage métastatique des cellules tumorales depuis la tumeur primitive. L'AREG peut également augmenter l'expression de l'intégrine alpha-2 (Solic and Davies 1997), impliquée dans les changements de composition membranaire nécessaires au phénotype invasif des cellules cancéreuses. L'AREG induit l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMPs) dans les cancers de sein (Menashi *et al.,* 2003) et de la tête et du cou (Kondapaka *et al.,* 1997), participant ainsi à la dégradation de la matrice extracellulaire. Enfin, l'AREG régule et active le potentiel d'invasivité et la motilité des cellules cancéreuses (Gschwind *et al.,* 2003 ; Willmarth and Ethier 2006) et c'est un marqueur prédictif positif de la présence de métastases dans le cancer colorectal (Yamada *et al.,* 2008).

2.5 Potentiel réplicatif illimité

L'AREG participe à l'acquisition d'une activité télomérase capable d'immortaliser le clone tumoral, caractéristique "tardive" mais capitale développée par les cellules cancéreuses (Blasco 2002). En effet, la suppression d'AREG du milieu de culture de kératinocytes est capable d'induire l'inhibition de l'activité télomérase (Matsui *et al.,* 2000).

2.6 Résistance au traitement

L'AREG a été décrite comme participant à la résistance à différents traitements en cancérologie. Elle peut tout d'abord participer à la résistance aux agents de chimiothérapie conventionnelle comme les sels de Platine dans le cancer du sein (Eckstein *et al.,* 2008), mais également induire la résistance à un traitement hormonal anti-cancéreux comme l'exemestane, un inhibiteur de la farnésyl-transférase (Wang *et al.,* 2008). L'AREG confère même une résistance aux nouvelles molécules de thérapie ciblée anti-EGFR comme le gefitinib dans le CBNPC (Ishikawa, *et al.* 2005). Le paragraphe 3.2 du chapitre III est dédié à la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase induite par l'AREG dans le CBNPC.

2.7 Effets antitumoraux des traitements anti-amphiréguline

La compilation de cette littérature démontre le rôle central que joue l'AREG dans l'acquisition d'un phénotype malin par une cellule. L'AREG est impliquée dans diverses localisations cancéreuses ainsi que dans des processus tumoraux variés suggérant un rôle potentiellement antitumoral pour des molécules qui cibleraient l'AREG elle-même. Effectivement, des oligonucléotides anti-sens anti-AREG suppriment la malignité des cellules de cancer du sein (Ma *et al.,* 1999), mais sont également capables de bloquer la croissance tumorale (Normanno *et al.,* 1995) et de restaurer une sensibilité à la thérapie ciblée anti-EGFR (Funatomi *et al.,* 1997).

L'AREG est déjà proposée comme candidate pour un rôle de marqueur pronostique (Yamada, *et al.* 2008) ou comme marqueur de sensibilité aux traitements (Ishikawa, *et al.* 2005) et l'AREG semble être une cible thérapeutique pour le traitement de certains cancers, ou pour contourner une résistance à certains agents antiprolifératifs. Le développement de thérapies anti-AREG pourrait donc apporter un bénéfice thérapeutique important pour des patients sélectionnés.

3. Rôle de l'amphiréguline dans le CBNPC

Dans le CBNPC avancé, l'expression de l'AREG est corrélée avec la taille de la tumeur (Fontanini *et al.,* 1998) illustrant ainsi son activité de facteur de croissance favorisant la prolifération cellulaire. L'AREG est également un indicateur corrélé à une survie globale diminuée dans le CBNPC, ce qui suggère un rôle intéressant de l'AREG comme marqueur pronostique (Fontanini, *et al.* 1998).
Sa participation à l'acquisition d'un phénotype malin a pu être démontrée, d'abord par son activité anti-apoptotique, mais également par son rôle protecteur contre la thérapie anti-EGFR.

3.1 Amphiréguline et résistance à l'apoptose

Des boucles autocrines impliquant les facteurs de croissance de la famille de l'EGF ont été décrites dans la tumorigenèse et la résistance à l'apoptose des tumeurs pulmonaires (Shivapurkar *et al.,* 2003) et l'activité antiapoptotique de l'AREG est déjà démontrée pour les carcinomes du sein (De Luca *et al.,* 1999), du foie (Castillo *et al.,* 2006) et du poumon. Dans le CBNPC, l'AREG coopère avec l'IGF1 pour inhiber l'apoptose induite par privation de sérum (Hurbin, *et al.* 2002) et l'utilisation d'anticorps anti-AREG restaure l'apoptose des cellules de CBNPC. L'AREG active le récepteur de l'IGF1 (IGF1-R), indépendamment de son propre récepteur l'EGFR. Une boucle d'activation autocrine se met en place puisque l'IGF1-R active en retour la sécrétion d'AREG et d'IGF1. La combinaison d'AREG et d'IGF1 active une voie de survie dépendante des PKC mais indépendante des MAPKinases et des PI3Kinases (Hurbin, *et al.* 2005). Cette voie abouti à l'inactivation des molécules proapoptotiques BAD et BAX, et conduit donc à la résistance à l'apoptose.

La partie IV est entièrement dédiée à décrire l'apoptose et les mécanismes qui la régissent.

3.2 Amphiréguline et résistance aux inhibiteurs de tyrosine-kinase de l'EGFR

Nous avons déjà vu que des molécules anticancéreuses comme le gefitinib ou l'erlotinib sont capables d'interrompre les boucles d'activation autocrines de l'EGFR et possèdent une activité antiproliférative dans le CBNPC (voir § 3.1 de la partie II). Cependant, le gefitinib n'a pu montrer d'avantage de survie par rapport au placebo dans une population globale. Des marqueurs prédictifs de sensibilité ou de résistance au gefitinib sont donc activement recherchés pour identifier les patients susceptibles de bénéficier de cette thérapie ciblée.

CBNPC sensibles au gefitinib	CBNPC résistants au gefitinib
Présence de mutations activatrices de l'EGFR	-
Population principalement féminine	Population principalement masculine
Non-fumeurs	Fumeurs
Tumeur de type adénocarcinome	Tumeur de type non-adénocarcinome
?	**Taux élevé d'AREG sérique**

Tableau 7. Caractéristiques de sous-groupes de patients sensibles ou résistants au gefitinib

D'après (Ishikawa, *et al.* 2005 ; Sharma, *et al.* 2007)

Les patients répondeurs au gefitinib présentent une expression génique de l'AREG différente de celle des non-répondeurs. Ces données ont été confirmées par RT-PCR, par immunohistochimie et par des dosages ELISA : l'AREG est surexprimée chez les répondeurs, alors qu'elle est indétectable chez les non-répondeurs (Kakiuchi *et al.,* 2004). De plus, les patients avec un CBNPC qui possèdent le pronostic vital le plus mauvais sont ceux qui possèdent des concentrations d'AREG sériques élevées. Ce paramètre étant corrélé à la résistance au gefitinib (Ishikawa, *et al.* 2005). Ce sous-groupe de patients non-répondeurs au gefitinib est principalement constitué d'hommes, fumeurs, avec des CBNPC autres que des adénocarcinomes.

Il est intéressant de constater que la plupart des patients chez qui le gefitinib est efficace sont des femmes, non fumeurs, avec des CBNPC de type adénocarcinome (Sharma, *et al.* 2007) et qui présentent des mutations de l'EGFR. Le **Tableau 7** résume ces caractéristiques.

Ces données indiquent que l'AREG sérique pourrait être un marqueur intéressant de résistance au gefitinib chez les patients avec des CBNPC de stade avancé.

Partie IV. L'APOPTOSE

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort.
La mort cellulaire "normale" a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement, tant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Lockshin and Zakeri 2001 ; Weber 1964). En 1972, Kerr et coll. ont décrit une mort cellulaire du même type dans divers tissus et types cellulaires avec des caractéristiques morphologiques distinctes de celles observées dans les cellules en nécrose (Kerr *et al.,* 1972). Ils ont suggéré que ces caractéristiques pouvaient être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont appelé "apoptose". Ce terme issu du grec fait allusion à la chute des feuilles en automne. L'apoptose est un phénomène conservé à travers les espèces, elle est retrouvée chez tous les organismes multicellulaires (Cikala *et al.,* 1999 ; Steller 1995).

Dans ce chapitre, nous décrirons dans une première partie le processus de l'apoptose et évoquerons rapidement ses rôles et principaux effecteurs. Puis, nous aborderons les voies de signalisation qui conduisent à l'apoptose.

1. Généralités sur l'apoptose

1.1 Définition et rôles

Au cours du développement, le processus apoptotique permet l'élimination de structures inutiles ou de tissus en excès, comme par exemple lors de la morphogenèse des doigts (Wood *et al.,* 2000) ou lors de la mise en place du système nerveux (Clarke *et al.,* 1998). L'apoptose intervient aussi chez l'adulte, pour maintenir l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau (Weil *et al.,* 1999), ou lors de l'étape finale de la réaction

immunitaire cellulaire, où les lymphocytes activés en surnombre, meurent par apoptose, de même que les lymphocytes dysfonctionnels ou autoréactifs. Donc, l'apoptose peut être activée par des signaux physiologiques normaux, intra- ou extracellulaires, et par des stimuli pathologiques (Hengartner 2000). En effet, elle est responsable de l'élimination des cellules endommagées par un stress oxydatif, oncogénique, par des altérations génétiques, par un choc thermique ou par des agents thérapeutiques cytotoxiques telles les chimiothérapies conventionnelles, l'irradiation aux rayons γ ou l'immunothérapie (Herr and Debatin 2001 ; Johnstone *et al.,* 2002 ; Kaufmann and Earnshaw 2000). Elle permet également à l'organisme d'éliminer les cellules tumorales (ou infectées par des virus) reconnues comme cellules du non-soi, qui sont détruites par un processus apoptotique, déclenché par les lymphocytes T cytotoxiques du microenvironnement. Ce processus de défense est nommé réponse immune anti-tumorale (Barry and Bleackley 2002 ; Catros-Quemener *et al.,* 2003 ; Pinkoski and Green 2002).

Etant donné l'importance biologique de l'apoptose, on comprendra aisément que des dérèglements de ce processus et/ou de son contrôle, aboutissent à une mort cellulaire excessive ou insuffisante, sont à l'origine d'anomalies du développement et de certaines pathologies. Ainsi, un excès d'apoptose dans le système nerveux central peut induire des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Mattson 2004) ou la maladie de Parkinson (Tatton *et al.,* 2003). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale découlant de l'apoptose des neurones conduit à une atrophie cérébrale. De même, le virus de l'immunodéficience humaine active l'apoptose des cellules T-auxiliaires (ou Helper) nécessaires à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques responsables de la défense contre les virus (Roshal *et al.,* 2001).

A l'inverse, un déficit apoptotique peut aussi causer diverses affections telles les maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde ou lupus érythémateux disséminé par exemple) qui se traduisent par une apoptose insuffisante des cellules auto-immunes réactives. Un défaut d'apoptose favorise la survie et la croissance des cellules anormales, à l'origine d'un déséquilibre entre la croissance et la mort cellulaire, qui conduit potentiellement au développement ou à la progression des tumeurs (Reed 1999 ; Thompson 1995).

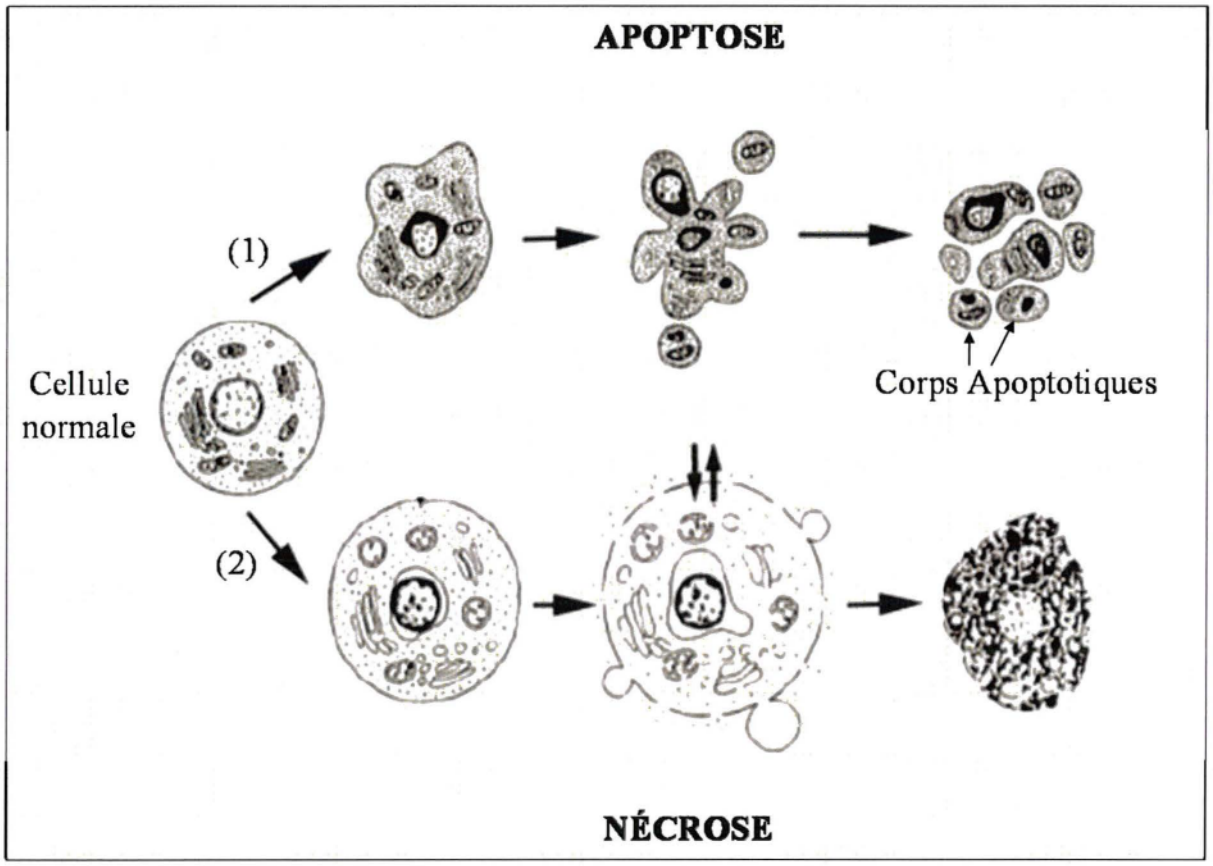


Figure 7. Modifications ultrastructurales séquentielles de l'apoptose et de la nécrose

Dans l'apoptose (1), les modifications initiales consistent en une condensation de la chromatine, suivie par des bourgeonnements du cytoplasme qui donnent naissance à des corps apoptotiques qui seront phagocytés. Les signes de la nécrose (2) sont un tassement de la chromatine, un gonflement des organites et une perte de l'intégrité des membranes. *Adapté d'après* (Van Cruchten and Van Den Broeck 2002).

1.2 Modifications morphologiques au cours de l'apoptose

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des changements morphologiques caractéristiques de ce type de mort cellulaire. **(Figure 7)**.

Une des premières modifications morphologiques identifiables est la réduction du volume cellulaire par condensation du cytoplasme. Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré cette rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts. Le noyau est aussi altéré : on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire, puis la membrane nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques cernés de membrane plasmique. Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former des "corps apoptotiques", qui sont libérés dans le milieu extracellulaire. *In vivo*, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans le tissu. Ces caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose, autre mode de mort cellulaire, qui aboutit à l'éclatement de la cellule et au relargage des constituants intracellulaires, entraînant une réaction inflammatoire.

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques telles que la fragmentation internucléosomale de l'ADN, générant de multiples fragments de 180 paires de bases, mis en évidence par migration électrophorétique sur gel d'agarose, sous forme "d'échelle de l'ADN". L'apoptose est aussi caractérisée par l'externalisation des phosphatildylsérines composant normalement le feuillet interne de la membrane plasmique. Ce processus permet aux cellules d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Fadok *et al.*, 2000).

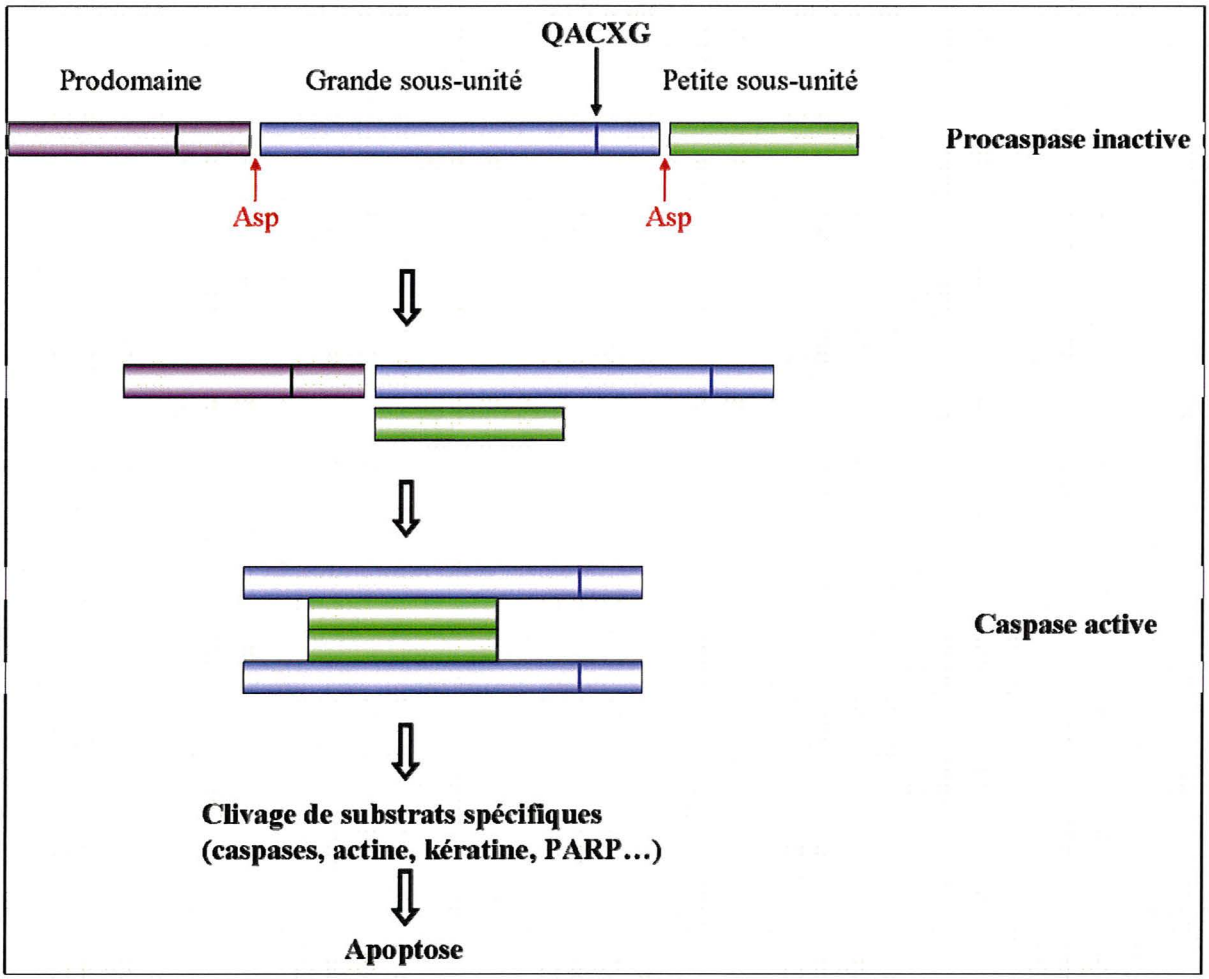


Figure 8. Structure et mode d'activation des caspases

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 contenant une cystéine, au sein d'un motif très conservé (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).

1.3 Principaux effecteurs

La mort cellulaire par apoptose résulte de l'activation de voies de signalisations moléculaires complexes étroitement régulées. Les gènes clés impliqués dans la régulation de l'apoptose, initialement identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (C. elegans), et leurs homologues chez les mammifères codent pour des protéines proapoptotiques telles que les caspases, ainsi que pour des facteurs anti-apoptotiques.

a) Les caspases et leurs cofacteurs

Physiologiquement, les caspases (Cysteinyl Aspartic Acid-Protease) sont exprimées sous forme de zymogène contenant trois domaines : un prodomaine aminoterminal de taille variable, une grande sous-unité et une petite sous unité. Selon la taille du prodomaine, nous distinguons les caspases à prodomaine long (caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9 et -10) et les caspases à prodomaine court (caspases-3, -6 et -7) (Stennicke and Salvesen 2000). Ces prodomaines jouent un rôle important dans l'activation des caspases du fait de la présence de séquences permettant leur interaction avec d'autres protéines. Ainsi, les prodomaines longs des caspases-8 et -10 contiennent le motif DED (Death Effector Domain) leur permettant d'interagir avec des protéines adaptatrices et celui de la caspase-9 renferme le motif CARD (Caspase Activation Recruitment Domain) susceptible de lier d'autres caspases ou des facteurs activateurs ou inhibiteurs.

L'activation des caspases nécessite leur clivage au niveau de résidus aspartates, la libération du prodomaine et l'association de la petite et de la grande sous-unité sont intimement liées (**Figure 8**). De façon générale, les caspases initiatrices sont capables de s'autoactiver et d'activer les caspases effectrices. 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.

L'activité enzymatique des caspases est étroitement régulée, notamment par leur interaction avec des cofacteurs. Ces interactions font intervenir leurs prodomaines, notamment les séquences DED et CARD. Parmi les activateurs de caspases, nous trouvons la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) qui lie la caspase-9 ou la protéine FADD (Fas Associated Death Domain) qui lie les caspases-8 et -10.
Les caspases sont les effecteurs moteurs du processus apoptotique. Une fois activées elles vont cliver des substrats spécifiques en une protéolyse raisonnée conduisant aux modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques des cellules en apoptose. Par exemple, en clivant leurs cibles les caspases 1) inactivent des protéines antiapototiques, 2) dégradent des protéines de structure, 3) dégradent des protéines de jonction favorisant l'isolement de la cellule.

b) Les facteurs antiapoptotiques

Parmi les facteurs antiapoptotiques, on trouve certaines protéines virales qui permettent la réplication du virus en bloquant la mort de la cellule infectée. Ces protéines incluent la protéine Crm-A (Cytokine response modifier gene A) du virus de la vaccine qui interagit avec les caspases-1 et -8 et prévient leur clivage, la protéine p35 (Zhou *et al.,* 1997) exprimée par le baculovirus qui inhibe la caspase-3 activée en interagissant avec elle (Bump *et al.,* 1995 ; Riedl *et al.,* 2001), ou encore les protéines de la famille IAP (Inhibitor of Apoptosis) découvertes initialement chez le baculovirus. Tous les membres de cette famille (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, survivin, livin, Ts-IAP, NIAP) portent une ou plusieurs copies du motif BIR (Baculovirus IAP Repeats) nécessaires pour lier et inactiver les caspases (Liston *et al.,* 2003). Ils inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices. Ces inhibiteurs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2. Celles-ci sont libérées dans le cytoplasme par la mitochondrie lors de l'apoptose et vont se lier aux IAP pour les inactiver (Du *et al.,* 2000 ; Liston, *et al.* 2003)

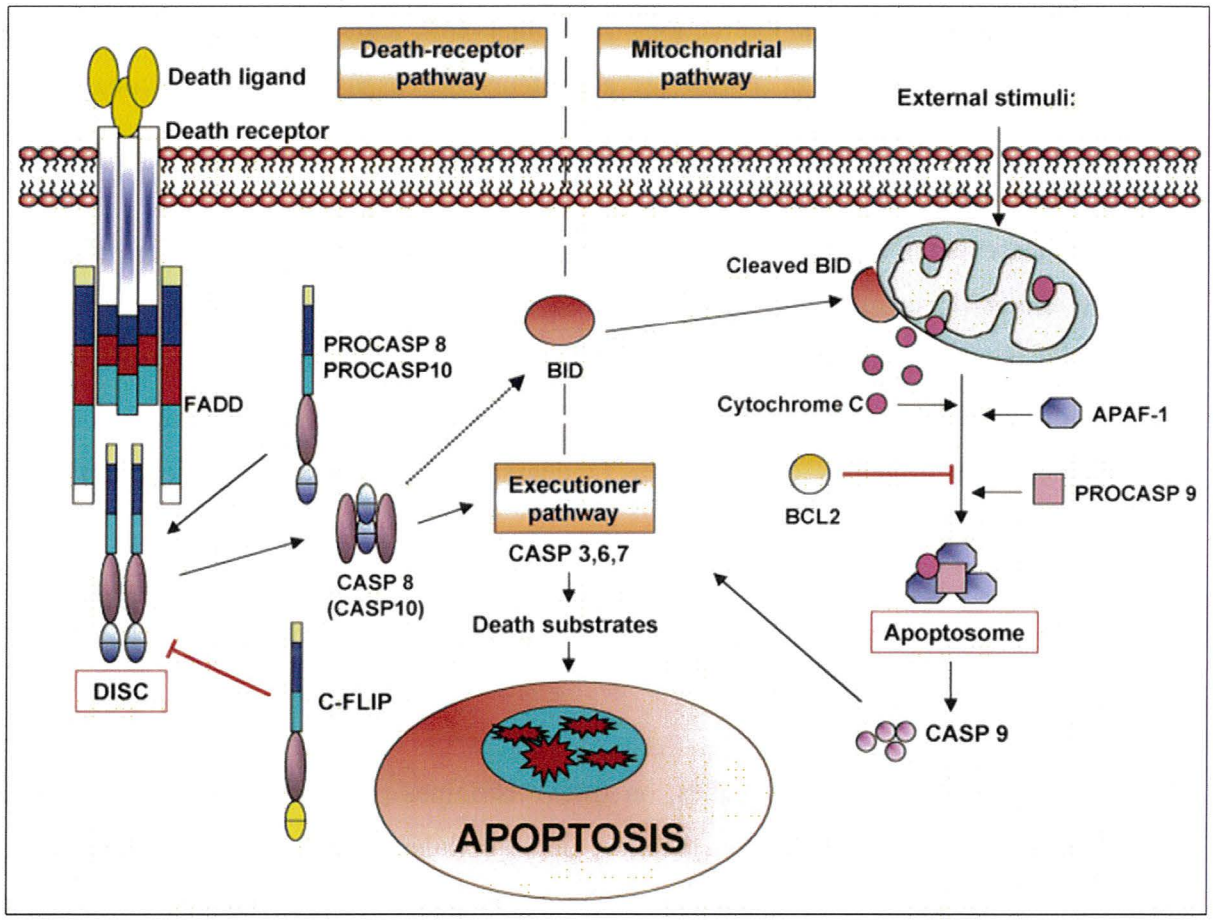


Figure 9. Les deux grandes voies apoptotiques

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 l'une ou de l'autre des 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. *D'après (Shivapurkar, et al. 2003).*

Une autre famille de protéines antiapoptotiques contrôle l'activation des caspases-8 et -10. Il s'agit des protéines c-FLIP (FADD-ICE like Inhibitory Protein), homologues chez le mammifère de la protéine virale v-FLIP (Thome and Tschopp 2001).

L'autre grand groupe d'inhibiteurs de l'apoptose est représenté par les membres de la famille BCL-2. La protéine BCL-2 possède quatre domaines conservés nommés BCL-2 Homolgy (BH) domaine. Chez les mammifères, la famille BCL-2 compte au moins 20 membres comportant tous au moins un domaine BH (Cory and Adams 2002).

BCL-2 et quatre autres membres de cette famille (BCL-XL, BCL-W, A1 et MCL-1) contiennent des régions BH1, 2 et 3 et sont antiapoptotiques. La sous-famille dont le chef de file est BAX, contient uniquement trois membres (BAX, BAK et MTD/BOK) possédant également des régions BH1, 2 et 3 mais possède une activité proapoptotiques. La plupart des protéines proapoptotiques possèdent uniquement un court domaine BH3 (BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA et HRK). Ces facteurs proapoptotiques agissent en formant des hétérodimères avec les membres antiapoptotiques de la famille BCL-2, neutralisant ainsi leurs fonctions de survie. D'autre part, certaines protéines peuvent inhiber l'apoptose en interagissant avec des protéines proapoptotiques de la famille de Bcl-2. Parmi de nombreux exemples, citons la protéine **Ku70** qui est capable de séquestrer BAX, l'empêchant ainsi d'induire l'apoptose (Cohen *et al.,* 2004).

2. Deux grandes voies de signalisation

A ce jour, deux grandes voies à l'origine de l'activation des caspases et des membres de la famille BCL-2 ont été décrites : la voie mitochondriale ou voie intrinsèque et la voie des récepteurs de mort, ou voie extrinsèque (**Figure 9**).

2.1 La voie mitochondriale

Cette voie est activée en réponse à divers stimuli intra- et extra-cellulaires comme la privation en facteurs de croissance, un stress osmotique, hypoxique ou génotoxique (Hengartner 2000 ; Kaufmann and Vaux 2003). Elle implique la libération de cytochrome *c* par la mitochondrie dans le cytoplasme.

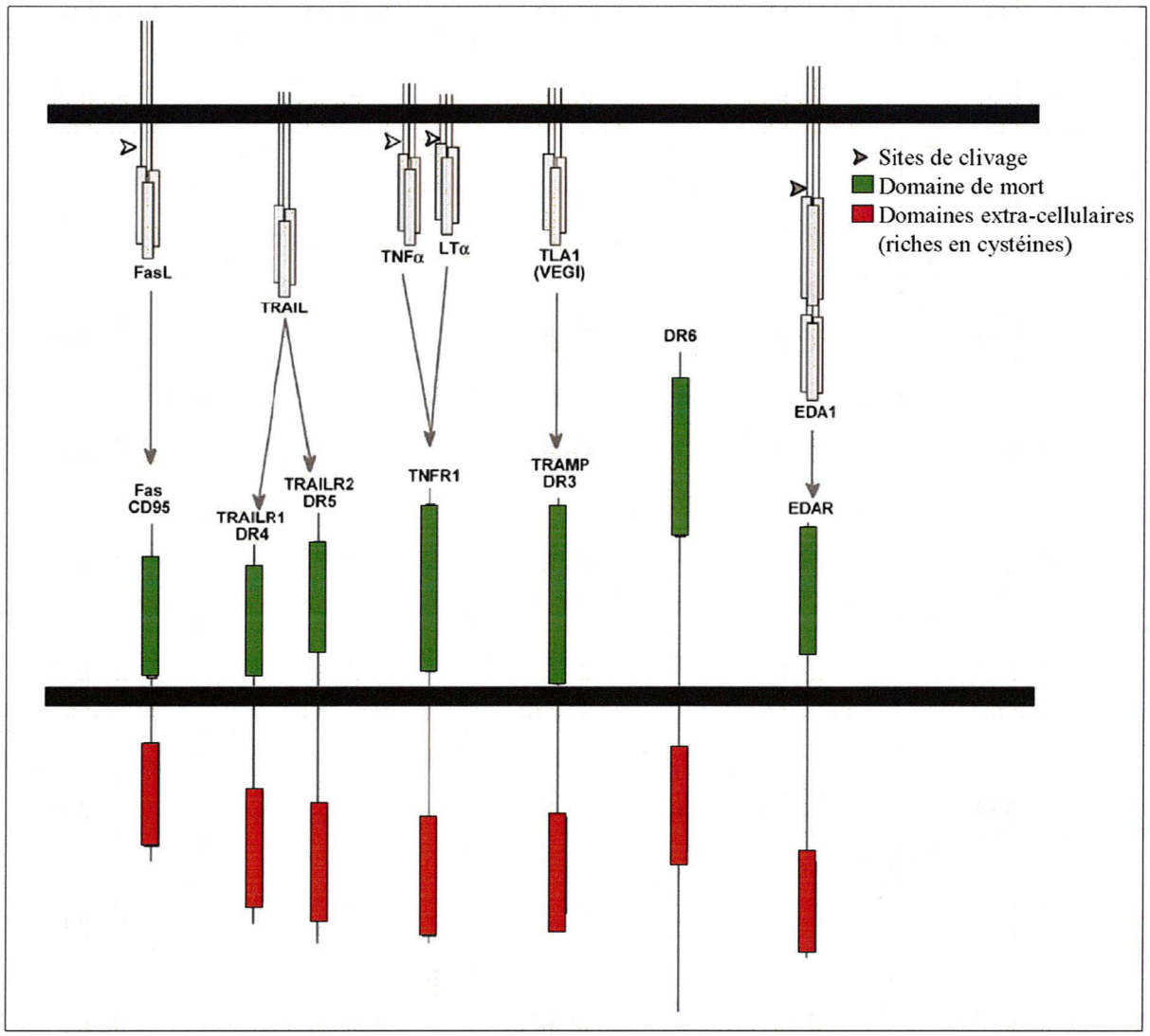


Figure 10. La famille des récepteurs de mort

Huit récepteurs de mort ont été identifiés à ce jour : FAS ou CD95, TRAILR1 ou DR4, TRAILR2 ou DR5, TNFR1, TRAMP ou DR3, DR6, EDA-R (Ectodyspasin A Receptor) et NGF-R (Nerve Growth Factor Receptor ou TNFR16). Ce sont des récepteurs membranaires qui contiennent un domaine extracellulaire renfermant deux à quatre sous-domaines riches en cystéines, un domaine transmembranaire et une séquence cytoplasmique qui comporte un domaine de mort permettant leur interaction avec les protéines adaptatrices FADD ou TRADD. Les ligands respectifs de ces récepteurs sont également représentés. Certains peuvent être clivés par des métalloprotéases (pour FasL, TNFα, LTα) ou par la furine (pour EDA1) résultant en la libération de formes circulantes solubles. *D'après* (French and Tschopp 2003)

Le cytochrome *c* forme alors un complexe multiprotéique avec la protéine APAF-1 et la procaspase-9 en présence d'ATP. Ce complexe est appelé apoptosome (Adrain and Martin 2001). La procaspase-9, activée lors de son recrutement au niveau de l'apoptosome, active à son tour les caspases effectrices. Deux autres protéines proapoptotiques, jouant un rôle dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, sont également libérées par la mitochondrie: le facteur AIF (Apoptsis Inducing Factor) et l'endonucléase G (Li *et al.,* 2001 ; Susin *et al.,* 1999) (**Figure 9**)

2.2 La voie des récepteurs de mort

L'autre voie majeure initiatrice de l'apoptose impliquée dans la réponse cellulaire immune (Ashkenazi and Dixit 1998), ou en réponse à un stress génotoxique (Debatin and Krammer 2004 ; Micheau, Hammann *et al.,* 1999 ; Micheau, Solary *et al.,* 1999) est celle des récepteurs de mort ou voie extrinsèque.

Ces récepteurs membranaires appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF (Tumor Necrosis Factor) dont les membres présentent un domaine extracellulaire similaire, riche en cystéines. Les récepteurs de mort exprimés à la surface de la cellule sous forme d'homotrimères renferment également dans leur région cytoplasmique un domaine d'interaction protéine-protéine nommé domaine de mort (DD pour Death Domain), qui permet le recrutement d'autres protéines et la propagation du signal de mort induit par la stimulation de ces récepteurs (Ashkenazi and Dixit 1998 ; Bodmer *et al.,* 2000 ; Peter and Krammer 2003).

On décompte actuellement huit membres incluant FAS (aussi dénommé CD95, APO-1, DR2) activé par son ligand FASL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF-α et la lymphotoxine-α, et les récepteurs du ligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing ligand), TRAILR1 (aussi connu sous le nom DR4 et APO-2) et TRAILR2 (également dénommé DR5, KILLER et TRICK2) (**Figure 10**)

L'activation de ces récepteurs par leurs ligands respectifs conduit à l'induction de l'apoptose. Comme le montre la **Figure 10**, la fixation du ligand induit une oligoméristaion des récepteurs, un changement de leur conformation, et le recrutement par les domaines DD de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein). FADD, qui possède en

son extrémité N-terminale un autre domaine d'interaction protéine-protéine appelé domaine effecteur de mort (DED) stimule le recrutement des caspases initiatrices -8 ou -10. Ce complexe incluant le ligand, son récepteur, FADD et la caspase-8/-10 correspond au complexe du DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le recrutement de la caspase-8 (ou caspase-10) et sa forte concentration locale semblent être à l'origine de son autoclivage et de son activation. La caspase-8 (ou caspase-10) ainsi activée initie alors la cascade de caspases effectrices en aval, soit directement (cellules de type I, forte concentration en caspase-8), soit par l'intermédiaire d'une boucle d'autoamplification qui aboutit en la libération de cytochrome c par la mitochondrie (cellules de type II, concentration en caspase-8 moins élevée). Il existe donc un lien étroit entre les voies intrinsèque et extrinsèque.

L'ensemble des informations présentées dans cette introduction indique que les traitements utilisés de façon conventionnelle pour traiter les cancers bronchiques ne sont pas assez efficaces. Dans l'optique d'améliorer le mauvais pronostic du CBNPC, de nouvelles thérapies moléculaires ciblées ont été développées. De très bons résultats ont été obtenus avec le gefitinib, un inhibiteur de la tyrosine-kinase de l'EGFR. Certains patients sont extrêmement sensibles à ce traitement, contrairement à d'autres chez qui ce traitement est inefficace. De nombreuses études ont été menées afin d'identifier des marqueurs capables de prédire une sensibilité ou une résistance à cette molécule. Une étude a corrélé résistance au gefitinib chez des patients porteurs de CBNPC avec des concentrations sériques élevées en amphiréguline, suggérant un rôle potentiel de ce facteur de croissance dans la résistance au gefitinib.

Mon travail de thèse a tout d'abord consisté à démontrer l'implication de l'amphiréguline dans la résistance au gefitinib. Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les acteurs intracellulaires qui participent à cette voie de résistance et à caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu par l'amphiréguline.

Travail de Thèse

I. OBJECTIFS

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, à la fois chez l'homme et chez la femme. Le cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC) représente 80% des cancers du poumon et possède un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 12%, et ce malgré l'emploi de traitements comme la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires pour améliorer la prise en charge de ces patients. Les nouvelles thérapies moléculaires ciblées sont en plein essor et devraient permettre d'obtenir dans les années à venir des résultats encourageants notamment pour améliorer le confort et prolonger la survie des patients atteints de CBNPC.

L'EGFR est impliqué dans le développement de nombreux cancers et constitue de fait une cible moléculaire privilégiée pour enrayer la prolifération tumorale. Dans le CBNPC, l'EGFR est souvent surexprimé, ce qui constitue un facteur de mauvais pronostic pour le patient (Selvaggi *et al.,* 2004). Récemment, une nouvelle classe de médicaments appelée inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) a vu le jour. Le gefitinib, une molécule appartenant à la famille des EGFR-TKI, a montré de puissants effets anti-prolifératifs dans les CBNPC de stades avancés, après échec de deux lignes de chimiothérapie (Fukuoka, *et al.* 2003). Malheureusement, le gefitinib n'a pas conféré d'avantage de survie par rapport au placebo sur des cohortes de patients non sélectionnés (Thatcher, *et al.* 2005). Cette étude a entraîné une recherche intensive de facteurs capables de prédire une résistance ou une sensibilité à ce traitement. Certaines mutations de l'EGFR ont été associées à une meilleure sensibilité au gefitinib (Lynch *et al.,* 2004). Ces mutations sont principalement retrouvées chez des patients de sexe féminin, d'origine asiatique, non-fumeurs et qui présentent des tumeurs d'histologie adénocarcinomateuse. Une augmentation du nombre de copies du gène ERBB2 est un autre marqueur de sensibilité au gefitinib (Sharma, *et al.* 2007). D'autres facteurs, comme une mutation activatrice de KRAS (Sharma, *et al.* 2007), une amplification de MET (Engelman, *et al.* 2007), ou une expression du récepteur de l'IGF1-R (Morgillo, *et al.* 2007), sont des facteurs prédictifs d'une résistance au gefitinib. Malheureusement, aucun facteur isolé ne permet de déterminer la sensibilité au gefitinib.

L'amphiréguline (AREG) est un facteur de croissance qui active l'EGFR. Une étude clinique a montré que les patients porteurs de CBNPC résistants au gefitinib ont des taux d'AREG sérique élevés (Ishikawa, *et al.* 2005), suggérant l'implication de l'AREG dans la résistance au

gefitinib. Notre groupe a montré le rôle anti-apoptotique de l'AREG dans le CBNPC (Hurbin, *et al.* 2002). L'AREG participe en effet à l'inhibition de l'apoptose en inactivant la protéine proapoptotique BAX (Hurbin, *et al.* 2005).
Notre laboratoire a cherché à démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib des cellules de CBNPC et à décrire les mécanismes moléculaires impliqués.

II. PRINCIPAUX RÉSULTATS

Nous avons utilisé deux lignées cellulaires de CBNPC. Les cellules H322 ne sécrètent pas d'AREG et sont sensibles à 1µM de gefitinib, les cellules H358 sécrètent beaucoup d'AREG et sont insensibles à 1µM de gefitinib. L'ajout d'AREG aux cellules H322 inhibe l'apoptose induite par le gefitinib. Inversement, l'invalidation de l'expression de l'AREG par ARN interférence dans les cellules H358 restaure l'apoptose induite par le gefitinib, et un ajout d'AREG recombinante réverse ce phénotype. Ceci confirme le rôle spécifique de l'AREG dans la résistance au gefitinib.
Nous décrivons le mécanisme d'action de l'AREG dans la résistance au gefitinib. En effet, l'AREG diminue l'expression de la protéine proapoptotique BAX et empêche son activation en inhibant son changement de conformation. L'implication de la protéine Ku70 dans ce mécanisme a été établie grâce aux ARN interférents anti-Ku70. En effet, les siRNA anti-Ku70 restaurent la sensibilité à l'apoptose induite par le gefitinib et Ku70 empêche le changement conformationnel de BAX. De plus, nous montrons que l'inactivation de BAX est liée à son interaction avec Ku70, phénomène contrôlé par l'AREG. Enfin, nous montrons que cette séquestration de BAX dépend de l'acétylation de Ku70 et que l'utilisation d'inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACi) sensibilise fortement les cellules au gefitinib en provoquant la libération de BAX par Ku70, suivie de l'induction d'une apoptose importante.

Nous avons caractérisé un mécanisme de résistance original au gefitinib, montrant pour la première fois une régulation de l'acétylation de Ku70 par un facteur de croissance. Ces travaux sont soumis pour publication à Oncogene (Busser *et al.*, 2008).

III. MANUSCRIT

Amphiregulin-dependent deacetylation of Ku70 promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells

B BUSSER[1,2,3], C NIANG[1,2], S KHOCHBIN[1,2], MC FAVROT[1,2,3], JL COLL[1,2] and A HURBIN[1,2]

[1] INSERM U823, Grenoble, F-38042, France. [2] Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38042, France. [3] CHRU Grenoble, Hôpital Michallon, UF Cancérologie Biologique et Biothérapie, Grenoble, F-38000, France.

Running title: AR induces gefitinib resistance *via* Ku70 deacetylation

Keywords: amphiregulin, acetylation, BAX, Ku70, gefitinib, apoptosis

Correspondence: Amandine Hurbin or Jean-Luc Coll, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, BP170 Grenoble, F-38042 cedex 9, France.

Phone: 33-4-76-54-95-53; Fax: 33-4-76-54-94-13

E-mail: amandine.hurbin@ujf-grenoble.fr

Abstract

Molecular resistance mechanisms affecting the efficiency of receptor tyrosine kinase inhibitors such as gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cells are not fully understood. Amphiregulin has been proposed to predict NSCLC resistance to gefitinib and we established that amphiregulin-overexpressing H358 NSCLC cells resisted apoptosis. Here, we demonstrate the involvement of amphiregulin in gefitinib-induced apoptosis resistance in NSCLC cells. We show that H358 cells resist to gefitinib-induced apoptosis in contrast to amphiregulin-lacking H322 cells. Amphiregulin siRNAs restore gefitinib sensitivity in H358 cells whereas amphiregulin confers resistance to gefitinib in H322 cells. Under a gefitinib treatment, amphiregulin decreases the expression level of the proapoptotic protein BAX and inhibits its conformational change. Ku70 siRNAs restore BAX activation and apoptosis in gefitinib-treated H358 cells. Amphiregulin prevents gefitinib-mediated acetylation of Ku70, thus increasing BAX/Ku70 interaction and subsequent inhibition of apoptosis. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A counteracts gefitinib resistance and cooperates with gefitinib to induce BAX/Ku70 dissociation and massive apoptosis. These data reveals that amphiregulin inhibits gefitinib-induced apoptosis in NSCLC cells through an original acetylation-dependent pathway. These findings suggest new prospects in combining both Histone Deacetylase and Epidermal Growth Factor Receptor inhibitors in NSCLC treatment.

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in the world, both in males and females. Non-Small Cell Lung Cancers (NSCLC) account for about 80% of lung cancers. Once diagnosed, NSCLC 5-year survival rate hardly reaches 12% despite different treatments such as chemotherapy, radiotherapy and surgery (Guessous *et al.,* 2007). Therefore, novel therapeutic strategies improving the prognosis of lung cancer are urgently needed.

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is involved in the development of various human cancers. In NSCLC, EGFR is frequently overexpressed and associated with poor prognosis of patients (Selvaggi, *et al.* 2004). In the last decade, a novel class of inhibitors targeting the kinase activity of the EGFR (the EGFR-TKI family) was developed to overcome the poor successes of classical chemotherapy. Gefitinib is an orally administered member of this family that showed potent anti-tumour effects in clinical trials for NSCLC treatment after previous chemotherapy (Fukuoka, *et al.* 2003). Surprisingly, gefitinib failed to improve the overall survival benefit in an unselected population (Thatcher, *et al.* 2005). Predictive markers of gefitinib treatment sensitivity have thus been extensively studied in order to identify patients likely to respond to EGFR-TKIs. Somatic mutations in the EGFR gene have been found associated with response to gefitinib (Lynch, *et al.* 2004). These mutations activate the EGFR tyrosine kinase and are mainly associated with adenocarcinoma histology, never-smoking status, female gender and Asian ascent (Sharma, *et al.* 2007). An increased ErbB2/Her-2 gene copy number is another marker associated with gefitinib sensitivity (Sharma, *et al.* 2007). Other factors such as KRAS activating mutation (Sharma, *et al.* 2007), MET amplification (Engelman, *et al.* 2007) or Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor expression (Morgillo, *et al.* 2007) are predictors of resistance to gefitinib treatment in NSCLC. Unfortunately, no single factor examined so far, has been able to perfectly determine the sensitivity of patients to gefitinib treatment.

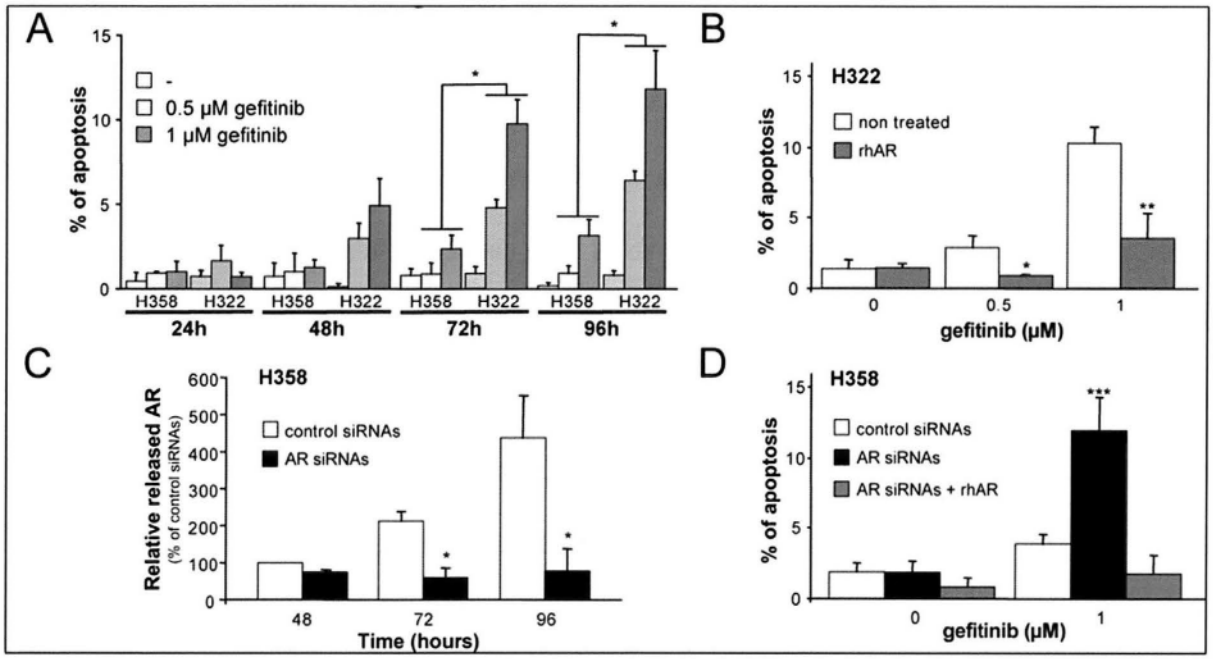


Fig 1. AR inhibits gefitinib-induced apoptosis.

A, H358 and H322 NSCLC cells were treated 24 to 96 hours with gefitinib (Astra-Zeneca, France) as indicated. **B**, H322 cells were treated with 50 ng/ml recombinant human AR (rhAR, Sigma-Aldrich, France) and/or gefitinib as indicated. **C**, H358 cells were transfected with two siRNAs targeting human AR (5'-CGA-ACC-ACA-AAU-ACC-UGG-CTT-3' and 5'-CCU-GGA-AGC-AGU-AAC-AUG-CTT-3') or control siRNAs (5'-CUU-ACG-CUC-ACU-ACU-GCG-ATT-3') (MWG Biotech, France) with Oligofectamine^{TM} reagent (Invitrogen, France). The efficiency of AR knockdown was assessed by ELISA as previously described (Hurbin, *et al.* 2002). Results are expressed as a rate of AR released 48 hours after control siRNAs transfection and as the mean ± SD of three independent experiments. **D**, H358 cells were transfected with control or AR siRNAs and treated with 1 µM gefitinib and/or 50 ng/ml rhAR.

Apoptosis was scored after counting at least 500 Hoechst-stained cells (5µg/ml, Sigma). Percentages of apoptosis were expressed as the mean ± SD of at least three independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, for comparison between H358 and H322 cells (A), between treated and control cells (B, C, D).

Amphiregulin (AR), an EGF-related growth factor, is associated with shortened survival of patients with NSCLC and poor prognosis. High level of AR in the serum of patients with advanced NSCLC might have a diagnostic value for predicting poor response to gefitinib (Ishikawa, *et al.* 2005). Our group previously reported the anti-apoptotic activity of AR in NSCLC cell lines (Hurbin, *et al.* 2002). AR actually participates to apoptosis inhibition by inactivating the proapoptotic protein BAX (Hurbin, *et al.* 2005). However, the mechanism of BAX inactivation in NSCLC cell lines has not been completely defined. In this study, we uncover the mechanism that allows AR to induce gefitinib resistance in NSCLC cell lines. We show that AR prevents gefitinib-induced apoptosis through an original acetylation-dependent pathway leading to BAX inactivation.

The H358 and H322 NSCLC cell lines, expressing wild-type EGFR, were chosen for initial study on the effect of gefitinib. H322 cells have gefitinib IC_{50} around 1 µM (Morgillo, *et al.* 2007) whereas various gefitinib sensitivities with IC_{50} ranging from $\leq$ 1 µM to $\geq$ 10 µM are reported for H358 cells (Cragg *et al.*, 2007 ; Engelman *et al.*, 2005 ; Morgillo, *et al.* 2007 ; Sordella *et al.*, 2004 ; Tracy *et al.*, 2004). We firstly measured gefitinib effect in these cell lines. Gefitinib induced significant dose-dependent apoptosis from 48 hours of treatment in H322 but not in H358 cells (Fig 1A). We have previously shown that H358 but not H322 cells secrete high levels of AR that inhibits apoptosis (Hurbin, *et al.* 2002). To assess the involvement of AR in gefitinib resistance, recombinant AR was added in the culture medium of H322 cells. AR actually returned gefitinib-induced apoptosis level back to non-treated level (Fig 1B), in a dose-dependent manner (data not shown). To confirm the role of AR, H358 cells were transfected with anti-AR small interfering RNAs (AR siRNAs). This treatment inhibited 83% of secreted AR level 96h after transfection, compared to control siRNAs (Fig 1C).

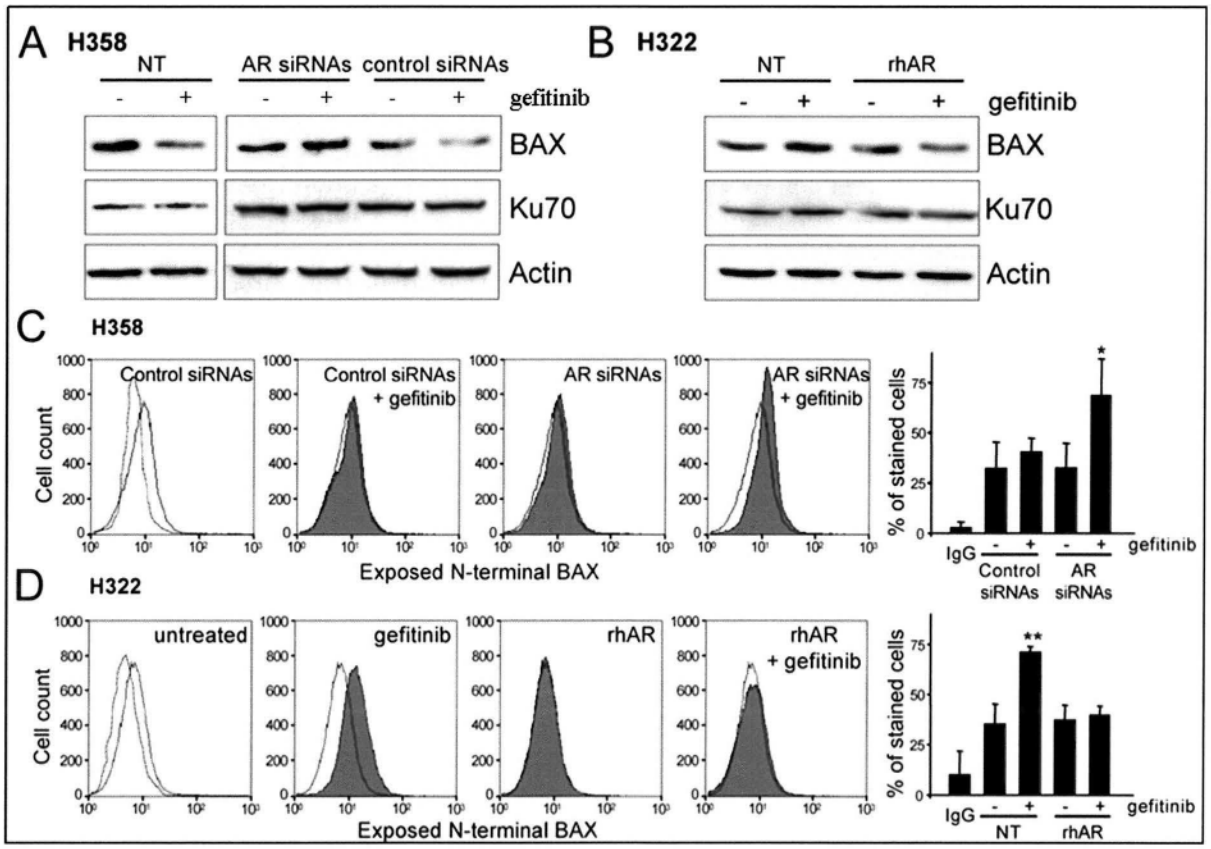


Fig 2. AR inactivates BAX

H358 cells (A, C) were untransfected (NT) or transfected with control or AR siRNAs as described in figure 1. H322 cells (B, D) were untreated (NT) or treated with 50 ng/ml rhAR. 0.5 µM gefitinib was added as indicated for 96 hours.

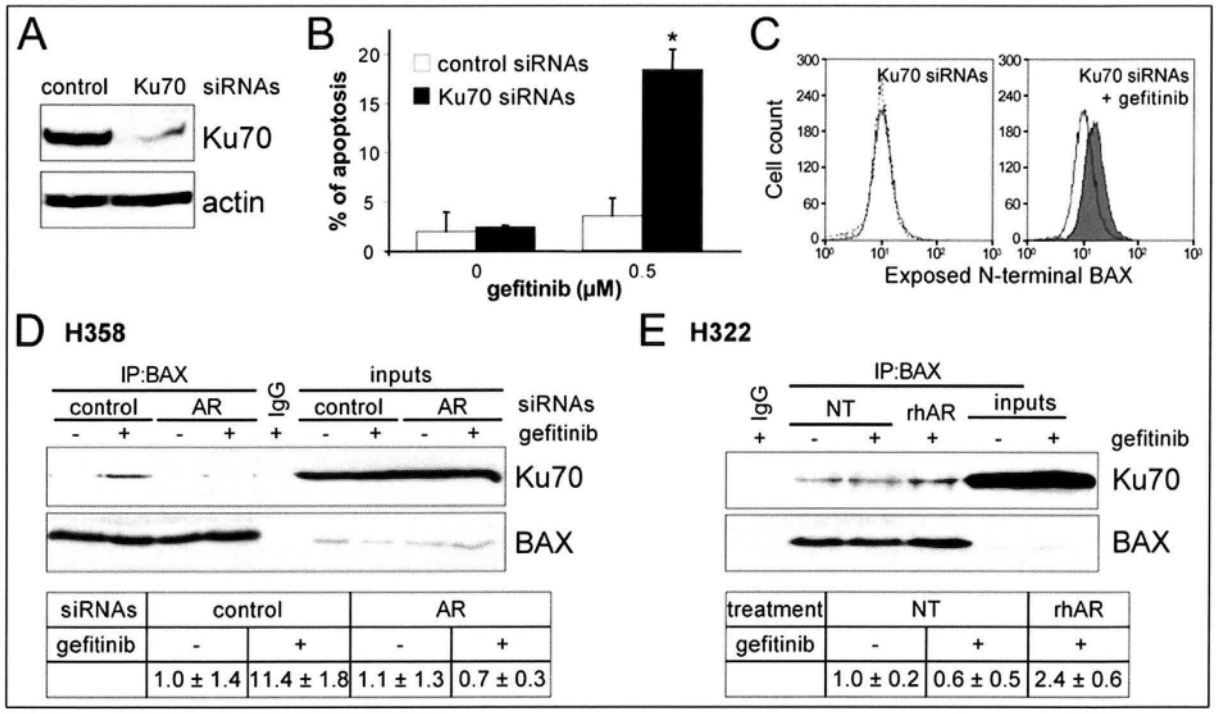
A, **B**, Total cell lysates were subjected to Western blotting using anti-BAX (1/3000, Becton Dickinson) or anti-Ku70 (1/1000, Neomarkers Interchim, France) antibodies and revealed by chemiluminescence (ECL, Amersham, France). Actin was used as protein level control (Sigma, 1/1000). Blots are representative of 3 independent experiments.

C, **D**, Flow cytometry analysis of BAX immunostaining was performed as previously described (Hurbin *et al.*, 2005). Dotted histogram and IgG, irrelevant antibody; open histogram, control cells; filled histogram, treated cells as indicated. Percentages of activated BAX stained cells were expressed as the mean ± SD of at least 3 independent experiments. * $p<0.05$, more significant than control.

Interestingly, while AR siRNAs did not directly induce apoptosis in H358 cells, they significantly sensitized H358 cells to gefitinib (Fig 1D). AR siRNAs combined with gefitinib induced three times more apoptosis compared to control siRNAs. AR abolished this effect, demonstrating the specific effect of the siRNAs. Altogether, these results showed that AR strongly reduces gefitinib proapoptotic activity. AR invalidation overcomes the resistance of H358 cells to gefitinib. AR might thus be a principal activator of the ligand-receptor pathway that leads to gefitinib resistance in wild-type EGFR cancer cells.

We have previously shown in NSCLC cells that AR-mediated apoptosis resistance results in the Bcl_2 family member BAX inactivation (Dubrez *et al.,* 2001 ; Hurbin, *et al.* 2005 ; Hurbin, *et al.* 2002). Recent data linked gefitinib activity to Bcl_2 family proapoptotic proteins (Costa *et al.,* 2007 ; Cragg, *et al.* 2007 ; Gong *et al.,* 2007). We thus investigated the relationship between gefitinib activity, AR and BAX activation. We first studied the effect of AR on BAX expression level following a gefitinib exposure. In H358 resistant cells, gefitinib decreased BAX level and this effect was prevented by AR siRNAs (Fig 2A). Conversely, gefitinib slightly increased the level of BAX in AR-lacking H322 cells and AR inhibited this induction (Fig 2B). These results suggested that, in the presence of AR, BAX level is decreased under a gefitinib treatment. In contrast, without AR, gefitinib induces apoptosis by enhancing BAX level.

We then analyzed the conformational state of BAX using an antibody targeting the exposed N-terminal sequence of BAX and flow cytometry (Desagher *et al.,* 1999 ; Dubrez, *et al.* 2001 ; Hsu and Youle 1997). Gefitinib strongly increased BAX immunofluorescence and the percentage of stained cells in H322, but not in H358 cells (Fig 2C, D). AR siRNAs alone had limited influence on the activated BAX, but enhanced the immunofluorescence and the percentage of stained cells for activated BAX in gefitinib-treated H358 cells (Fig 2C).



siRNAs	control		AR	
gefitinib	-	+	-	+
	1.0 ± 1.4	11.4 ± 1.8	1.1 ± 1.3	0.7 ± 0.3

treatment	NT		rhAR
gefitinib	-	+	+
	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.5	2.4 ± 0.6

Fig 3. Ku70 inhibits gefitinib-induced apoptosis

H358 cells (A-D) were transfected with siRNAs targeting human Ku70 (5'-GAU-GCC-CUU-UAC-UGA-AAA-ATT-3' and 5'-UUC-UCU-UGG-UAA-CUU-UCC-CTT-3'), AR siRNAs or control siRNAs as described in figure 1. H322 cells (E) were untreated (NT) or treated with 50 ng/ml rhAR. 0.5 μM gefitinib was applied as indicated for 96 hours.

A, The efficiency of Ku70 knockdown was assessed by Western-blotting 96h after transfection. Actin was used as protein level control. **B**, Apoptosis was scored as described in Figure 1. * $p<0.05$, for comparison between Ku70 and control siRNAs. **C**, Flow cytometry analysis of BAX immunostaining as described in figure 2. Dotted histogram, control cells; open histogram, Ku70 siRNAs; filled histogram, Ku70 siRNAs and gefitinib. **D**, **E**, Equal amounts of endogenous BAX were immunoprecipitated (IP) from whole-cell extracts and subjected to Western blot analysis with anti-Ku70 and anti-BAX antibodies. IgG: irrelevant immunoglobulins, used as negative control. Inputs: cell lysates not subjected to immunoprecipitation. The values denote the relative intensity, measured using ImageJ software, of Ku70 protein bands of treated samples to that of control cells, after being normalized to the respective BAX. Each value represent the average of three (C) or two (D) independent experiments.

In contrast, AR prevented the effect of gefitinib on BAX activation in H322 cells (Fig 2D). These observations strongly suggested that inhibition of gefitinib-induced apoptosis by AR come from the inhibition of BAX conformational change.

Interestingly, it has been shown that BAX can be sequestered in the cytoplasm in an inactive conformation by the auto-antigen Ku70 (Cohen, *et al.* 2004). We investigated the relationship between gefitinib activity, Ku70 and BAX. Ku70 expression level was not modified by gefitinib and/or AR treatments in both cell lines (Fig 2A, B). SiRNAs targeting Ku70 strongly silenced endogenous Ku70 in H358 cells, compared to control siRNAs (Fig 3A). Interestingly, while Ku70 siRNAs did not directly induce apoptosis, they strongly increased apoptosis in gefitinib-treated H358 cells (Fig 3B), suggesting the involvement of Ku70 in gefitinib-induced apoptosis inhibition. The role of Ku70 on BAX activation was assessed by flow cytometry. Ku70 siRNAs alone had no influence on BAX, compared to control siRNAs, but enhanced the immunofluorescence of activated BAX in gefitinib-treated H358 cells (Fig 3C), suggesting the involvement of Ku70 in gefitinib-induced apoptosis inhibition through BAX conformational change inhibition. We then measured the interaction between BAX and Ku70 using coimmunoprecipitation assays. The BAX/Ku70 interaction was very low in H358 cells, but strongly increased under gefitinib treatment (Fig 3D). Interestingly, AR siRNAs significantly prevented BAX/Ku70 interaction induced by gefitinib, suggesting that AR induces the binding of BAX with Ku70 under a gefitinib treatment. This hypothesis was sustained by our results using the sensitive AR-lacking H322 cells. Indeed, BAX/Ku70 interaction level did not change in gefitinib-treated H322 cells compared to untreated cells, but increased weakly, but reproducibly, in the presence of both AR and gefitinib (Fig 3E). Altogether, these results showed that AR inhibits gefitinib-induced apoptosis though BAX level inhibition and inactivation by binding to Ku70. Both phenomena being additive and may explain the low sensitivity of H358 to gefitinib.

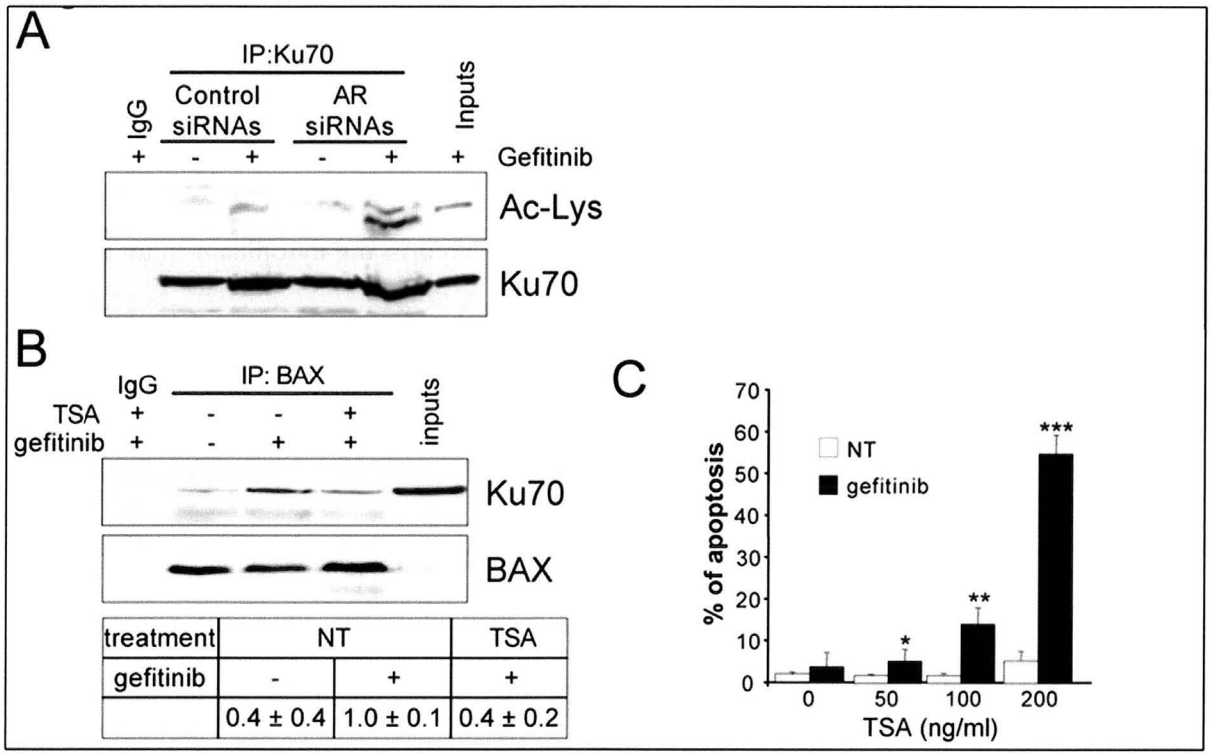


Fig 4. AR inhibits Ku70 acetylation

A, H358 cells were transfected with control or AR siRNAs as described in figure 1 and treated with 0.5 μM gefitinib for 96 hours. Cells were incubated with 50 ng/ml TSA (Sigma) overnight before lysis in presence of 100 ng/ml TSA and broke-down through a 25-gauge needle. The suspension was centrifuged at 300g for 7 min at 4°C, the resulting supernatant was then centrifuged at 16000g for 15 min at 4°C. The supernatant contained the cytoplasmic proteins and equal amounts of endogenous cytoplasmic Ku70 were immunoprecipitated (IP) and subjected to immunoblotting using anti-acetylated protein antibody (1/1000, Abcam, France). The immunoblot was reprobed with anti-Ku70 antibody to confirm the presence of an overlapping Ku70 band. IgG: irrelevant immunoglobulins, used as negative control. Inputs: cell lysates not subjected to immunoprecipitation.

B, H358 cells were treated 96 hours with 0.5 μM gefitinib and 200 ng/ml TSA as indicated. BAX was immunoprecipitated (IP) and immunoblotting was performed as described in figure 3. The values denote the relative intensity of Ku70 protein bands of untreated or TSA treated cells to that of gefitinib-treated samples, after being normalized to the respective BAX. Each value represents the average of three independent experiments.

C, H358 cells were treated with TSA and 0.5 μM gefitinib as indicated. Apoptosis was analyzed as described in figure 1. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$ statistically more significant than control.

In contrast, without AR, gefitinib induces apoptosis by enhancing BAX level, inducing its conformational change and preventing its binding to Ku70. Ku70 is thus involved in the AR-mediated inactivation of BAX in gefitinib-induced apoptosis inhibition.

Acetylation of cytoplasmic Ku70 disrupts its binding to BAX, which translocates to mitochondria, leading to cell apoptosis (Cohen, *et al.* 2004). The effect of AR on Ku70 acetylation status, was assessed after immunoprecipitation of the cytoplasmic fraction of Ku70. Ku70 immunoprecipitates from H358 cells transfected with control siRNAs showed a discrete acetylation in presence of gefitinib (Fig 4A). This gefitinib-dependent acetylation of Ku70 was markedly increased with AR siRNAs, suggesting that AR can inhibit gefitinib-mediated acetylation of Ku70 and thus strengthens the inactivation of BAX by Ku70. We then treated H358 cells with Trichostatin A (TSA), an inhibitor of Histone deacetylase (HDAC), to increase Ku70 acetylation and thus reduce BAX/Ku70 interaction. TSA effectively reduced the gefitinib-induced binding of BAX to Ku70 in H358 cells (Fig 4B). In addition, while concentrations of up to 200 ng/ml TSA alone did not significantly induce apoptosis in H358 cells, the combination of gefitinib with TSA showed a very significant and dose-dependent apoptosis induction (Fig 4C). Apoptosis level in the presence of gefitinib and 200 ng/ml TSA was ten times higher compared to single treatment. These results suggested that inhibition of BAX/Ku70 interaction by TSA strongly sensitizes the H358 cells to gefitinib-induced apoptosis. More importantly, they also suggested that HDAC inhibitors could counteract the protective effect of AR and sensitize cells to gefitinib by inducing the release of BAX from Ku70 in its active form.

In summary, our findings provide evidence that AR mediates gefitinib resistance in NSCLC cells through an original acetylation-dependent pathway. AR decreases BAX level and reduces Ku70 acetylation, thus strengthening the functional inactivation of BAX and resulting in gefitinib-induced apoptosis inhibition in NSCLC cells. AR might thus represent a new biomarker of NSCLC cell resistance to gefitinib treatment, and could be used to identify patients likely to respond to EGFR-TKI (Ishikawa, *et al.* 2005 ; Kakiuchi, *et al.* 2004). Moreover, the involvement of acetylation mechanisms in gefitinib sensitivity should encourage the application of HDAC inhibitors as anticancer agents (Bolden *et al.*, 2006), especially in EGFR-TKI resistant patients and in combination with EGFR-TKI treatments.

Acknowledgments

We thank AstraZeneca for gefitinib. This work was supported by grants and research fellowship from La Ligue contre le Cancer, comité de la Drôme, EpiPro program (INCa) and "projet libre INCa", PL06_025, to MCF and SK laboratories.

References

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5:** 769-84.

Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, *et al.* (2004). Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* **13:** 627-38.

Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, *et al.* (2007). BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med* **4:** 1669-79.

Cragg MS, Kuroda J, Puthalakath H, Huang DC, Strasser A. (2007). Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med* **4:** 1681-89.

Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, *et al.* (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144:** 891-901.

Dubrez L, Coll JL, Hurbin A, Solary E, Favrot MC. (2001). Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. *J Biol Chem* **276:** 38980-7.

Engelman JA, Janne PA, Mermel C, Pearlberg J, Mukohara T, Fleet C, *et al.* (2005). ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **102:** 3788-93.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316:** 1039-43.

Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, *et al.* (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* **21:** 2237-46.

Gong Y, Somwar R, Politi K, Balak M, Chmielecki J, Jiang X, *et al.* (2007). Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med* **4:** e294.

Guessous I, Cornuz J and Paccaud F. (2007). Lung cancer screening: current situation and perspective. *Swiss Med Wkly* **137:** 304-11.

Hurbin A, Coll JL, Dubrez-Daloz L, Mari B, Auberger P, Brambilla C, *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:** 19757-67.

Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, Favrot MC. (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:** 49127-33.

Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, Hayama S, *et al.* (2005). Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* **65:** 9176-84.

Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, Furukawa C, Tsunoda T, Yano S, *et al.* (2004). Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet* **13:** 3029-43.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350:** 2129-39.

Morgillo F, Kim WY, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, Lee HY. (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:** 2795-803.

Selvaggi G, Novello S, Torri V, Leonardo E, De Giuli P, Borasio P, *et al.* (2004). Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* **15:** 28-32.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **7:** 169-81.

Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305:** 1163-7.

Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, *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:** 1527-37.

Tracy S, Mukohara T, Hansen M, Meyerson M, Johnson BE, Janne PA. (2004). Gefitinib induces apoptosis in the EGFRL858R non-small-cell lung cancer cell line H3255. *Cancer Res* **64:** 7241-4.

Discussion

Nos travaux rapportent des résultats originaux qui concernent la résistance de cellules cancéreuses aux thérapies moléculaires ciblées anti-EGFR, un problème récurrent dans la prise en charge thérapeutique de nombreux cancers :

Nous démontrons tout d'abord l'implication d'un facteur de croissance de la famille de l'EGF, l'AREG dans la résistance du CBNPC à un traitement anti-EGFR, le gefitinib puis, nous caractérisons le mécanisme moléculaire responsable de cette résistance (**Figure 11**).
Dans notre modèle, les cellules qui sont dépourvues d'AREG sont sensibles au gefitinib. Cette molécule induit l'apoptose des cellules suite à l'activation de la protéine proapoptotique BAX qui change de conformation, va à la mitochondrie et déclenche l'apoptose. La présence d'AREG conditionne la résistance des cellules de CBNPC au gefitinib en diminuant le niveau d'expression de BAX, et en empêchant son activation. L'AREG agit en maintenant Ku70 sous une forme déacétylée, ce qui favorise son interaction avec BAX. En conséquence, en présence d'AREG, BAX est incapable d'aller à la mitochondrie sous l'action du gefitinib, et l'apoptose est inhibée.

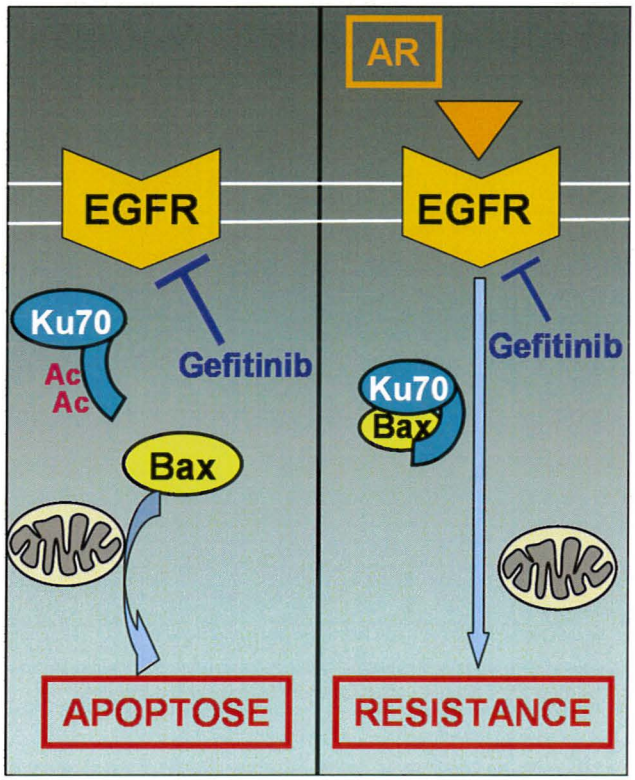


Figure 11. Mécanisme de résistance au gefitinib des cellules de cancer bronchique non-à petites cellules. Ce mécanisme dépend de l'amphiréguline et passe par la séquestration de BAX par Ku70.

Nous montrons pour la première fois que Ku70 est incriminé dans un mécanisme de résistance aux EGFR-TKI et que son acétylation est régulée par un facteur de croissance de la famille de l'EGF. De plus, nos données suggèrent fortement que l'utilisation d'HDACi pourrait contrecarrer l'effet protecteur de l'AREG et sensibiliser les cellules au gefitinib, provoquant la libération de BAX par Ku70.
Pour conclure, nous confirmons que l'AREG est un facteur de résistance au gefitinib, et suggérons de l'utiliser comme marqueur **diagnostique** pour discriminer avant traitement les patients susceptibles d'être résistants au gefitinib. Nous proposons également une stratégie **thérapeutique** qui permettrait de bloquer la résistance au gefitinib induite par l'AREG.

De nombreuses perspectives découlent de ce travail :

Dans un premier temps, nous souhaitons poursuivre l'identification complète des intermédiaires réactionnels qui interviennent dans la résistance au gefitinib médiée par l'AREG. Les précédents résultats du laboratoire montrent que l'AREG inhibe l'apoptose des cellules de CBNPC par une voie IGF1-R- et PKC-dépendante (Hurbin *et al.*, 2002 ; Hurbin *et al.*, 2005) qui aboutit à l'inactivation de BAX. Nous étudierons si les effecteurs cytoplasmiques de signalisation intervenant dans cette voie de résistance à l'apoptose sont également mis en jeu dans la résistance au gefitinib.

De plus, le mécanisme que nous décrivons fait intervenir l'acétylation de Ku70. Ce processus d'acétylation est régulé d'une part, par les histones acétyl-transférases (HAT), et notamment CBP et P/CAF (Cohen et al., 2004) chargées de greffer le groupement acétate, et d'autre part, par les déacétylases comme les HDAC et les sirtuins (Cohen et al., 2004) qui ont la mission inverse. Nous souhaitons donc identifier les HAT et/ou les déacétylases qui interviennent dans la voie de résistance au gefitinib et analyser l'influence de l'AREG sur la régulation de ces molécules.

Par ailleurs, un travail de collaboration avec la plateforme de "détection moléculaire *in situ*" du CHU de Grenoble (Pr E. Brambilla) et avec le service d'oncologie thoracique de l'hôpital Tenon (Pr J.Cadranel) a été entrepris. Nous analysons par immunohistochimie l'expression de l'AREG, l'EGFR, l'IGF1, l'IGF1-R ainsi que les principales voies de signalisation (phospho-AKT, phospho-ERK et phospho-PKC) sur des coupes de tissu tumoral de patients porteurs de

CBNPC (échantillons issus du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Grenoble) ou d'adénocarcinomes bronchioloalvéolaires traités par gefitinib (échantillons issus de l'essai IFCT-BIO-0401). Nous espérons confirmer le rôle de l'AREG comme marqueur de résistance au gefitinib.

De plus, une étude *in vivo* chez la souris Nude visera à confirmer les hypothèses issues des résultats obtenus *in vitro*. Nos résultats préliminaires montrent qu'il est possible d'augmenter la sensibilité de tumeurs sous-cutanées au gefitinib en ciblant l'AREG de façon concomitante avec des SiRNA.

Enfin, nous souhaitons confirmer qu'un traitement à base d'inhibiteurs d'HDAC est capable de restaurer une sensibilité au gefitinib. Des études complémentaires destinées à valider la puissance de l'association EGFR-TKI à celle des inhibiteurs d'HDAC seront conduites *in vitro* et *in vivo*. Nous espérons démontrer l'intérêt thérapeutique de cette association afin d'optimiser la future prise en charge des patients porteurs de CBNPC, qui possèdent un pronostic vital des plus sombres.

Conclusions

THÈSE SOUTENUE PAR : Benoît BUSSER

TITRE : Rôle de l'amphiréguline dans la résistance du cancer du poumon non-à petites cellules au gefitinib

CONCLUSIONS

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, à la fois chez l'homme et chez la femme. Le cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC) représente 80% des cancers du poumon et possède un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 12%, et ce malgré l'emploi de traitements comme la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc nécessaires pour améliorer la prise en charge de ces patients. Les nouvelles thérapies moléculaires ciblées sont en plein essor et devraient permettre d'obtenir dans les années à venir des résultats encourageants notamment pour améliorer le confort et prolonger la survie des patients atteints de CBNPC.

Les premières données concernant des inhibiteurs spécifiques de l'angiogenèse ou de la voie de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) semblent prometteuses. L'EGFR est impliqué dans le développement de nombreux cancers et constitue de fait une cible moléculaire privilégiée pour enrayer la prolifération tumorale. Dans le CBNPC, l'EGFR est souvent surexprimé, ce qui constitue un facteur de mauvais pronostic pour le patient. Récemment, une nouvelle classe de médicaments appelée inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) a vu le jour. Le gefitinib, une molécule appartenant à la famille des EGFR-TKI, a montré de puissants effets anti-prolifératifs dans les CBNPC de stades avancés, après échec de deux lignes de chimiothérapie. Malheureusement, le gefitinib n'a pas conféré d'avantage de survie par rapport au placebo sur des cohortes de patients non sélectionnés. Ces données ont entraîné la recherche intensive de marqueurs capables de prédire une résistance ou une sensibilité à ce traitement. Certaines mutations de l'EGFR et une augmentation du nombre de copies du gène ERBB2 ont ainsi été associées à une meilleure sensibilité au gefitinib. Par ailleurs, d'autres facteurs, comme une mutation activatrice de KRAS, une amplification de MET, ou une expression du récepteur de l'IGF1-R, sont des facteurs prédictifs d'une résistance au gefitinib.

Malheureusement, aucun facteur isolé ne permet de parfaitement déterminer la sensibilité au gefitinib.

L'amphiréguline (AREG) est un facteur de croissance qui active l'EGFR. Une étude clinique a montré que les patients porteurs de CBNPC résistants au gefitinib ont des taux d'AREG sérique élevés, suggérant l'implication de l'AREG dans la résistance au gefitinib.

Notre équipe a cherché à démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib des cellules de CBNPC et à décrire les mécanismes moléculaires impliqués. Notre travail montre que l'AREG permet de résister à l'apoptose induite par le gefitinib en inactivant la protéine proapoptotique BAX. Dans les cellules de CBNPC traitées par gefitinib, le niveau d'expression de la protéine BAX diminue en présence d'AREG. De plus, l'AREG est capable de réguler le niveau d'acétylation de Ku70, augmentant ainsi l'interaction entre BAX et Ku70. Nos résultats décrivent ainsi un mécanisme original de résistance au gefitinib qui dépend de l'acétylation de Ku70 et qui est régulé par un facteur de croissance, l'AREG qui possède donc un rôle capital dans la résistance des CBNPC au gefitinib.

Une utilisation diagnostique de l'AREG en tant que biomarqueur devrait permettre d'identifier les patients susceptibles de répondre ou non à ce traitement et le développement d'une thérapie ciblée anti-AREG pourrait sensibiliser les patients porteurs de CBNPC aux EGFR-TKI. De plus, l'implication de mécanismes de régulation de l'acétylation dans la résistance aux EGFR-TKI, et l'effet synergique obtenu en associant des inhibiteurs d'histone-déacétylases au gefitinib, encourage l'utilisation de ce type d'association dans la prise en charge thérapeutique du CBNPC, notamment pour les patients résistants aux EGFR-TKI.

Dans un contexte où le cancer pulmonaire est un problème majeur de santé publique et où la résistance aux traitements reste une des principales préoccupations des professionnels de santé, nos travaux pourraient avoir un impact sur la prise en charge des patients porteurs d'adénocarcinomes bronchiques. En effet, d'importantes applications diagnostiques et thérapeutiques potentielles découlent de notre recherche, concernant à la fois l'identification des patients porteurs de CBNPC résistants aux EGFR-TKI, mais aussi leur traitement.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 20 octobre 2008.

LE DOYEN
Pr Renée Grillot

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1 U.F.R. DE PHARMACIE

LE PRÉSIDENT DU JURY
Pr Alain Favier
Université J. Fourier - Faculté de Pharmacie
Domaine de la Merci
38700 LA TRONCHE - FRANCE

Références Bibliographiques

A

Adam, R. M., Borer, J. G., Williams, J., Eastham, J. A., Loughlin, K. R. and Freeman, M. R. **(1999)**.Amphiregulin is coordinately expressed with heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the interstitial smooth muscle of the human prostate. *Endocrinology*; 140 (12): 5866-75.

Adam, R. M., Chamberlin, S. G. and Davies, D. E. **(1996)**.Induction of anchorage-independent growth by amphiregulin. *Growth Factors*; 13 (3-4): 193-203.

Adrain, C. and Martin, S. J. **(2001)**. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*; 26 (6): 390-7.

Akagi, M., Yokozaki, H., Kitadai, Y., Ito, R., Yasui, W., Haruma, K., et al. **(1995)**. Expression of amphiregulin in human gastric cancer cell lines. *Cancer*; 75 (6 Suppl): 1460-6.

Akutsu, N., Bastien, Y., Lin, R., Mader, S. and White, J. H. **(2001)**. Amphiregulin is a vitamin D3 target gene in squamous cell and breast carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*; 281 (4): 1051-6.

Alberg, A. J. and Samet, J. M. **(2003)**. Epidemiology of lung cancer. *Chest*; 123 (1 Suppl): 21S-49S.

Aouba, A., Péquignot, F., Le Toullec, A. and Jougla, E. **(2007)**.Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*; (35-36): 308-314.

Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. **(1998)**. Death receptors: signaling and modulation. *Science*; 281 (5381): 1305-8.

B

Barry, M. and Bleackley, R. C. **(2002)**.Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*; 2 (6): 401-9.

Beasley, M. B., Brambilla, E. and Travis, W. D. **(2005)**.The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*; 40 (2): 90-7.

Beerli, R. R. and Hynes, N. E. **(1996)**. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem*; 271 (11): 6071-6.

Bennett, K. L., Plowman, G. D., Buckley, S. D., Skonier, J. and Purchio, A. F. **(1992)**. Regulation of amphiregulin mRNA by TGF-beta in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Growth Factors*; 7 (3): 207-13.

Berasain, C., Castillo, J., Perugorria, M. J., Prieto, J. and Avila, M. A. **(2007)**. Amphiregulin: A new growth factor in hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*;

Blanchet, S., Ramgolam, K., Baulig, A., Marano, F. and Baeza-Squiban, A. **(2004)**.Fine particulate matter induces amphiregulin secretion by bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 30 (4): 421-7.

Berquin, I. M., Dziubinski, M. L., Nolan, G. P. and Ethier, S. P. **(2001)**.A functional screen for genes inducing epidermal growth factor autonomy of human mammary epithelial cells confirms the role of amphiregulin. *Oncogene*; 20 (30): 4019-28.

Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E. and Pardee, A. B. **(2000)**.Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97 (15): 8542-7.

Blasco, M. A. **(2002)**.Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer*; 2 (8): 627-33.

Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., et al. **(2000)**.TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol*; 2 (4): 241-3.

Bolden, J. E., Peart, M. J. and Johnstone, R. W. **(2006)**.Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*; 5 (9): 769-84.

Brambilla, E., Travis, W. D., Colby, T. V., Corrin, B. and Shimosato, Y. **(2001)**. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J*; 18 (6): 1059-68.

Breuer, R. H., Postmus, P. E. and Smit, E. F. **(2005)**.Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration*; 72 (3): 313-30.

Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., et al. **(1995)**.Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*; 269 (5232): 1885-8.

Busser, B., Niang, C., Khochbin, S., Favrot, M. C., Coll, J. L. and Hurbin, A. **(2008)**.Amphiregulin-dependent deacetylation of Ku70 promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells. *Oncogene*; submitted

C

Castillo, J., Erroba, E., Perugorria, M. J., Santamaria, M., Lee, D. C., Prieto, J., et al. **(2006)**.Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*; 66 (12): 6129-38.

Catros-Quemener, V., Bouet, F. and Genetet, N. **(2003)**.[Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Med Sci (Paris)*; 19 (1): 43-53.

Choi, S. S., Miller, M. A. and Harper, P. A. **(2006)**. In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces amphiregulin gene expression in the developing mouse ureter. *Toxicol Sci*; 94 (1): 163-74.

Chung, E., Cook, P. W., Parkos, C. A., Park, Y. K., Pittelkow, M. R. and Coffey, R. J. **(2005)**.Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis. *J Invest Dermatol*; 124 (6): 1134-40.

Ciarloni, L., Mallepell, S. and Brisken, C. **(2007)**.Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor {alpha} function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104 (13): 5455-60.

Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A. and David, C. N. **(1999)**. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol*; 9 (17): 959-62.

Citri, A., Skaria, K. B. and Yarden, Y. **(2003)**.The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*; 284 (1): 54-65.

Clarke, P. G., Posada, A., Primi, M. P. and Castagne, V. **(1998)**.Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother*; 52 (9): 356-62.

clinicaltrials.gov, website de l'US National Institute of Health relatif aux essais cliniques, dernière consultation le 16.10.2008. http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=gefitinib+lung

Cohen, H. Y., Lavu, S., Bitterman, K. J., Hekking, B., Imahiyerobo, T. A., Miller, C., et al. **(2004)**.Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell*; 13 (5): 627-38.

Cory, S. and Adams, J. M. **(2002)**.The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*; 2 (9): 647-56.

Costa, D. B., Halmos, B., Kumar, A., Schumer, S. T., Huberman, M. S., Boggon, T. J., et al. **(2007)**.BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med*; 4 (10): 1669-79; discussion 1680.

Cragg, M. S., Kuroda, J., Puthalakath, H., Huang, D. C. and Strasser, A. **(2007)**. Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics. *PLoS Med*; 4 (10): 1681-89; discussion 1690.

Cutry, A. F., Kinniburgh, A. J., Krabak, M. J., Hui, S. W. and Wenner, C. E. **(1989)**. Induction of c-fos and c-myc proto-oncogene expression by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha is calcium-independent. *J Biol Chem*; 264 (33): 19700-5.

D

D'Antonio, A., Losito, S., Pignata, S., Grassi, M., Perrone, F., De Luca, A., et al. **(2002)**. Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas. *Int J Oncol*; 21 (5): 941-8.

Damstrup, L., et al. **(1999)**. Amphiregulin acts as an autocrine growth factor in two human polarizing colon cancer lines that exhibit domain selective EGF receptor mitogenesis. *Br J Cancer*; 80 (7): 1012-9.

Das, S. K., Chakraborty, I., Paria, B. C., Wang, X. N., Plowman, G. and Dey, S. K. **(1995)**.Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol*; 9 (6): 691-705.

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

De Luca, A., Casamassimi, A., Selvam, M. P., Losito, S., Ciardiello, F., Agrawal, S., 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): 589-94.

Debatin, K. M. and Krammer, P. H. **(2004)**. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*; 23 (16): 2950-66.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., et al. **(1999)**.Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*; 144 (5): 891-901.

Dossiers du CNHIM. **(2004)**. Anticancéreux: utilisation pratique (5e édition). XXV, 4-5.

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., et al. **(1984)**.Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*; 307 (5951): 521-7.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. **(2000)**.Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*; 102 (1): 33-42.

Du, B., Altorki, N. K., Kopelovich, L., Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A. J. **(2005)**.Tobacco smoke stimulates the transcription of amphiregulin in human oral epithelial cells: evidence of a cyclic AMP-responsive element binding protein-dependent mechanism. *Cancer Res*; 65 (13): 5982-8.

Dubrez, L., Coll, J. L., Hurbin, A., Solary, E. and Favrot, M. C. **(2001)**.Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein. *J Biol Chem*; 276 (42): 38980-7.

E

Eberhard, D. A., Johnson, B. E., Amler, L. C., Goddard, A. D., Heldens, S. L., Herbst, R. S., et al. **(2005)**. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*; 23 (25): 5900-9.

e-cancer.fr, website de l'Institut National du Cancer (INCa), dernière consultation le 16 octobre 2008. http://www.e-cancer.fr/Les-Essais-cliniques/Registre-des-essais-cliniques/op_com_etudecliniquev2-it_738-la_1-ve_1.html?mdrEC=gefitinib&envoiMrdEC=chercher&option=com_etudecliniquev2&Itemid=738&task=listeec&lang=1&vers=1&idfamille=&idspecialite=&idorgane=

Eckstein, N., Servan, K., Girard, L., Cai, D., von Jonquieres, G., Jaehde, U., et al. **(2008)**.Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J Biol Chem*; 283 (2): 739-50.

Eilstein, D., Uhry, Z., Lim, T. A. and Bloch, J. **(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): 282-90.

Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D. and Collins, V. P. **(1992)**.Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89 (10): 4309-13.

Engelman, J. A., Janne, P. A., Mermel, C., Pearlberg, J., Mukohara, T., Fleet, C., et al. **(2005)**.ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102 (10): 3788-93.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., et al. **(2007)**.MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*; 316 (5827): 1039-43.

Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T. T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., 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): 4103-11.

F

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. and Henson, P. M. **(2000)**. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*; 405 (6782): 85-90.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. and Boyle, P. **(2007)**. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*; 18 (3): 581-92.

Folkman, J. **(2006)**.Angiogenesis. *Annu Rev Med*; 57 1-18.

Fontanini, G., De Laurentiis, M., Vignati, S., Chine, S., Lucchi, M., Silvestri, V., et al. **(1998)**.Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIA non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res*; 4 (1): 241-9.

French, L. E. and Tschopp, J. **(2003)**. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ*; 10 (1): 117-23.

Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J. Y., et al. **(2003)**.Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*; 21 (12): 2237-46.

Funatomi, H., Itakura, J., Ishiwata, T., Pastan, I., Thompson, S. A., Johnson, G. R., et al. **(1997)**.Amphiregulin antisense oligonucleotide inhibits the growth of T3M4 human pancreatic cancer cells and sensitizes the cells to EGF receptor-targeted therapy. *Int J Cancer*; 72 (3): 512-7.

G

Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., et al. **(1993)**. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*; 53 (14): 3217-20.

Gazel, A., Rosdy, M., Tornier, C., De Fraissinette, A. D. and Blumenberg, M. **(2008)**.Transcriptional profiling defines the effects of nickel in human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol*

Gazzeri, S., Gouyer, V., Vour'ch, C., Brambilla, C. and Brambilla, E. **(1998)**. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene*; 16 (4): 497-504

Giaccone, G., Herbst, R. S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., et al. **(2004)**.Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol*; 22 (5): 777-84.

Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P. and Mendelsohn, J. **(1995)**.Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res*; 1 (11): 1311-8.

Gong, Y., Somwar, R., Politi, K., Balak, M., Chmielecki, J., Jiang, X., et al. **(2007)**. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR- dependent lung adenocarcinomas. *PLoS Med*; 4 (10): e294.

Greulich, H., Chen, T. H., Feng, W., Janne, P. A., Alvarez, J. V., Zappaterra, M., et al. **(2005)**.Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med*; 2 (11): e313.

Gschwind, A., Fischer, O. M. and Ullrich, A. **(2004)**.The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 4 (5): 361-70.

Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M. and Ullrich, A. **(2003)**.TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *Embo J*; 22 (10): 2411-21.

Guessous, I., Cornuz, J. and Paccaud, F. **(2007)**.Lung cancer screening: current situation and perspective. *Swiss Med Wkly*; 137 (21-22): 304-11.

H

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. **(2000)**. The hallmarks of cancer. *Cell*; 100 (1): 57-70.

Hanna, N., Lilenbaum, R., Ansari, R., Lynch, T., Govindan, R., Janne, P. A., et al. **(2006)**.Phase II trial of cetuximab in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24 (33): 5253-8.

Hecht, S. S. **(2003)**.Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*; 3 (10): 733-44.

Hengartner, M. O. **(2000)**.The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407 (6805): 770-6.

Herbst, R. S., Giaccone, G., Schiller, J. H., Natale, R. B., Miller, V., Manegold, C., et al. **(2004)**.Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol*; 22 (5): 785-94.

Herbst, R. S., Heymach, J. V. and Lippman, S. M. **(2008)**.Lung cancer. *N Engl J Med*; 359 (13): 1367-80.

Herbst, R. S., Yano, S., Kuniyasu, H., Khuri, F. R., Bucana, C. D., Guo, F., et al. **(2000)**.Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*; 6 (3): 790-7.

Herr, I. and Debatin, K. M. **(2001)**.Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*; 98 (9): 2603-14.

Hill, C. and Doyon, F. **(2006)**.[The frequency of cancer in France in year 2002, and trends since 1968]. *Bull Cancer*; 93 (1): 7-11.

Holbro, T., Civenni, G. and Hynes, N. E. **(2003)**.The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*; 284 (1): 99-110.

Hsu, Y. T. and Youle, R. J. **(1997)**.Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*; 272 (21): 13829-34.

Huh, J. I., Qiu, T. H., Chandramouli, G. V., Charles, R., Wiench, M., Hager, G. L., et al. **(2007)**.2-methoxyestradiol induces mammary gland differentiation through amphiregulin-epithelial growth factor receptor-mediated signaling: molecular distinctions from the mammary gland of pregnant mice. *Endocrinology*; 148 (3): 1266-77.

Hurbin, A., Coll, J. L., Dubrez-Daloz, L., Mari, B., Auberger, P., Brambilla, C., 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): 19757-67.

Hurbin, A., Dubrez, L., Coll, J. L. and Favrot, M. C. **(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): 49127-33.

Hynes, N. E. and Lane, H. A. **(2005)**.ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*; 5 (5): 341-54.

I

Ishikawa, N., Daigo, Y., Takano, A., Taniwaki, M., Kato, T., Hayama, S., et al. **(2005)**. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res*; 65 (20): 9176-84.

J

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., et al. **(2008)**.Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*; 58 (2): 71-96.

Johansson, C. C., Yndestad, A., Enserink, J. M., Ree, A. H., Aukrust, P. and Tasken, K. **(2004)**.The epidermal growth factor-like growth factor amphiregulin is strongly induced by the adenosine 3',5'-monophosphate pathway in various cell types. *Endocrinology*; 145 (11): 5177-84.

Johnson, G. R., Saeki, T., Auersperg, N., Gordon, A. W., Shoyab, M., Salomon, D. S., et al. **(1991)**.Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: nuclear localization of endogenous amphiregulin. *Biochem Biophys Res Commun*; 180 (2): 481-8.

Johnson, G. R., Saeki, T., Gordon, A. W., Shoyab, M., Salomon, D. S. and Stromberg, K. **(1992)**.Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J Cell Biol*; 118 (3): 741-51.

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. and Lowe, S. W. **(2002)**.Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*; 108 (2): 153-64.

Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W. and Burgess, A. W. **(2003)**.Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*; 284 (1): 31-53.

K

Kakiuchi, S., Daigo, Y., Ishikawa, N., Furukawa, C., Tsunoda, T., Yano, S., et al. **(2004)**.Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet*; 13 (24): 3029-43.

Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., et al. **(2002)**. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*; 346 (9): 645-52.

Kato, M., Inazu, T., Kawai, Y., Masamura, K., Yoshida, M., Tanaka, N., et al. **(2003)**. Amphiregulin is a potent mitogen for the vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Biochem Biophys Res Commun*; 301 (4): 1109-15.

Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. **(2000)**. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*; 256 (1): 42-9.

Kaufmann, S. H. and Vaux, D. L. **(2003)**. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*; 22 (47): 7414-30.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. **(1972)**.Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26 (4): 239-57.

Khatua, A., Wang, X., Ding, T., Zhang, Q., Reese, J., DeMayo, F. J., et al. **(2006)**.Indian hedgehog, but not histidine decarboxylase or amphiregulin, is a progesterone-regulated uterine gene in hamsters. *Endocrinology*; 147 (9): 4079-92.

Kondapaka, S. B., Fridman, R. and Reddy, K. B. **(1997)**. Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer*; 70 (6): 722-6.

Krause, D. S. and Van Etten, R. A. **(2005)**. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*; 353 (2): 172-87.

Kris, M. G., Natale, R. B., Herbst, R. S., Lynch, T. J., Jr., Prager, D., Belani, C. P., 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): 2149-58.

Kwak, E. L., Sordella, R., Bell, D. W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., et al. **(2005)**. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102 (21): 7665-70.

L

Lababede, O., Meziane, M. A. and Rice, T. W. **(1999)**.TNM staging of lung cancer: a quick reference chart. *Chest*; 115 (1): 233-5.

LaMarca, H. L. and Rosen, J. M. **(2007)**.Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage. *Breast Cancer Res*; 9 (4): 304.

Lantuejoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J. and Brambilla, E. **(2003)**.Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol*; 200 (3): 336-47.

Lantuejoul, S., Salon, C., Soria, J. C. and Brambilla, E. **(2007)**. Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *Int J Cancer*; 120 (9): 1835-41.

Le Faou, A. L. and Scemama, O. **(2005)**.[Epidemiology of tobacco smoking]. *Rev Mal Respir*; 22 (6 Pt 2): 8S27-32.

Lemjabbar, H., Li, D., Gallup, M., Sidhu, S., Drori, E. and Basbaum, C. **(2003)**.Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin. *J Biol Chem*; 278 (28): 26202-7.

Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. **(2001)**. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*; 412 (6842): 95-9.

Li, S., Plowman, G. D., Buckley, S. D. and Shipley, G. D. **(1992)**.Heparin inhibition of autonomous growth implicates amphiregulin as an autocrine growth factor for normal human mammary pithelial cells. *J Cell Physiol*; 153 (1): 103-11.

Lilenbaum, R. C. **(2006)**.The evolving role of cetuximab in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 12 (14 Pt 2): 4432s-4435s.
Liston, P., Fong, W. G. and Korneluk, R. G. **(2003)**.The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*; 22 (53): 8568-80.

Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. **(2001)**. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2 (7): 545-50.

Luetteke, N. C., Qiu, T. H., Fenton, S. E., Troyer, K. L., Riedel, R. F., Chang, A., et al. **(1999)**.Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development*; 126 (12): 2739-50.

Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., et al. **(2004)**. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*; 350 (21): 2129-39.

M

Ma, L., de Roquancourt, A., Bertheau, P., Chevret, S., Millot, G., Sastre-Garau, X., et al. **(2001)**.Expression of amphiregulin and epidermal growth factor receptor in human breast cancer: analysis of autocriny and stromal-epithelial interactions. *J Pathol*; 194 (4): 413-9.

Ma, L., Gauville, C., Berthois, Y., Millot, G., Johnson, G. R. and Calvo, F. **(1999)**. Antisense expression for amphiregulin suppresses tumorigenicity of a transformed human breast epithelial cell line. *Oncogene*; 18 (47): 6513-20.

Madelaine, J. and Zalcman, G. **(2005)**. Biologie des cancers bronchiques. *EMC-pneumologie*; 2 (1): 1-8.

Mahtouk, K., Hose, D., Reme, T., De Vos, J., Jourdan, M., Moreaux, J., et al. **(2005)**.Expression of EGF-family receptors and amphiregulin in multiple myeloma. Amphiregulin is a growth factor for myeloma cells. *Oncogene*; 24 (21): 3512-24.

Martinez-Lacaci, I., Johnson, G. R., Salomon, D. S. and Dickson, R. B. **(1996)**.Characterization of a novel amphiregulin-related molecule in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-treated breast cancer cells. *J Cell Physiol*; 169 (3): 497-508.

Martinez-Lacaci, I., Saceda, M., Plowman, G. D., Johnson, G. R., Normanno, N., Salomon, D. S., et al. **(1995)**. Estrogen and phorbol esters regulate amphiregulin expression by two separate mechanisms in human breast cancer cell lines. *Endocrinology*; 136 (9): 3983-92.

Martini, N. **(1990)**.Surgical treatment of non-small cell lung cancer by stage. *Semin Surg Oncol*; 6 (5): 248-54.

Massarelli, E., Varella-Garcia, M., Tang, X., Xavier, A. C., Ozburn, N. C., Liu, D. D., 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): 2890-6.

Matsui, M., Miyasaka, J., Hamada, K., Ogawa, Y., Hiramoto, M., Fujimori, R., et al. **(2000)**. Influence of aging and cell senescence on telomerase activity in keratinocytes. *J Dermatol Sci*; 22 (2): 80-7.

Mattson, M. P. **(2004)**.Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*; 430 (7000): 631-9.

McBryan, J., Howlin, J., Napoletano, S. and Martin, F. **(2008)**.Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; 13 (2): 159-69.

Menashi, S., Serova, M., Ma, L., Vignot, S., Mourah, S. and Calvo, F. **(2003)**.Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res*; 63 (22): 7575-80.

Merrick, D. T., Haney, J., Petrunich, S., Sugita, M., Miller, Y. E., Keith, R. L., et al. **(2005)**. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dypslasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer*; 48 (1): 31-45.

Micheau, O., Hammann, A., Solary, E. and Dimanche-Boitrel, M. T. **(1999)**.STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochem Biophys Res Commun*; 256 (3): 603-7.

Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. and Dimanche-Boitrel, M. T. **(1999)**.Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem*; 274 (12): 7987-92.

Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., et al. **(1995)**.Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*; 376 (6538): 337-41.

Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Tsutsui, S., Yasunaga, Y., Zushi, S., Higashiyama, S., et al. **(1996)**.Oxidative stress increases gene expression of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured rat gastric epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 226 (2): 542-6.

Morgillo, F., Kim, W. Y., Kim, E. S., Ciardiello, F., Hong, W. K. and Lee, H. Y. **(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): 2795-803.

Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., et al. **(1995)**. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*; 55 (23): 5536-9.

N

Negishi, H., Ikeda, C., Nagai, Y., Satoh, A., Kumasako, Y., Makinoda, S., et al. **(2007)**.Regulation of amphiregulin, EGFR-like factor expression by hCG in cultured human granulosa cells. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 86 (6): 706-10.

Nicholson, R. I., Gee, J. M. and Harper, M. E. **(2001)**.EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*; 37 Suppl 4 S9-15.

Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A. and Salomon, D. S. **(2001)**.The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci*; 6 D685-707.

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., et al. **(2006)**.Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*; 366 (1): 2-16.

Normanno, N., Selvam, M. P., Bianco, C., Damiano, V., de Angelis, E., Grassi, M., et al. **(1995)**. Amphiregulin anti-sense oligodeoxynucleotides inhibit growth and transformation of a human colon carcinoma cell line. *Int J Cancer*; 62 (6): 762-6.

Normanno, N., Selvam, M. P., Qi, C. F., Saeki, T., Johnson, G., Kim, N., et al. **(1994)**.Amphiregulin as an autocrine growth factor for c-Ha-ras- and c-erbB-2-transformed human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91 (7): 2790-4.

O

O'Hagan, R. C. and Hassell, J. A. **(1998)**.The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase. *Oncogene*; 16 (3): 301-10.

O'Reilly, S. M., Leonard, M. O., Kieran, N., Comerford, K. M., Cummins, E., Pouliot, M., et al. **(2006)**.Hypoxia induces epithelial amphiregulin gene expression in a CREB-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol*; 290 (2): C592-600.

Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M. and Hynes, N. E. **(1999)**.ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*; 274 (24): 17209-18.

Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. and Hynes, N. E. **(2000)**.The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J*; 19 (13): 3159-67.

Ornskov, D., Nexo, E. and Sorensen, B. S. **(2007)**.Insulin induces a transcriptional activation of epiregulin, HB-EGF and amphiregulin, by a PI3K-dependent mechanism: identification of a specific insulin-responsive promoter element. *Biochem Biophys Res Commun*; 354 (4): 885-91.

P

P, O. Charoenrat, Rhys-Evans, P. and Eccles, S. **(2000)**.Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*; 88 (5): 759-65.

Pao, W., Wang, T. Y., Riely, G. J., Miller, V. A., Pan, Q., Ladanyi, M., et al. **(2005)**.KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*; 2 (1): e17.

Peter, M. E. and Krammer, P. H. **(2003)**.The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*; 10 (1): 26-35.

Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E. and Doll, R. **(2000)**.Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *Bmj*; 321 (7257): 323-9.

Picihard, V., Berthois, Y., Roccabianca, M., Prevot, C., Sarrazin, M., Portugal, H., et al. **(2006)**.Concomitant cell growth and differentiation are dependent on erbB1 and integrin activation in an autonomously surviving colon adenocarcinoma: involvement of autocrine amphiregulin secretion. *Anticancer Res*; 26 (4B): 2769-83.

Pinkoski, M. J. and Green, D. R. **(2002)**. Lymphocyte apoptosis: refining the paths to perdition. *Curr Opin Hematol*; 9 (1): 43-9.

Plowman, G. D., Green, J. M., McDonald, V. L., Neubauer, M. G., Disteche, C. M., Todaro, G. J., et al. **(1990)**. The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol Cell Biol*; 10 (5): 1969-81.

Q

Qin, L. and Partridge, N. C. **(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): 632-40.

Qin, L., Tamasi, J., Raggatt, L., Li, X., Feyen, J. H., Lee, D. C., 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): 3974-81.

Quantin, B. and Breathnach, R. **(1988)**.Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature*; 334 (6182): 538-9.

R

Reed, J. C. **(1999)**. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*; 17 (9): 2941-53.

Riedl, S. J., Renatus, M., Snipas, S. J. and Salvesen, G. S. **(2001)**.Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. *Biochemistry*; 40 (44): 13274-80.

Riese, D. J., Kim, E. D., Elenius, K., Buckley, S., Klagsbrun, M., Plowman, G. D., et al. **(1996)**.The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor-alpha, heparin-binding epidermal growth factor-like factor, and amphiregulin to Neu, ErbB-3, and ErbB-4. *J Biol Chem*; 271 (33): 20047-52.

Rinehart, JJ., Wilding, G., Willson, J., Krishnamuhrti, S., Natale, RB. and Dasse, KD et al. **(2003)**.A phase I clinical and pharmacokinetic (PK)/food effect study of oral CI-1033, a pan-erb B tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *ASCO Meeting Abstracts*; (22): 821.

Risch, A. and Plass, C. **(2008)**.Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer*; 123 (1): 1-7.

Roshal, M., Zhu, Y. and Planelles, V. **(2001)**.Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*; 6 (1-2): 103-16.

Ross, HJ., Blumenschein, GR., Dowlati, A., Aisner, J., Rigas, A. and Stanislaus M, et al. **(2005)**.Preliminary safety results of a phase II trial comparing two schedules of lapatinib (GW572016) as first line therapy for advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *ASCO Meeting Abstracts*; (23): 7099.

Rumelhard, M., Ramgolam, K., Auger, F., Dazy, A. C., Blanchet, S., Marano, F., et al. **(2007)**.Effects of PM2.5 components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells. *Toxicol Lett*; 168 (2): 155-64.

Rusch, V., Klimstra, D., Linkov, I. and Dmitrovsky, E. **(1995)**.Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res*; 55 (6): 1365-72.

S

Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., et al. **(2004)**.Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*; 164 (5): 769-79.

Sakurai, H., Tsukamoto, T., Kjelsberg, C. A., Cantley, L. G. and Nigam, S. K. **(1997)**.EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney. *Am J Physiol*; 273 (3 Pt 2): F463-72.

Salomon, D. S., Normanno, N., Ciardiello, F., Brandt, R., Shoyab, M. and Todaro, G. J. **(1995)**.The role of amphiregulin in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 33 (2): 103-14.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. **(1995)**.Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*; 19 (3): 183-232.

Sanchez-Cespedes, M. **(2003)**.Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer*; 40 (2): 111-21.

Sato, J. D., Kawamoto, T., Le, A. D., Mendelsohn, J., Polikoff, J. and Sato, G. H. **(1983)**.Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med*; 1 (5): 511-29.

Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., et al. **(2002)**.Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 346 (2): 92-8.

Schlessinger, J. **(2000)**.Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*; 103 (2): 211-25.

Schreiber, A. B., Lax, I., Yarden, Y., Eshhar, Z. and Schlessinger, J. **(1981)**. Monoclonal antibodies against receptor for epidermal growth factor induce early and delayed effects of epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 78 (12): 7535-9.

Schuger, L., Johnson, G. R., Gilbride, K., Plowman, G. D. and Mandel, R. **(1996)**. Amphiregulin in lung branching morphogenesis: interaction with heparan sulfate proteoglycan modulates cell proliferation. *Development*; 122 (6): 1759-67.

Sehgal, I., Bailey, J., Hitzemann, K., Pittelkow, M. R. and Maihle, N. J. **(1994)**.Epidermal growth factor receptor-dependent stimulation of amphiregulin expression in androgen-stimulated human prostate cancer cells. *Mol Biol Cell*; 5 (3): 339-47.

Selvaggi, G., Novello, S., Torri, V., Leonardo, E., De Giuli, P., Borasio, P., et al. **(2004)**.Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*; 15 (1): 28-32.

Sequist, L. V., Bell, D. W., Lynch, T. J. and Haber, D. A. **(2007)**.Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25 (5): 587-95.

Shao, J., Sheng, G. G., Mifflin, R. C., Powell, D. W. and Sheng, H. **(2006)**.Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer Res*; 66 (2): 846-55.

Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. and Haber, D. A. **(2007)**.Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*; 7 (3): 169-81.

Shepherd, F. A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E. H., Hirsh, V., Thongprasert, S., et al. **(2005)**.Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 353 (2): 123-32.

Shields, T. W. **(1993)**.Surgical therapy for carcinoma of the lung. *Clin Chest Med*; 14 (1): 121-47.

Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P. M. and Gazdar, A. F. **(2003)**.Apoptosis and lung cancer: a review. *J Cell Biochem*; 88 (5): 885-98.

Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. and Todaro, G. J. **(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): 6528-32.

Shoyab, M., McDonald, V. L., Dick, K., Modrell, B., Malik, N. and Plowman, G. D. **(1991)**.Amphiregulin-associated protein: complete amino acid sequence of a protein produced by the 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun*; 179 (1): 572-8.

Shoyab, M. and Plowman, G. D. **(1991)**.Purification of amphiregulin from serum-free conditioned medium of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-treated cell lines. *Methods Enzymol*; 198 213-21.

Sibilia, M. and Wagner, E. F. **(1995)**.Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*; 269 (5221): 234-8.

Skorski, T. **(2002)**. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*; 2 (5): 351-60.

Soh, J., Toyooka, S., Ichihara, S., Suehisa, H., Kobayashi, N., Ito, S., et al. **(2007)**.EGFR mutation status in pleural fluid predicts tumor responsiveness and resistance to gefitinib. *Lung Cancer*; 56 (3): 445-8.

Solic, N. and Davies, D. E. **(1997)**. Differential effects of EGF and amphiregulin on adhesion molecule expression and migration of colon carcinoma cells. *Exp Cell Res*; 234 (2): 465-76.

Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A. and Settleman, J. **(2004)**.Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*; 305 (5687): 1163-7.

Soria, J. C., Lee, H. Y., Lee, J. I., Wang, L., Issa, J. P., Kemp, B. L., et al. **(2002)**.Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res*; 8 (5): 1178-84.

Soria, JC., Cortes, J., Armand, JP., Taleb, A., van Bree, L. and Lopez, E, et al. **(2005)**.Phase I pharmacokinetic profile and early clinical evaluation of the PAN-HER inhibitor BMS-599626. *ASCO Meeting Abstracts*; (23): 3109.

Spiro, S. G. and Porter, J. C. **(2002)**.Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*; 166 (9): 1166-96.

Steller, H. **(1995)**.Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*; 267 (5203): 1445-9.

Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. **(2000)**.Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*; 1477 (1-2): 299-306.

Sternlicht, M. D., Sunnarborg, S. W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D. C. and Werb, Z. **(2005)**. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*; 132 (17): 3923-33.

Sunnarborg, S. W., Hinkle, C. L., Stevenson, M., Russell, W. E., Raska, C. S., Peschon, J. J., et al. **(2002)**.Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem*; 277 (15): 12838-45.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., et al. **(1999)**.Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; 397 (6718): 441-6.

T

Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. **(2003)**.Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*; 53 Suppl 3 S61-70; discussion S70-2.

Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., von Pawel, J., 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): 1527-37.

Thiberville, L. and Paris, C. **(2004)**. Epidémiologie et facteurs de risque des cancers bronchiques primitifs. *EMC-pneumologie*; 1 (1): 7-18.

Thome, M. and Tschopp, J. **(2001)**. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*; 1 (1): 50-8.

Thompson, C. B. **(1995)**.Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267 (5203): 1456-62.

Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Zhao, J. J., Howard, A. D., Griffin, P. R. and Chapman, K. T. **(1994)**.Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochemistry*; 33 (13): 3934-40.

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., et al. **(1995)**.Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*; 269 (5221): 230-4.

Torring, N., Hansen, F. D., Sorensen, B. S., Orntoft, T. F. and Nexo, E. **(2005)**.Increase in amphiregulin and epiregulin in prostate cancer xenograft after androgen deprivation-impact of specific HER1 inhibition. *Prostate*; 64 (1): 1-8.

Torring, N., Jorgensen, P. E., Sorensen, B. S. and Nexo, E. **(2000)**.Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Res*; 20 (1A): 91-5.

Torring, N., Sorensen, B. S., Bosch, S. T., Klocker, H. and Nexo, E. **(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.

Tracy, S., Mukohara, T., Hansen, M., Meyerson, M., Johnson, B. E. and Janne, P. A. **(2004)**.Gefitinib induces apoptosis in the EGFRL858R non-small-cell lung cancer cell line H3255. *Cancer Res*; 64 (20): 7241-4.

W. D. Travis, E. Brambilla, H. K. Müller-Hermelink and C. C. Harris, Eds. (**2004**). WHO Classification of tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, IARC Press.

Tsao, M. S., Sakurada, A., Cutz, J. C., Zhu, C. Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., et al. **(2005)**.Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*; 353 (2): 133-44.

Tsutsui, S., Shinomura, Y., Higashiyama, S., Higashimoto, Y., Miyazaki, Y., Kanayama, S., et al. **(1997)**.Induction of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor and amphiregulin mRNAs by gastrin in the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun*; 235 (3): 520-3.

U

Ushiro, H. and Cohen, S. **(1980)**. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem*; 255 (18): 8363-5.

V

Van Cruchten, S. and Van Den Broeck, W. **(2002)**.Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*; 31 (4): 214-23.

Vardy, D. A., Kari, C., Lazarus, G. S., Jensen, P. J., Zilberstein, A., Plowman, G. D., et al. **(1995)**. Induction of autocrine epidermal growth factor receptor ligands in human keratinocytes by insulin/insulin-like growth factor-1. *J Cell Physiol*; 163 (2): 257-65.

Vecchi, M., Rudolph-Owen, L. A., Brown, C. L., Dempsey, P. J. and Carpenter, G. **(1998)**.Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate-induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin. *J Biol Chem*; 273 (32): 20589-95.

Vignot, S. and Besse, B. **(2007)**. [Gemcitabine and non small-cell lung cancer]. *Bull Cancer*; 94 Spec No Actualites S95-103.

W

Wang, X., Masri, S., Phung, S. and Chen, S. **(2008)**.The role of amphiregulin in exemestane-resistant breast cancer cells: evidence of an autocrine loop. *Cancer Res*; 68 (7): 2259-65.

Weber, R. **(1964)**.Ultrastructural Changes in Regressing Tail Muscles of Xenopus Larvae at Metamorphosis. *J Cell Biol*; 22 481-7.

Wei, Y., Fox, T., Chambers, S. P., Sintchak, J., Coll, J. T., Golec, J. M., et al. **(2000)**.The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol*; 7 (6): 423-32.

Weil, M., Raff, M. C. and Braga, V. M. **(1999)**.Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*; 9 (7): 361-4.

Willmarth, N. E. and Ethier, S. P. **(2006)**.Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem*; 281 (49): 37728-37.

Willmarth, N. E. and Ethier, S. P. **(2008)**.Amphiregulin as a novel target for breast cancer therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; 13 (2): 171-9.

Wood, W., Turmaine, M., Weber, R., Camp, V., Maki, R. A., McKercher, S. R., et al. **(2000)**.Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development*; 127 (24): 5245-52.

Woodworth, C. D., McMullin, E., Iglesias, M. and Plowman, G. D. **(1995)**.Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92 (7): 2840-4.

Wu, M., Rivkin, A. and Pham, T. **(2008)**.Panitumumab: Human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Ther*; 30 (1): 14-30.

Y

Yamada, M., Ichikawa, Y., Yamagishi, S., Momiyama, N., Ota, M., Fujii, S., et al. **(2008)**.Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; 14 (8): 2351-6.

Yamamoto, T., Fujita, I., Akisue, T., Marui, T., Nakatani, T., Kawamoto, T., et al. **(2004)**.Amphiregulin and epidermal growth factor receptor expression in human malignant fibrous histiocytoma of soft tissues. *Anticancer Res*; 24 (2C): 1307-10.

Z

Zhang, Q., Thomas, S. M., Lui, V. W., Xi, S., Siegfried, J. M., Fan, H., et al. **(2006)**.Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103 (18): 6901-6.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M. and Salvesen, G. S. **(1997)**.Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem*; 272 (12): 7797-800.

Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A. F. and Minna, J. D. **(2002)**.Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol*; 64 681-708.

Annexes

Cancer du poumon

Lignes directrices pour le traitement des échantillons et la déclaration du stade des tumeurs

Classification histologique des tumeurs malignes du poumon

Carcinome à petites cellules
Variantes : Carcinome composite à petites cellules

Carcinome épidermoïde*
Variantes : Papillaire
À cellules claires
À petites cellules
Basaloïde

Adénocarcinome*
Acineux
Papillaire
Carcinome bronchiolo-alvéolaire
non mucineux (cellules de Clara/pneumocyte detype II)
mucineux (cellules caliciformes)
mixte mucineux et non mucineux
Adénocarcinome solide
Adénocarcinome avec sous-types mixtes
Variantes : Adénome embryonnaire bien différencié
Adénocarcinome mucineux («colloïde»)
Cystadénocarcinome mucineux
Adénocarcinome à cellules en bague
Carcinome à cellules claires

Carcinome à grandes cellules
Variantes : Carcinome neuro-endocrine à grandes cellules
Carcinome neuro-endocrine composite à grandes cellules
Carcinome basaloïde
Carinome de type lymphoépithéliome
Carcinome à cellules claires
Carcinome à grandes cellules et rhabdoïde

Carcinome adénosquameux

Carcinomes avec éléments pléomorphes, sarcomatoïdes ou sarcomateux
Carcinomes à cellules fusiformes ou à cellules géantes
Carcinome pléomorphe
Carcinome à cellules fusiformes
Carcinome à cellules géantes
Carcinosarcome
Blastome pulmonaire

Tumeur carcinoïde
Carcinoïde typique
Carcinoïde atypique

Tumeurs des glandes bronchiques
Carcinome mucoépidermoïde
Carcinome adénoïde kystique
Autres

* Classement : bien différencié, modérément différencié et peu différencié.

Annexe 1. Classification histologique des tumeurs malignes pulmonaires selon l'OMS
Adapté d'après Brambilla *et al.*, 2001

	OMS Grade 1	OMS Grade 2	OMS Grade 3	OMS Grade 4
Alopécie	Perte des cheveux	Alopécie modérée en plaques	Alopécie complète mais réversible	Alopécie irréversible
Toxicité cutanée	Erythème	Desquamation, vésicules	Suintement, ulcération	Fièvre avec hypotension
Cardiotoxicité	Mineure - Ne nécessite pas l'arrêt du traitement	Modérée - Ne nécessite pas l'arrêt du traitement	Sévère	Intolérable
Mucite	Douleur, érythème	Erythème, ulcère, alimentation solide	Ulcérations, alimentation liquide uniquement	Alimentation impossible Voie parentérale
Myélotoxicité (adulte)				
- Anémie (Hb en g/dl)	9,5 à 10,9	8 à 9,4	6,5 à 7,9	< 6,5
- Leucopénie (L en G/l)	3 à 3,9	2 à 2,9	1 à 1,9	< 1
- Neutropénie (PNN en G/l)	1,5 à 1,9	1 à 1,4	0,5 à 0,9	< 0,5
- Thrombopénie (P en G/l)	75 à 99	50 à 75	25 à 50	< 25
Hémorragie	Pétéchie	Modérée	Moyenne	Importante
Infection	Mineure	Modérée	Majeure	Choc infectieux
Nausées, vomissements	Nausées	Vomissements transitoires	Vomissements nécessitant un traitement antiémétique	Vomissements incoercibles
Diarrhée	Transitoire < 2 jours	Tolérable > 2 jours	Intolérable, demandant un traitement	Hémorragique Déshydratation
Neurotoxicité, état de conscience	Assoupissements	Somnolence < 50% des heures d'éveil	Somnolence > 50% des heures d'éveil	Coma
Neurotoxicité périphérique	Paresthésies légères et/ou diminution des réflèxes ostéotendineux	Paresthésies sévères et/ou faiblesse musculaire modérée	Paresthésies intolérables et/ou perte motrice marquée	Paralysie
Stérilité				
Cancer secondaire				

Hb=Hemoglobine, L=Leucocytes
PNN=Polynucléaires neutrophiles
P=Plaquettes, G/l=Giga/l=10^9/l

Annexe 2. Principaux effets secondaires des anticancéreux. Classification par stades de gravité de l'OMS.
D'après Anticancéreux: utilisation pratique (5ème édition). Dossiers du CNHIM, 2004, XXV, 4-5.

RESEAUX DE CANCEROLOGIE RHONE-ALPES ET AUVERGNE
ONCORA - CONCORDE - ONCOLOIRE - ARC ALPIN - ONCAUVERGNE

GROUPE DE TRAVAIL REFERENTIELS COMMUNS DE PROTOCOLES DE CHIMIOTHERAPIE

REFERENTIEL DE BON USAGE - CANCERS THORACIQUES

I- CANCERS BRONCHIQUES NON A PETITES CELLULES (CBNPC)

A- PROTOCOLES ENREGISTRES EN RCP

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique		Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
PEMETREXED EN MONOTHERAPIE	Pemetrexed 500 mg/m² J1 Tous les 21 jours		Localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	A - I	HANNA N [15]
GEMCITABINE EN MONOTHERAPIE	Gemcitabine 1250 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	Gemcitabine 1000 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Localement avancé ou métastatique	A - I	GRIDELLI C [13]
					MANEGOLD C [25]
					VANSTEENKISTE JF [50]
CISPLATINE - GEMCITABINE	- Cisplatine 80 mg/m² J1 - Gemcitabine 1250 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	- Cisplatine 100 mg/m² J1 - Gemcitabine 1000 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Localement avancé ou métastatique	A - I	SANDLER AB [35]
					SMIT EF [41]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - GEMCITABINE	- Bevacizumab 7,5 ou 15 mg/kg J1 - Cisplatine 80 mg/m² J1 - Gemcitabine 1250 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	- Bevacizumab 7,5 ou 15 mg/kg J1 - Cisplatine 100 mg/m² J1 - Gemcitabine 1000 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	MANEGOLD C [26] AMM Bevacizumab

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CARBOPLATINE - GEMCITABINE	**- Carboplatine** AUC 5 (Calvert) J1 **- Gemcitabine** 1200 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique	**A - I**	RUDD RM [33]
BEVACIZUMAB - CARBOPLATINE - GEMCITABINE	**- Bevacizumab** 7,5 ou 15 mg/kg J1 **- Carboplatine** AUC 5 (Calvert) J1 **- Gemcitabine** 1200 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
VINORELBINE INJ EN MONOTHERAPIE	**Vinorelbine** 30 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Métastatique	**A - I**	GRIDELLI C [13]
VINORELBINE PER OS EN MONOTHERAPIE	Cures n°1, 2 et 3 **Vinorelbine** 60 mg/m² J1 Cure n°4 et suivantes **Vinorelbine** 80 mg/m² J1 **Tous les 7 jours**	Métastatique	**A - I**	JASSEM J [19]
CISPLATINE - VINORELBINE INJ	**- Cisplatine** 80 mg/m² J1 **- Vinorelbine** 30 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Adjuvant	**A - I**	ARRIAGADA R [1]
				DOUILLARD JY [5]
				PIGNON JP [31]
				WINTON T [55]
		Métastatique	**A - I**	GRIDELLI C [12]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - VINORELBINE INJ	**- Bevacizumab** 7,5 ou 15 mg/kg J1 **- Cisplatine** 80 mg/m² J1 **- Vinorelbine** 30 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CISPLATINE - VINORELBINE INJ / PER OS	Cure n° 1 - Cisplatine 80 mg/m² J1 - Vinorelbine inj 30 mg/m² J1 - Vinorelbine per os 60 mg/m² J8 Cure n°2 et suivantes - Cisplatine 80 mg/m² J1 - Vinorelbine inj 30 mg/m² J1 - Vinorelbine per os 80 mg/m² J8 Tous les 21 jours	Métastatique	A - I	JASSEM J [18] DE LENA M [4]
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - VINORELBINE INJ / PER OS	Cure n° 1 - Bevacizumab 7,5 ou 15 mg/kg J1 - Cisplatine 80 mg/m² J1 - Vinorelbine inj 30 mg/m² J1 - Vinorelbine per os 60 mg/m² J8 Cure n°2 et suivantes - Bevacizumab 7,5 ou 15 mg/kg J1 - Cisplatine 80 mg/m² J1 - Vinorelbine inj 30 mg/m² J1 - Vinorelbine per os 80 mg/m² J8 Tous les 21 jours	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	AMM Bevacizumab Pas de littérature
CISPLATINE - VINORELBINE INJ + RT	- Cisplatine 80 mg/m² J1 - Vinorelbine 15 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	Localement avancé non résécable ou non opérable	A - I	VOKES EE [52]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CISPLATINE - ETOPOSIDE + RT	- Cisplatine 50 mg/m² J1, J8 - Etoposide 50 mg/m² J1 à J5 Tous les 28 jours	Localement avancé non résécable ou non opérable	A - Médicaments non inscrits sur la liste hors GHS	GANDARA DR [9]
CARBOPLATINE - PACLITAXEL + RT	- Carboplatine AUC 2 (Calvert) J1 - Paclitaxel 50 mg/m² J1 Tous les 7 jours	Localement avancé non résécable ou non opérable, en cas de contre-indication au cisplatine	A - II	VOKES EE [53]
BEVACIZUMAB EN MONOTHERAPIE	Bevacizumab 7,5 ou 15 mg/kg Tous les 21 jours Poursuite du traitement jusqu'à progression de la maladie, après 6 cures du schéma bevacizumab - sels de platine	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	A - I	MANEGOLD D [26] AMM Bevacizumab
				SANDLER A [34] AMM Bevacizumab
GEMCITABINE - VINORELBINE INJ	- Gemcitabine 1000 mg/m² J1, J8 - Vinorelbine 25 mg/m² J1, J8 Tous les 21 jours	Localement avancé ou métastatique	A - I	GRIDELLI C [12]
CISPLATINE - PACLITAXEL	- Cisplatine 80 mg/m² J1 - Paclitaxel 175 mg/m² J1 Tous les 21 jours	Avancé ou métastatique (stades IIIB et IV). Patient non candidat à une chirurgie potentiellement curative et/ou à une radiothérapie (1ère ligne)	A - I	GATZEMEIER U [10]
				GIACCONE G [11]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - PACLITAXEL	**- Bevacizumab** 7,5 ou 15 mg/kg J1 **- Cisplatine** 80 mg/m² J1 **- Paclitaxel** 175 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
CARBOPLATINE - PACLITAXEL	**- Carboplatine** AUC 6 (Calvert) J1 **- Paclitaxel** 200 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique (1ère ligne)	**A - II**	KELLY K [20]
				SCAGLIOTTI GV [38]
				SCHILLER JH [37]
BEVACIZUMAB - CARBOPLATINE - PACLITAXEL	**- Bevacizumab** 7,5 ou 15 mg/kg J1 **- Carboplatine** AUC 6 (Calvert) J1 **- Paclitaxel** 200 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ère ligne)	**A - I**	SANDLER A [34] AMM Bevacizumab
PACLITAXEL - GEMCITABINE	**- Paclitaxel** 175 mg/m² J1 **- Gemcitabine** 1250 mg/m² J1, J8 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique (1ère ligne, **en cas de contre-indication documentée au cisplatine**)	**A - II**	SMIT EF [41]
DOCETAXEL EN MONOTHERAPIE	**Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	**A - I**	FOSSELLA FV [7]
				SHEPHERD FA [39]
CISPLATINE - DOCETAXEL	**- Cisplatine** 75 mg/m² J1 **- Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Localement avancé ou métastatique, non résécable (1ère ligne)	**A - I**	FOSSELLA F [8]

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB - CISPLATINE - DOCETAXEL	**- Bevacizumab** 7,5 ou 15 mg/kg J1 **- Cisplatine** 75 mg/m² J1 **- Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ères ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
GEMCITABINE - DOCETAXEL	**- Gemcitabine** 1000 mg/m² J1, J8 **- Docétaxel** 85 mg/m² J8 **Tous les 21 jours**	**Localement avancé non résécable ou métastatique (1ères ligne, en cas de contre-indication documentée au cisplatine)**	**A - II**	PUJOL JL [32]
CARBOPLATINE - DOCETAXEL	**- Carboplatine** AUC 6 (Calvert) J1 **- Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Localement avancé non résécable ou métastatique (1ères ligne, en cas de contre-indication documentée au cisplatine)	**A - II**	FOSSELLA F [8]
BEVACIZUMAB - CARBOPLATINE-DOCETAXEL	**- Bevacizumab** 7,5 ou 15 mg/kg J1 **- Carboplatine** AUC 6 (Calvert) J1 **- Docétaxel** 75 mg/m² J1 **Tous les 21 jours**	Avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, si histologie non à prédominance épidermoïde (1ères ligne)	**A - I**	AMM Bevacizumab Pas de littérature
ERLOTINIB EN MONOTHERAPIE	**Erlotinib** 150 mg/j **En continu**	Localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	**A - Médicament non inscrit sur la liste hors GHS**	SHEPHERD FA [40]

B- PROTOCOLES DISCUTES EN RCP (DE 1er NIVEAU OU DE RECOURS)

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
CARBOPLATINE - PACLITAXEL	- Carboplatine AUC 6 (Calvert) J1 - Paclitaxel 200 mg/m² J1 Tous les 21 jours	Adjuvant, en cas de contre-indication documentée au cisplatine et chez des patients PS 0 ou 1 à haut risque de rechute : stades IB (tumeur > 4 cm), II et IIIA	B - Annexe INCa	STRAUSS GM [45]
				STRAUSS GM [46]
PACLITAXEL EN MONOTHERAPIE	Paclitaxel 80 mg/m² J1, J8, J15 Tous les 28 jours	Localement avancé ou métastatique (≥ 3ème ligne)	B - Annexe INCa	SOCINSKI MA [42]

C- PROTOCOLES NON AUTORISES

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
BEVACIZUMAB	-	Formes épidermoïdes ou à potentiel hémorragique important	C - III	-
	-	Formes non épidermoïdes et à potentiel hémorragique faible, en phase péri-opératoire (néoadjuvant, adjuvant)	C - Annexe INCa	-
	-	Formes non épidermoïdes et à potentiel hémorragique faible, en radiochimiothérapie concomitante	C - Annexe INCa	-
	-	Formes non épidermoïdes, stade localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	C - Annexe INCa	-
PEMETREXED	-	Adjuvant et métastatique (1ère ligne)	C - Annexe INCa	-
IRINOTECAN	-	-	C - Annexe INCa	-

Intitulé du protocole	Schéma thérapeutique	Stade	Groupe de référence	Références bibliographiques
OXALIPLATINE	-	-	C - Annexe INCa	-
CETUXIMAB	-	-	C - Annexe INCa	-
GEMCITABINE	-	Adjuvant	C - Annexe INCa	-
GEMCITABINE + RT	-	Localement avancé non résécable ou non opérable	C - III	-
POLYCHIMIOTHERAPIE TRIPLET, QUELS QUE SOIENT LES MEDICAMENTS ASSOCIES	-	-	C - Protocole absent du référentiel de l'INCa	-
TOPOTECAN	-	-	C - Annexe INCa	-
VINORELBINE INJ EN MONOTHERAPIE	-	Adjuvant	C - Annexe INCa	
VINORELBINE PER OS EN MONOTHERAPIE	-	Adjuvant	C - Annexe INCa	
PACLITAXEL EN MONOTHERAPIE	-	Adjuvant Localement avancé ou métastatique (1ère et 2ème ligne)	C - Annexe INCa	-
PACLITAXEL EN ASSOCIATION	-	Localement avancé ou métastatique (≥ 2ème ligne)	C - Annexe INCa	-
DOCETAXEL	-	Adjuvant	C - Annexe INCa	-
DOCETAXEL + RT	-	Localement avancé non résécable	C - Annexe INCa	-
RALTITREXED	-	-	C - Annexe INCa	-

Nom d'essai :	**GORTEC-GETTEC CARISSA**	**IFCT-0301**
Titre	Essai clinique de phase 2 randomisé testant l'association du ZD1839 (Iressa®) à la radiothérapie post-opératoire et au cisplatine dans les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures	Essai de phase 2 randomisé comparant 3 chimiothérapies, par gefitinib ou par gemcitabine ou par docétaxel, chez des patients fragilisés ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules de stade IV ou IIIB non accessible à un traitement par radiothérapie
Type d'essai :	thérapeutique	thérapeutique
Phase :	2	2
Etat de l'essai :	ouvert aux inclusions	clos aux inclusions
Avancement :	Ouverture effective le : 30/09/2005	Ouverture effective le : 24/12/2004
	Nombre d'inclusions prévues : 140	Nombre d'inclusions prévues : 126
	Nombre effectif : 30 au 28/02/2008	Nombre effectif : 128 au 18/06/2007
	Clôture prévue le : 30/09/2008	Clôture effective le : 18/06/2007
Organisme promoteur :	Groupe Oncologie Radiothérapie Tête Et Cou (GORTEC)	Groupe Nord d'Oncologie Multidisciplinaire (GNOM)
Collaboration(s) scientifique(s) :	Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête Et du Cou (GETTEC)	Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT)
	Essai prioritaire INCa	
Financement(s) :	Astra Zeneca	Sanofi Aventis et Astra Zeneca
Sexe : hommes et femmes	*Age :* tout âge	*Age :* entre 18 et 80 ans
Essai avec tirage au sort (randomisé) :	Oui	Oui
Essai avec placebo :	Non	Non
Etendue investigation:	multicentrique - France	multicentrique - France
Registre INCa		
Date de publication :	22/05/2008	29/06/2007
N° d'enregistrement :	RECF0077	RECF0131

adapté d'après http://ww.e-cancer.fr/Les-Essais-Cliniques/ , 2008. Rubrique "registre des essais cliniques", mot clé : gefitinib

Faculté de Pharmacie de Grenoble

Serment des Apothicaires

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 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 d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Thèse soutenue par : BUSSER Benoît

Titre :

Rôle de l'amphiréguline dans la résistance du cancer du poumon non-à petites cellules au gefitinib

Résumé :

Le cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC) représente 80% des cancers du poumon et possède un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 12%. Le gefitinib, une molécule appartenant à la famille des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) a montré de puissants effets anti-prolifératifs dans les CBNPC, mais la grande variabilité des réponses a incité une recherche de marqueurs capables de prédire une résistance ou une sensibilité à ce traitement. Les patients porteurs de CBNPC résistants au gefitinib ont des taux d'amphiréguline (AREG) sérique élevés, c'est pourquoi nous avons d'abord cherché à démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib des cellules de CBNPC avant d'en décrire le mécanisme moléculaire.

Notre travail montre que l'AREG permet de résister à l'apoptose induite par le gefitinib en inactivant la protéine proapoptotique BAX. Non seulement l'AREG induit une diminution du niveau d'expression de BAX, mais elle augmente aussi son interaction avec la protéine Ku70, par un mécanisme dépendant de l'acétylation. Ainsi nous décrivons un mécanisme original de résistance au gefitinib, dépendant de l'acétylation de Ku70 et contrôlé par un facteur de croissance, l'AREG.

Dans un contexte où le cancer pulmonaire est un problème majeur de santé publique et où la résistance aux traitements reste une des principales préoccupations des professionnels de santé, nos travaux suggèrent des applications potentielles pour la prise en charge clinique des patients porteurs de CBNPC. Ces applications concernent à la fois les domaines diagnostique et thérapeutique. En effet, nous démontrons le rôle central de l'AREG dans la résistance au gefitinib et proposons son utilisation comme biomarqueur prédictif de la résistance à ce traitement. De plus, nous proposons d'associer les EGFR-TKI à une thérapie anti-AREG ou aux inhibiteurs d'histone-déacétylases, notamment chez les patients porteurs de CBNPC résistants au gefitinib.

Mots clés : Amphiréguline, Gefitinib, Cancer bronchique, Résistance, Tyrosine-kinase

Jury : Monsieur le Professeur A. Favier - Président du jury

Madame le Professeur P. Cohen

Monsieur le Professeur M. Sève

Madame le Docteur M.J. Richard

Madame le Docteur A. Hurbin – Directeur de Thèse