

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION SUR LA CARCINOGENESE BRONCHIQUE</b>	p. 10
I. Epidémiologie des cancers pulmonaires	p. 10
II. Histologie des cancers pulmonaires et classification pTNM	p. 12
1. carcinomes épidermoïdes	p. 13
2. carcinomes à petites cellules	p. 13
3. adénocarcinomes	p. 14
4. carcinomes à grandes cellules	p. 15
5. carcinomes adénosquameux	p. 16
6. carcinomes sarcomatoïdes	p. 16
7. tumeurs carcinoïdes	p. 17
8. autres tumeurs épithéliales malignes	p. 17
III. Histologie des lésions préneoplasiques bronchiques	p. 22
IV. Approche clinique: diagnostic précoce des lésions préneoplasiques bronchiques	p. 26
V. La carcinogenèse bronchique: processus multi étapes et notion de champ de cancérisation	p. 29
VI. Anomalies cytogénétiques au cours du champ de cancérisation	p. 31
 <b>ONCOGENES ET GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR</b>	 p. 32
I. Oncogènes	p. 32
1. famille du gène ras	p. 32
2. gènes de la famille myc	p. 34
3. famille des récepteurs de type tyrosine kinase c-erbB	p. 36
4. bcl2 et apoptose	p. 42
5. autres oncogènes et facteurs de croissance	p. 44
II. Gènes suppresseurs de tumeur	p. 46
1. gène p53	p. 46
a. régulation d'amont de p53	p. 47
b. voie de signalisation de p53	p. 48
c. homologues de p53	p. 49

d.	p53 dans les carcinomes pulmonaires et les lésions prénéoplasiques	p. 50
2.	gène du rétinoblastome Rb	p. 52
a.	structure de Rb	p. 53
b.	inhibition de E2F1 par Rb et complexe Rb/E2F1 dans le contrôle du cycle cellulaire	p. 53
c.	régulation de la fonction de Rb par phosphorylation	p. 54
d.	rôle de Rb dans l'apoptose	p. 55
e.	inactivation de Rb ou de ses voies de signalisation dans les carcinomes pulmonaires et les lésions prénéoplasiques bronchiques	p. 57
3.	les sémaphorines	p. 59
a.	structure et nomenclature des sémaphorines	p. 59
b.	fonctions des sémaphorines	p. 61
c.	sémaphorines et cancer	p. 61
III.	VEGF et ses récepteurs	p. 63
a.	récepteurs du VEGF	p. 63
b.	voies de signalisation du VEGF	p. 67
c.	voies de régulation du VEGF	p. 69
<b>LA TELOMERASE</b>		p. 71
I.	Sénescence cellulaire réplivative	p. 71
II.	Structures et rôles des télomères	p. 75
III.	Rôle de la télomérase	p. 78
IV.	Le complexe enzymatique de la télomérase	p. 79
1.	sous unité catalytique hTERT	p. 79
2.	sous unité ARN hTERC	p. 80
3.	autres protéines du complexe	p. 81
V.	Régulation de la télomérase	p. 81
1.	localisation génique et amplification	p. 82
2.	régulation transcriptionnelle	p. 82
VI.	Régulation de l'activité protéique de la télomérase	p. 86
1.	assemblage du complexe télomérase	p. 86
2.	localisation subcellulaire de hTERT	p. 88

3. phosphorylation de hTERT	p. 89
4. rôle de hTERT	p. 90
5. régulation de la télomérase par les télomères et les protéines télomériques	p. 91
VII. Télomérase et cancers des voies aériennes supérieures et inférieures	p. 94
1. implication pronostique de la télomérase dans les carcinomes non à petites cellules	p. 97
2. télomérase dans les lésions préneoplasiques pulmonaires	p. 98
VIII. Télomérase et autres cancers	p. 98
IX. Thérapeutiques anti télomérase	p. 100
1. inhibiteurs de la télomérase anti hTERT ou hTERC	p. 100
2. inhibition directe du maintien des télomères	p. 103
<b>OBJECTIFS DE CETTE THESE</b>	p. 104
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	p. 107
1. matériel	p. 107
2. méthodes	p. 108
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	p. 122
<b>I. <u>Article 1</u>: Valeur pronostique des marqueurs immunohistochimiques dans les lésions préneoplasiques bronchiques.</b>	
<i>Jeanmart M, Lantuéjoul S, Fievet F, Moro D, Sturm N, Brambilla C, Brambilla E. Clin Cancer Res. 2003</i>	p. 122
<b>II. <u>Article 2</u> : Expression de VEGF, de la Sémaphorine SEMA3F et de leurs récepteurs communs les neuropilines dans les lésions préneoplasiques bronchiques, les tumeurs pulmonaires et les lignées cellulaires.</b>	
<i>Lantuéjoul S, Constantin B, Roche J, Drabkin H, Brambilla C, Brambilla E. J Pathol 2003.</i>	p. 126

**III. Article 3: Expression différentielle de la sous- unité catalytique de la télomérase hTERT dans les cancers pulmonaires.**

*Lantuéjoul S, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Lorimier P, Brichon PY, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Br J Cancer. 2004*

p. 129

**IV. Article 4: Expression de la sous- unité catalytique hTERT dans les lésions préneoplasiques bronchiques.**

*Lantuéjoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro- Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Clin Cancer Res 2005.*

p. 133

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

p. 136

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

p. 142

## SOMMAIRE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Illustration des principaux types histologiques de cancer pulmonaires	p. 18
<b>Tableau I :</b>	Classification pTNM des carcinomes pulmonaires	p. 21
<b>Tableau II :</b>	Critères histologiques diagnostiques des dysplasies bronchiques et carcinome in situ selon l'OMS	p. 24
<b>Figure 2 :</b>	Histologie des lésions prénéoplasiques bronchiques	p. 25
<b>Figure 3 :</b>	Famille des récepteurs ErbB et leurs ligands	p. 37
<b>Figure 4 :</b>	Voies de signalisation de EGF-R	p. 40
<b>Figure 5 :</b>	Signaux de transduction dépendant de l'activation de EGF-R	p. 40
<b>Figure 6 :</b>	Régulation d'amont et voies de signalisation de p53	p. 48
<b>Figure 7 :</b>	Schéma de la régulation du cycle cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose par Rb	p. 56
<b>Figure 8 :</b>	Récepteurs du VEGF	p. 63
<b>Figure 9 :</b>	Voies de signalisation du VEGF	p. 69
<b>Figure 10 :</b>	Evènements principaux intervenant dans la sénescence	p. 74
<b>Figure 11 :</b>	Sénescence tumorale et ses conséquences	p. 74
<b>Figure 12 :</b>	Boucles télomériques T et D et protéines associées aux télomères	p. 76
<b>Figure 13 :</b>	Formations des tétrades et des structures quadruplex G	p. 76
<b>Figure 14 :</b>	Rôles possibles des structures quadruplex G	p. 77
<b>Tableau III :</b>	Protéines associées à hTERT et hTERC	p. 87
<b>Tableau IV :</b>	Facteurs intervenant dans la régulation de hTERT	p. 93
<b>Tableau V :</b>	Activité télomérase dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules	p. 94
<b>Figure 15 :</b>	Chronologie d'expression de la télomérase dans les CPC et les carcinomes pulmonaires non à petites cellules	p. 96
<b>Figure 16 :</b>	Différents oligonucléotides ciblant hTERT ou hTERC	p. 102
<b>Figure 17 :</b>	Molécules inhibant le maintien des télomères	p. 103
<b>Figure 18 :</b>	Chronologie d'apparition des anomalies génétiques et moléculaires au cours de la carcinogenèse bronchique	p. 104
<b>Figure 19 :</b>	Séquence d'apparition des anomalies génétiques et moléculaires au cours du développement des carcinomes pulmonaires	p. 105

## ABBREVIATIONS

AAH: Atypical Alveolar Hyperplasia  
ADN: Acide DesoxyriboNucléique  
ALT: Alternative Lengthening of Telomeres  
APC : Adenomatous Polyposis Coli  
ARN: Acide RiboNucléique  
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated kinase  
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad-related kinase  
BER : Base Excision Repair sytem  
BPDE : benzo(a)pyrene diol epoxyde  
BTC : betacellulin  
Cdc 25 : cell division cycle protein 25  
Cdk: cyclin-dependent kinase  
CGH: Comparative Genomic Hybridization  
Chk: checkpoint kinase  
CIS: Carcinome In Situ  
COX-2: Cyclo oxygenase- 2  
CRM1: Chromosomal Region Maintenance 1  
CRMP-1: Collapsin Response Mediator Protein-1  
CYP1A1: cytochrome P450 1A1  
DIPNECH : Hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique  
DDB2: Damaged DNA-binding protein 2  
EGF: Epidermal Growth Factor  
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
ELISA: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay  
eNOS: endothelial constitutive Nitric Oxide Synthetase  
EPR: Epireguline  
ERK: Extracellular signal Regulated Kinase  
FAK: Focal Adhesion Kinase  
bFGF: basic Fibroblast Growth Factor  
flk-1: fetal liver kinase-1 ou VEGFR2  
flt: fms-like tyrosine kinase  
Flt-1 : VEGFR1  
Flt-4 : VEGFR3  
Fz: Frizzled Factor  
GADD45: DNA damage-inducible gene  
GDP: Guanosine DiPhosphate  
GRP/BN: Gastrin Releasing Peptide/ Bombesin  
GSTM1: Glutathione S-transferase M1

GTP: Guanosine TriPhosphate  
HB-REGF: Heparin Binding Receptor EGF  
HDAC: Histone déacétylase  
HDM2: Human Double Minute protein 2  
HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor  
HIF -1: Hypoxia Inducible Factor 1  
HIPK: Homeodomain-Interacting Protein Kinase  
HLHLZ : Helix Loop Helix Leucine Zipper ou fermeture éclair à leucine et hélice boucle hélice  
Hn RNP: heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein  
HP1: Heterochomatine Protein 1  
4-HPR: N-(4-hydroxyphenyl) retinamide  
HPV: Human Papilloma Virus  
HRE : Elément de Réponse à l'hypoxie  
HRR: Homologous Recombination Repair  
Hsp90: Heat shock protein 90  
HTEP 1: Human Telomerase Protein Component  
HTERC: Human Telomerase Reverse Transcriptase RNA component  
HTERT: Human telomerase reverse Transcriptase protein component  
IAP: protéines inhibitrices de l'apoptose  
IGF: Insulin Growth Factor  
IGFR: Insulin Growth Factor Receptor  
IL: Interleukine  
JNK: c-jun terminal protein kinase  
kDa: kiloDaltons  
KDR: Kinase insert Domain containing Receptor ou VEGF R2  
LEF: Lymphoid Enhancing Factor  
LIFE: Lung Imaging Fluorescence Endoscope  
MAM: meprin, A5 protein, u protein tyrosine phosphatase  
MAPK: Mitogen Activating Protein Kinase  
MAPKK: Mitogen Activating Protein Kinase Kinase  
MAPKKK: Mitogen Activating Protein Kinase Kinase Kinase  
NCAM: Neural Cell Adhesion Molecules  
MEK: Map kinase ERK activating Kinase  
MEN: Multiple Endocrine Neoplasia  
NER: Nucleotide Excision Repair  
MTOR: mammalian target of rapamycin  
MVD: MicroVascular Density  
MZF-2: Myeloid-specific Zinc Finger protein 2  
NE: neuroendocrine  
NIMA: Never In Mitosis A gene

NLS: Nuclear Localization Signals  
NNK: Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone  
NO: Nitroxyde  
Np-1: Neuropiline 1  
NRG: Neuréguline  
NTP: Nucleotide Tri Phosphate  
O<sup>6</sup>MGMT: O<sup>6</sup>-méthylguanine DNA méthyltransferase  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor  
PDK : Phosphoinositide Dependent Kinase  
PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1  
PI-3K : Phosphatidyl Inositol 3-kinase  
PIGF: Placental Growth Factor  
PIG : Prostanoïde IP  
PGE : Prostacycline E  
PK A : Protéines Kinases dépendantes de cAMP  
PK C ou B : Protein Kinase C ou B  
cPLA2 : cytosolic phospholipase A2  
PLC : PhosphoLipase C  
PML : ProMyelocytic Leukemia protein  
PP2A : Protein Phosphatase 2A  
PNA : Peptide Nucleic Acid  
PTB: PhosphoTyrosine Binding  
PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten  
Rac-P : Rac Protein Kinase  
Rb: Rétinoblastome  
RTK: Receptor Tyrosine Kinase  
RT-PCR: Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction  
SAHF: Senescence Associated Heterochromatic Foci  
SCF: Stem Cell Factor  
SH2: Src Homology 2  
SHP: Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase  
sFlt-1 : Soluble Flt-1 (ou VEGFR1)  
SKP2: S-Phase Kinase associated Protein-2  
SnoRNA: small nucleolar RNA  
SnoRNP: small nucleolar RiboNucleoProtein  
Sos: Son of sevenless  
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription  
SV40: Simian Virus 40  
TCF: T Cell Factor



TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAP: Telomeric Repeat Assay Protocol

TRF: Telomeric Restriction Fragment

TRF 1 ou 2: Telomeric Repeat binding Factor protein 1 ou 2

TTF1:Thyroid Transcription Factor 1

UV: Ultraviolets

UTR: UnTranslated Region

VE cadherine: Vascular Endothelial cadherine

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VHL : Von Hippel Lindau

Wnt : Wingless

## INTRODUCTION SUR LA CARCINOGENESE BRONCHIQUE

### I. Epidémiologie des cancers pulmonaires

Les cancers pulmonaires sont au premier rang de la fréquence des cancers et représentent la principale cause de mort par cancer chez l'homme et chez la femme dans le monde. Ils sont responsables de plus de 1 million de morts par an dans le monde et de 170 000 aux USA. Ceci dépasse la somme des décès dus aux trois autres cancers les plus fréquents après les cancers pulmonaires que sont le cancer du sein, du colon et de la prostate. Moins de 15% survivront à 5 ans (Greenlee et al 2000) et 70% des patients présentent un stade avancé et sont donc inopérables au moment du diagnostic. Tandis que les patients de stades IA ont une survie à 5 ans de 70%, la survie des stades II à IV chute de 40 à 5% à 5 ans (Mountain 1997).

La consommation de tabac représente 90% des facteurs de risque des cancers pulmonaires chez les hommes et 80% chez les femmes, les autres étant attribués à l'asbestose, au radon ou à d'autres facteurs environnementaux et professionnels, ainsi qu'à des facteurs de prédisposition génétique. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 47% des hommes et 12% des femmes âgés de plus de 15 ans dans le monde sont des fumeurs. Si le nombre de fumeurs tend à diminuer dans les pays industrialisés, on note une augmentation de plus de 50% dans les pays en voie de développement. La mortalité par cancer du poumon augmente avec le niveau de consommation tabagique. Le taux de mortalité est 15 fois plus élevé chez les fumeurs et 4 fois plus élevé chez les ex fumeurs par rapport aux non-fumeurs. De même le taux relatif de mortalité est de 7.5 chez les fumeurs fumant de 1 à 14 cigarettes par jour contre 25.4 chez les tabagiques consommant plus de 25 cigarettes jour (Doll et al 1994). Enfin le tabagisme passif augmente le risque de cancer pulmonaire (Hirayama et al 1981) et les ex fumeurs ont une réduction progressive de risque de développer un cancer avoisinant 90% survenant à partir de 5 ans de sevrage (Rom et al 2000). Les femmes semblent plus sensibles que les hommes pour un même niveau de tabagisme et leur risque de développer un cancer est 1.7 à 2.7 fois supérieur à celui des hommes (Ryberg et al 1994, Henschke et Miettinen 2004).

Par ailleurs, la fréquence des différents types histologiques de cancer pulmonaire a sensiblement évolué avec une nette augmentation tout récemment de la fréquence des adénocarcinomes qui représentent maintenant 45% des cancers pulmonaires, alors que la fréquence des carcinomes malpighiens et des autres carcinomes à grandes cellules est en diminution. Ces modifications sont possiblement en relation avec une consommation de cigarettes dites plus légères mais dont la fumée est inhalée plus profondément, permettant aux agents carcinogènes d'accéder à l'unité bronchioloalvéolaire d'où naissent la plupart des adénocarcinomes (Thun et al 1997). Enfin les tabacs mélangés vendus actuellement comportent plus de tiges que de feuilles, plus riches en N nitrosamines.

La fumée de tabac renferme plus de 4800 composants identifiés re-suspendus dans un aérosol de  $10^{10}$  particules par millilitre. Parmi la soixantaine de carcinogènes identifiés, on retrouve des aromatiques polycycliques, des aza-arenes, des N-nitrosamines, des amines aromatiques hétérocycliques, des aldéhydes, des hydrocarbures volatiles et des métaux. Bien que la dose par cigarette de chacun de ces composés soit faible, leur accumulation au cours d'une vie de fumeur peut être considérable : ainsi par cigarette, la fumée contient entre 20 à 40 ng de benzo(a)pyrene et entre 0.08 à 0.77  $\mu\text{g}$  de nitrosamines « tobacco-specific nitrosamines » ou 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), la quantité totale de NNK provoquant le développement de cancer pulmonaire chez le rat étant comparable à celle qu'inhalent un fumeur au cours de sa vie.

La plupart des carcinogènes organiques dérivés du tabac sont insolubles dans l'eau et doivent être oxydés et conjugués pour être excrétés en atmosphère aqueuse. Les membres de la famille du cytochrome p450 CYP1A1 catalysent ces carcinogènes en ajoutant un oxygène, ce qui a pour effet d'activer les amines aromatiques. Les membres de la glutathione S transférase GST les inactivent en les convertissant en formes solubles excrétables. Cependant au cours de ce processus, des formes intermédiaires électrolytiques se constituent qui réagissent fortement avec l'ADN et entraînent la formation d'adduits de l'ADN. Il existe un certain degré de polymorphisme des gènes codant pour les enzymes CYP1A1 et GSTM1. Chez les patients présentant le phénotype CYP1A1 Msp1 associé à la présence d'un enzyme CYP1A1 de haute activité, et le phénotype nul GSTM1, on note à la fois une activation des carcinogènes et une diminution de leur inactivation ce qui exposerait ces patients à un risque accru de cancer pulmonaire (Spivack et al 1997). Cependant la corrélation entre un phénotype nul GSTM1 et

une augmentation du risque de cancer n'a pas été confirmé dans une étude récente portant sur 9500 patients (Benhamou et al 2002). Par ailleurs la capacité de réparation de l'ADN après exposition au benzo(a)pyrene diol époxyde (BPDE) est significativement altérée chez les patients atteints de cancer pulmonaire (Wei et al 1996). En effet, les cellules sont équipées de différents systèmes pour éliminer les adduits d'ADN, dont le NER (ou Nucleotide Excision Repair), le BER (ou Base Excision Repair system) qui excise les bases altérées, et la O<sup>6</sup>MGMT (O<sup>6</sup>-méthylguanine DNA méthyltransferase) qui répare les bases méthylées O<sup>6</sup>-méthylguanines. La plupart de ces enzymes présentent un polymorphisme chez l'humain et l'équilibre entre l'activation métabolique, la détoxification et les processus de réparation de l'ADN influence le risque de cancer chez les sujets fumeurs.

## **II Histologie des cancers pulmonaires et classification pTNM**

L'intérêt d'une telle classification repose sur la nécessité de délivrer un diagnostic qui permette l'inclusion des patients dans des protocoles thérapeutiques et serve de base aux études épidémiologiques et biologiques. Il doit reposer sur des critères histologiques simples, reproductibles et donc utilisables par tous les pathologistes.

La récente classification de l'OMS de 1999 (Travis et al) et sa mise à jour en 2004 (Travis et al 2004) ont intégré de nouvelles entités depuis celle de 1981 et redéfinit les critères diagnostiques des lésions préneoplasiques bronchiques que nous traiterons dans un chapitre à part, des hyperplasies alvéolaires atypiques (AAH) précurseurs des adénocarcinomes, et de l'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique (DIPNECH) précurseur des tumeurs carcinoïdes. Pour des raisons pratiques, nous traiterons les AAH et la DIPNECH à la fin de chaque chapitre concernant les tumeurs correspondantes.

Cette nouvelle classification a de plus permis de préciser le concept de tumeurs neuroendocrines pulmonaires, et d'intégrer les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules et les carcinomes basaloïdes au sein de la classe des carcinomes à grandes cellules. Enfin elle redéfinit les quatre grandes classes d'adénocarcinomes, avec une mention toute particulière pour les carcinomes bronchiolo alvéolaires qui, en raison de leur caractère non invasif, conservent un très bon pronostic et méritent donc d'être parfaitement identifiés.

D'une manière très générale, les cancers pulmonaires sont classés en fonction de leur contingent le mieux différencié mais gradés selon leur contingent le plus agressif. Néanmoins les cancers pulmonaires font souvent preuve d'une grande hétérogénéité d'un champ à l'autre et on estime que 50% des carcinomes comportent plus d'un contingent. Par ailleurs un contingent pour être pris en compte doit représenter au minimum 10% de la tumeur (contingent squameux ou glandulaire d'un carcinome adénosquameux par exemple ou contingent à cellules fusiformes et/ou géantes d'un carcinome pléiomorphe). Pour toutes ces raisons, même si le diagnostic de carcinome pulmonaire peut être porté sur des prélèvements biopsiques (obtenus par bronchoscopie ou ponction biopsie), son type histologique précis ne sera définitivement établi que sur la pièce de résection chirurgicale.

Nous n'aborderons dans ce chapitre que la classification des tumeurs malignes pulmonaires primitives puis, dans un chapitre à part, les critères diagnostiques histologiques des lésions préneoplasiques bronchiques.

### **1. Carcinomes épidermoïdes**

Par définition, il s'agit de tumeurs malignes dont les cellules élaborent de la kératine et/ou sont séparées par des ponts d'union intercellulaires (Figure 1A). Les formes variantes sont représentées par le carcinome épidermoïde papillaire (carcinome bien différencié revêtant de larges axes conjonctifs papillaires), à cellules claires, à petites cellules (les cellules de petite taille comportant un noyau à chromatine granulaire au sein d'un cytoplasme relativement ample, et de ponts d'union intercellulaires), et basaloïde (cellules de petite taille formant des lobules délimités par une assise palissadique et ébauchant des plages de différenciation épidermoïde) (Figure 1B).

### **2. Carcinomes à petites cellules**

Tumeurs malignes faites de cellules de petite taille (diamètre inférieur à celui de trois lymphocytes) à très haut rapport nucléocytoplasmique, et dont la chromatine est dense finement granulaire dissimulant le nucléole. Les cellules sont rondes ou fusiformes et les noyaux ont tendance à se déformer réciproquement. L'activité mitotique est très élevée (60 à 70 par mm<sup>2</sup> soit 10 champs à fort grandissement) et la nécrose souvent extensive (Figure 1C).

La forme variante est le carcinome à petites cellules composite comportant un contingent glandulaire, squameux ou à grandes cellules, neuroendocrine ou non, moins fréquemment à cellules fusiformes ou géantes.

La microscopie électronique n'est pas indispensable au diagnostic qui doit se faire en histologie standard; néanmoins celle ci montrerait des granules neuroendocrines de 100 nm de diamètre dans 85% des cas et l'immunohistochimie, également facultative, une expression de la chromogranine A, de la synaptophysine et des molécules NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) (Figure 1D) ainsi que du facteur de transcription TTF1 dans environ 80% des cas.

### **3. Adénocarcinomes**

Tumeurs malignes présentant une différenciation glandulaire architecturale ou à l'échelle cellulaire (sécrétion de mucines), d'architecture mixte (forme majoritaire observée dans 80%) (Figure 1E), acinaire (Figure 1F), papillaire (Figure 1G), solide à sécrétion intracellulaire de mucus (Figure 1H) ou bronchioloalvéolaire (Figure 1I). Si certains adénocarcinomes peuvent ressembler aux adénocarcinomes mammaires, des glandes salivaires ou même gastro-intestinaux, la plupart des adénocarcinomes pulmonaires sont constitués de cellules de type Clara ou pneumocytes de type II. L'évaluation immunohistochimique des marqueurs caractéristiques de l'épithélium pulmonaire, comme les protéines du surfactant, le facteur de transcription TTF1, exclusivement exprime par les adénocarcinomes pulmonaires primitifs, et la cytokératine 7 ou la cytokératine 20, l'antigène spécifique prostatique et de la phosphatase acide prostatique peuvent aider dans la distinction entre adénocarcinomes pulmonaires primitifs et métastatiques.

Les adénocarcinomes pulmonaires arborent très fréquemment plusieurs architectures, combinant des contingents acinaires, papillaires, solides et bronchioloalvéolaires, faisant donc du variant mixte le plus fréquent (85%). A la différence du carcinome bronchioloalvéolaire d'histologie alvéolaire distale, les adénocarcinomes papillaires, acinaires, solides ou mixtes peuvent naître depuis la bronche jusqu'à l'alvéole et se présenter donc soit sous la forme d'une lésion endobronchique soit sous la forme d'une masse périphérique parenchymateuse. La forme bronchioloalvéolaire correspond à un adénocarcinome présentant une forme pure à croissance lépidique le long des parois alvéolaires sans envahissement de l'interstitium alvéolaire, ni envahissement vasculaire ou pleural. Les carcinomes bronchioloalvéolaires mucineux ont tendance à former des nodules satellites par voie aérogène pour réaliser des aspects pseudo-pneumoniques multacentriques.

**Formes variantes** : adénocarcinome bien différencié de type fœtal, adénocarcinome colloïde muqueux, cystadénocarcinome mucineux, adénocarcinome à cellules en bague à chaton, adénocarcinome à cellules claires.

**Les hyperplasies alvéolaires atypiques** représentent les lésions précurseurs des adénocarcinomes, les étapes de progression des AAH vers un adénocarcinome ayant été plusieurs fois proposées sans que cette progression n'ait été observée ou confirmée longitudinalement (Shimosato et al 1982, Kodama et al 1986, Miller 1990, Kerr 2001, Kerr et al 1994, Aoyagi et al 2001). Elles sont observées chez 20% des patients opérés pour cancer pulmonaire et seulement chez 5% des patients sans cancer pulmonaire. Ces lésions ne sont généralement pas visibles à l'œil nu, et correspondent à un groupe millimétrique d'alvéoles bordées de cellules de type Clara ou pneumocytes de type II qui forment un alignement discontinu le long des parois alvéolaires. Il n'y a par définition ni fibrose ni inflammation, bien qu'en pratique, les parois alvéolaires puissent être épaissies par un dépôt de collagène et quelques lymphocytes (Figure 1J). Si la plupart (75%) mesure entre 1 et 3 mm, certaines AAH peuvent atteindre 19 mm. La distinction avec un carcinome bronchioloalvéolaire peut parfois être ténue et même si Miller a suggéré que toute lésion de plus de 5 mm soit un carcinome, la plupart des experts reconnaissent que certaines petites lésions sont très atypiques (par la présence de cellules cylindriques formant une rangée presque continue le long de la paroi alvéolaire, ébauchant des structures papillaires et présentant des atypies cytologiques) et sont très probablement à considérer comme des carcinomes bronchioloalvéolaires quand à l'inverse des lésions de grande taille mais très régulières sont de simples AAH.

#### 4. Carcinomes à grandes cellules

Il s'agit de tumeurs malignes ne présentant pas les critères de différenciation des carcinomes épidermoïdes, glandulaires ou à petites cellules. Il s'agit donc d'un diagnostic d'exclusion dans sa forme commune contrairement à ses variants.

**Formes variantes : le carcinome neuroendocrine à grandes cellules** présente typiquement une architecture organoïde associant rosettes et palissades périvasculaires traduisant une différenciation neuroendocrine. L'activité mitotique est élevée (plus de 11 mitoses pour 10 champs à fort grossissement ou pour 2 mm<sup>2</sup>) et la nécrose est abondante (Figure 1K). Ce diagnostic doit être confirmé par l'immunohistochimie (Figure 1L) ou la microscopie électronique. *Les carcinomes neuroendocrines composites* comportent de plus un

contingent glandulaire, épidermoïde, à cellules géantes ou fusiformes, associé au contingent neuroendocrine.

**Le carcinome basaloïde** est constitué de cellules d'aspect basal, cubiques ou fusiformes au cytoplasme réduit, qui se disposent en lobules, travées et forment des palissades périlobulaires. Il n'y a pas de ponts intercellulaires ni de kératinisation. La nécrose comédonienne est fréquente et des rosettes sont observées dans un tiers des cas (Figure 1M). L'immunohistochimie est négative pour les marqueurs neuroendocrines mais met en évidence une expression des cytokératines 1, 5, 10, 14 (Figure 1N) (Sturm et al 2003). Lorsque cette forme s'associe à un contingent épidermoïde, elle correspond à la variante basaloïde du carcinome épidermoïde. Plus de la moitié des cas s'accompagnent de carcinomes in situ étendus et ces tumeurs sont volontiers proximales et forment des lésions endobronchiques. La survie de ces patients aux stades I-II est deux fois plus courte que celle des patients atteints de carcinomes épidermoïdes (606 jours versus 1218 jours) (Brambilla et al 1992).

**Autres variants** : carcinome lymphoépithélial, carcinome à cellules claires, carcinome à phénotype rhabdoïde.

## 5. Carcinomes adénosquameux

Tumeurs malignes associant un contingent glandulaire et un contingent épidermoïde, chacun devant représenter au moins 10% du volume tumoral.

## 6. Carcinomes sarcomatoïdes

Il s'agit de carcinomes non à petites cellules, soit pléiomorphes c'est à dire associant des contingents épidermoïdes, glandulaires ou à grandes cellules avec des contingents à cellules géantes et/ou à cellules fusiformes, soit de carcinomes à cellules fusiformes purs, de carcinomes à cellules géantes purs, ou encore de carcinosarcomes et de blastome pulmonaire (toujours biphasique).



## 7. Tumeurs carcinoïdes

Tumeur caractérisée par une architecture dite organoïde traduisant une différenciation neuroendocrine, associant des travées, un aspect insulaire, des palissades et des arrangements en rosettes.

**Les carcinoïdes typiques** présentent moins de deux mitoses pour 10 champs à fort grossissement et jamais de nécrose (Figure 1O). Par contre, ils peuvent présenter des atypies cytologiques, une cellularité accrue et une invasion lymphatique.

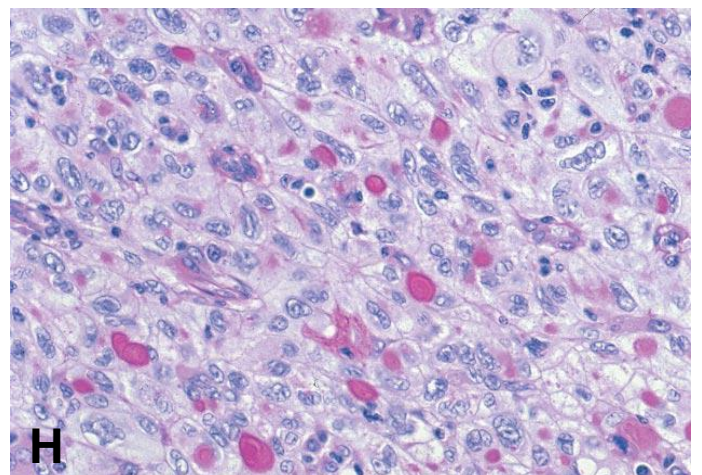
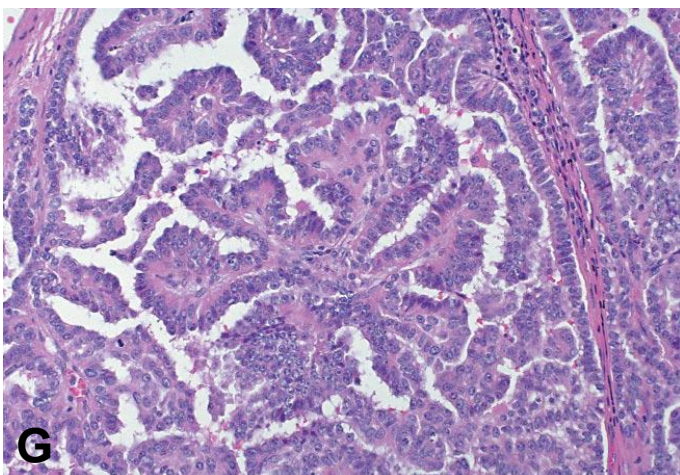
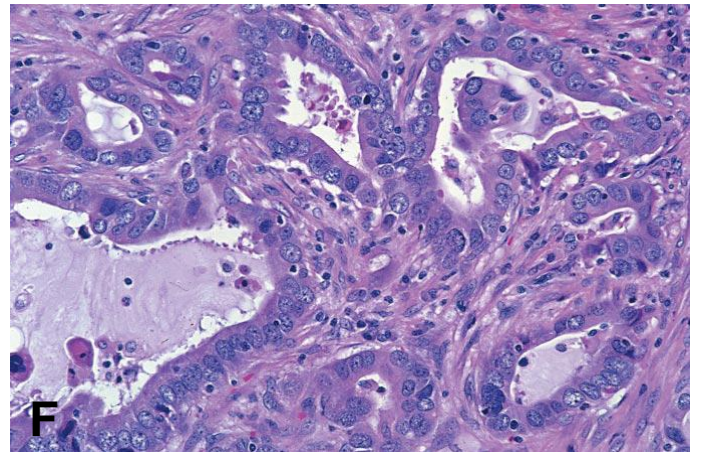
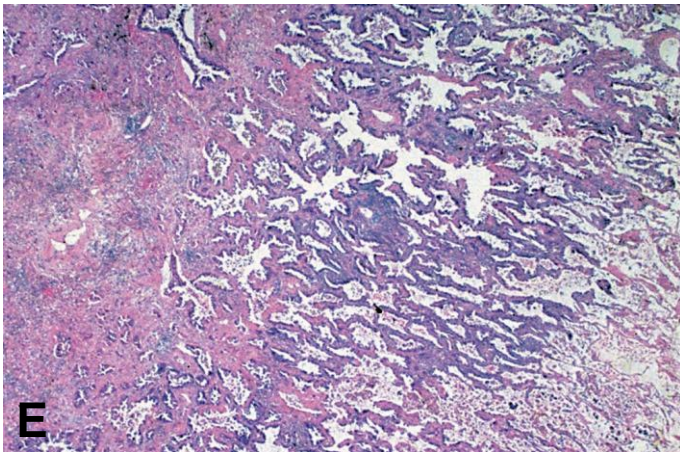
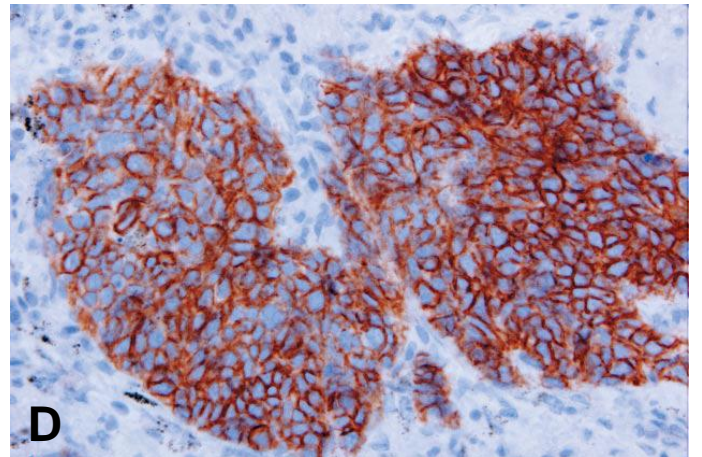
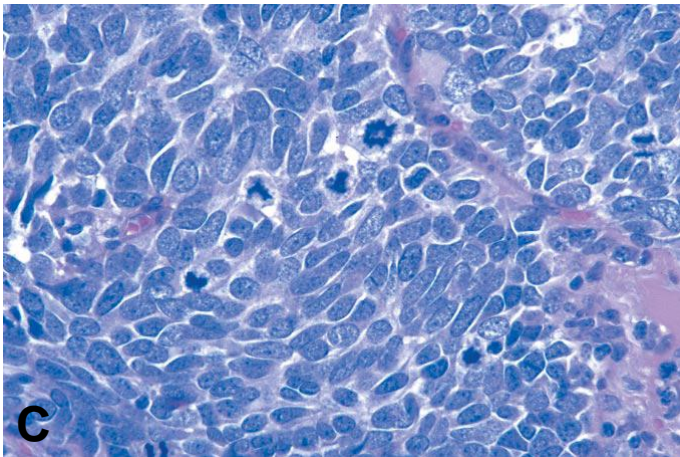
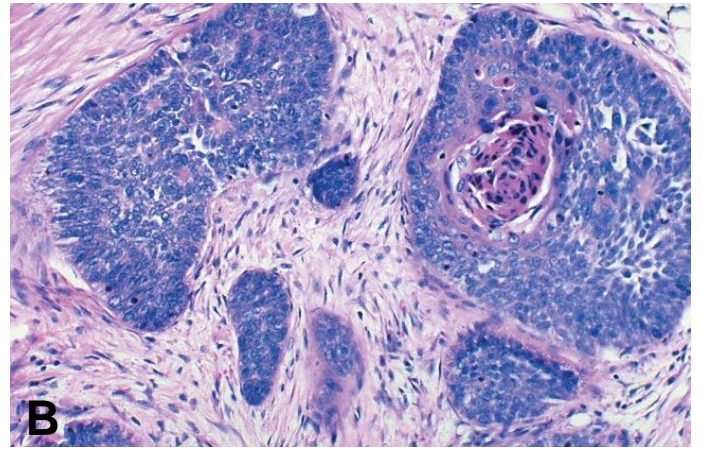
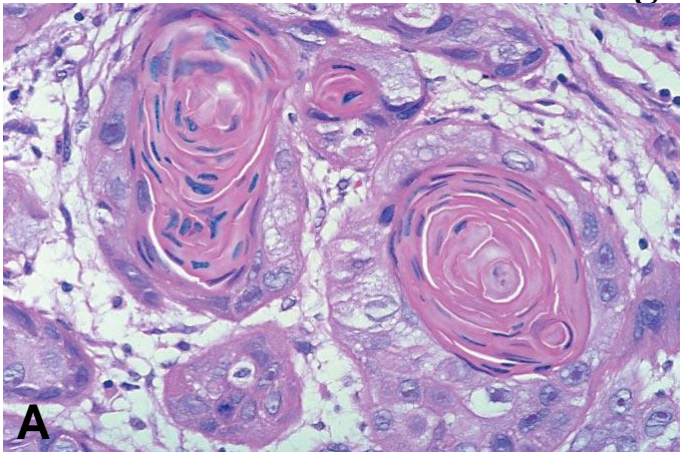
**Les carcinoïdes atypiques** présentent entre deux et 10 mitoses pour 10 champs et /ou des foyers de nécrose focale (Figure 1P).

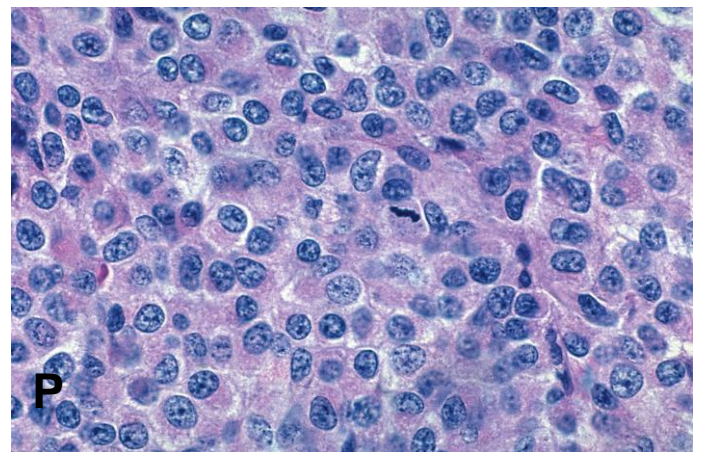
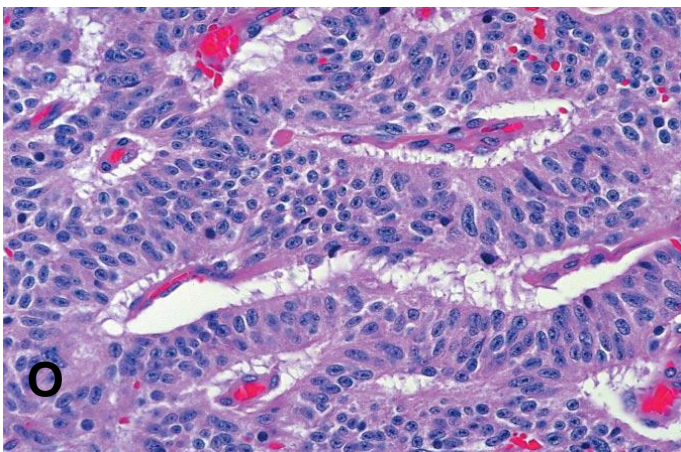
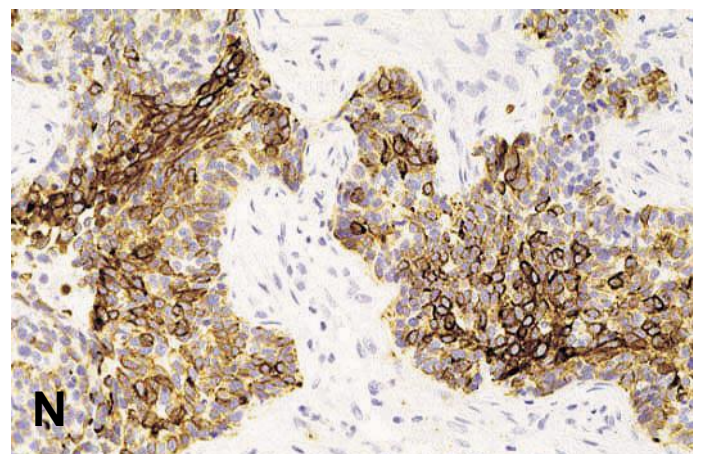
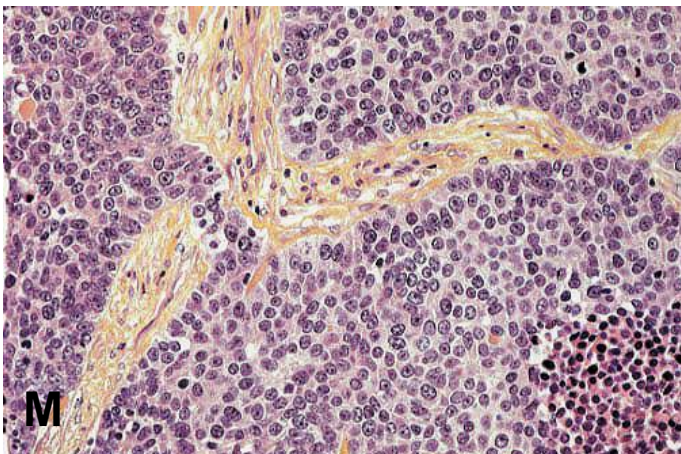
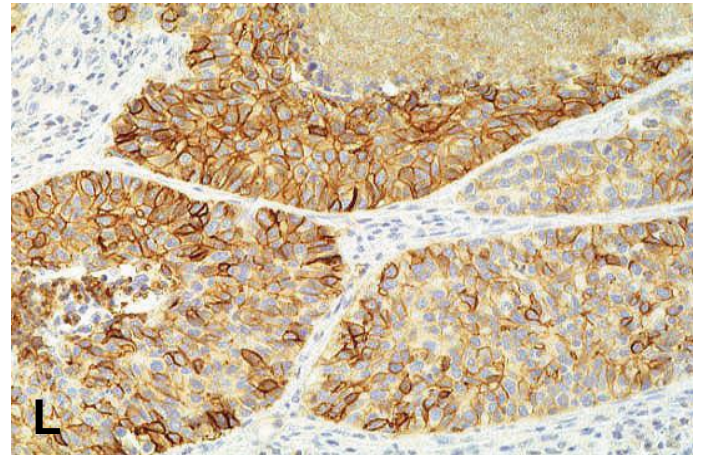
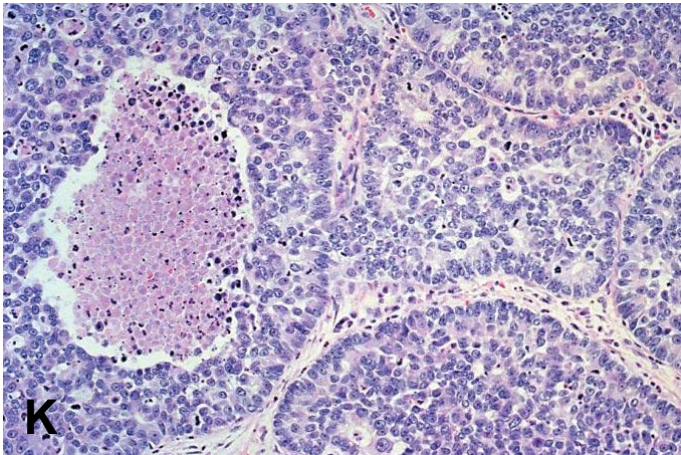
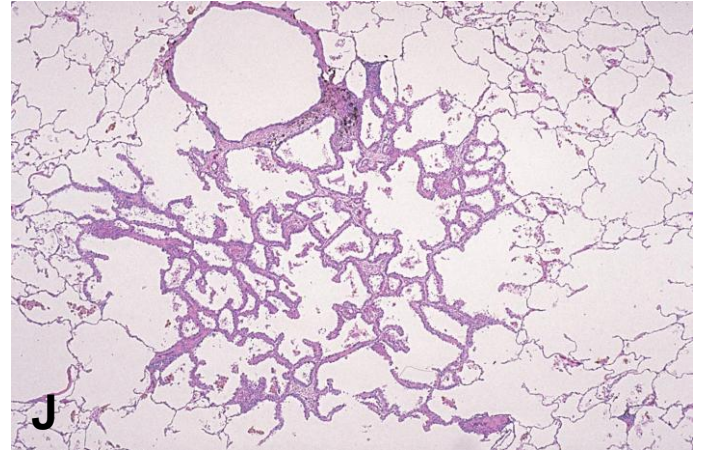
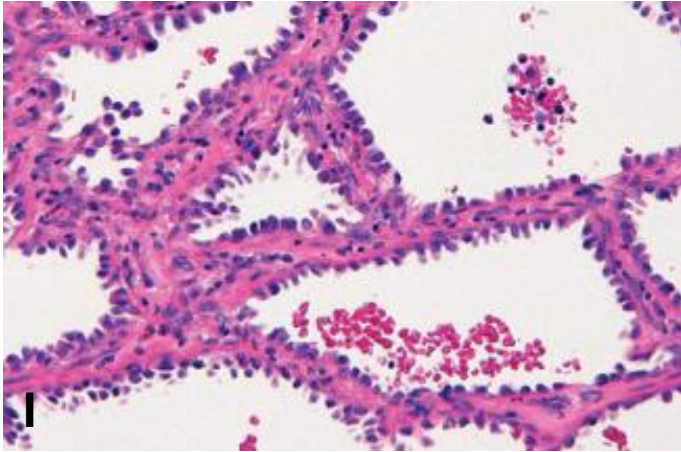
**L'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique (DIPNECH)** correspond à une hyperplasie des cellules neuroendocrines des voies aériennes sous la forme de cellules isolées disposées le long de la basale bronchique ou bronchiolaire, ou formant de petits nodules (neuroendocrine bodies), ou encore à disposition linéaire, mais n'envahissant pas la membrane basale épithéliale. Elle peut être observée en association avec une fibrose oblitérative bronchiolaire, mais également indépendamment de toute fibrose ou inflammation interstitielle ou des voies aériennes. Cette hyperplasie des cellules neuroendocrines est également retrouvée dans 75% des cas au sein de la muqueuse des bronches ou bronchioles à proximité de carcinoïdes, mais alors focale et non diffuse, et cette forme n'entre donc pas dans l'entité DIPNECH. Lorsque ces nodules hyperplasiques se développent en deçà ou au dessous de la lame basale épithéliale, la lésion devient une tumeurlet. Si elle excède 5 mm, elle doit être considérée comme une tumeur carcinoïde.

## 8. Autres tumeurs épithéliales malignes

Carcinomes des glandes salivaires, carcinome mucoépidermoïde, carcinome adénoïde kystique.

Figure 1





**Figure 1: Illustration des principaux types histologiques de cancers pulmonaires**

Figure 1A: Carcinome malpighien bien différencié (HES)

Figure 1B: Carcinome malpighien-variante basaloïde squameux (HES)

Figure 1C: Carcinome à petites cellules (HES)

Figure 1D: Carcinome à petites cellules: immunomarquage à l'aide de l'anticorps 123C3 anti CD56 ou molécules NCAM

Figure 1E: Adénocarcinome mixte (HES)

Figure 1F: Adénocarcinome acinaire (HES)

Figure 1G: Adénocarcinome papillaire (HES)

Figure 1H: Adénocarcinome solide à sécrétion intracellulaire de mucus (HES)

Figure 1I: Carcinome bronchiolo alvéolaire (HES)

Figure 1J: Hyperplasie Alvéolaire Atypique (HES)

Figure 1K: Carcinome neuroendocrine à grandes cellules (HES)

Figure 1L: Carcinome neuroendocrine à grandes cellules: immunomarquage à l'aide de l'anticorps 123C3 anti CD56 ou molécules NCAM

Figure 1M: Carcinome basaloïde (HES)

Figure 1N: immunomarquage à l'aide de l'anticorps 34 bêta E12 anti cytokératines 1, 5, 10, 14.

Figure 1O: Carcinoïde typique (HES)

Figure 1P: Carcinoïde atypique (HES)

**La classification histopathologique pTNM** définit le stade histologique d'extension d'une tumeur en tenant compte de l'analyse anatomopathologique de la pièce de résection tumorale. Elle traduit le degré d'invasion de cette lésion et sert de base à la prise en charge thérapeutique des patients et aux études épidémiologiques. Elle repose sur trois critères : la taille de la tumeur et son extension aux structures adjacentes ou T, la présence ou l'absence de métastases ganglionnaires ou N et la présence ou l'absence de métastases à distance ou M.

**Tableau I: classification Pathologique pTNM des carcinomes pulmonaires d'après l'UICC 2002**

### **pT. Tumeur primitive**

pT0 : pas de tumeur

pTis : carcinome in situ

pT1 : tumeur de 3 cm maximum sans invasion bronchoscopique d'une bronche souche

pT2 : tumeur de plus de 3 cm, ou envahissant une bronche souche à plus de 2cm de la carène, ou envahissant la plèvre viscérale ou associée à une atélectasie ou une pneumonie obstructive

pT3 : Tumeur envahissant la paroi thoracique, le diaphragme, la plèvre médiastinale ou située à moins de 2 cm de la carène ou associée à une atélectasie ou une pneumonie obstructive de tout un poumon

pT4 : Tumeur envahissant le médiastin, le coeur, les gros vaisseaux, la trachée, l'œsophage, le corps vertébral, la carène, associée à une pleurésie maligne ou deux nodules dans le même lobe

### **pN. Ganglions lymphatiques régionaux**

pN0 : pas de métastase ganglionnaire

pN1 : métastase dans les ganglions péribronchiques homolatéraux ou hilaires homolatéraux ou intrapulmonaires

pN2 : métastase dans les ganglions homolatéraux médiastinaux ou sous carénaires

pN3 : métastases dans les ganglions controlatéraux médiastinaux, hilaires ou supraclaviculaires

### **pM. Métastases à distance**

pM0 : pas de métastase

M1 : métastase à distance incluant deux nodules dans deux lobes différents

### **Stades TNM**

0 : Tis N0M0

IIIA : T1N2M0 T2N2M0 T3N1M0 T3N2M0

IA : T1N0M0

IIIB : N3M0

IB : T2N0M0

IV : M1

IIB : T2N1M0 T3N0M0

IIA : T2N1M0

### **III Histologie des lésions préneoplasiques bronchiques**

D'une manière générale, les lésions dysplasiques, de degré croissant légères, modérées et sévères et les carcinomes in situ de l'épithélium bronchique ressemblent à ceux de l'épithélium cervical ou des voies aéro- digestives supérieures.

Les critères objectifs entrant dans la définition de chaque lésion prennent en compte la taille et les aspects nucléaires des cellules épithéliales ainsi que la maturation, l'orientation et l'épaisseur de l'épithélium.

**La dysplasie légère** (Figure 2C) se caractérise par un bouleversement architectural et cytologique minime : l'épithélium est le siège d'une métaplasie malpighienne dont les assises basales sont hyperplasiques. Cependant l'augmentation de la cellularité s'associe à des atypies cytonucléaires et un pléiomorphisme minime se limitant au premier tiers de l'épithélium. Les noyaux parfois hyperchromatiques ont tendance à s'orienter verticalement. Les mitoses sont absentes. La dysplasie légère diffère de l'hyperplasie basale (ou « basal cell hyperplasia ») qui correspond à une simple augmentation d'épaisseur de l'assise basale qui dépasse 3 rangées cellulaires sans atypies. L'hyperplasie basale pourrait être la lésion précurseur de la métaplasie malpighienne immature. Cette dernière correspond à un épithélium en voie de différenciation malpighienne occupant la partie inférieure de l'épithélium. Celui ci est surmonté en surface par un épithélium glandulaire respiratoire. La métaplasie malpighienne est dite mature lorsque les cellules superficielles de l'épithélium s'aplatissent en surface et sont dépourvue de cils. Ni l'hyperplasie ni la métaplasie malpighienne ne présentent d'atypies cellulaires.

**La dysplasie modérée** (Figure 2D) présente des atypies cytologiques modérées en matière d'hyperchromatisme et de pléiomorphisme, mais les noyaux sont orientés verticalement et la chromatine reste finement granulaire; ces anomalies occupent les deux tiers de l'épithélium et l'épaisseur de cet épithélium est toujours augmentée. La maturation demeure visible jusqu'à la partie supérieure de l'épithélium. Les mitoses sont observées au premier tiers.

**La dysplasie sévère** (Figure 2E) présente un pléiomorphisme cellulaire marqué et la chromatine est grossière. La maturation des cellules a presque disparu mais l'orientation des

cellules basales est distincte. Les atypies nucléocytoplasmiques et les mitoses occupent les trois tiers de l'épithélium dont l'épaisseur est importante. En surface, les cellules conservent leur tendance à l'aplatissement.

**Le carcinome in situ** (Figure 2F) se caractérise parfois mais pas systématiquement par une augmentation de l'épaisseur de l'épithélium. Les atypies cytologiques et le pléiomorphisme sont majeurs, les mitoses s'observent à tous les niveaux et la maturation est inapparente si bien que l'épithélium n'est plus orientable. Certains carcinomes in situ présentent un aspect considérablement épaissi de l'épithélium qui devient parfois polypoïde, exophytique et papillaire.

*Les lésions dysplasiques angiogéniques* (ou « angiogenic squamous dysplasia ») décrites par Keith et al (2000) sont définies par un épithélium malpighien hyperplasique ou dysplasique et papillomateux surmontant un chorion richement vascularisé dont les capillaires s'immiscent au sein de l'épithélium (Keith et al 2000). 60% de ces lésions ne se détectent qu'en fibroscopie en lumière fluorescente (cf chapitre Approche clinique et diagnostic précoce des lésions prénéoplasiques) et elles ne s'observent que chez les fumeurs. Elles sont dues à une augmentation de la densité microvasculaire (MVD ou microvascular density) et sont fréquemment associées à une perte d'un allèle en 3p mais ne présentent que rarement de mutation de p53.

Bien que les critères histologiques permettant le diagnostic de lésions prénéoplasiques soient clairement définis (Tableau II), leur reproductibilité est parfois mise en doute car elle dépend largement de l'expérience des pathologistes. Par ailleurs la significativité clinique de cette classification reste à démontrer, et certains considèrent qu'une simple distinction entre lésions prénéoplasiques de bas grade et lésions de haut grade serait suffisante. Néanmoins la place de la dysplasie modérée comme appartenant aux lésions de bas grade ou aux lésions de haut grade est discutée et varie selon les auteurs.

**Tableau II: Critères histologiques pour le diagnostic des dysplasies bronchiques et carcinome in situ selon l'OMS (Travis et al 2004)**

Type de dysplasie	Epaisseur	Taille cellulaire	Maturation/orientation	Noyaux
<b>Dysplasie légère</b>	Légèrement augmentée	Légèrement augmentée, anisocytose et pléiomorphisme minimales	Maturation continue de l'assise basale à la surface de l'épithélium, zone basale épaissie par une accumulation de cellules dans le premier tiers de l'épithélium. Zone intermédiaire conservée, aplatissement en surface des cellules épithéliales	Légère variation du rapport N/C, chromatine finement granulaire, angulation minimale, nucléoles discrets ou absents, noyaux orientés verticalement au sein du premier tiers, mitoses absentes ou très rares
<b>Dysplasie modérée</b>	Modérément augmentée	Augmentation modérée de taille, cellules souvent petites, anisocytose et pléiomorphisme modérés	Maturation partielle de l'assise basale à la surface, expansion des assises basales par une accumulation de cellules gagnant les deux tiers inférieurs de l'épithélium, zone conservée confinée au tiers supérieur, aplatissement en surface des cellules épithéliales	Variation modérée du ratio N/C, chromatine finement granuleuse, angulations, incisures et lobulations nucléaires, nucléoles discrets ou absents, noyaux orientés verticalement au sein des deux tiers inférieurs, mitoses présentes au niveau du premier tiers
<b>Dysplasie sévère</b>	Très nettement augmentée	Très nettement augmentée, anisocytose et pléiomorphisme marqués	Faible maturation de l'assise basale à la surface, expansion des assises basales par une accumulation de cellules gagnant le dernier tiers de l'épithélium, zone conservée très réduite, aplatissement en surface des cellules épithéliales	Ratio N/C élevé ou variable, chromatine dense ou hétérogène, Angulations nucléaires et replis marqués, nucléoles souvent présents et proéminents, noyaux orientés verticalement au sein des deux tiers de l'épithélium, figures mitotiques présentes au sein des deux tiers de l'épithélium.
<b>Carcinome in situ</b>	Augmentée ou non	Peut être augmentée de façon nette, anisocytose potentiellement marquée, pléiomorphisme	Absence de maturation de l'assise basale à la surface, l'épithélium est non orientable et peut être inversé sans changement, expansion des assises basales par une accumulation de cellules gagnant tout l'épithélium, zone conservée absente, aplatissement en surface restreint aux cellules épithéliales les plus superficielles	Ratio N/C élevé ou variable, chromatine dense ou hétérogène, Angulations nucléaires et replis proéminents, nucléoles pouvant être présents ou discrets, absence d'orientation évidente des noyaux par rapport à la surface de l'épithélium, figures mitotiques présentes sur toute la hauteur de l'épithélium.



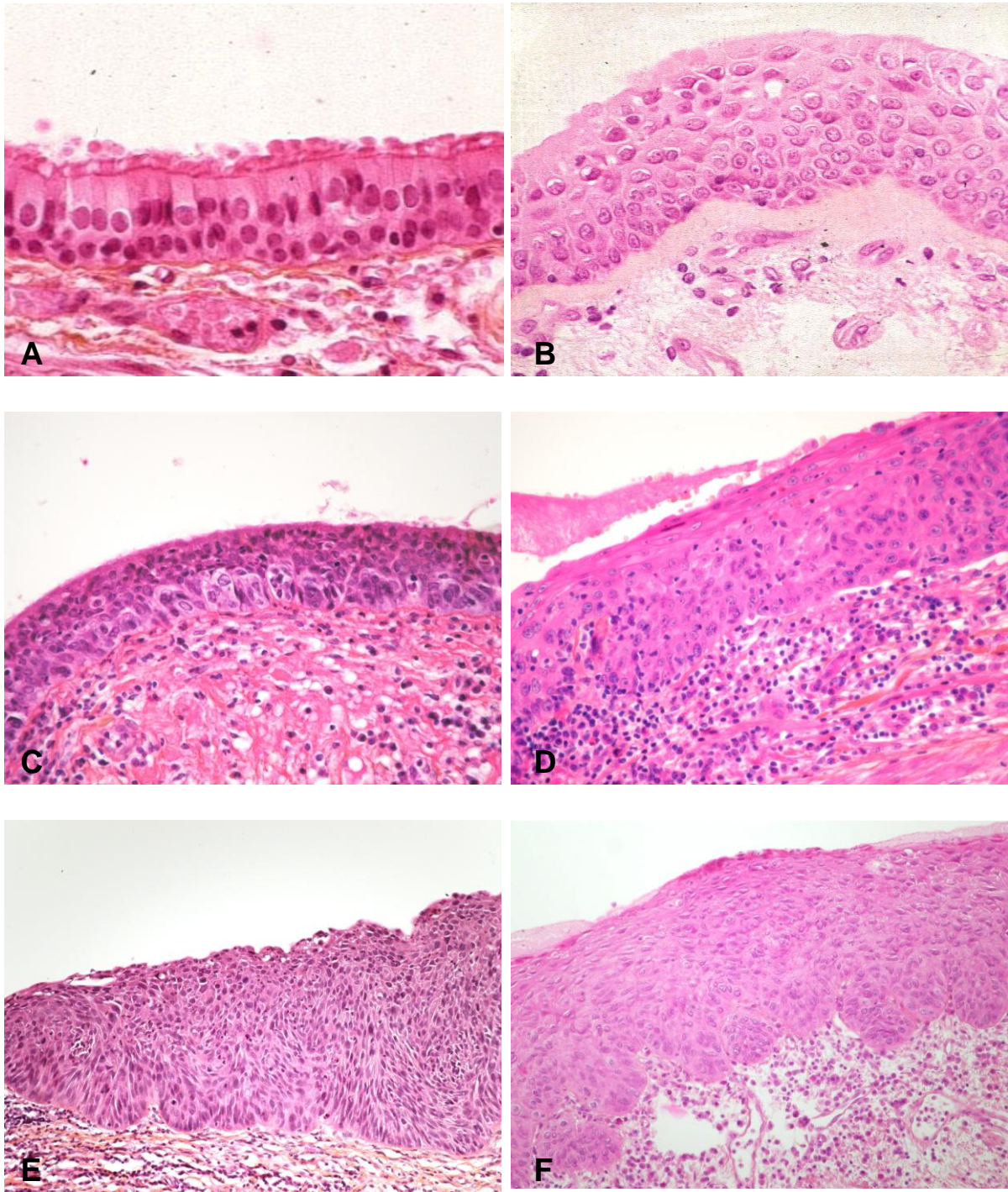


Figure 2A: épithélium bronchique normal  
Figure 2B: métaplasie malpighienne immature  
Figure 2C: dysplasie légère  
Figure 2D: dysplasie modérée  
Figure 2E: dysplasie sévère  
Figure 2F: carcinome in situ

#### **IV. Approche clinique : diagnostic précoce des lésions préneoplasiques bronchiques**

Le pronostic des cancers pulmonaires souvent diagnostiqués tardivement au moment de l'apparition des symptômes reste redoutable et ce malgré les progrès des traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques. La mise en œuvre ces dernières années de programmes de détection précoce des cancers bronchiques chez les patients à risque fumeurs, a pour but d'améliorer leur prise en charge et de permettre leur diagnostic à un stade précoce opérable, seule garantie de leur survie prolongée. Il s'agit également de proposer aux patients porteurs de lésions préneoplasiques de nouvelles thérapeutiques limitant l'évolutivité et la progression des lésions dysplasiques vers un cancer invasif.

Jusqu'à il y a encore quelques années, la description de la transformation des lésions préneoplasiques bronchiques en carcinome invasif était basée sur la description d'anomalies cytologiques de l'épithélium bronchique observées sur des prélèvements d'expectoration. Ces études montraient que 40% à 80% des patients présentant des atypies marquées et 10 à 15% de ceux porteurs d'atypies modérées développeraient un cancer invasif au cours des 5 à 10 prochaines années, tandis qu'à l'inverse, les dysplasies légères étaient considérées comme des lésions au faible risque d'évolutivité (Risse et al 1988, Band et al 1986, Frost et al 1986). Néanmoins ces données morphologiques sont seulement le reflet d'un processus de cancérisation diffus ou « en champ » de l'ensemble de l'arbre bronchique, et ne permettent pas de fournir d'informations précises quant au diagnostic histologique et à la topographie précise des lésions, ni d'en définir l'évolutivité.

Grâce à l'amélioration des techniques d'imagerie endoscopique basées sur les propriétés d'autofluorescence de la muqueuse bronchique, il est maintenant possible d'établir une cartographie des zones précancéreuses bronchiques et surtout de détecter avec une plus grande sensibilité les lésions dysplasiques peu visibles en endoscopie standard. Ainsi les cancers occultes, qui correspondent dans 75% à des carcinomes in situ ou microinvasifs prédominant au niveau de l'arbre bronchique proximal, ne seraient détectées en endoscopie standard en lumière blanche que dans 30% des cas (Saito et al 1992). La technique d'endoscopie par autofluorescence utilise le défaut de fluorescence de la muqueuse

pathologique comparativement à la muqueuse saine après excitation par la lumière ultraviolette. Plusieurs systèmes sont actuellement proposés dont le système LIFE (Lung Imaging Fluorescence Endoscope) utilisé à Grenoble qui utilise une source laser Hélium-Cadmium de 442 nm et permet la visualisation des lésions dysplasiques en négatif par rapport à l'épithélium normal alentour. Ainsi, en comparaison avec une technique d'endoscopie standard, le système LIFE permet une amélioration de la sensibilité de détection des lésions dysplasiques de haut grade et des CIS variant de 28 à 68% et une perte en matière de spécificité de 24 à 66% selon les études (Lam et al 1998, Kato et al 1998, Venmans et al 1996, Vermylen et al 1999, Hirsch et al 2001). Pour les cancers invasifs, cette technique s'avère également meilleure, offrant un gain de sensibilité de 30%. (Lam et al 1998). A noter néanmoins que le nombre de faux positifs en lumière blanche et plus encore en fluorescence reste élevé et que la rentabilité de cet examen reste très dépendante de l'expérience de l'opérateur.

D'après l'étude de Bota et al (2001) qui a porté sur 416 biopsies bronchiques réalisées chez 104 patients sous fibroscope LIFE sur une période de 2 ans, sur 36 biopsies réalisées sur un épithélium normal ou métaplasique, 6 soit 16% ont révélé l'apparition de lésions dysplasiques de bas grade. En ce qui concerne les hyperplasies, globalement 1/3 ont régressé, 1/3 ont persisté et 1/3 ont progressé en dysplasies légères à modérées. Les dysplasies légères et modérées diagnostiquées sur la première biopsie ont quant à elles régressé en métaplasie malpighienne ou en épithélium normal dans environ 2/3 des cas respectivement, 1/3 sont restées stables, et 3.5% seulement ont évolué en dysplasies sévères. Un tiers des dysplasies sévères ont progressé vers un CIS ou récidivé, les 2/3 ayant régressé en lésion de bas grade ou ayant laissé place à un épithélium normal. Enfin 12% des CIS ont régressé sous la forme de lésions de bas grade ou d'un épithélium normal tandis que 87% ont persisté et ont été traités par voie endoscopique (Bota et al 2001). D'après Deygas et al (2001) sur 35 CIS traités par cryothérapie, seuls 9% à 1 an et 28% à 4 ans présentent une récurrence. D'autres études montrent des évolutions plus péjoratives des CIS, notamment Venmans et al (2000) qui observent une progression vers un cancer invasif en 6 mois de la moitié des CIS. D'après Moro-Sibilot et al (2004) sur 31 CIS, 17% progressent à 1 an et 63% à 3 ans, sur une série qui inclut cependant 8 patients non traités et 17 traités par cryothérapie. Le fait que les patients présentent ou non un cancer synchrone ou métachrone aux lésions préneoplasiques de haut grade ne semble pas influencer l'évolution des ces dernières (Moro-Sibilot et al 2004, Bota et al 2001).

Il reste à prouver que les régressions ne sont pas des résections par biopsies et que les lésions retrouvées dans le suivi ne sont pas des lésions voisines des précédentes et préexistantes. En effet la dimension (quelques centaines microns) des lésions préneoplasiques n'autorise pas réellement les études longitudinales par biopsies répétées. De plus, les recommandations sur la conduite à tenir devant les lésions préneoplasiques de haut grade varient : classiquement le traitement préconisé est une résection chirurgicale au risque de priver des patients souvent porteurs par ailleurs d'insuffisance respiratoire liée au tabagisme, de parenchyme pulmonaire. Les traitements endobronchiques, comme la photothérapie, l'électrocautérisation ou la cryothérapie permettent de préserver le parenchyme pulmonaire tout en assurant un contrôle local de la maladie préinvasive ou microinvasive.

De la même manière que les lésions pré invasives se développent préférentiellement chez des patients déjà porteurs de cancer, la progression des lésions de bas grade vers des lésions de grade plus élevé est probablement plus importante chez les patients déjà porteurs par ailleurs d'autres lésions de haut grade, témoignant d'un processus déjà avancé de cancérisation en champ (Bota et al, 2001 Moro- Sibilot et al 2004, Breuer et al 2005). Ainsi selon Bota et al 87.5% des CIS persistent ou progressent en lésions invasives tandis que seulement 2.5% des lésions de bas grade évoluent vers une lésion de plus haut grade, ce pourcentage augmentant significativement (6.1%) lorsque ces lésions sont associées à des lésions de haut grade (Bota et al 2001). Dans une série plus récente ayant porté sur 134 lésions préneoplasiques diagnostiquées par endoscopie classique ou de type LIFE chez 52 patients (dont 23% de fumeurs), 32% des dysplasies sévères contre seulement 9% de dysplasies légères et de métaplasies malpighiennes (Breuer et al 2005). Toutes histologies confondues, 54% des lésions préneoplasiques régressent tandis que 26 % des lésions de bas grade et 39% des lésions de haut grade progressent, suggérant un taux constant de progression dans le temps des lésions préneoplasiques quelque que soit leur histologie initiale. Selon les auteurs de cette étude, certains clones dysplasiques de lésions de bas grade présentent déjà des anomalies moléculaires et génétiques irréversibles et sont donc potentiellement malins.

## **V. Carcinogénèse bronchique : processus multi-étapes et champ de cancérisation**

Il existe un grand nombre de travaux expérimentaux chez l'animal (Melamed et Zaman 1982, Nasiell et al 1987, Nettesheim et al 1982) suggérant une progression depuis les dysplasies vers le carcinome in situ puis vers le carcinome invasif. La modification la plus précoce de l'épithélium est l'hyperplasie des cellules basales, et cette hyperplasie du compartiment des cellules de réserve correspond probablement à un des premiers événements du processus de carcinogénèse multi-étapes. Sous l'influence d'une stimulation/irritation par les carcinogènes du tabac, ces cellules amorcent une métaplasie malpighienne. L'accumulation de nouvelles agressions nucléaires conduira ensuite les cellules à l'état de dysplasie puis de carcinome in situ où elles acquièrent un génotype et un phénotype anormaux. Cependant ce processus séquentiel longitudinal n'a pas fait ses preuves, une évolution plus directe d'une lésion prénéoplasiques de quelque degré que ce soit à un carcinome invasif étant possible (McWilliams et al 2003).

Les études expérimentales suggèrent que toutes ces modifications seraient réversibles si l'agent stimulant ou les carcinogènes étaient supprimés (Nasiell et al 1987, Nettesheim et al 1982) et que les lésions dysplasiques pourraient croître et décroître en fonction de la dose et de la durée d'exposition aux carcinogènes. Néanmoins, les altérations moléculaires persistent même quand les lésions s'amendent histologiquement.

Parallèlement à ces modifications morphologiques les cellules dysplasiques accumulent des anomalies génétiques et moléculaires leur permettant d'acquérir de nouvelles capacités de prolifération, de résistance à l'apoptose, de progression et d'invasion. L'apparition d'un cancer résulte donc d'une accumulation séquentielle d'altérations génétiques et épigénétiques (Chung et al 1996, Sozzi et al 1992, Thiberville et al 1995, Wistuba et al 2000a) qui pour la plupart sont dues aux agents carcinogènes du tabac (Volgenstein et Kinzler 1993, Auerbach et al 1974, 1979). La présence de certaines d'entre elles (pertes d'allèle, méthylation) s'observe déjà au sein de l'épithélium bronchique normal, hyperplasique ou en métaplasie malpighienne des fumeurs ainsi qu'au niveau de l'épithélium alvéolaire, avant même l'apparition d'authentiques lésions dysplasiques suggérant donc que leur apparition précède celle des lésions histologiques (Mao et al 1997, Wistuba et al 2000b).

Ces anomalies moléculaires et génétiques sont de plus multicentriques traduisant donc une atteinte diffuse de l'arbre bronchique qui peut présenter différents types d'anomalies à différents sites, d'évolution, de degré de gravité et de rapidité d'accumulation variables. Ce mode d'atteinte de l'épithélium bronchique est appelé « champ de cancérisation » (Strong et al 1984, Slaughter et al 1953). Le processus de cancérogenèse est donc multicentrique et multi étapes tant sur le plan phénotypique que génétique.

L'accumulation de ces anomalies génétiques et épigénétiques, et plus globalement moléculaires, favorise la croissance excessive, le potentiel d'envahissement local et la capacité de métastaser. Ces anomalies affectent donc plus particulièrement des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tels que les oncogènes qui favorisent la croissance cellulaire, les gènes suppresseurs de tumeur qui inhibent cette croissance et les gènes régulant la mort cellulaire programmée ou apoptose. Ainsi environ 50 gènes suppresseurs de tumeurs et plus de 100 oncogènes ont été identifiés. Les allèles mutants des oncogènes sont considérés comme dominants car l'altération d'un seul allèle suffit à entraîner une transformation cellulaire, cette altération étant due soit à une mutation, une translocation ou une amplification génique; à l'inverse l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur nécessite l'altération des deux allèles, par mutation, délétion ou méthylation par exemple, ces gènes étant donc considérés comme récessifs. Les gènes impliqués dans l'apoptose peuvent se comporter soit comme des gènes dominants antiapoptotiques soit comme des gènes récessifs proapoptotiques. D'autres catégories de gènes sont également impliquées dans la carcinogenèse incluant les gènes codant pour des protéines de migration cellulaire, d'angiogenèse, des protéines réparatrices de l'ADN et d'immortalité cellulaire comme la télomérase.

## **VI. Anomalies cytogénétiques au cours du processus de champ de cancérisation**

Un certain nombre d'anomalies génétiques ont été observées dans le processus de carcinogenèse bronchique mettant donc en cause des mutations d'oncogènes et des mutations ou des pertes d'hétérozygotie au niveau de loci de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces anomalies intéressent préférentiellement les chromosomes 1, 3, 5, 6, 9, 11, 13, 17 et 18. Les altérations du bras court du chromosome 3 sont les plus fréquentes et les plus précoces dans les cancers pulmonaires, et s'observent dans 100% des carcinomes à petites cellules et 90% des carcinomes non à petites cellules. Ces délétions en 3p sont donc précoces dans la carcinogenèse bronchique et apparaissent de façon clonale dans l'épithélium respiratoire des fumeurs. La région contient un certain nombre de gènes suppresseurs de tumeur.

Grâce à l'apport de la technique de CGH (Comparative Genomic Hybridization), un nombre accru de copies des régions 3q, 5p, 8q, 17q et 19q dans les carcinomes non à petites cellules et 3q, 5p, 8p et Xq dans les carcinomes à petites cellules a été mis en évidence, de même que des diminutions du nombre de copies des régions 3p, 5q, 10q, 13q et 17p. Les pertes les plus fréquentes observées dans les carcinomes non à petites cellules en dehors des délétions en 3p sont en 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q et 17p, et en 5q, 13q, 17p dans les carcinomes à petites cellules (Schwendel et al 1997, Michelland et al 1999, Petersen et al 1997).

D'après Wistuba et al (1997), environ 30% des épithéliums histologiquement normaux et 42% des métaplasies et hyperplasies prélevés chez des patients fumeurs, présentent au moins une perte d'hétérozygotie en 3p12, 3p14.2, 3p14.1-21.3, 3p21, 3p22-24, 3p25, 5q22, 9p21, 13q14 et 17p13. Il existe de plus une augmentation croissante du nombre de LOH en fonction du grade de dysplasie des lésions prénéoplasiques. Les anomalies les plus précoces affectent les régions 3p21, 3p22-24, 3p25 et 9p21 et la taille de la délétion en 3p augmente également en fonction du degré de sévérité des lésions histologiques. De même, la perte au niveau du locus de p53 en 17p13 s'observe préférentiellement dans les dysplasies et les CIS. Enfin ces pertes d'hétérozygotie surviennent de façon clonale et indépendante dans le temps et dans l'espace, corroborant le concept de champ de cancérisation.

## ONCOGENES ET GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR

### I. Oncogènes

Les oncogènes responsables de la carcinogenèse dérivent de proto oncogènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire normales. Les oncogènes codent pour des protéines souvent dépourvues d'éléments régulateurs et dont la production par des cellules transformées ne dépend pas nécessairement de facteurs de croissance ou d'autres signaux externes. Ces protéines représentent ainsi des formes altérées de protéines normales et sont classées en fonction de leur rôle dans la transduction du signal et dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi nous détaillerons les protéines transductrices du signal de croissance comme ras, les protéines effectrices et facteurs de transcription comme myc, et les oncoprotéines assurant des fonctions de facteurs de croissance ou de récepteurs de facteur de croissance et de régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines.

#### **1. Famille du gène ras**

Il s'agit d'une famille de proto oncogènes impliqués plus particulièrement dans la genèse des adénocarcinomes pulmonaires. Les gènes ras (K-ras, H-ras et N-ras) codent pour trois protéines membranaires de 21 kDa qui appartiennent à la même famille que rho, rac et rab et qui régulent les modifications du cytosquelette et le transport vésiculaire et nucléaire. Elles interviennent également dans la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de la transduction de signaux de prolifération ou de différenciation en fonction de l'état des cellules (Jacobson 1998). La protéine Ras sauvage est capable de fixer le GTP (guanosine triphosphate) et possède une activité intrinsèque GTPasique responsable d'une hydrolyse du GTP fixé en GDP. La protéine Ras devient activée par la fixation du GTP et active raf-1, une MAP-kinase-kinase-kinase qui est son effecteur direct, et qui forme un complexe et phosphoryle une MAP kinase-kinase (MAPKK) telle que MEK (MAP kinase ERK activating kinase), qui phosphoryle son tour les MAP kinases ERK1 et ERK2 (extracellular signal regulated kinase) capables de le transloquer dans le noyau pour activer des facteurs de transcription dont C-fos et C-jun (complexe AP-1) et induire la synthèse d'ADN. C-raf-1 pourrait être impliqué dans la carcinogenèse bronchique, son locus étant situé en 3p25, site de



fréquentes délétions dans les cancers pulmonaires (Graziano et al 1991). Cependant aucune mutation de c-raf-1 n'a été détectée dans ces cancers et c-raf-1 est souvent hyper exprimé (sans mutation) dans les cancers à petites cellules.

Les protéines Ras participent donc à la transmission de signaux de croissance issus de la fixation de récepteurs tyrosine kinases à leur ligand (EGF, HER2/neu, IGF1, PDGF). A l'inverse, quand le GTP est hydrolysé en GDP, la protéine revêt alors une forme inactive. Par contre, lorsque le gène ras est muté par un simple changement de base, l'oncoprotéine perd sa capacité à hydrolyser le GTP en raison d'une mutation sur le site GTPasique et devient constitutivement active et stimule en permanence différents facteurs de transcription nucléaires impliqués dans la prolifération cellulaire, comme Fos et Jun qui forment le complexe AP1.

Les oncogènes ras sont généralement activés par des mutations ponctuelles des codons 12, 13 ou 61, 90% de ces mutations concernant le codon 12 dans les cancers bronchiques. Ces mutations sont observées dans 15 à 30% des adénocarcinomes et sont exceptionnelles dans les autres cancers non à petites cellules sauf les adénosquameux. Elles sont absentes dans les carcinomes à petites cellules (Rodenhuis et al 1992, Slebos et al 1990). Elles sont observées chez moins de 10% des non-fumeurs, argument en faveur de l'implication des agents carcinogènes du tabac dans leur genèse. La majorité des mutations de c-K- ras (70%) affectent donc le codon 12 et sont des transversions G vers T, responsables d'une substitution de la glycine par la cystéine (GGT en TGT) ou de la glycine par la valine (GGT en GTT). Le benzo(a)pyrène et les nitrosamines de la fumée de tabac favorisent l'apparition in vitro de mutations identiques affectant le codon 12, ce type d'anomalie étant également observé dans les mutations du gène p53 ; elles sont caractéristiques des lésions de l'ADN provoquées par ces carcinogènes (Greenblatt et al 1994).

L'influence de ces mutations sur le pronostic des cancers bronchiques est encore discutée; certains auteurs ont suggéré que les mutations de ras seraient associées à un mauvais pronostic dans les carcinomes non à petites cellules pulmonaires à la fois à des stades précoces et avancés (Sugio et al 1992, Rosell et al 1993, Keohavong et al 1996), tandis que d'autres ne retrouvent pas de corrélation au pronostic (Siegfried et al 1997) ni d'association à une chimiorésistance (Tsai et al 1993, Rodenhuis et al 1997).

Les raisons de la prédominance voire de l'exclusivité des mutations de ras dans les adénocarcinomes ne sont pas claires : une des hypothèses est que ces mutations entraîneraient une modification de la différenciation cellulaire et donc favoriserait l'émergence de ce type de carcinome. Ces mutations seraient plus fréquentes dans les adénocarcinomes d'origine bronchioloalvéolaire (Cooper et al 1997) plutôt que bronchique pour certains alors que pour d'autres ce sont surtout les cellules caliciformes mucipares bronchiques qui seraient les plus exposées aux mutations de K ras (Tsuchiya et al 1995, Yakubovskaya et al, Urban et al 2000, Keohavong et al 2001). Ces mutations surviendraient précocement au cours de la genèse des adénocarcinomes comme en témoigne leur présence dans les hyperplasies alvéolaires atypiques (Westra et al 1996), et ne seraient pas détectées au sein du parenchyme pulmonaire normal (Sugio et al 1994, Urban et al 1996). L'influence des mutations de K-ras et la chronologie de leur apparition dans la carcinogenèse bronchique sont également contestées ; selon Sugio et al (1994), les mutations de K-ras ne s'observeraient pas dans les métaplasies ni même les dysplasies bronchiques (Sugio et al 1994, Urban et al 1996). La détection de mutation de K-ras dans des expectorations bronchiques de patients porteurs de cancer pulmonaire serait corrélée à la présence concomitante d'un cancer (Kertsing et al 2000, Sommers et al 1999). Par ailleurs, deux séries plus récentes restent sujettes à controverse (Urban et al 2000, Keohavong et al 2001), mettant en évidence une détection de mutation de ras dans 20% des bronches normales.

## **2. Gènes de la famille myc**

La stimulation de ras qui induit une cascade de signaux de transduction aboutit à une activation de facteurs de transcription via le complexe AP (fos-jun) dont myc qui appartient à la famille des facteurs de transcription HLHLZ ou « helix loop helix leucine zipper » (fermeture éclair à leucine et hélice boucle hélice). La protéine c-Myc comporte un domaine N terminal de transactivation et un domaine C terminal contenant une région basique entourée de motifs de liaison à l'ADN de type HLHLZ. C-Myc est impliquée dans la croissance des cellules normales et dans leur prolifération par l'intermédiaire de l'activation de gènes de la synthèse de l'ADN, du métabolisme de l'ARN et du cycle cellulaire (Grandori et Eisenman 1997). Les protéines Myc fonctionnent par hétérodimérisation avec les protéines Max, les dimères Myc-Max ayant une haute affinité pour les séquences consensus CACGTG qui activent la transcription d'autres facteurs de transcription. Les dimères activent le promoteur

cdc25A, qui active à son tour les Cdk2 et 4 stimulant le passage de G1/S. Cdc25A et B peuvent coopérer pour activer ras lors de la transformation de fibroblastes (Hunter 1997). Les protéines Max interagissent également avec des protéines Mad de type HLHLZ qui forment des complexes antagonistes aux dimères Myc-Max.

Les proto oncogènes c-myc sont des homologues d'un oncogène d'un rétrovirus aviaire v-myc. Au sein de la famille des gènes myc, c-myc est le plus souvent activé dans les carcinomes à petites cellules et non à petites cellules pulmonaires, alors que ses homologues N-myc et L-myc ont uniquement amplifiés dans les carcinomes à petites cellules (Nau et al 1985). L'activation des gènes myc se fait par amplification génique ou par dérégulation transcriptionnelle, et conduit à une hyper expression de la protéine (Krystal et al 1988). Les gènes amplifiés comportent de 20 à 115 copies du gène par cellule et dans la plupart des cas seul un membre de la famille myc est amplifié. L'amplification génique est généralement associée à une augmentation d'expression des ARN messagers et de la protéine.

D'un point de vue fonctionnel, c-myc est capable de réprimer des gènes de l'arrêt du cycle comme gas1, qui active un arrêt du cycle cellulaire p53 dépendant, via gadd45 et p21. Gas 1 est donc activé dans les cellules en G0, les maintenant en G0 à condition que la protéine P53 soit sauvage (Lee TC et al 1997, Marhin et al 1997, Del Sal et al 1995).

C-Myc est également un régulateur positif des kinases dépendantes des cyclines (CDK) G1 spécifiques et particulièrement de la cycline E liée à la kinase dépendante des cyclines CDK2. Dans les tissus tumoraux, c-Myc stimule et empêche l'inhibition de la cycline E liée à CDK2 en inhibant les CDK inhibiteurs que sont p27 et probablement p21 et p57 par des mécanismes post-translotionnels et post- transcriptionnels. Ainsi la dérégulation du cycle cellulaire dans les carcinomes non à petites cellules peut s'expliquer en partie par l'hyper expression de myc et de l'activité de la cycline E et par l'inactivation par phosphorylation de Rb conduisant à l'entrée en cycle des cellules tumorales (*cf chapitre ultérieur sur la régulation de Rb*).

C Myc favorise la prolifération cellulaire en stimulant des facteurs de croissance tel que TGF $\beta$ , qui inhibe à son tour c-Myc et induit la différenciation cellulaire. C Myc joue un double rôle car il peut également induire l'apoptose notamment dans les cellules normales et en l'absence de facteurs de croissance. Cette induction de l'apoptose dépendante de P53 peut être contrecarrée par Bcl2 et l'inactivation de P53. Il est probable que dans les cellules

tumorales, la voie pro apoptotique de c-Myc soit inactivée au profit de la seule voie proliférative.

Les anomalies les plus souvent observées dans les cancers pulmonaires sont l'hyperexpression de Myc par amplification génique ou non. Ainsi 18% des carcinomes à petites cellules et 8% des cancers non à petites cellules présentent une amplification d'un des membres de la famille myc (Richardson et Johnson 1993). En revanche, on n'observe pas de translocations ni de mutations ponctuelles. Cette amplification de myc est également observée dans les lignées cellulaires (31% des carcinomes à petites cellules et 20% des non à petites cellules) cependant qu'environ 50% des carcinomes non à petites cellules hyper expriment c-Myc en l'absence d'amplification génique (Broers et al 1993, Gazzeri et al 1994). Il ne semble pas exister de corrélation entre l'hyper expression de c-Myc et une évolution péjorative des carcinomes pulmonaires, mais l'amplification de son gène serait plus importante dans les lignées de carcinomes métastatiques, chez des patients traités par chimiothérapie et dont la survie serait plus courte (Johnson et al 1996).

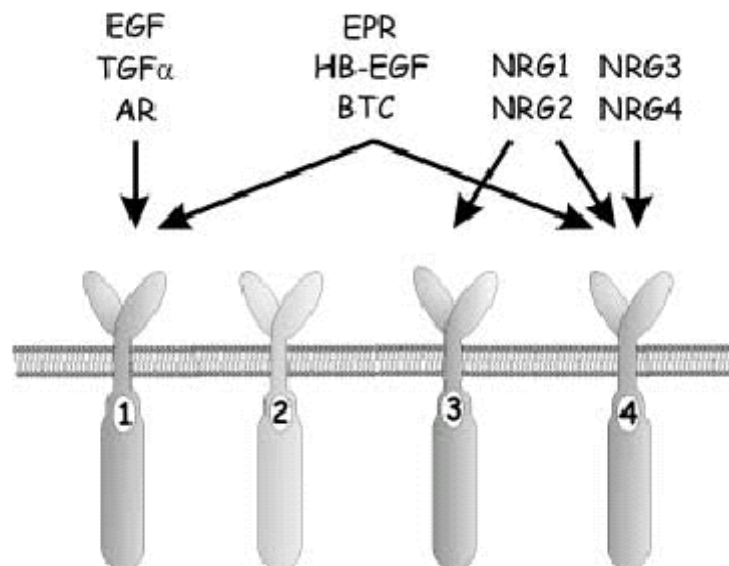
### **3. La famille des récepteurs de type tyrosine kinase c-erbB**

Les protéines ErbB appartiennent à la superfamille des récepteurs tyrosine kinase ou (RTK). Les quatre membres de la famille RTK sont les récepteurs de l'EGF (epidermal growth factor) également appelés ErbB1/HER1/EGFR1, ErbB2/Neu/HER2//EGFR2, ErbB3/HER3/EGFR3 et ErbB4/HER4/EGFR4. Ces récepteurs ont en commun de posséder un domaine extracellulaire se lequel se fixe leur ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intra cytoplasmique doté d'une activité tyrosine kinase. Lorsque leurs ligands (cf infra) vont se fixer sur le domaine extracellulaire des récepteurs ErbB, ils vont entraîner la formation d'homo ou d'hétéro dimères par ces récepteurs, ce qui a pour effet de stimuler leur activité tyrosine kinase intrinsèque et d'entraîner l'auto phosphorylation des résidus tyrosine du domaine intracellulaire. Ces résidus phosphorylés servent alors de sites d'arrimage à des molécules impliquées dans la signalisation et la régulation de signaux intracellulaires en cascade qui par l'intermédiaire des MAP kinases activent des protéines nucléaires comme la cycline D1 ou des facteurs de transcription nucléaires comme C-fos, C-myc, C-jun, SP1, NF-kB.

Les récepteurs ErbB sont exprimés par une grande variété de tissus épithéliaux, mésenchymateux et neuronaux où ils jouent un rôle dans le développement, la prolifération et

la différenciation. La dérégulation de ErbB1 et ErbB2 intervient par ailleurs dans différents cancers humains. La capacité qu'ont les récepteurs de la famille ErbB de former des hétéro dimères permet vraisemblablement de fournir une grande diversité dans la signalisation.

Les ligands de la famille ErbB sont très nombreux comportant tous un domaine EGF-like qui leur confère leur spécificité de fixation. Ces récepteurs sont EGF, TGF alpha (transforming growth factor), l'amphiréguline qui fixent spécifiquement ErbB1, la betacellulin (BTC), l'heparin binding EGF (HB-REGF) et l'épiréguline (EPR) qui fixent ErbB1 et ErbB4. Les neurégulines (NRG) dont NRG 1 et 2, fixant à la fois ErbB3 et ErbB4, et NRG 3 et NRG4 fixant ErbB4 et non ErbB3 (Figure 3). Par contre, il n'existe pas de ligand direct de ErbB2 qui agit en fait comme partenaire avec les autres membres de récepteurs ErbB dans le processus d'hétérodimérisation et potentialise la signalisation (Beerli et al 1995). A l'exception de EGF qui peut être mis en évidence dans des fluides corporels, les autres ligands agissent sur un mode autocrine et paracrine et se trouvent donc à proximité de leurs récepteurs.



**Figure 3: Famille des récepteurs ErbB (ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4) et leurs ligands EGF, TGF alpha, EPR, HB-EGF, BTC et les neurégulines NRG (D'après Hynes et al 2001)**

Les protéines qui s'amarrent aux résidus phosphorylés des récepteurs ErbB activés sont des protéines de type SH2 (Src homology 2) c'est à dire contenant un domaine homologue de Src ou comportant un domaine PTB (phosphotyrosine binding) fixant la phosphotyrosine. Ces protéines sont des protéines adaptatrices comme Shc, Crk, Grb2, Grb7 et Gab1, des kinases comme Src, Chk et la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI-3K) et les tyrosine-phosphatases SHP1 et SHP2.

Le gène de EGFR1/ErbB1 est situé en 7p24 ; il est impliqué dans la régulation de la prolifération épithéliale et la différenciation. Son absence chez la souris knock-out provoque des anomalies de développement des alvéoles et de la septation pulmonaire (Miettinen et al 1995 et 1997). EGF, comme TGF $\alpha$  est sécrété par les cellules tumorales sur un mode autocrine de stimulation de leur croissance (Rachwal et al 1995, Tateishi et al 1990, Rusch et al 1993). L'activation de l'EGFR survient par liaison du ligand ou par autoactivation et l'expression de la protéine est appréciable par immunohistochimie. Plusieurs signaux de transduction sont induites par l'auto phosphorylation de EGFR y compris la cascade Ras-MAPK, Src et la voie des activateurs de la transcription STAT (Figures 4 et 5).

Ras peut donc être induit transitoirement par la fixation de EGF sur son récepteur et auto phosphorylation de celui ci. Cette phosphorylation va entraîner une fixation d'une protéine Shc qui va fixer à son tour la protéine adaptatrice GrB2 qui va se complexer avec le facteur Sos (Son of sevenless) ou ras guanine nucleotide exchange protein, pour transformer le complexe ras-GDP en ras-GTP. Un des effecteurs de ras est la sérine kinase raf-1 qui active à son tour une MEK kinase (MAPK/ERK kinase) qui activera ERK1 et 2 par phosphorylation.

En parallèle à cette voie de signalisation, une autre voie en aval de ras met en jeu la protéine kinase B (PKB) appelée encore RAC-PK (protein kinase related to protein kinase A and C) ou Akt (Franke et al 2003). L'activation de la voie Akt est impliquée dans la suppression de l'apoptose et de la différenciation et dans la progression du cycle cellulaire. L'activation de ras par EGF-R entraîne celle de la phosphatidyl inositol-3 kinase (PI-3K), qui phosphoryle des phosphoinositides en position 3'-OH sur l'anneau inositol donnant naissance aux phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PI-3,4-P2) et triphosphate PIP3 sur lesquels va se fixer Akt qui se relocalise alors sur la membrane cytoplasmique. La phosphorylation de Akt sur son résidu thréonine 308 par la phosphoinositide -dependent kinase 1 (PDK1) active Akt qui va inhiber la caspase 9 mais également phosphoryler et inhiber Bad, membre de la famille

Bcl pro-apoptotique. Bad est alors retenu dans le cytosol par sa fixation aux molécules 14-3-3 sur ses résidus phosphosérines et devient incapable d'inhiber les protéines mitochondriales anti apoptotiques de type Bcl-X<sub>L</sub> (Zha et al 1996). Ainsi l'inhibition de l'activité de EGF-R diminue les niveaux de Bad phosphorylé et entraîne l'apoptose de cellules mammaires normales. Le gène PTEN est un gène suppresseur de tumeur fréquemment muté dans les cancers (Myers et Tonks 1997) qui code pour une phosphoinositide phosphatase qui déphosphoryle les produits de PI-3K prévenant ainsi l'activation de Akt (Maehama et Dixon 1998). L'inactivation ou la perte de PTEN par mutations entraîne une élévation des produits de PI-3K et favorise la progression du cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose et la transformation oncogénique via Akt active (Cantley et Neel 1999).

EGF-R est également capable de protéger les cellules tumorales de l'apoptose induite par l'interféron alpha (INF  $\alpha$ ). Celui-ci active la kinase Jnk-1 (Jun Kinase-1) sur son domaine NH2 terminal et la MAP Kinase p38. Il induit également une augmentation de 50% de la forme phosphorylée de ERK1 et ERK2 et donc une augmentation de leur activité enzymatique. L'apoptose induite par INF  $\alpha$  est potentialisée par l'inhibition de l'activité de ras. Les effets de JunK-1 et de p38 pro apoptotiques sont contrecarrés par EGF ainsi que l'activation des caspases 3,6 et 8.

Par ailleurs il existe une synergie entre la voie de signalisation de WNT et celle de EGF-R. Lorsque WNT se fixe à son récepteur Frizzled (Fz), il prévient la phosphorylation de la  $\beta$  caténine par glycogène synthétase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), ce qui permet sa stabilisation, sa translocation nucléaire et l'activation de facteurs de transcription de la famille TCF/Lef. L'activation de EGFR par ses ligands induit une phosphorylation de résidus tyrosine de la  $\beta$  caténine impliquée dans la migration et le pouvoir métastasant. Par ailleurs Fz transactive ErbB1 et, via une activation en cascades de MAK kinases, entraîne une augmentation d'expression de la cycline D1 dans des cellules épithéliales mammaires (Civenni et al 2003). Enfin Akt active et phosphoryle GSK-3 prévenant ainsi la formation du complexe GSK-3/APC/ $\beta$  caténine. Ainsi l'activation de PI3K/Akt par EGF récepteur peut réguler la fonction de la  $\beta$  caténine et de APC expliquant son rôle dans la migration.

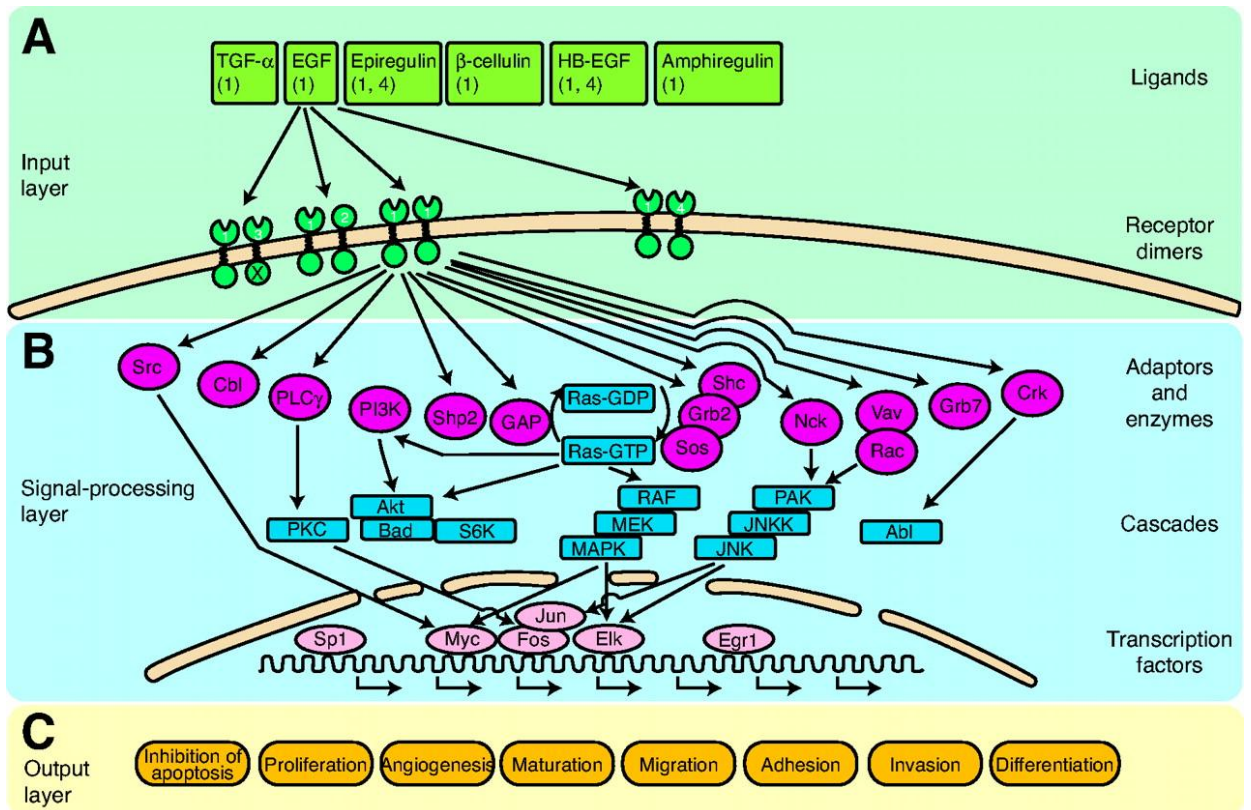


Figure 4: Voies de signalisation de EGF-R (D'après Arteaga 2002)

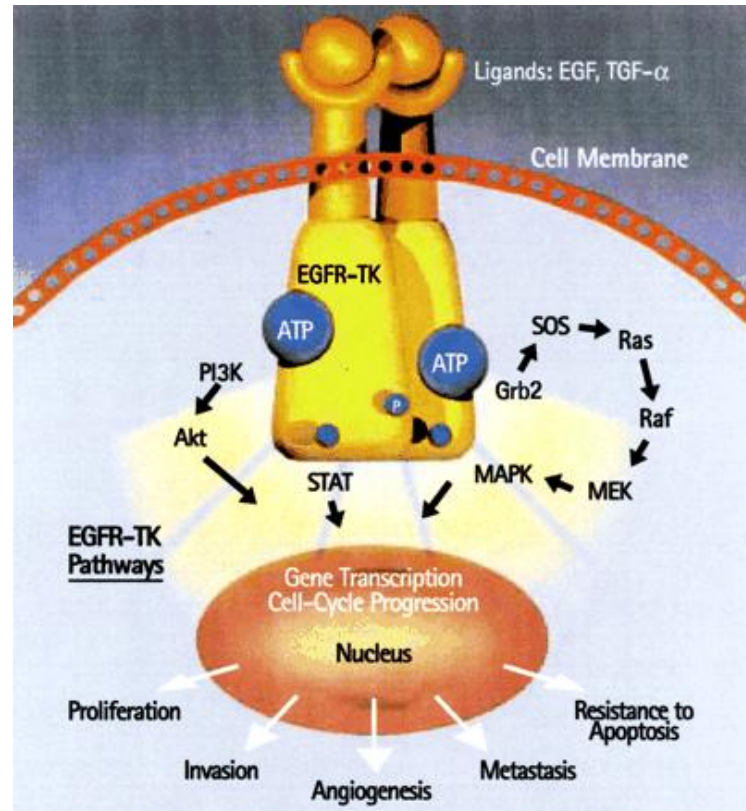


Figure 5: Signaux de transduction dépendant de l'activation de EGF-R (D'après Herbst et Bunn 2003)



L'expression de EGF-R s'observe dans une grande variété de tumeurs humaines dont les carcinomes mammaires, de la tête et du cou, gastriques, rénaux, pancréatiques, ovariens et dans 70 à 80% des carcinomes non à petites cellules (90% des carcinomes malpighiens et 75% des adénocarcinomes) (Tateishi et al 1990, Damstrup et al 1992, Brambilla E et Brambilla C 2000). Elle est absente dans les carcinomes neuroendocrines pulmonaires de haut grade (carcinomes à petites cellules et carcinomes neuroendocrines à grandes cellules) et pourrait servir de critère diagnostique différentiel (Cerny et al 1986). Aucune implication pronostique de l'expression de EGFR n'a cependant été rapportée dans les cancers pulmonaires. Dans les préneoplasies bronchiques, l'expression de EGFR est croissante parallèlement au degré de gravité des lésions dysplasiques et est maximum dans les carcinomes in situ pour décroître dans les carcinomes invasifs (Brambilla E et Brambilla C 2000, Rusch et al 1995). De même l'expression d'Akt phosphorylé sur le résidu Ser 473 sur la voie d'activation de EGF-R est plus élevée dans les dysplasies (33%) que dans les cancers invasifs (33%) (Tsao et al 2003), supportant l'idée que l'expression d'Akt phosphorylé est un événement précoce dans la progression tumorale, notion qui pourrait être utilisée dans des essais de chimioprévention. Cette expression serait soit en relation avec les fréquentes amplifications en 3q observées dans les carcinomes non à petites cellules, région qui code pour la sous unité catalytique p110 de PI3K qui active Akt, soit serait liée à l'hyperexpression de EGFR.

L'EGFR est une cible des inhibiteurs des tyrosine-kinases comme le gefitinib, une anilinoquinazoline qui, par compétition avec l'ATP sur son site de fixation en Lysine 745 de l'EGFR, inhibe l'activité tyrosine kinase de ce dernier. 10% des patients européens et américains et 28% des patients japonais (principalement porteurs de bronchioloalvéolaires et non fumeurs) répondent au gefitinib, sans qu'une relation entre les niveaux d'expression de l'EGFR présentés par la tumeur et sa sensibilité au traitement ait été mise en évidence. Récemment, deux équipes ont révélé que des mutations du domaine tyrosine kinase des carcinomes à petites cellules affectant les codons 18, 19 et 21, seraient associées à la chimiosensibilité des tumeurs au gefitinib (Paez et al 2004, Lynch et al 2004) et à l'erlotinib (Pao et al 2004), les mutations sur le codon 16 étant plus spécifiques des tumeurs diagnostiquées chez les Japonais.

Le gène de ErbB2 est situé en 17q21 et son amplification et son hyper expression ont été suspectées dans le développement de nombreux cancers. Bien que son amplification soit très rare dans les cancers pulmonaires, ErbB2 est hyper exprimé dans un tiers environ des carcinomes non à petites cellules et notamment les adénocarcinomes (20%) (Schneider et al 1989, Shi et al 1992, Weiner et al 1990). ErbB2 possède un potentiel oncogénique puisqu'il est capable de faciliter la transformation maligne de cellules épithéliales bronchiques immortalisées lorsqu'il est transfecté (Noguchi et al 1993) et l'inhibition de ErbB2 par un anticorps monoclonal induit une inhibition de croissance in vitro de lignées cellulaires de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (Kern et al 1994). De plus certaines séries ont rapporté une influence pronostique défavorable de ErbB2, son hyper expression étant corrélée à une survie plus courte, plus particulièrement dans les adénocarcinomes (Tateishi et al 1991, Kern et al 1990 et 1994, Pfeiffer et al 1996). De même une hyper expression de ErbB2 serait corrélée à une augmentation du risque métastatique et à l'acquisition d'une chimiorésistance (Yu et al 1994, Tsai et al 1995 et 1996). L'hyper expression de ErbB2 ne dépend pas d'une amplification génique, observée dans seulement 3% des cas (Schneider et al 1989), mais procède d'une augmentation de la transcription et donc du niveau d'expression des ARN messagers.

#### **4. bcl2 et apoptose**

Les cellules tumorales ont acquis la capacité d'échapper à l'apoptose, ou mort programmée, qui affecte d'ordinaire les cellules normales en réponse à des conditions précises telles que des lésions de l'ADN. Un grand nombre de protéines ont des capacités pro apoptotiques comme Bax, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>, Bad, Bid, Bik, et Hrk, ou des effets anti-apoptotiques comme Bcl2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, et A1 (Yang et al 1996). Les éléments les plus importants intervenant dans le processus apoptotique sont Bcl2 et P53. La protéine Bcl2 contrecarre l'induction de l'apoptose par P53 et joue donc un rôle dans la chimiorésistance des cellules tumorales (Ohmori et al 1993, Ziegler et al 1997).

L'expression de Bcl2 observée dans 75 à 95% des carcinomes à petites cellules (Jiang et al 1995 et 1996, Kaiser et al 1996, Brambilla et al 1996), et seulement par 25 à 30% des carcinomes malpighiens et 10% des adénocarcinomes pulmonaires (Pezzella et al 1993, Higashiyama et al 1997, Apolinario et al 1997) serait donc corrélée pour certains à la

différenciation neuroendocrine des tumeurs pulmonaires. Une relation inverse semble exister dans les carcinomes non à petites cellules entre l'expression de Bcl2 et celle d'une P53 anormale, suggérant qu'une seule de ces anomalies soit capable d'induire une inhibition de l'apoptose dans ce type de tumeurs (Fontanini et al 1995, Kitagawa et al 1996). A l'inverse, dans les carcinomes à petites cellules, on observe à la fois une hyper expression de Bcl2 et des mutations de P53, alors que les carcinomes à petites cellules sont capables d'apoptose massive, notamment sous l'effet de la chimiothérapie. Il est possible que Bcl2 ait des effets Bax-like dus aux caspases (Cheng et al 1997) ou que l'hyper expression de Bcl2 constatée en immunohistochimie ne soit le reflet que d'une protéine inactive hyper phosphorylée ou encore que l'apoptose induite par les drogues soit médiée une voie Bcl2 résistante ou indépendante. Quoiqu'il en soit, les thérapeutiques anti sens anti- Bcl2 sont en cours d'application clinique et permettent de rétablir l'apoptose dans les lignées de carcinomes à petites cellules et non à petites cellules

A l'inverse la protéine Bax exerce un rôle pro apoptotique et se comporte comme un gène suppresseur de tumeur (Yin et al 1997). Bax est une cible transcriptionnelle de p53 et peut former des homo dimères Bax-Bax pro apoptotiques ou des hétéro dimères Bax- Bcl2 anti apoptotiques. Le ratio Bcl2/Bax détermine la susceptibilité à l'apoptose. Ainsi les carcinoïdes expriment fortement Bax et faiblement Bcl2 à l'opposé des tumeurs neuroendocrines de haut grade (Brambilla E et al 1996).

Dans les lésions prénéoplasiques bronchiques, la protéine Bcl2 est exprimée dans environ 30% des dysplasies (Katabami et al), et il existe une discrète corrélation entre le degré de sévérité des dysplasies et l'hyperexpression de Bcl2. Cette hyperexpression est corrélée à la régulation négative de Bax, et une inversion du ratio Bax/Bcl2 est observé dans 3% des métaplasies malpighiennes, 25% des dysplasies légères, 67% des dysplasies modérées, 78% des dysplasies sévères et 53% des carcinomes in situ. L'inversion de ce ratio corréle avec le grade histologique des lésions mais sans que l'on retrouve de dépendance nette avec le statut de p53 (Brambilla et al 1998, Jeanmart et al 2003).

## 5. Autres oncogènes et facteurs de croissance

Il s'agit le plus souvent de facteurs de croissance autocrines, les cellules tumorales étant capables de sécréter à la fois un facteur de croissance et son récepteur, limitant ainsi leur dépendance par rapport au milieu extérieur. La sécrétion de ces facteurs de croissance peut être induite par la fumée de tabac par exemple et favoriser la croissance et l'accélération de la division cellulaire sans pour autant entraîner de transformation maligne des cellules.

L'Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor (HGF/SF) est un facteur de croissance qui stimule la prolifération épithéliale, la différenciation au cours de la morphogenèse et l'angiogenèse. Il comporte un potentiel mitogène pour les cellules normales ou dysplasiques de l'épithélium bronchique (Singh Kaw et al 1995). Au cours du développement pulmonaire, son expression augmente pendant la phase post natale de maturation et son récepteur le proto oncogène c-met ou HGF-R est exprimé par les cellules alvéolaires de type II et bronchiolaires (Sato et al 1997). HGF est impliqué dans le bourgeonnement et le branchement pulmonaire stimulant la mobilité et l'activité mitotique des cellules bronchiques alvéolaires, des pneumocytes de type II et des lignées cellulaires de carcinomes à petites cellules. Ses niveaux d'expression augmentent également lors de lésions du parenchyme pulmonaire (Yanagita et al 1993).

En pathologie tumorale, HGF est exprimé par les carcinomes à petites cellules et les carcinomes non à petites cellules ainsi que son récepteur, codé par le proto oncogène c-met, l'ensemble suggérant donc une boucle autocrine de stimulation de la croissance dans les cancers pulmonaires (Rygaard et al 1993, Harvey et al 1996, Olivero et al 1996). L'expression de c-met serait observée dans environ 70% des adénocarcinomes et 40% des carcinomes malpighiens, en association avec un pronostic péjoratif notamment pour les adénocarcinomes (Ichimura et al 1996, Siegfried et al 1997b).

Une autre boucle de croissance autocrine est représentée par les Insulin-like Growth Factor (IGF-1 et 2) et leur récepteur IGF-1R, fréquemment co exprimés dans les carcinomes à petites cellules et non à petites cellules pulmonaires (Quinn et al 1996). Au sein de la famille IGF, IGF-2 est le principal élément impliqué dans la croissance tumorale des cancers du poumon.

Le proto oncogène c-kit code pour une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs protéines kinases (RTK) et dont la fixation à son ligand SCF (Stem Cell Factor) entraîne une homo dimérisation du récepteur, stimule son activité tyrosine kinase et sa phosphorylation, et initie via une activation en cascade de protéines kinases, des signaux intracellulaires impliqués dans la transduction. C-Kit et SCF sont co exprimés dans les carcinomes à petites cellules dont ils stimulent la croissance (Krystal et al 1996). En immunohistochimie, 25 à 50% des carcinomes à petites cellules expriment C-Kit au moment du diagnostic mais perdent cette expression après chimiothérapie (Rossi et al 2003). Néanmoins, il n'existe pas actuellement d'évidence d'activation ni de mutations de C-kit dans les cancers à petites cellules ni d'effet démontré sur la survie des patients lors de l'utilisation en mono thérapie d'un inhibiteur de C-Kit (Heinrich 2003, Johnson et al 2003).

Le PDGF ou Platelet-Derived Growth Factor dont le proto-oncogène est v-sis, et son récepteur PDGFR sont également co exprimés par les cancers pulmonaires sous la forme d'une boucle autocrine (Antoniades et al 1992), de même que le Gastrin- Releasing Peptide et d'autres bombésin-like peptides (GRP/BN) et leur récepteurs impliqués dans la régulation de la sécrétion, la croissance et la neuromodulation. Trois sous types de ces GRP/BN récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et comportent des domaines transmembranaires. Ils sont exprimés à la fois par les carcinomes à petites cellules et non à petites cellules alors que le GRP est surtout observé dans les carcinomes à petites cellules (20 à 60%) (Richardson et Johnson 1993, Fathi et al 1996). L'inhibition de la voie GRP/BN par des anticorps neutralisants dirigés contre leur domaine C terminal ou par antagonistes de la bombésine empêche la formation de clones de lignées de carcinomes à petites cellules in vitro et in vivo, confirmant donc le rôle de ces peptides dans la carcinogenèse (Cuttita et al 1985, Halmos et Schally 1997). Le succès clinique de ces molécules antagonistes du GRP a cependant été quasiment nul, témoignant possiblement d'un échappement des cellules tumorales à leur dépendance aux facteurs de croissance.

Il n'a pas été observé de réarrangement ou d'amplification des gènes des GRP/BN, mais leur expression dans les carcinomes à petites cellules est le reflet d'un processus de ré activation dans les cellules tumorales, ces mêmes peptides participant au développement pulmonaire et aux processus de réparation en favorisant, via leur sécrétion par les cellules NE, la croissance et la migration des cellules épithéliales (Spurzem et al 1997).

## **II. Gènes suppresseurs de tumeur**

La plupart des tumeurs pulmonaires ont inactivé plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, certains étant communs aux carcinomes à petites cellules et non à petites cellules, tandis que d'autres sont plus spécifiques d'un type histologique donné. Les gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquemment délétés sont p53, Rb1 et p16<sup>INK4</sup>.

### **1. Le gène p53**

Le gène p53 est situé sur le chromosome 17p13 et le domaine de transactivation se trouve dans la région N terminale à proximité du domaine de fixation séquence spécifique de l'ADN et du domaine d'oligomérisation C terminal. Les mutations du gène p53 correspondent aux anomalies génétiques les plus souvent observées dans les cancers et particulièrement dans les cancers pulmonaires. Ces mutations concernent le plus souvent les exons 5 à 8 et concernent les codons 157, 245, 248 et 273, les codons 157, 248 et 273 étant le siège d'adduits BPDE au niveau de leurs sites CpG dans les cellules bronchiques en culture soumises aux carcinogènes du tabac comme le benzo(a)pyrène (Ramet et al 1995). Ces mutations incluent surtout des mutations missens (dans 75%) aboutissant à des transversions de G vers T caractéristiques de l'effet des carcinogènes du tabac sur l'ADN, des mutations nonsense, des anomalies de splicing et des délétions plus ou moins importantes. Les mutations missens sont responsables de la synthèse d'une protéine P53 modifiée dont la demi-vie atteint plusieurs heures permettant sa détection en immunohistochimie (Casey et al 1996). Ainsi une expression de P53 par au moins 20% des cellules présentes au sein d'une population tumorale est corrélée dans 90% des cas à la présence d'une mutation missens (Nishio et al 1996). Cette protéine de 53 kDa composée de 939 acides aminés, fonctionne comme un facteur de transcription, activé en réponse aux dommages subis par l'ADN, ou pouvant fixer plusieurs sites de lésions de l'ADN par l'intermédiaire de son domaine carboxy terminal.

L'activation de P53 s'observe au cours de lésions de l'ADN dues à des irradiations gamma ou UV ou sous l'effet de carcinogènes ou d'ions ionisants (Levine 1997); elle s'observe également en réponse à l'hyperthermie, l'hypoxie, la déplétion en nucléotide ou en réponse à une stimulation par des oncogènes comme c-myc, ras ou E2F1. L'activation du gène p53 conduit à une élévation rapide du niveau d'expression de la protéine qui active des facteurs de transcription et des gènes en aval. Les conséquences sont un arrêt du cycle

cellulaire permettant la réparation de l'ADN ou l'apoptose de la cellule en cas de réparation impossible. Ainsi la protéine P53, découverte par David Lane en 1992 dans les extraits protéiques de cellules infectées par le virus SV40, est appelée le gardien du génome et peut bloquer les cellules en cycle en phase G1 ou G2. A l'inverse, sa perte de fonction favorise la survie des cellules tumorales endommagées génétiquement.

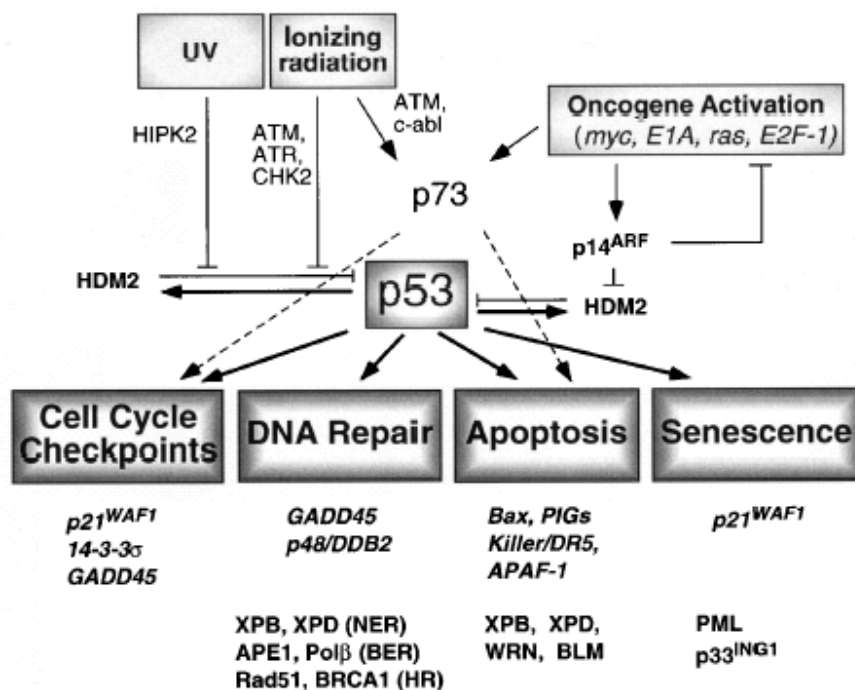
### **a. Régulation d'amont de p53**

Dans les cellules normales, le niveau d'expression de la protéine P53 modifiée post transcriptionnellement est bas mais peut s'élever en cas de stress cellulaire, la protéine s'accumulant dans le noyau (Apella and Anderson 2001, Prives and Hall 1999). Ces états de stress sont les dommages de l'ADN (Kastan et al 1991), l'activation d'oncogènes (Kamijo et al 1998), l'hypoxie (Graeber et al 1996), l'hyperploïdie (Di Leonardo et al 1997), certains états d'oxydoréduction (Hainaut et Milner 1993), la déplétion en ribonucléotides (Linke et al 1996) et la perte d'adhésion cellulaire (Nigro et al 1997).

Deux voies de signalisation aboutissant à la stabilisation de la protéine P53 ont été décrites (Figure 6). L'une concerne les réponses aux stress génotoxiques, comme les dommages de l'ADN liés aux irradiations UV ou ionisantes, et implique l'intervention de kinases comme ATM, ATR, CHK2 et HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2) qui phosphorylent des résidus sérine et thréonine du domaine de transactivation N terminal de P53 (Appella et Anderson 2001, D'Orazi et al 2002, Hofmann et al 2002). Cette phosphorylation inhibe la fixation de régulateurs négatifs de P53 comme HDM2 et favorise la transactivation de ses gènes cibles.

L'autre voie met en jeu une régulation positive de p14<sup>ARF</sup> en réponse à des signaux mitogéniques aberrants dus à des stimulations oncogéniques (hyperexpression de Myc, activation de E2F1 ou expression de ras activé) (Bates et al 1998, Palmero et al 1998, Sherr 2001). P14<sup>ARF</sup> stabilise la fixation de P53 à HDM2 et permet sa séquestration dans le noyau (Weber et al 1999). D'ordinaire, lorsque la protéine P53 est sauvage et à l'état basal indépendamment de toute stimulation, sa liaison à HDM2 permet sa protéolyse par des ubiquitines, d'où sa demi-vie courte, et un rétrocontrôle négatif sur la transcription p53 dépendante en aval. En cas de stress génotoxique ou en cas de mutation de p53 induisant des phosphorylations de la protéine par exemple, sa liaison à HDM2 est altérée. Sous l'action de différents stimuli oncogéniques (hyperexpression de c-Myc, mutation de ras, E2F1) ou lors de

la perte de la protéine Rb, la transcription du gène  $p14^{ARF}$  induit l'accumulation de la protéine P14 qui va former un complexe avec HDM2 dans le nucléole permettant à la protéine P53 d'échapper à la protéolyse pendant le temps de son action. Cette voie fait en fait le lien entre les fonctions de suppression de la croissance tumorale de p53 et celles de stimulation de cette croissance par E2F1 et explique l'apoptose P53 dépendante de E2F1 (*cf infra*). Par ailleurs, d'autres sites de modifications post translationnelles de p53 (phosphorylation, acétylation, sumoylation) ont été décrits permettant sa stabilisation et / ou la stimulation de la régulation de la transcription p53 dépendante (Prives and Manley 2001).



**Figure 6: Régulation d'amont et voies de signalisation de p53**  
(D'après Robles et al 2002)

### b. la voie de signalisation de P53

Le gène p53 exerce ses effets multiples via des mécanismes à la fois dépendants et indépendants de la transcription. L'activation de p53 conduit à l'homotétramérisation de la protéine qui peut alors exercer sa fonction d'activation de la transcription. P53 induit un arrêt



transitoire du cycle cellulaire en G1 ou G2 en transactivant des gènes cibles comme p21<sup>KIP1/WAF1</sup> et 14-3-3 $\sigma$  (El-Deiry 1998, Harper et al 1993, Hermeking et al 1997). P53 peut aussi initier un arrêt permanent du cycle, ou sénescence, via la transactivation de P21<sup>KIP1/WAF1</sup> (Di Leonardo 1994, Itahana et al 2001), ceci pouvant être modulé par PML et p33ING1 (Pearson et Pelicci 2001). Une activation chronique de P53 peut ainsi conduire à un vieillissement prématuré (Tyner et al 2002). Le gène p21<sup>KIP1/WAF1</sup> est responsable d'une inhibition du complexe cyclines/ cycline dépendantes kinases (cdk) à la phase G1 du cycle. Bien que l'on ne note pas de mutations du gène p21<sup>KIP1/WAF1</sup>, l'hyper expression de ses ARN messagers et de la protéine sont observés dans 65% des carcinomes non à petites cellules et semble-t-il indépendamment de P53 (Shimizu et al 1996, Marchetti et al 1996).

Par ailleurs, P53 initie l'apoptose en transactivant des gènes comme Bax, Fas, Killer /DR5, PIG3 et Apaf-1 (Miyashita and Reed 1995, Wu GS et al 1999, Polyak et al 1997, Moroni et al 2001). De plus, P53 peut initier une apoptose indépendante de la transcription par l'intermédiaire d'interactions physiques avec des membres de la superfamille des DNA hélicases (Wang et al 2001). L'initiation de l'apoptose ou de la sénescence inhibe la tumorigenèse par le biais de l'élimination de cellules potentiellement mutées.

Le gène p53 joue également un rôle dans les voies de la réparation de l'ADN. La protéine P53 sauvage augmente la réparation par excision de nucléotides possiblement via la transactivation de p48/ DDB2 et /ou de GADD45 (Hwang et al 1999, Smith et al 2002). P53 favorise la réparation par excision de base (Base Excision Repair) et régulerait négativement la réparation par recombinaison homologue ou HRR (Homologous Recombination Repair) (Duddenhoffer et al 1999, Zhou et al 2001). P53 a la capacité de fixer et d'inhiber Rad51 ou « central HRR factor », les taux de recombinaison devenant plus élevés dans les cellules p53 déficientes. (Bertrand et al 1997).

### **c. les homologues de p53**

Deux homologues de P53, P73 et P63, partagent certaines fonctions caractéristiques de P53 telle que la transactivation génique et l'induction de l'apoptose (Irwin and Kaelin 2001). Les gènes p63 et p73 sont situés respectivement en 3q27-29 et en 1p36.

P73 est un garde-fou en cas d'inactivation de P53 et sa régulation dépend de la tyrosine kinase c-Abl (Agami et al 1999). P73 se comporte comme un intermédiaire dans les

voies de signalisation d'oncogènes et E2F1 peut déclencher directement sa transcription et induire une apoptose P53 dépendante (Irwin et al 2000). P63 et P73 favorisent vraisemblablement la chimiosensibilité des cellules tumorales. A l'inverse, la chimiorésistance peut s'expliquer par une fixation de P73 à une P53 mutée, celle ci inhibant l'action pro apoptotique et les fonctions transactivatrices de P73 (Di Como et al 1999, Strano et Blandino 2003).

Le gène p63 joue un rôle dans les interactions mésenchyme- épiderme au cours du développement embryonnaire et les mutations de p63 entraînent une dysplasie ectodermique. L'isoforme délétée en N terminal -DeltaN P63- présente des propriétés oncogéniques ou anti apoptotiques et le gène p63 est amplifié dans des lignées de cellules carcinomateuses malpighiennes de la tête et du cou ou pulmonaires (Hibi et al 2000). DeltaNP63 en tant que dominant négatif diminue la transactivation induite par P53 sauvage, probablement par compétition sur les sites de fixation des promoteurs des gènes cibles. A l'inverse, de la même manière que P53 sauvage peut former des hétéro dimères avec une P53 mutée, une P53 sauvage peut fixer DeltaN P63 et favoriser sa dégradation vraisemblablement par clivage par des caspases (Ratovitski et al 2001).

#### **d. p53 dans les cancers pulmonaires et les lésions préneoplasiques bronchiques**

Le gène p53 joue un rôle important dans la cancérogenèse pulmonaire et une délétion d'un allèle en 17p13 (locus de p53) associée à une mutation de l'allèle restant, aboutissant à une perte de fonction de la protéine, sont observées dans 75 à 100% des carcinomes à petites cellules et dans 50% des non à petites cellules (Greenblatt et al 1994). Plusieurs études montrent que les mutations de p53 seraient plus fréquentes dans les carcinomes malpighiens que dans les adénocarcinomes. La valeur prédictive de la survie des mutations de p53 est controversée: la survenue de mutations de p53 ou d'une accumulation de la protéine en immunohistochimie serait corrélée à une survie plus courte, les études génétiques et les analyses d'expression de la protéine étant parfois discordantes. Ces discordances peuvent être liées à l'utilisation d'anticorps différents ou à la présence de la protéine stabilisée mais non mutée. Environ 15 à 25% des patients développent des anticorps anti p53 circulants, laissant à penser que cette protéine est capable d'induire une réponse immune humorale en réponse à son accumulation. Cependant, ces anticorps sont dirigés préférentiellement contre des épitopes situés sur les régions amino et carboxy terminales de la protéine, qui ne sont pas

concernées par les mutations. Ces anticorps, qui reconnaissent donc également la protéine sauvage (Schlichtholz et al 1994), ne peuvent donc pas être considérés comme des marqueurs potentiels du diagnostic précoce du cancer pulmonaire.

Plusieurs altérations des voies de signalisation de P53 ont été rapportées dans les cancers pulmonaires sous la forme d'anomalies génétiques ou épigénétiques : l'amplification de HDM2 (dans 25 à 50 % des NSCLC), ou la perte de fonction de p14<sup>ARF</sup> (60% des cancers pulmonaires) sont connues pour inactiver P53 dans les tumeurs humaines (Sherr 2000). Ces anomalies sont fonctionnellement équivalentes à une mutation de p53 puisqu'elles ont pour conséquence de soumettre la protéine P53 sauvage à une dégradation ubiquitine dépendante induite par HDM2. Les altérations de P53 et de P14<sup>ARF</sup> paraissent redondantes pour n'être retrouvées conjointement que dans quelques carcinomes non à petites cellules (moins de 1%). Cependant elles sont souvent concomitantes dans les tumeurs neuroendocrines de haut grade, notamment les carcinomes à petites cellules (Gazzeri et al 1998). Ceci suggère que p14<sup>ARF</sup> présente des fonctions indépendantes de p53; il peut se fixer à E2F1 et inhiber son activité transcriptionnelle (Eymin et al 2001ab). Par contre l'association d'une hyperexpression de HDM2 et d'une perte de P14<sup>ARF</sup> est rarissime (Eymin et al 2002), et suggère des effets redondants pour l'inactivation de p53 et/ou de Rb.

Plusieurs études ont montré que l'épithélium dysplasique bronchique présente des mutations de p53 (Kohno et al 1999, Sozzi et al 1992, Sundaresan et al 1992), et que l'accumulation de la protéine croît avec le degré de sévérité des lésions dysplasiques, faisant donc de l'altération de p53 un évènement précoce dans la carcinogenèse bronchique. L'accumulation de la protéine qui la rend détectable en immunohistochimie coïncide avec la perte de polarité nucléaire des cellules dysplasiques. De fait plusieurs études témoignent de l'absence d'anomalie de p53 au sein de l'épithélium normal tandis que 0 à 6% des métaplasies malpighiennes accumulent la protéine et sont donc positives en immunohistochimie. Les dysplasies légères et modérées accumulent P53 pour 17 à 28% d'entre elles, alors que les dysplasies sévères et les carcinomes in situ accumulent P53 dans 59 à 100% des cas (Nuorva et al 1993, Bennett et al 1993, Katabami et al 1998, Brambilla et al 1998). Les dysplasies retrouvées au voisinage de cancer invasif, synchrone ou métachrone, sont souvent P53 positives alors que des lésions identiques survenant chez des patients sans cancer sont négatives; ceci suggère que l'existence d'une protéine P53 stabilisée est prédictive de

l'existence d'un cancer invasif synchrone ou métachrone (Brambilla et al 1998, Ponticello et al 2000, Boers et al 1996).

## **2. Le gène du rétinoblastome Rb et ses voies de signalisation**

Le gène du rétinoblastome a été identifié il y a plus de dix ans comme le premier gène suppresseur de tumeur. Initialement découvert en raison de ses fréquentes mutations chez les patients présentant un rétinoblastome, il est maintenant admis qu'il joue un rôle fondamental dans la régulation du cycle cellulaire et dans le développement de plusieurs tumeurs comme les ostéosarcomes, les carcinomes à petites cellules bronchiques, les cancers prostatiques et les cancers mammaires (Friend et al 1986, Yokota et al 1988, Lee JO et al 1988). Le gène du rétinoblastome, situé au locus 13q14, code pour une famille de phosphoprotéines comportant Rb1, de 928 acides aminés, Rb2 ou P107 et Rb3 ou P130, qui bloquent les cellules en cycle en phase G1 (Weinberg 1995). Rb peut être phosphorylée ou déphosphorylée au cours du cycle, la forme hyperphosphorylée ou inactive prédominant dans les cellules proliférantes alors que la forme hypophosphorylée ou active est plus abondante dans les cellules quiescentes ou différenciées (Chen et al 1989). Son rôle suppresseur de tumeur a été démontré par l'inhibition de la croissance tumorale de cellules Rb négatives transfectées avec Rb (Huang et al 1988). Rb peut également être inactivée fonctionnellement en l'absence de mutations par hyperphosphorylation (Sherr 1996). Enfin certaines oncoprotéines virales comme E1A des adénovirus, l'antigène tumoral SV40 et l'oncoprotéine E7 de l'HPV (Human Papilloma Virus) ont la capacité de fixer et d'inactiver Rb et de permettre ainsi la transformation maligne des cellules infectées (De Caprio et al 1988, Whyte et al 1989, Dyson et al 1989). Les fonctions de Rb dépendent au moins en partie de ses interactions avec la famille de facteurs de transcription E2F (Chellappan et al 1991, Dyson 1998, Nevins 1998) et les sites de fixation de ces protéines se trouvent au niveau de promoteurs de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Rb réprime la transcription de ces gènes en interagissant avec E2F le privant de son activité transcriptionnelle (Blake and Azizkhan 1989). Il régule ainsi principalement la transition G1-S au niveau moléculaire (Figure 7).

### **a. structure de Rb**

Rb contient différents domaines fonctionnels dont les domaines A et B, hautement conservés qui participent à la formation de la poche centrale ou « Rb pocket » essentielle à sa fonction tumeur suppresseur de tumeur (Qin et al 1992). Cette poche est altérée par la plupart des mutations germinales chez les patients porteurs de rétinoblastome héréditaire et par les mutations survenant dans les tumeurs (Horowitz et al 1990). Elle est aussi le site de fixation de diverses protéines dont les oncoprotéines virales (Lee JO et al 1998).

Un autre domaine fonctionnel de Rb est la région carboxy terminale qui contient des sites de fixation pour la tyrosine kinase c-Abl et pour HDM2 (Xiao et al 1995, Welch et Wang 1993). L'activité tyrosine kinase de c-Abl est bloquée quand elle se complexe avec Rb. Quand Rb est hyperphosphorylée, c-Abl est active et libre (Welch et Wang 1993). La région carboxy terminale participe également à l'assemblage de complexes multimériques contenant notamment Rb et E2F. Rb interagit également avec HDM2, et cette liaison libère E2F1 et inactive les capacités de Rb d'arrêt du cycle en G1. Rb forme avec HDM2 et p53 un complexe trimérique et inhibe ainsi l'activité anti apoptotique de HDM2 en empêchant la dégradation de p53 (Hsieh et al 1999).

La fonction de la région amino terminale de Rb reste controversée : elle contient des sites consensus pour la phosphorylation par les cdk qui régulent l'activité de Rb lorsqu'elles sont phosphorylées au cours du cycle. Cette région interagit également avec différentes protéines dont MCM7, une kinase régulant la transition G2/M (Stern et al 1998).

### **b. inhibition de E2F1 par Rb et répression du complexe Rb/E2F dans le contrôle du cycle cellulaire**

E2F1 appartient à une famille de cinq facteurs de transcription homologues (E2F-1, -2, -3, -4 et -5) et deux protéines partenaires fixant l'ADN, DP1 et DP2/3. Certains sont activateurs (E2F-1, -2, -3) et d'autres sont répresseurs (E2F-4 et -5) de la transcription. L'activation transcriptionnelle de E2F1 est importante pour la progression des cellules dans le cycle et leur passage en S. Rb permet l'arrêt en G1 des cellules en inhibant l'activité transcriptionnelle de E2F grâce à des protéines se fixant à la fois à Rb et à E2F. Cependant si

Rb et ces protéines sont phosphorylées par des cdk en début de phase G1, elles laissent E2F libre, celui-ci permettant alors le passage des cellules en S. Par ailleurs, E2F peut former un complexe répresseur avec Rb et/ou d'autres « protéines pocket », ces complexes jouant un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire par Rb via un arrêt en G1 des cellules. (Sellers et al 1995, He et al 2000).

### **c. régulation de la fonction de Rb par la phosphorylation**

Le rôle de Rb dans sa forme active hypophosphorylée sur l'arrêt en G1 consiste donc à séquestrer et donc à réprimer l'activité transcriptionnelle de E2F1. A l'inverse, le passage des cellules en cycle est possible lorsque Rb est inactivée par phosphorylation entraînant une libération de E2F1 de son complexe répresseur avec Rb. Cette phosphorylation est catalysée par des cdk formant des complexes avec des cyclines (Chen et al 1996, Lundberg and Weinberg 1998) et Rb contient 16 sites potentiels de phosphorylation par les cdk. Trois différents complexes peuvent phosphoryler Rb au cours du cycle : cdk4/6-cycline D au début de G1, cdk2-cycline E à la fin de G1 et cdk2-cycline A qui maintient la phosphorylation de Rb en cours de phase S (Sherr 1996). En fait en G0, Rb est non phosphorylée et inactive et une première phosphorylation par les cdk4/6 lui permettrait de passer à une forme hypophosphorylée active, alors que les hyperphosphorylations ultérieures successives par les complexes cycline D1- cdk4/6 et cycline E-cdk2 en phase G1 inhiberaient la fonction de Rb. De plus, l'introduction du gène de la cycline E dans le locus de la cycline D1 prévient les manifestations phénotypiques liées à une délétion du gène de la cycline D1 suggérant que la cycline E a des fonctions communes avec la cycline D1 (Geng et al 1999). Cependant, les complexes cycline D1-cdk4/6 et cycline E- Cdk2 réguleraient des fonctions différentes de Rb, les complexes cycline D-cdk4/6 phosphorylant des sites spécifiques en région carboxy-terminale de Rb entraînant un déplacement des HDAC de la poche de Rb, ce qui inhiberait la capacité de Rb à réprimer la transcription des gènes de la cycline E et de la cycline A (Zhang et al 2000a). Ainsi le complexe cycline D-cdk4/6 permet l'expression de la cycline E en perturbant le complexe Rb-HDAC. De plus l'expression de la cycline E est suffisante pour surmonter l'arrêt en G1 induit par Rb, et le complexe cycline D-cdk4/6 n'est pas indispensable à la progression dans le cycle si la cycline E est constitutionnellement ou prématurément exprimée dans le cycle. La cycline E présenterait donc des fonctions dominantes sur celles de la cycline D1.

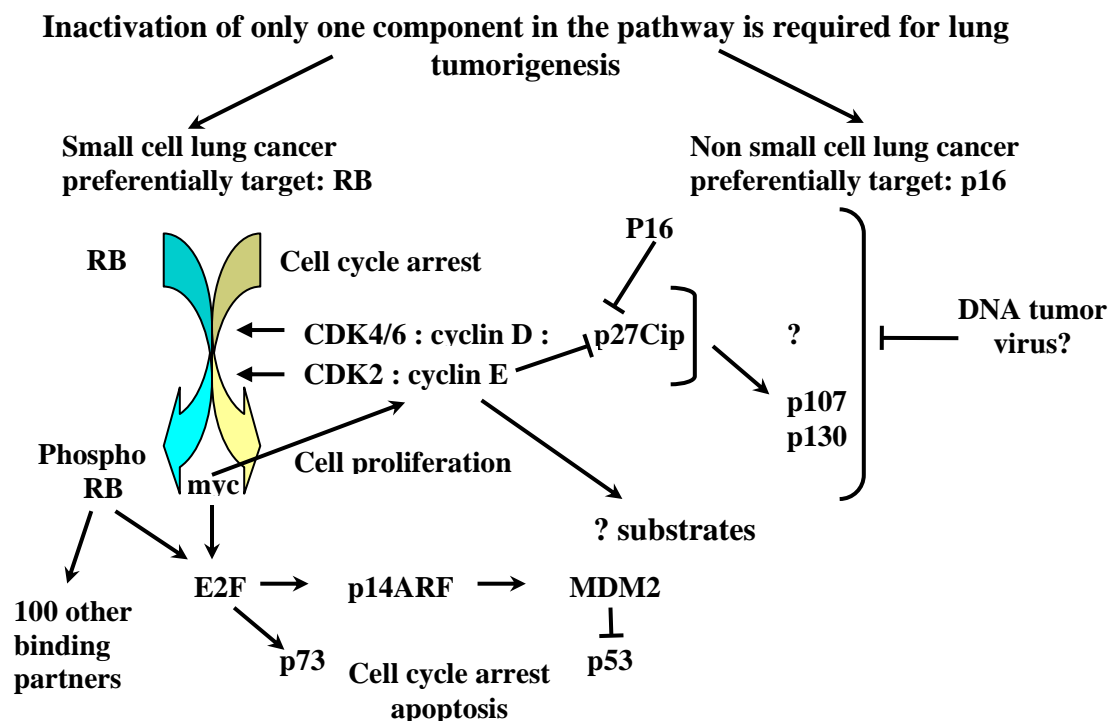
Par ailleurs les complexes cycline D-cdk4/6 peuvent également se fixer aux membres de la famille p21/p27/p57 Cip/ Kip, qui d'ordinaire sont des inhibiteurs des complexes cycline E-cdk2, et permettent ainsi la séquestration et la neutralisation de ces derniers et donc la stabilisation de l'activité des complexes cycline E-cdk2. La protéine P16<sup>INK4</sup>, du gène du même nom dont le locus est en 9p21, est capable quant à elle d'inhiber la kinase cdk4/6 et donc d'empêcher la phosphorylation de Rb en phase G1. L'induction de la fixation de P16<sup>INK4</sup> à cdk4 non seulement supprime directement l'activité du complexe cycline D1-cdk4/6 mais libère P27<sup>KIP1</sup> de ce complexe, qui peut alors fixer et inhiber le complexe cycline E-cdk2. L'inhibition de l'activité de la cycline E peut induire l'arrêt en G1 des cellules proliférantes, conférant à P16<sup>INK4</sup> un effet suppresseur de tumeur indirect via P27<sup>KIP1</sup>. Ainsi si dans 10% des carcinomes à petites cellules la protéine Rb sauvage est présente, elle est inactivée en amont par perte de P16<sup>INK4</sup> ou l'hyperexpression des cyclines D1 ou E (Beasley et al 2003). Le fait que dans les cancers pulmonaires on observe soit une inactivation de Rb soit une perte d'expression de la protéine P16<sup>INK4</sup>, et jamais les deux à la fois, est un argument en faveur de la nature suppressive de tumeur de P16<sup>INK4</sup>, et surtout la démonstration que ses fonctions sont dévolues à l'inhibition de la phosphorylation de Rb (Rb1). La perte de la protéine P16<sup>INK4</sup> est due soit à une inactivation du gène par hyperméthylation de son promoteur et de l'exon 1 (régulation épigénétique) aboutissant à une absence d'ARN messagers (46% des cas), soit à une délétion homozygote (40%) ou à des mutations missens (14%) (Gazzeri et al 1998).

#### **d. rôle de Rb dans l'apoptose**

Rb est inactivé soit par mutation soit par hyperphosphorylation dans la quasi totalité des cancers pulmonaires et dans de très nombreux autres cancers, et sa perte de fonction déclenche l'apoptose P53 dépendante. Il s'agit en fait d'un mécanisme de protection intrinsèque permettant l'élimination des cellules dont Rb est dérégulée (Morgenbesser et al 1994). Néanmoins la perte de fonction de Rb va créer une pression de sélection pour les cellules ayant acquis des mutations leur permettant d'échapper à l'apoptose P53 dépendante. Le lien entre P53 et Rb semble être E2F1 qui devient libre en cas de perte de fonction de Rb et qui déclenche l'apoptose P53 dépendante. A l'inverse, une délétion du gène E2F1 entraîne une réduction de 80% de l'apoptose P53 dépendante dans les cellules Rb négatives (Pan et al 1998). Cette apoptose p53 dépendante est médiée par la protéine P14<sup>ARF</sup>, dont le gène est situé au même locus que p16<sup>INK4</sup> avec qui il partage la même séquence ADN codante pour les

exons 2 et 3, l'exon 1 $\beta$  codant pour la protéine P14<sup>ARF</sup> tandis que l'exon 1 $\alpha$  code pour P16<sup>INK4</sup>. E2F1 libéré induit la transcription de p14<sup>ARF</sup> qui va empêcher la dégradation de P53 médiée par HDM2 en se liant à lui, et augmenter en retour le niveau de P53 et donc entraîner l'apoptose. E2F1 se fixe également à P14<sup>ARF</sup> ce qui a pour effet d'entraîner son ubiquitination et sa dégradation par le complexe du protéasome. A l'inverse la phosphorylation de E2F1 par les kinases ATM/ATR ou sa fixation à Rb réduit sa dégradation.

E2F1 peut également induire une apoptose p53 dépendante mais indépendante de P14<sup>ARF</sup> en augmentant l'expression de la kinase ATM ou en se fixant directement sur P53 ce qui a pour effet d'accroître sa transcription. Par ailleurs E2F1 peut déclencher une apoptose P53 indépendante en augmentant la transcription de p73 et en régulant positivement différents facteurs pro apoptotiques comme les caspases, apaf-1 ou Bcl2 ou encore en déplaçant les complexes répresseurs Rb-E2F de leur fixation à des promoteurs (Pan et Griep 1995). Salon et al (in press 2005) ont récemment démontré que E2F réprime la transcription de la forme courte de FLIP (FLIP-S) activant l'apoptose médiée par Fas via l'activation de DISC.



**Figure 7: Schéma de la régulation du cycle cellulaire, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose par Rb (D'après Kaye 2002)**



### **e. Inactivation de Rb ou de ses voies de signalisation dans les cancers pulmonaires et les lésions préneoplasiques bronchiques**

Le gène du rétinoblastome ou Rb a été le premier gène suppresseur de tumeur identifié dans les cancers pulmonaires (Harbour et al 1988, Yokota et al 1988), et la fréquence de son inactivation directe ou indirecte est si élevée que l'on peut pratiquement considérer qu'elle concerne 100% des cancers pulmonaires, à l'exception des carcinoïdes.

Les carcinomes à petites cellules bronchiques présentent une perte d'expression de la protéine Rb dans 90% des cas (Kubo et Kaye 2001) due à des altérations cytogénétiques et une perte d'hétérozygotie (LOH). La protéine Rb peut cependant être présente dans 10% des cas et être détectée en immunohistochimie car elle est stable; néanmoins, cette protéine reste inactive car dépourvue de domaine fonctionnel en raison d'une mutation ponctuelle ou d'une délétion du gène (Horowitz et al 1990, Kaye 2002). Les raisons pour lesquelles la perte de Rb plutôt qu'une inactivation de P16<sup>INK4</sup> s'observe préférentiellement dans les cancers à petites cellules ne sont pas connues. Néanmoins les souris Rb -/- présentent une mort par apoptose des cellules nerveuses, et les souris hétérozygotes développent des tumeurs neuroendocrines hypophysaires et des cancers médullaires de la thyroïde (Jacks et al 1992). Lorsque ces souris présentent le génotype P53-/- ou +/- associé, elles développent de nombreuses tumeurs neuroendocrines pancréatiques, surrénaliennes (phéochromocytomes) ou thyroïdiennes (cancer médullaire). Néanmoins il n'y a pas de modèle actuellement permettant de faire le lien entre les voies de signalisation du gène Rb et les effets de la Ménine, impliquée dans le syndrome MEN 1 (Multiple Endocrine Neoplasia de type 1) ou de Ret dont le gène est impliqué dans le syndrome MEN 2.

P27<sup>KIP1</sup> est un membre de la famille des inhibiteurs des CDK, qui inclut également P21<sup>WAF1</sup>, gène cible de p53, P16<sup>INK4</sup> et P57<sup>KIP2</sup>. En association avec P16<sup>INK4</sup>, P27<sup>KIP1</sup> contrebalance les effets des cyclines D1 et E sur la phosphorylation de Rb. Il coordonne l'activation du complexe CDK2-cycline E à l'accumulation du complexe CDK4-Cycline D et initie la sortie des cellules du cycle cellulaire en réponse à des signaux antimitotiques. P27<sup>KIP1</sup> peut également promouvoir ou inhiber l'apoptose selon le contexte; néanmoins, il est volontiers considéré comme un gène suppresseur de tumeur, potentiellement perdu dans les cellules tumorales. Son gène n'est cependant pas délété (absence de LOH hétérozygote ou de délétion homozygote) et son promoteur n'est semble t il pas méthylé en 5' dans les tumeurs.

p27<sup>KIP1</sup> est probablement un gène suppresseur de tumeur à fonctionnement "dose dépendant". Dans les cancers coliques, mammaires, prostatiques, urinaires et pulmonaires, il existe une corrélation directe entre les niveaux protéiques de P27<sup>KIP1</sup> et la survie, alors que la diminution des niveaux de P27<sup>KIP1</sup> contribue au développement tumoral par accroissement de la prolifération tumorale et/ou diminution de leur susceptibilité à l'apoptose. Par ailleurs, P27<sup>KIP1</sup> peut affecter l'efficacité des chimiothérapies, qui ont surtout des effets sur les cellules en cycle. Ishii et al (2004) ont démontré récemment par l'utilisation de RNA si (short interfering) que la neutralisation endogène de P27<sup>KIP1</sup> induisait la mort cellulaire dans des lignées de carcinomes pulmonaires non à petites cellules, tandis que son expression forcée dans des lignées de carcinomes non à petites cellules entraîne l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme, ce qui a pour effet de l'éloigner de ses cibles intranucléaires que sont les complexes cdk-cyclines, et de provoquer leur résistance inattendue à l'apoptose. Cependant, alors que la baisse d'expression de P27<sup>KIP1</sup> apparaît comme un facteur de mauvais pronostic dans les cancers non à petites cellules, son expression demeure élevée dans des lignées de cancers à petites cellules soumises à des conditions de culture défavorables ou à l'hypoxie, et leur confère une résistance à l'apoptose (Masuda et al 2001). De la même manière, une baisse d'expression de la protéine SKP2, qui dégrade P27<sup>KIP1</sup> et permet le passage G1/S, entraîne l'apoptose dans des lignées de cancers à petites cellules (Yokoi et al 2002), faisant donc de P27<sup>KIP1</sup> un facteur de survie cellulaire (anti apoptotique) dans les carcinomes à petites cellules.

L'absence de mutations de ras dans les cancers à petites cellules pourrait éventuellement être liée à l'inactivation de Rb. L'augmentation des niveaux de P16<sup>INK4</sup> entraînant une perte des niveaux de cycline D1 à l'état stable, pourrait générer par ce biais une résistance aux récepteurs HER1/EGF-R et HER2/neu ainsi qu'à K-ras, dont les mutations pour être actives requièrent la présence de la cycline D1 au cours de la carcinogenèse mammaire (Kaye 2002). Les carcinomes à petites cellules n'ont donc aucun avantage à sélectionner une mutation activatrice de ras.

Dans les carcinomes non à petites cellules, Rb est très rarement muté (Harbour et al 1988) et la protéine P16 est absente dans environ 50% des cas. 40% présentent une délétion homozygote de p16 contre 1% des carcinomes à petites cellules (Gazzeri et al 1998). A l'inverse, lorsque les carcinomes non à petites cellules ont perdu Rb, on retrouve une forte expression nucléaire de P16 en immunohistochimie. L'inactivation de P16 par méthylation de son gène est plus fréquente aux stades précoces des cancers non à petites cellules, alors que

les délétions homozygotes et / ou les mutations apparaissent plus souvent aux stades tardifs. De plus dans 45% des carcinomes non à petites cellules on observe une hyperexpression de la cycline D1 ainsi que dans 6% des hyperplasies/ métaplasies, 17% des dysplasies modérées, 46% des dysplasies sévères et 38% des carcinomes in situ (Brambilla et al 1999 ab). Une hyperexpression de la cycline E peut s'observer dès l'état de métaplasie (3%), dans 25% des dysplasies légères, 33% des dysplasies modérées, 55% des dysplasies sévères et 89% de carcinomes in situ. De plus 69% des lésions préneoplasiques expriment alternativement une hyperexpression de la cycline D1 ou de la cycline E, 31% exprimant conjointement les deux anomalies (Jeanmart et al 2003).

La perte de Rb ne correspond pas à une anomalie observée dans les lésions préneoplasiques bronchiques mais la perte d'expression de P16 est retrouvée dans 12% des dysplasies modérées et dans 30 à 47% des carcinomes in situ, exclusivement chez des patients présentant un cancer synchrone (Brambilla et al 1999a, Jeanmart et al 2003).

### **3. Les sémaphorines**

Les sémaphorines forment une famille de protéines sécrétées et/ou associées à des protéines membranaires affectant l'élongation, la fasciculation, le branchement ou la formation des synapses par leurs effets attractifs ou répulsifs. Elles influencent la guidance des axones mais également la réaction immunitaire, l'organogenèse, la vascularisation et l'angiogenèse et la progression de certains cancers.

#### **a. structure et nomenclature des sémaphorines**

Depuis la découverte en 1993 de la première sémaphorine, la Sema3A, anciennement collapsin- 1, plus d'une vingtaine de sémaphorines ont été recensées dans le monde animal. La nouvelle classification des sémaphorines permet depuis 1998 de standardiser leur nomenclature, qui est basée sur la comparaison des différents domaines des sémaphorines et leur relation à la membrane cytoplasmique (Unified Nomenclature for the Semaphorins/ Collapsins 1999). En effet, les sémaphorines possèdent toutes par définition un domaine extracellulaire d'environ 500 acides aminés ou "sema domain" comportant 14 à 16 résidus cystéines, plusieurs blocs d'acides aminés conservés et un site potentiel d'aminoglycosylation (Kolodkin et al 1993). La découverte de ce domaine conservé entre des protéines issues

d'espèces différentes a permis d'isoler de nouveaux membres de cette famille à la fois chez les vertébrés et chez les invertébrés (Kolodkin et al 1993, Püschel 1995). Ces protéines comportent également une région C terminale plus spécifique, de 70 à 500 acides aminés contenant des séquences additionnelles. Les sémaphorines diffèrent également de par leur rapport à la membrane cytoplasmique, certaines étant sécrétées, d'autres transmembranaires ou encore liées au glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). L'ensemble de ces caractéristiques sert de base à leur classification, celle-ci n'incluant pas les autres protéines qui comportent aussi des domaines sema comme les plexines ou les récepteurs aux tyrosines kinases.

Il existe 8 classes de sémaphorines, de la SEMA1 à la SEMA7, en plus de la classe des sémaphorines virales ou SEMAV. Par principe les lettres capitales sont réservées aux sémaphorines isolées chez l'humain (ex : SEMA3A, B C ou D) tandis que les minuscules s'adressent aux sémaphorines de la souris (Sema3A, B, C ou D). Le chiffre désigne la sous-classe de sémaphorine et la lettre qui suit désigne le membre de cette sous-classe. Chez les invertébrés, la nomenclature diffère légèrement et se caractérise par l'interposition d'un trait d'union (Sema-1a par ex).

La classe 3 des sémaphorines humaines concerne les sémaphorines sécrétées ayant un domaine d'homologie avec les immunoglobulines et une séquence carboxy-terminale riche en acides aminés basiques. Ces sémaphorines établissent via leur domaine carboxy-terminal des liaisons avec les charges négatives de la matrice extracellulaire ou de la membrane cytoplasmique, leur domaine Ig servant à la relation avec d'autres protéines. Sont regroupées dans cette classe la SEMA3A (anciennement collapsine 1 ou H SemaIII), la SEMA3B (anciennement H SemaA ou V), la SEMA3C (anciennement collapsine 3 ou H SemaE), la SEMA3D (anciennement collapsine 2), la SEMA3E (anciennement collapsine 5) et la SEMA3F (anciennement H SemaIV).

Les neuropilines sont des glycoprotéines transmembranaires récepteurs des sémaphorines de classe 3. Elles fonctionnent également comme des co-récepteurs des isoformes 165 et 145 du VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) et jouent donc à ce titre un rôle au cours du développement et de la tumorigenèse (cf infra).

## **b. fonctions des sémaphorines**

Les sémaphorines ne jouent pas uniquement un rôle dans le développement du système nerveux central mais sont également exprimées par un certain nombre de tissus adultes ou embryonnaires où elles exercent diverses fonctions (Tamagone et Comoglio 2000). Par exemple, elles sont impliquées dans la mobilité des cellules endothéliales, le bourgeonnement capillaire et la formation de microvaisseaux *in vitro*. Elles participent au contrôle de la prolifération des lymphocytes T, à l'agrégation des lymphocytes B, ainsi qu'à la survie et à la différenciation des lymphocytes des centres germinatifs. La Sema3A est également responsable d'une inhibition de la bifurcation bronchique au cours de la morphogenèse du poumon fœtal chez la souris (Ito et al 2000).

## **c. sémaphorines et cancer**

Le rôle des sémaphorines, et plus particulièrement des SEMA3B et SEMA3F dans la carcinogenèse pulmonaire, n'est pas précisément connu. Le gène de la SEMA3F a été isolé à partir d'une délétion homozygote survenant dans trois lignées de carcinomes à petites cellules bronchiques (Roche et al 1996, Xiang et al 1996, Sekido et al 1996). Cette région 3p21.3 est connue pour abriter plus de 19 candidats gènes suppresseurs de tumeur en plus de ceux de SEMA3B et SEMA3F. Elle correspond à un site de perte d'hétérozygotie et de délétions homozygotes dans 80% des cancers pulmonaires mais aussi dans 40 % des lésions préneoplasiques bronchiques et des muqueuses normales des voies aériennes des fumeurs. La région 3p21.3 abrite également le gène de la bêta caténine, dont la délétion homozygote inhibe la croissance d'une lignée de cellules mésothéliales malignes NCI-H28 (Usami et al 2003) et dont les mutations semblent rares dans les cancers pulmonaires (Shigemitsu et al 2001). Récemment a été identifié en 3p21.3 le gène LIMD1 (LIM domains containing protein 1) qui interagit avec le gène Rb et inhibe la transcription médiée par E2F1, supprimant donc l'expression des gènes comportant des éléments de réponse à E2F1. LIMD1 supprime la croissance tumorale *in vivo* et *in vitro* et se comporte à ce titre comme un gène suppresseur de tumeur (Sharp et 2004). Cette région 3p21.3 comporte une séquence de 80 kDa, contenant les gènes des sémaphorines 3A et 3F, et présente un effet suppresseur de la croissance tumorale (Lerman and Minna 2000, Sekido et al 1996). Comme argument en faveur du rôle suppresseur de SEMA3B et SEMA3F, on retiendra la fréquente perte d'expression des ARN messagers de la SEMA3B dans 80% des cancers pulmonaires (Tomizawa et al 2001) et l'implication de la

SEMA3F dans la suppression de la croissance tumorale de cellules HEY d'adénocarcinome ovarien (Buick et al 1985) ou A9 de fibrosarcome chez la souris nude, ainsi que l'altération dans ces mêmes cellules de la réponse à l'apoptose induite par l'Adriamycine et le Taxol (Xiang et al 2002). Par contre, on n'observe pas de suppression de la formation tumorale par SEMA3F dans certaines lignées de carcinomes à petites cellules (Xiang et al 2002, Kok et al 1993) et les mutations des gènes de SEMA3B et SEMA3F sont rares (Tomizawa et al 2001). Néanmoins l'étude en immunohistochimie de la distribution de l'expression de la SEMA3F dans le poumon normal et dans les tumeurs pulmonaires (Brambilla et al 2000) témoigne d'une expression de la SEMA3F dans les cellules épithéliales pulmonaires normales alvéolaires et bronchiolaires (pneumonocytes et cellules basales bronchiolaires) sous la forme d'un marquage essentiellement membranaire et à un moindre degré cytoplasmique. Dans les tumeurs, seuls les adénocarcinomes bien différenciés (carcinomes bronchioloalvéolaires et adénocarcinomes papillaires) et les carcinoïdes conservent une expression de la SEMA3F membranaire et cytoplasmique, alors qu'elle est perdue ou uniquement cytoplasmique dans tous les autres carcinomes à grandes cellules. La SEMA3F serait impliquée dans la mobilité cellulaire comme le suggère l'expression de la SEMA3F par les cellules tumorales isolées observées en périphérie des tumeurs. L'analyse en microscopie confocale de culture de cellules Calu-3 met de plus en évidence un marquage accru à l'aide d'un anticorps anti SEMA3F dans les pseudopodes ou protrusions cellulaires (lamellipodes) des cellules en migration sur les berges d'une plaie sur monocouche de culture cellulaire au stade inhibition de contact.

Une autre sémaphorine sécrétée, la SEMA3C est hyperexprimée dans des lignées tumorales métastatiques uniquement et son expression serait donc corrélée au pouvoir métastatique (Christensen et al 1998). Par ailleurs l'expression de la SEMA3E confère un phénotype chimiorésistant à des cellules tumorales d'ordinaire sensibles au cisplatine et ceci indépendamment du gène MDR ; son expression est également induite par des irradiations UV ou par des rayons X (Yamada et al 1997). Par ailleurs une autre sémaphorine, la SEMA4D ou CD 100, est impliquée dans la résistance à l'apoptose des lymphocytes B et induit la formation d'agrégats in vitro (Dorfman et al 1998). Enfin l'expression de la CRMP-1 ou Collapsin Response Mediator Protein-1, qui est un des effecteurs de la voie de signalisation des sémaphorines, est inversement corrélée au potentiel invasif des cellules carcinomateuses pulmonaires en culture, ainsi qu'à un stade pTNM élevé, à la survenue de métastases ganglionnaires et à une plus courte survie dans les cancers pulmonaires (Shih et al 2001).

### III. VEGF ou Vascular Endothelial Growth Factor

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est un facteur de croissance angiogénique de type “heparin binding” présentant une grande spécificité pour les cellules endothéliales. Il est le principal médiateur de la néovascularisation impliquée dans différentes pathologies (Carmeliet 2000, Ferrara 2000). Il appartient à une famille de cinq membres comportant le VEGF (A), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E ou Orf virus VEGF et le PlGF. Ces facteurs de croissance produisent des signaux par l'intermédiaire de l'activation de récepteurs de type tyrosine kinase. VEGF est un homodimère dont les composants sont reliés par des ponts disulfite. Plusieurs isoformes sont générées par splicing alternatif dont VEGF 121, 145, 165, 189 ou 206, en fonction du nombre d'acides amines composant les polypeptides et de la présence ou non des résidus codés par les exons 6 et 7. Dans l'ensemble, la plupart des cellules exprimant VEGF expriment préférentiellement les isoformes 121, 165 et 189. VEGF 145 et 206 sont rares et restreints aux cellules placentaires (Zachary et Gliki 2001).

#### a. récepteurs du VEGF

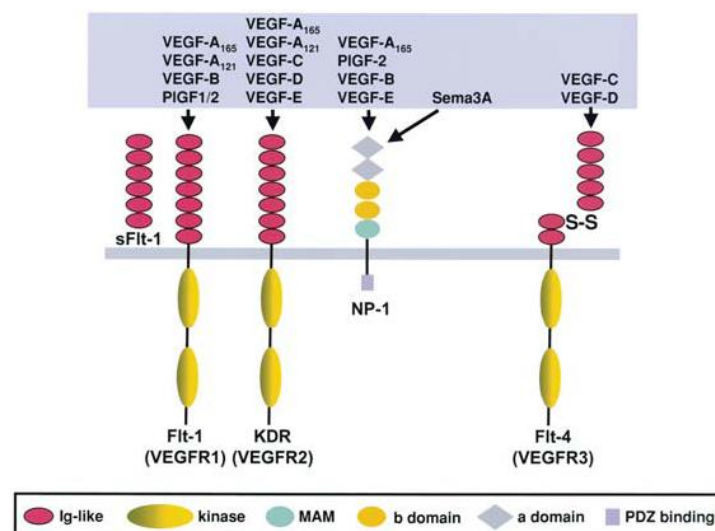


Figure 8: Récepteurs du VEGF d'après Zachary (2003).

### VEGF R1, VEGF R2 et VEGF R3

Plusieurs récepteurs du VEGF ont été identifiés dont VEGF R1 ou flt (fms-like tyrosine kinase), VEGF R2 ou flk-1 (fetal liver kinase-1) appelé encore KDR pour «kinase insert domain containing receptor» et VEGF R3 ou FLT4. Ils présentent des similitudes fonctionnelles et structurales avec les récepteurs de la famille des récepteurs aux PDGF (Neufeld et al 1999) (Figure 8). Ces récepteurs ont tous 7 domaines extracellulaires homologues avec ceux des immunoglobulines sur leur partie extracellulaire et un domaine intracellulaire tyrosine kinase. VEGF R1 et 2 sont exprimés essentiellement par les vaisseaux sanguins alors que VEGF R3 est exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. VEGF fixe à la fois VEGF R1 et 2 et est capable d'induire des hétérodimères entre eux. Parmi les autres membres de la famille du VEGF, PIGF et VEGF-B fixent VEGF R1, et VEGF-C et -D interagissent avec VEGF R2 et 3. Des sites de fixations pour VEGF R1 et 2 existent symétriquement à chaque pôle de VEGF et les interactions entre les monomères de récepteurs induisent leur dimérisation et leur activation par phosphorylation. VEGF R2 sert d'intermédiaire aux effets de VEGF sur les cellules endothéliales, à la différence de VEGF R1 qui induit également la migration des monocytes et la migration des cellules endothéliales

VEGF R1 est une glycoprotéine de 180 kDa et a une haute affinité pour VEGF (de Vries et al 1992) mais peut également se fixer à d'autres ligands comme VEGF B et PIGF. VEGF R1 est exprimé par les cellules endothéliales quiescentes mais aussi prolifératives, et joue donc probablement un rôle dans la maintenance des endothéliums. VEGF R1 est essentiel à la vasculogénèse et les souris knock-out pour VEGF R1 décèdent au 8<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire par défaut d'organisation des cellules endothéliales pour former des vaisseaux sanguins (Fong et al 1995). VEGF R1 est aussi impliqué dans le chimiotactisme des monocytes et dans l'expression des métalloprotéinases par les cellules musculaires lisses vasculaires (Barleon et al 1996, Wang et Keiser, 1998). Une forme tronquée et soluble de VEGF R1 (sFlt-1) ne présentant que 6 domaines Ig like, se comporte comme un récepteur « leurre », en soustrayant VEGF à ses autres récepteurs et en formant des hétérodimères non fonctionnels avec VEGF R2 (Kendall et al 1996). Par exemple de hauts niveaux de VEGF R1 solubles sont observés dans le placenta où ils contrôlent les niveaux de VEGF au cours des différents stades de la grossesse.



VEGF R2 est une glycoprotéine de 200 à 230 kDa présentant également une haute affinité pour VEGF mais aussi pour VEGF-C et VEGF-D (Quinn et al 1993). Les souris VEGF R2<sup>-/-</sup> décèdent au 9<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire par anomalies de développement des précurseurs des lignées hématopoïétiques et endothéliales. VEGF R2 n'est pas exprimé par les vaisseaux adultes quiescents et VEGF R2, via la phosphorylation de ses résidus tyrosine, est impliqué dans la mitogenèse et le chimiotactisme des cellules endothéliales (Quinn et al 1993, Waltenberg et al 1994).

VEGF R3 ou Flt-4 a une expression restreinte à l'endothélium des vaisseaux lymphatiques des tissus adultes. VEGF R3 se fixe à VEGF-C et VEGF-D mais pas à VEGF et contrôle la lymphangiogenèse (Kaipainen et al 1995).

L'expression de ces récepteurs est stimulée par l'hypoxie, VEGF R1 comme VEGF possédant une séquence consensus HIF-1 sur son promoteur. Par contre VEGF R2 ne possède pas une telle séquence et son expression peut être à l'inverse discrètement diminuée par l'hypoxie. Cependant l'expression de VEGF R2 est induite au niveau post transcriptionnel par l'ischémie tissulaire et par différents facteurs de croissance. Ainsi l'expression de VEGF elle-même entraîne une augmentation de celle de VEGF R2. bFGF agit également en synergie avec VEGF pour induire l'angiogenèse via une augmentation de l'expression de VEGF R2 par les cellules endothéliales. L'expression de VEGF R2 varie également en fonction des interactions intercellulaires ou cellule- matrice extracellulaire (variation en fonction de la densité cellulaire en culture ou en fonction des niveaux de PECAM1 ou platelet endothelial cell adhesion molecule 1) (Robinson et Stringer 2001).

## **Neuropilines 1 et 2**

Les cellules endothéliales comportent d'autres récepteurs de plus petite taille que VEGF R1 et 2 qui se fixent électivement sur VEGF165 sur sa partie carboxy-terminale codée par l'exon 7 (Soker et al 1996). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires ayant un court domaine intracellulaire. Elles sont également exprimées par certaines lignées carcinomateuses du sein et de la prostate (Bachelder et al 2001, Latil et al 2000b). Elles ont été identifiées par chromatographie d'affinité comme correspondant à des récepteurs connus des sémaphorines (cf supra) (He et Tessier- Lavigne 1997, Kolodkin 1997).

Neuropiline 1 (Np-1) est une glycoprotéine de 130 acides aminés hautement conservée identifiée initialement dans le tissu nerveux en développement (Soker et al 1998). Un deuxième gène, celui de la neuropiline 2 (Np-2), a été identifié par clonage d'expression et présente des homologies de structure avec celui de Np-1. Les neuropilines 1 et 2 contiennent toutes deux un domaine extracellulaire de 860 acides aminés, un domaine transmembranaire et un court domaine intracellulaire de 40 acides aminés. Leur domaine extracellulaire est composé de 5 régions nommées a1, a2, b1, b2 et c. Ce dernier partage des homologies avec le domaine MAM (mephrin, A5 protein, μ protein tyrosine phosphatase). Ces régions sont impliquées dans la fixation des ligands et la formation d'homo ou hétérodimères. Des formes tronquées de neuropilines existent, dépourvues de domaines transmembranaire et cytoplasmique. Ces neuropilines (trois Np1 et une Np2) sont donc libérées par les cellules et solubles.

Dans le système nerveux, l'expression des neuropilines est localisée aux axones, et impliquée dans leur croissance et leur guidance. Les neuropilines sont également exprimées au cours du développement cardiaque, des membres, du placenta, du rein, des poumons et de l'épiderme. Elles sont également exprimées par les cellules endothéliales, et participent à l'angiogenèse : la Np-1 est semble-t-il un co-récepteur de KDR ou VEGF-R2 et la co-expression par les cellules endothéliales de Np-1 et de KDR favorise la fixation de VEGF sur KDR pour permettre le chimiotactisme des cellules endothéliales.

Au cours du développement pulmonaire, la neuropiline 1 est semble-t-il impliquée dans la migration et la différenciation des cellules et dans la morphogénèse en favorisant notamment les ramifications bronchiques (ou « branching »). Ainsi des souris homozygotes NP-1<sup>-/-</sup> présentent un développement pulmonaire très inférieur aux souris hétérozygotes Np-1<sup>+/-</sup> ou homozygotes Np-1<sup>+/+</sup>. Par contre les souris Np-2<sup>-/-</sup> survivent et présentent essentiellement des défauts neurologiques.

De façon intéressante, les neuropilines ont également été identifiées comme les récepteurs des sémaphorines dans la morphogénèse pulmonaire, la SEMA3A étant impliquée dans le développement des bronchioles terminales, la SEMA3C dans celui des bronches lobaires et la SEMA3F dans celui de l'épithélium très terminal bronchioloalvéolaire (Kagoshima et al 2001).

Les neuropilines sont également exprimées par les cellules de la crête neurale, les ostéoblastes, les cellules mésangiales, les cellules neuroendocrines et un certain nombre de cellules tumorales (Soker et al 1998) notamment mammaires, prostatiques et pancréatiques (Bachelder et al 2001, Latil et al 2000b, Fukahi et al 2004). L'expression des neuropilines a été rapportée dans les ostéosarcomes (Handa et al 2000), les mélanomes (Lacal et al 2000) ou encore les astrocytomes (Ding et al 2000) où elle est le plus souvent corrélée à un mauvais pronostic. Dans les carcinomes non à petites cellules pulmonaires, la co-expression de Np-1 et de Np-2 est corrélée à la progression tumorale et à la néovascularisation (Kawakami et al 2002).

### **b. Voies de signalisation du VEGF (Figure 9)**

La plupart des effets de VEGF sont médiés par KDR (ou VEGFR2), qui est activé par la dimérisation provoquée par sa fixation à son ligand, et par l'autophosphorylation de ses résidus tyrosine tandis que des tyrosines phosphatases entraînent son inactivation.

Une des voies principales de signalisation de VEGF concerne la survie des cellules endothéliales via l'activation de PI-3-kinase qui active à son tour la kinase anti apoptotique Akt/protein kinase B. Akt en retour phosphoryle et inhibe les protéines pro apoptotiques Bad et la caspase 9. Les effets sur la survie à long terme des cellules endothéliales sont médiés par une augmentation du niveau d'expression de protéines pro apoptotiques comme Bcl2 et A1 ou la survivine et les protéines IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose) qui inhibent soit les caspases soit leurs effecteurs (Gerber et al 1998, Tran et al 1999). Akt est également impliquée dans la production de NO induite par VEGF via la phosphorylation de eNOS (endothelial constitutive Nitric Oxide Synthetase). Les voies de signalisation médiées par Akt dépendent également de VE (Vascular Endothelial) cadhérine, élément majeur des jonctions adhérentes endothéliales. Ainsi un défaut ou une amputation de la partie cytosolique de VE cadhérine entraîne des anomalies de développement et de maturation des vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse. Elle s'accompagne également d'une mort accrue des cellules endothéliales, d'une perte des associations entre KDR et VE cadherine, beta catenine et PI3-kinase, et d'une diminution de la signalisation de Akt et de l'expression de Bcl2. Cette voie de signalisation est également dépendante des intégrines, dont l'intégrine alpha v beta 3, et

VEGF induit la phosphorylation de FAK (Focal Adhesion Kinase) qui est un élément majeur des voies de signalisation des intégrines.

VEGF est par ailleurs un activateur des protéines ERK 1 et 2 via KDR, l'activation par les récepteurs tyrosine kinase des ERK induisant une activation de la cascade Raf-1/MEK/ERK. KDR active aussi ERK de façon ras indépendante par l'intermédiaire d'une phosphorylation et donc d'une activation de PLC (phospholipase C) gamma, entraînant une activation de PKC (protéine kinase C). VEGF active également la voie de JNK (ou c-jun terminal protein kinase) ainsi que l'expression de COX-2 via l'activation de cPLA2 (cytosolic phospholipase), et entraîne ainsi la production de prostaglandines dérivées de COX comme PIG2 et PGE2. Ainsi les récepteurs tyrosine kinase de la famille EGF-R et VEGF-R croisent leurs effets d'aval au niveau de la survie cellulaire, via la voie d'Akt phosphorylé, et au niveau de la prolifération via la voie MEK-ERK.

Une autre voie concerne le chimiotactisme et la migration des cellules endothéliales et implique FAK, les intégrines et les récepteurs tyrosine kinase. Les voies de signalisation de FAK mettent en jeu la famille des kinases src, qui est activée lors de la signalisation de KDR par le VEGF responsable de la migration des cellules endothéliales et de leur survie. La protéine kinase p38 est également impliquée dans la migration des cellules endothéliales de même que NO, des petites GTPases ou la protéine Rho.

La voie de signalisation de VEGF médiée par VEGFR1 met en jeu la phosphorylation de PLC gamma et l'activation de ERK, mais semble dans l'ensemble peu relevante biologiquement, générant des effets plus faibles que KDR ; il est même probable que VEGFR1 serve de leurre pour réguler négativement les effets de KDR.

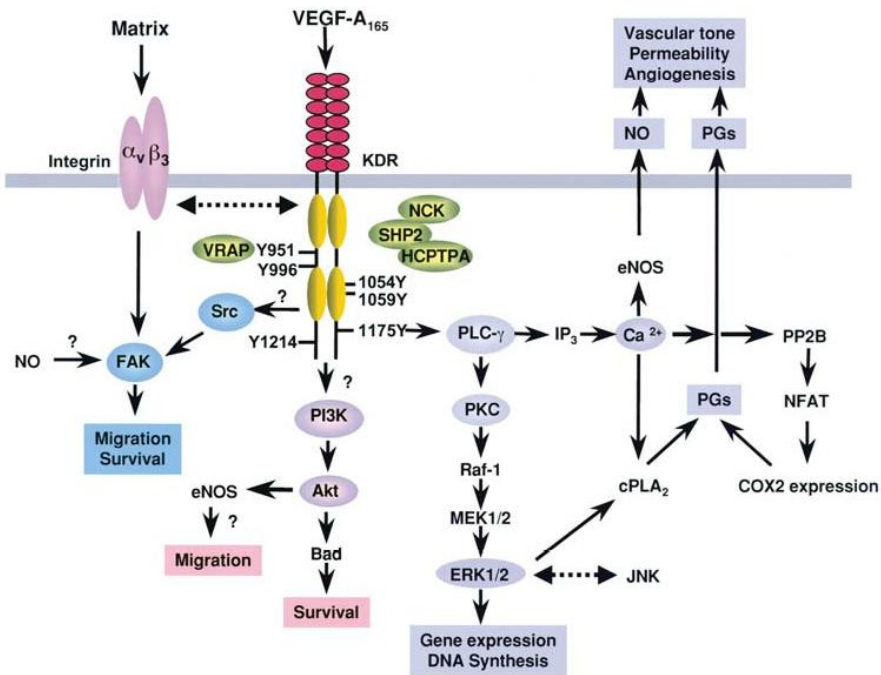


Figure 9: Voies de signalisation du VEGF d'après Zachary (2003)

### c. voies de régulation de VEGF

De nombreuses cytokines régulent et induisent l'expression de VEGF dont PDGF, le TNF alpha, TGF alpha et beta, FGF4, EGF, IGF1 et les interleukines IL-1 alpha et beta, et IL-6.

L'hypoxie induit une élévation rapide et intense du niveau des ARN messagers de VEGF, notamment en périphérie des plages de nécrose tumorale, faisant de VEGF le principal facteur angiogénique induisant la néovascularisation en réponse à l'hypoxie. L'adénosine provenant des cellules hypoxiques se fixe sur les récepteurs adénosine A2 qui activent VEGF par le biais de protéines kinases dépendantes de cAMP, les PKA. Par ailleurs, il existe un élément de réponse à l'hypoxie (HRE) contenant une séquence consensus pour la fixation de HIF- 1 (Hypoxia- Inducible-Factor) et qui permet donc l'activation de VEGF en cas de baisse des niveaux d'oxygène. Par ailleurs, l'hypoxie permet la stabilisation des ARM messagers de VEGF par l'intermédiaire de protéines telle que la protéine HuRmRNA, qui se fixent en 3' ou en 5' sur les régions UTR (UnTranslated Region) des ARNm.

Une autre voie de régulation de VEGF implique le gène suppresseur de tumeur VHL (Von Hippel Lindau) dont les mutations s'observent dans des tumeurs très vascularisées comme l'hémangioblastome cérébelleux et les carcinomes rénaux, ce gène réprimant à l'état normal des gènes tel que VEGF dont l'expression est induite par l'hypoxie. Au niveau post transcriptionnel, VHL séquestre toujours à l'état normal les PKC zeta et delta dans le cytoplasme, empêchant leur translocation au niveau de la membrane cytoplasmique et donc l'activation des MAPK et celle de VEGF. La protéine VHL permet également l'ubiquitinylation et la protéolyse de VEGF, laquelle est supprimée par une mutation du gène VHL conduisant à l'accumulation post transcriptionnelle de VEGF. Au niveau transcriptionnel, VHL forme un complexe avec le facteur de transcription SP-1 et inhibe l'induction de l'expression de VEGF provoquée par la fixation de SP-1 sur le promoteur de VEGF (Robinson et Stringer 2001). A noter enfin que dans les carcinomes non à petites cellules, la survenue de mutations de p53 est corrélée à l'expression de VEGF (Niklinska et al 2001).

## LA TELOMERASE

### I Sénescence cellulaire réplivative

La sénescence cellulaire se définit comme un arrêt de la prolifération qui affecte les cellules normales au terme d'un certain nombre de divisions cellulaires. Après 20 divisions cellulaires environ, les cellules somatiques normales se divisent de plus en plus lentement puis stoppent leur division et rentrent en sénescence. Les cellules sénescents issues de cellules régénératives, deviennent insensibles aux signaux de croissance mais restent métaboliquement et synthétiquement actives. Elles présentent des caractéristiques morphologiques particulière telles qu 'un noyau et cytoplasme volumineux, une forme aplatie, une richesse accrue en lysosomes, en mitochondries, en composants de la matrice extracellulaire et produisent des facteurs paracrines qui affectent la croissance et la survie des cellules voisines ainsi que l'organisation tissulaire. Ainsi des fibroblastes sénescents peuvent favoriser la prolifération de cellules épithéliales préneoplasiques immortelles présentant des mutations de p53 et accélérer la croissance et la tumorigenèse de lignées cellulaires tumorales (Krtolica et al 2001). Le profil d'expression génique de ces fibroblastes sénescents est perturbé avec de hauts niveaux de cdk inhibiteurs, tels que p16 et p21, et une accumulation de Rb hypophosphorylée.

La sénescence cellulaire est un état irréversible qui recouvre plusieurs phénotypes. La sénescence peut être induite par le raccourcissement des télomères (sénescence réplivative). Elle n'est alors pas directement liée à la perte d'ADN télomérique, mais plutôt à des modifications des structures chromatiniennes télomériques. La sénescence cellulaire peut également être induite par une exposition de cellules normales à un stress oxydatif, aux UV, à des radiations ionisantes, à la mitomycine C ou induite par des signaux de croissance dépendant de l'activation de la protéine Ras activée. L'ensemble de ces stimuli provoque une sénescence prématurée induite par le stress (ou « stress- induced premature senescence ») appelée encore sénescence accélérée, au bout seulement de 10 à 15 divisions .

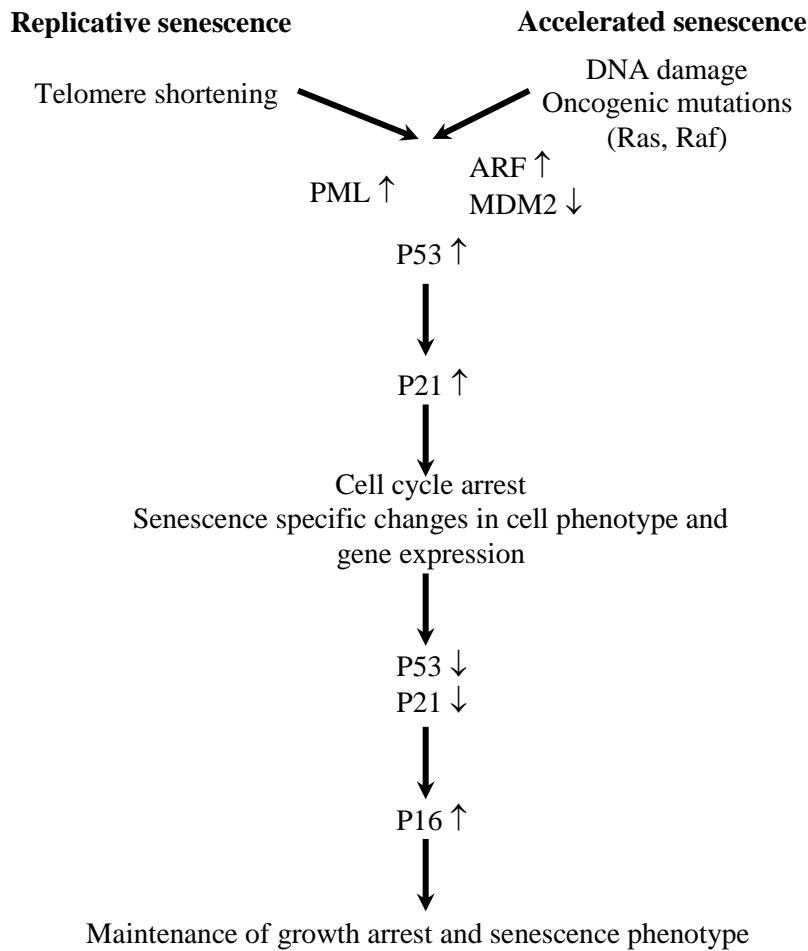
Les mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire impliquent les deux principaux gènes suppresseurs de tumeur p53 et Rb (Ide et al 1983). Néanmoins les cellules sénescents ne rentrent pas en apoptose et l'effecteur de P53 dont elle active la transcription est un cdk inhibiteur P21<sup>waf1</sup>. En cas de sénescence répliquative, l'arrêt de la croissance est initié par l'activation de P53, stabilisée grâce à la séquestration de HDM2 par P14<sup>ARF</sup> qui permet à P53 d'échapper à la dégradation. En cas de sénescence accélérée Ras induite, l'activation de P53 est due à la régulation de son acétylation par la protéine suppresseur de tumeur PML (ProMyelocytic Leukemia). L'activation de P53- P21<sup>waf1</sup> est seulement transitoire et les niveaux d'expression de ces protéines diminuent au cours de l'installation de l'arrêt de croissance. Ras induit également une sénescence via l'activation de P14<sup>ARF</sup>, en activant les voies de signalisation Raf-MEK-ERK et Dmp1 (Sreeremanemi et al 2005), un autre cdk inhibiteur, P16<sup>INK4</sup>, permet le maintien de l'arrêt de la croissance dans les cellules sénescents. En inhibant les cdk4 /cdk6, il empêche les complexes cdk4/cdk6- cycline D1 de phosphoryler et d'inactiver Rb, qui dans sa forme hypophosphorylée, réprime activement les gènes commandant l'entrée en S en séquestrant E2F. Les altérations de la voie P53 -P21<sup>waf1</sup> permettraient l'établissement de la sénescence. Celles de la voie P16<sup>INK4</sup>-Rb permettraient le maintien de l'état de sénescence et coïncideraient avec l'apparition de modifications morphologiques spécifiques. Néanmoins cette hypothèse est remise en question actuellement au profit de la théorie selon laquelle P21<sup>waf1</sup> serait plus impliqué dans la sénescence répliquative et P16<sup>INK4</sup> dans celle induite par le stress (Itahana et al 2003). En effet, dans certains lignées de fibroblastes humains résistants à la sénescence induite par le stress, on note une accumulation de P21<sup>waf1</sup> mais pas de P16<sup>INK4</sup> même quand les cellules sont en sénescence répliquative complète, et l'inactivation de P53 restaure la prolifération (Beauséjour et al 2003). A l'inverse, certaines lignées expriment de hauts niveaux de P16<sup>INK4</sup> même en état de présénescence mais cette sénescence n'est plus réversible une fois établie malgré l'inactivation de P16<sup>INK4</sup>, P53 ou des deux. L'expression de P16<sup>INK4</sup> semble contrôlée par des facteurs de transcription et des protéines chromatiniennees comme Ets, Id-1 et Bmi-1 (Ohtani et al 2001). D'autres cdk inhibiteurs jouent également un rôle dans la sénescence des fibroblastes comme P27<sup>Kip1</sup> et P15<sup>INK4B</sup> (Munro et al 2001, Malumbres et al 2000).

La sénescence met en jeu la voie d'activation par le stress de la MAPK kinase (mitogen activated protein kinase) p38. Les télomères courts se comportent comme des cassures de l'ADN double brin et entraînent une réponse de type dommage de l'ADN. La voie des MAPK est en fait constituée d'une cascade de trois protéines MAPKKK (MAPK kinase

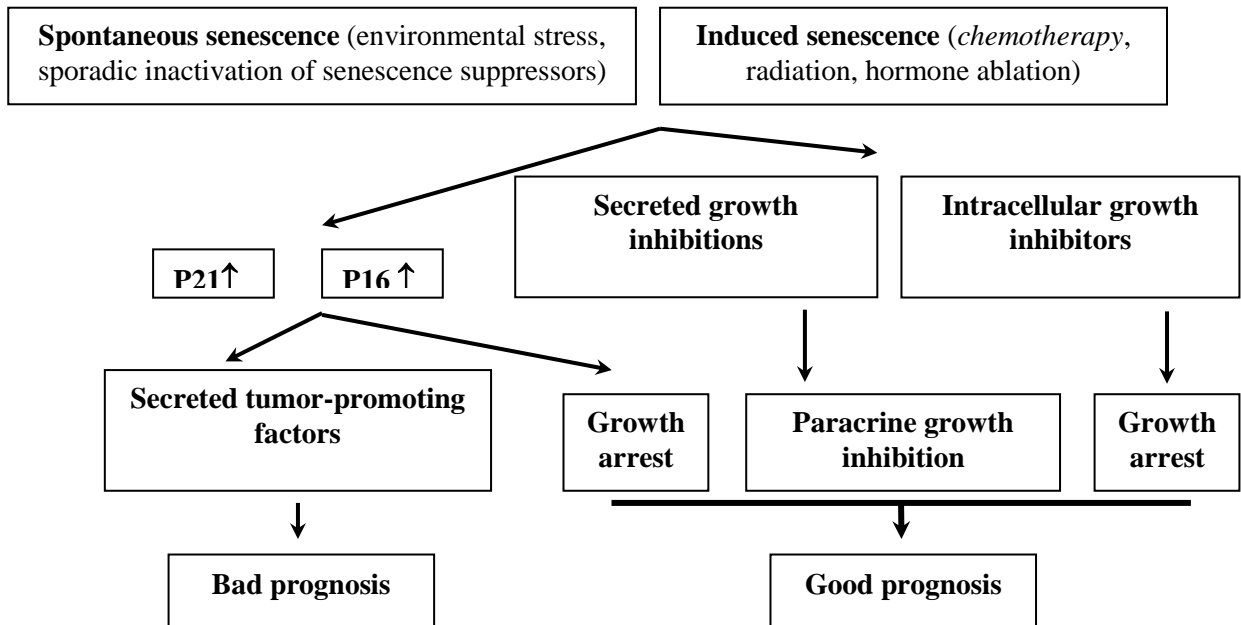


kinase) ou Raf-1, MAPKK (MAPK Kinase) et de MAPK. Sous l'effet d'un stress, les kinases en amont activent les kinases en aval qui phosphorylent et donc activent p38 (Wang et al 2002). L'activation de p38 entraîne un arrêt du cycle cellulaire en levant la répression exercée sur Rb par E2F1 en permettant la dissociation du complexe. Par ailleurs les noyaux des cellules sénescentes comportent des structures d'hétérochromatine appelées SAHF (senescence associated heterochromatic foci) dont la formation coïncide avec la synthèse d'une protéine de l'hétérochromatine HP1 via la répression de promoteurs de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire régulés par E2F et réprimés par Rb (Narita et al 2003). Les noyaux des cellules sénescentes comportent aussi des structures intranucléaires comme la protéine PML (ProMyelocytic Leukemia) dont le gène subit une translocation réciproque avec le gène du récepteur à l'acide rétinoïque dans certaines leucémies. Lors de la sénescence répllicative ou induite par Ras, les taux de protéine PML et les corps nucléaires PML augmentent (Ferbeyre et al 2000).

Les deux types de sénescence, répllicative et accélérée (Figures 10 et 11), jouent un rôle dans le programme « anticarcinogénique » des cellules normales, et préviennent la croissance de cellules ayant subi des dommages de l'ADN ou des mutations impliquant ras par exemple. Les cellules tumorales évitent l'entrée en sénescence répllicative en inactivant la voie P53-P21<sup>waf1</sup> et en maintenant la taille de leur télomères par l'activation d'une enzyme, la télomérase, ou via d'autres mécanismes alternatifs ayant les mêmes effets (ALT ou Alternative Lengthening of Telomeres). Elles échappent également à la sénescence accélérée lors de dommages de l'ADN en inactivant la voie de P16<sup>INK4</sup>. Ainsi les cellules tumorales présentent à la fois des modifications morphologiques typiques des cellules sénescentes, de courts télomères, des mutations de ras, et se dotent en plus de mécanismes adaptatifs d'échappement à la sénescence comme l'activation de la télomérase et l'inactivation de P53 /P16<sup>INK4</sup>/ P14<sup>ARF</sup>.



**Figure 10: Evènements principaux intervenant dans la sénescence répliquative et la sénescence accélérée de fibroblastes normaux (D'après Roninson 2003)**

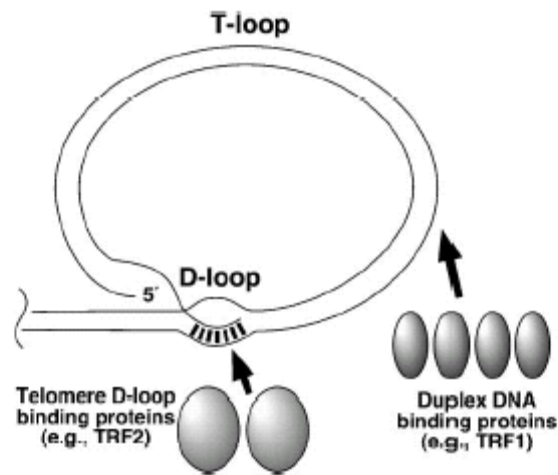


**Figure 11: Sénescence tumorale et ses conséquences (D'après Roninson 2003)**

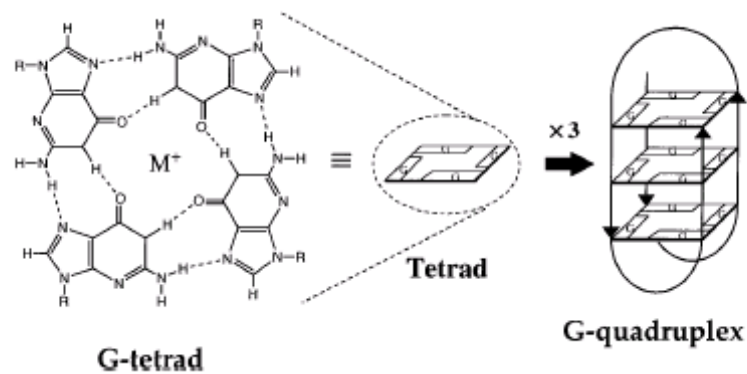
## **II. Structure et rôles des télomères**

Un des obstacles majeurs à la progression tumorale est représenté par la limitation du nombre de cycles de réplication cellulaire. Les télomères, portion répétitive d'ADN riche en guanine de type TTAGGG (Cheng et al 1989) répétée 150 à 2000 fois sont situés à l'extrémité des chromosomes. Ils sont longs de 5 à 8 kb et possèdent une extrémité 3' excédentaire existant sous la forme simple brin (Pommier et al 1995). L'extrémité des télomères forme une boucle impliquant l'extrémité simple brin ou boucle T et dont la base est constituée de séquences télomériques répétitives formant une boucle D. Les protéines associées aux télomères participent à la stabilité de ces boucles. Les télomères peuvent exister sous deux formes, l'une dite ouverte permettant l'accès de la télomérase en vue d'une élongation, et l'autre dite fermée ou boucle T ne permettant pas l'accès de l'extrémité simple brin à la télomérase. Le passage à la forme boucle T est semble-t-il gouverné par des protéines télomériques liées à l'ADN double brin TRF1 (Telomeric Repeat Binding Factor) et TRF2 (Figure 12).

Par ailleurs l'ADN télomérique peut se replier et former des structures quadruplex c'est à dire impliquant 4 brins d'ADN, deux brins double d'ADN ou quatre extrémités simple brin (Greider 1999) (Figure 13). Ces structures quadruplex adoptent des formes différentes selon qu'elles sont intra ou intermoléculaires. Elles comportent toutes un motif répété appelé quatuor G constitué de 4 guanines stabilisées par des liaisons hydrogène et de conformations syn ou anti. Des protéines chaperones comme la topoisomérase 1 et Rap1 favorisent la formation des structures quadruplex ainsi que la teneur en ions sodium et potassium tandis que les hélicases sélectives les défont. Le rôle de ces structures quadruplex est probablement de protéger les télomères (« capping »), de participer aux recombinaisons chromosomiques, et d'influencer la transcription génique en impliquant dans leur structure des promoteurs de gènes tels que c-Myc (Figure 14). Elles sont actuellement la cible toute désignée de nouveaux essais thérapeutiques visant à empêcher l'action de la télomérase et le maintien de la taille des télomères (cf infra).

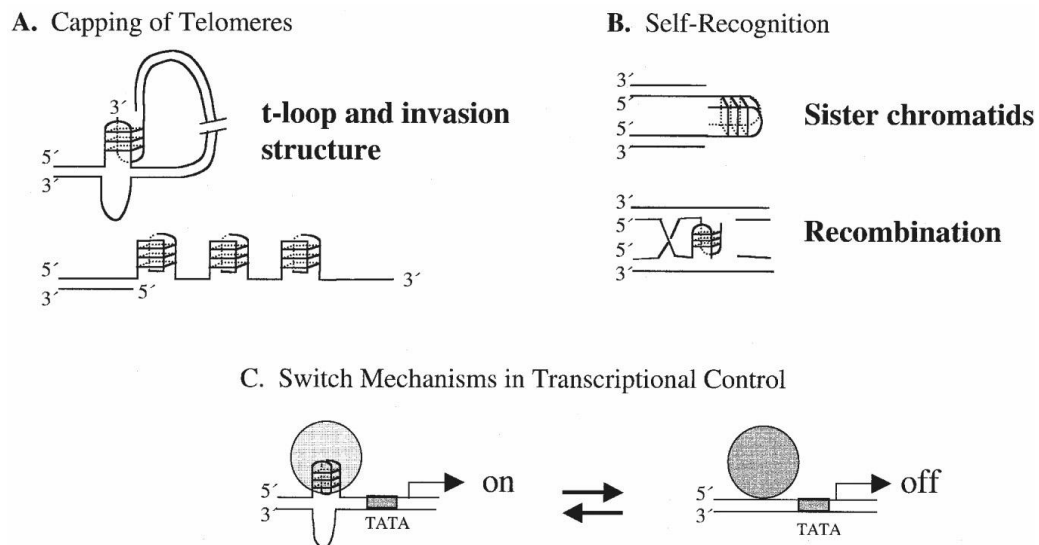


**Figure 12: Boucles télomériques T et D et protéines associées aux télomères (D'après Rezler et al 2003)**



**Figure 13: Formations des tétrades et des structures quadruplex G (D'après Hurley 2001)**

Les brins d'ADN à l'extrémité des chromosomes comportent des homopolymères poly(G) qui forment des structures en tétrades (rappelant les tétrades de guanosine) s'assemblant pour former des structures G quadruplex.



**Figure 14: Rôles possibles des structures quadruplex G (D'après Hurley 2001)**

Les structures quadruplex pourraient protéger les extrémités 3' riches en guanine des chromosomes, participer à l'alignement et à l'appariement des chromosomes homologues et à la recombinaison des gènes des immunoglobulines. Elles pourraient également réprimer ou réguler la transcription de gènes à proximité.

Les télomères sont essentiels à la protection, au positionnement et à la réplication des chromosomes en empêchant les fusions termino-terminales chromosomiques, en protégeant l'extrémité des chromosomes de la dégradation enzymatique exonucléolytique (Makarov et al 1997), en intervenant dans la régulation de l'expression de gènes (effet positionnel) ou facilitant le maintien de l'architecture nucléaire en permettant l'ancrage des chromosomes à la matrice nucléaire. Néanmoins, leur taille réduit à chaque cycle cellulaire, avec perte à chaque division de 50 à 200 nucléotides selon le type de cellule (Allsopp et al 1992, Counter et al 1992). Lorsque leur taille est inférieure à 1000 pb, soit l'équivalent en moyenne d'environ 20 cycles cellulaires restants, la cellule rentre en sénescence répllicative ou limite de Hayflick (Hayflick 1965). Ce phénomène, véritable « horloge biologique de la cellule » entraîne sa sortie du cycle (Allsopp et al 1992, Harley et al 1990). Il serait dû à l'action répllicative incomplète des DNA polymérase au niveau de l'extrémité 5' ("end replication problem"). Cet enzyme ne fonctionne que dans le sens 5'-3' et utilise des amorces ribonucléiques dont la

dégradation ultérieure entraîne la formation d'une extrémité simple brin 3'. Ces extensions simples brins sont essentielles aux fonctions des télomères (Garvik et al 1995).

### **III. Rôle de la télomérase**

La télomérase permet de palier à la réduction de la taille des télomères en permettant leur élongation. De façon physiologique, elle est réprimée dans les cellules somatiques normales mais exprimée dans les cellules germinales, les cellules souches et progénitrices ou à fort taux de renouvellement comme les lymphocytes T ou B. Une hypothèse en deux étapes permet d'expliquer à la fois la sénescence cellulaire et l'immortalisation. A la différence des cellules germinales dont la taille des télomères est conservée grâce à l'action de la télomérase, la plupart des cellules somatiques humaines subissent à chaque division cellulaire une réduction de la taille des télomères jusqu'à une taille critique qui précipite les cellules en sénescence répllicative ou mortalité M1 (Wright et al 1989) par l'intermédiaire de signaux de dommages de l'ADN mettant en jeu la voie de signalisation p53/ATM (Ijima et al 2003). Les cellules tumorales échappent à la sénescence répllicative en inactivant les gènes- verrous du cycle cellulaire que sont p53 et Rb/p16 pour continuer à se diviser et supporter d'autres pertes télomériques (Shay et al 1991). Lorsque les anomalies chromosomiques liées à la perte des télomères deviennent trop importantes, les cellules rentrent en crise de mortalité M2 caractérisée par une mort cellulaire massive (Counter et al 1992). Les rares cellules survivantes ( $1/10^7$ ) surmontent cette crise d'instabilité génétique grâce à la réactivation de la télomérase et se dotent ainsi d'une capacité de prolifération illimitée ou immortalité cellulaire.

En somme, la télomérase permet l'immortalisation de cellules transformées en leur conférant la capacité d'échapper à la crise M2 (Halvorsen et al 1999). Cependant la télomérase ne peut induire à elle seule un phénotype de cellules transformées (Jiang et al 1999, Morales et al 1999). Son inhibition peut limiter la croissance tumorale (Hahn et al 1999a), et l'expression ectopique de la sous unité catalytique hTERT en association avec celle de différents oncogènes du virus SV40 ou celle de H-ras permet la transformation de fibroblastes humains normaux ou de cellules épithéliales normales en cellules tumorales (Hahn et al 1999b).

A signaler que d'autres mécanismes dits alternatifs (ALT) de maintien de la taille des télomères existent dans les cellules tumorales en dehors de la télomérase: environ 10 à 15% des tumeurs sont télomérase négatives tout en présentant des capacités prolifératives

comparables aux tumeurs exprimant la télomérase (Bryan et al 1997). Ces cellules tumorales télomérase négatives comportent des télomères longs dont la taille atteint jusqu'à 50 kb. Ils sont le siège soit de recombinaisons des séquences télomériques soit de duplications sub télomériques. Principalement ce sont les ostéosarcomes et les carcinomes adrénocorticaux qui pour 83% d'entre eux sont télomérase négatifs et utilisent les mécanismes ALT.

#### **IV. Le complexe enzymatique de la télomérase**

Le complexe télomérasique est d'environ 1000 kDa chez les mammifères et est localisé dans le noyau sous la forme d'un assemblage de plusieurs sous unités protéiques dont les principales sont hTERT (telomerase reverse transcriptase) ou sous unité catalytique, hTEP1 (telomerase protein component 1) et hTERC ou molécule d'ARN « patron » .

##### **1. Sous unité catalytique hTERT**

La sous unité catalytique de la télomérase p123 a été initialement purifiée chez *Euplotes Aediculatus* puis chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* (Est2P), chez les protozoaires, les plantes, les mammifères puis enfin chez l'homme sous les synonymes de hTCS1, hTRT et hTERT (Meyerson et al 1997, Kilian et al 1997). Il s'agit d'un enzyme doté de propriétés transcriptase reverse mais qui se distingue des autres enzymes de la même famille de part sa composition: tous les motifs RT spécifiques sont localisés sur la moitié C terminale et hTERT comporte une région conservée spécifique, ou motif T, située en N terminal des motifs transcriptase reverse; d'autre part hTERT est doté d'une large région N terminale renfermant des domaines conservés fonctionnellement importants impliqués comme le domaine I dans des interactions avec des protéines accessoires du complexe comme EST3p chez la levure (Friedman et al 1999). hTERT est constitué de 1132 acides aminés (Harrington et al 1997) et son poids moléculaire théorique est de 127 kDa (Wick et al 1999).

Le gène hTERT est présent sous la forme d'une simple copie en situation 5p15.33 sur la partie la plus distale du chromosome 5, mais situé à plus de 2 Mb du télomère. Il contient 16 exons et 15 introns et s'étend sur plus de 40 kb (Cong et al 1999). Le gène hTERT est différemment épissé et on recense 8 transcrits détectés dans les cellules humaines dont le transcrit entier (ou « full length »), le transcrit alpha, délété de 36 nucléotides en 5' de l'exon 6, le transcrit bêta, délété des exons 7 et 8, le transcrit alpha beta, ainsi que des transcrits

comportant des insertions alternatives telles qu'une insertion de 159 nucléotides au niveau de l'intron 14, une insertion de 38 nucléotides sur l'intron 4, une insertion partielle sur l'intron 14 ou encore un remplacement de l'exon 15 et d'une partie de l'exon 16 par les 600 premiers nucléotides de l'intron 14. Tous ces variants sont exprimés au cours du développement humain sur un mode tissu et âge gestationnel dépendant, mais seul le transcrit entier est associé à une activité télomérase (Liu et al 2000). Le promoteur du gène est riche en séquence GC mais ne comporte pas de boîte TATA ou CAAT. Il contient un large îlot CpG susceptible de méthylation situé au sein d'une région de 330 bp en amont du site de début de la translation. Le site d'initiation de la transcription se situe entre 60 et 120 bp en amont. Le promoteur comporte de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription (cf régulation de la télomérase).

## 2. Sous unité ARN hTERC

Nommée parfois hTR, cette sous unité correspond à la composante ARN du complexe télomérase servant de patron à l'enzyme en vue de la synthèse de séquences télomériques. HTERC a donc une séquence complémentaire de la séquence d'ADN télomérique et est transcrit par une ARN polymérase II. Il est modifié en 3' pour fournir un transcrit de 451 nucléotides (Feng et al 1995). Sa structure primaire est conservée dans un grande variété d'espèces, et sa structure secondaire comporte quatre éléments fonctionnels dont un domaine CR2/CR3, un domaine CR4/CR5, un motif ou configuration de type H/ACA (ou hairpin-Hinge-hairpin-ACA) (CR6/CR8) et un domaine CR7. Son motif H/ACA ressemble à celui des petits ARN nucléolaires (small nucleolar RNA ou snoRNA) et semble indispensable à son accumulation, à sa maturation en 3' et à l'activité télomérase. De plus, les domaines conservés de hTERC sont des sites de fixations pour un grand nombre de protéines (hGAR, dyskerine, hNOP10, hStau, L22, hnRNP, La et hTERT) qui interagissent avec hTERC et sont impliquées dans sa stabilité, son accumulation et l'assemblage du complexe télomérasique (Le et al 2000, Mitchell et al 1999 ab, Ford et al 2001 ab). La partie qui s'étend des nucléotides 10 à 159 et qui appartient au domaine « patron » de l'ARN complémentaire de l'ADN télomérique représente la séquence minimale pour permettre l'activité télomérase. Deux fragments inactifs de hTERC comportant les nucléotides 33 à 147 et 146 à 325 sont impliqués dans sa fixation à hTERT.

Le gène hTERC est situé en 3q26.3 et des amplifications du bras long du chromosome 3 sont observées dans environ 10% des carcinomes pulmonaires ainsi qu'un nombre



augmente de copies du locus de hTERT dans 97% des carcinomes mammaires, de la tête et du cou et pulmonaires (Soder et al).

### **3. Autres protéines du complexe**

Les sous unités hTERT et hTERC représentent le « cœur » nécessaire et suffisant pour instaurer une activité télomérase ; néanmoins d'autres protéines sont utiles *in vivo* pour permettre le maintien de l'assemblage du complexe ou sa fixation à l'ADN télomérique.

Ainsi la protéine humaine TEP1 (telomerase associated protein 1) homologue de p80 isolée chez *Tetrahymena Thermophila*, comporte 2629 acides aminés dont 900 en N terminal qui interagissent avec hTERC. La région carboxy- terminale comporte 12 motifs répétitifs WD40 impliqués dans les interactions protéiques. TEP1 est détectée dans de nombreux tissus indépendamment de l'activité télomérase et son absence ne modifie pas l'activité de l'enzyme ni la longueur des télomères (Liu et al 2000).

Les protéines chaperones p23 et Hsp90 sont utiles pour l'assemblage du complexe ribonucléoprotidique et la formation de l'enzyme active. L'inhibition de la fonction de Hsp90 par la geldanamycine ou des interactions entre Hsp90 ou P23 et hTERT bloquent l'assemblage du complexe télomérase (Holt et al 1999a). Par contre une autre protéine chaperone Hsp70 ne semble pas s'assembler de façon stable au complexe.

## **V. Régulation de la télomérase**

L'activité de la télomérase est variable en fonction des cellules et des tissus. Ainsi elle est augmentée dans les lymphocytes activés (Liu et al 1999) et l'endomètre au cours du cycle menstruel (Kyo et al 1997). Par contre, la maturation terminale et la différenciation cellulaire s'accompagnent d'une répression de la télomérase (Sharma et al 1995). Enfin un certain nombre de signaux extra ou intra cellulaires module l'activité télomérase tels que les irradiations UV, l'interféron alpha, les oestrogènes et les cytokines (Ueda et al 1997, Xu et al 2000a, Misiti et al 2000, Yang et al 2001).

La régulation de l'activité télomérasique est complexe et intervient à différents niveaux, au cours de la transcription, de l'épissage de l'ARNm, de la maturation et des modifications de hTREC et de hTERT, du transport et la localisation subcellulaire de chaque

composant du complexe, de l'assemblage de la protéine active et enfin de sa fonctionnalité et de son accès aux télomères.

### **1. localisation génique et amplification:**

L'amplification du gène de hTERT est observée dans 31% des lignes cellulaires tumorales et dans 30% des tumeurs humaines (Bryce et al 2000, Zhang et al 2000b). Cette amplification se fait soit par augmentation du nombre de copies du gène (en moyenne 3 à 4 mais pouvant atteindre 20) soit due à une aneusomie et / ou à des gains en 5p (Zhang et al 2000b). L'amplification serait plus fréquente dans les cellules tumorales présentant une mutation de p53 en raison de l'instabilité chromosomique. Par ailleurs, des télomères courts peuvent modifier le profil d'expression de gènes télomériques et subtélomériques par l'intermédiaire de l'effet positionnel; néanmoins, il est peu probable que la situation distale du gène de hTERT sur le bras court du chromosome 5 (en 5p15.3) influence sa transcription car 2 Mb séparent le gène de hTERC du télomère, ce qui est considérable (Baur et al 2001).

### **2. régulation transcriptionnelle :**

Le promoteur du gène de hTERT est la cible d'un bon nombre de signaux qui impliquent plusieurs niveaux de régulation du gène. L'expression de hTERT est réprimée dans les cellules normales et le nombre de molécules d'ARNm de hTERT par cellule est inférieur à 0.004 tandis que dans les cellules télomérase positives, ce nombre varie de 0.2 à 6. Plusieurs facteurs de transcription participent à l'expression ou à la répression du gène de hTERT : Myc, Sp1, le récepteur aux oestrogènes, p53, E2F1, WT-1, NF kappa B et MZF-2.

### **Activation de la transcription de hTERT :**

C- Myc induit l'expression de hTERT, agissant comme un activateur direct de la transcription de hTERT dans les cancers prostatiques et cervicaux (Latil et al 2000a, Sagawa et al 2001) où son expression est corrélée à celle de hTERT. C-myc active le promoteur de hTERT (Oh et al 1999b), et sa transfection induit l'accumulation d'ARN messagers de hTERT dans des cultures primaires de fibroblastes (Greenberg et al 1999). L'activation du promoteur de hTERT se fait par fixation de c-Myc sur des sites spécifiques de type boîte E, qui sont occupés alternativement par des dimères Myc/Max ou Mad/1Max et sont

responsables respectivement d'une activation ou d'une répression de la transcription de hTERT. Ainsi Mad1, en formant des dimères avec Max, régule négativement la transcription de hTERT. Son expression n'est pas détectée dans un grand nombre de tumeurs alors qu'elle l'est dans les tissus normaux correspondants (Gunes et al 2000).

Par ailleurs Sp1 coopère avec c-Myc pour activer hTERT comme en témoigne la corrélation entre les expressions de C-Myc et Sp1 et celle de hTERT dans différentes lignées cellulaires analysées en western blot (Kyo et al 2000). La région 3' du promoteur de hTERT (nucléotides -242 à -34 en amont de ATG) contient des GC-box sur lesquelles se fixe Sp1. P53 peut induire une répression de hTERT en se complexant avec Sp1 et en gênant sa fixation au promoteur de hTERT. Ainsi, lorsqu'une P53 sauvage est introduite dans une lignée de cellules tumorales SiHa, l'activité de la télomérase et les niveaux d'ARN messagers de HTERT chutent dès les 36 heures qui suivent la transfection, indépendamment de l'inhibition de la croissance tumorale ou de l'induction de l'apoptose par p53. Des mutations affectant les sites de fixation de SP1 sur le promoteur de hTERT entraînent une diminution de la répression de la transcription de HTERT (Kanaya et al 2000, Xu et al 2000 b). Le mécanisme exact de l'interaction de p53 avec Sp1 n'est pas connu mais P53 sauvage peut soit former des complexes avec d'autres facteurs de transcription comme p300 gênant leur accès au promoteur de hTERT, soit à l'inverse se complexer à des inhibiteurs de la transcription comme les histones dé-acétylases.

L'activité télomérase peut être induite dans des kératinocytes humains par la protéine E6 du papillomavirus humain HPV 16. Cette activation est médiée par l'augmentation de la transcription de hTERT indépendamment de p53 ou de c-myc (Veldman et al 2001).

Le promoteur de hTERT comporte également deux sites actifs de réponse aux œstrogènes qui agissent comme activateurs directs de la transcription de hTERT dans les tissus hormono- sensibles. Ainsi le traitement de cellules ovariennes par du 17 beta estradiol induit une expression de l'ARNm et de la protéine hTERT dans les trois heures. L'activation du promoteur de hTERT s'observe également dans les lignées cellulaires de cancer mammaire où l'on note en parallèle une activation directe de hTERT par les œstrogènes et une activation indirecte médiée par c-myc (Kyo et al 1999). L'administration de tamoxifène, drogue non stéroïdienne aux effets anti œstrogènes, dans des lignées de cancers coliques et mammaires réduit leur activité télomérase (Aldous et al 1999). Le promoteur de hTERT est également une cible de la progestérone mais ses effets sont biphasiques sur l'expression de hTERT en

fonction de la durée d'administration : la progestérone induit une augmentation des ARN messagers de hTERT dans les 3 premières heures mais leur niveau décroît au bout de 12 heures probablement en raison des effets anti œstrogènes de la progestérone ou via l'induction de l'expression de p21 qui régule négativement le cycle cellulaire et induit une diminution d'expression de hTERT (Belair et al 1997).

### **Répression et régulation négative de la transcription de hTERT :**

Les cellules somatiques normales expriment des répresseurs fonctionnels de hTERT situés sur plusieurs chromosomes en 3p, 4, 6, 7, 9p et 10p. Ces répresseurs de hTERT correspondent très vraisemblablement à des gènes suppresseurs de tumeur (Shay 1999, Cuthbert et al 1999, Nishimoto et al 2001). Ainsi deux régions du chromosome 3 (3p21.3 et 3p12-21.1), sites de fréquentes pertes d'allèles ou LOH dans les cancers humains, contiennent des répresseurs de hTERT (Cuthbert et al 1999). La région 10p15.1 contient également un répresseur de hTERT mais aussi de hTERC (Miura et al 2001).

La protéine P53, inactivée dans 50% des cancers humains, inhibe à l'état sauvage la transcription de hTERT, et cette répression médiée par une interaction avec Sp1 intervient quelques heures après l'induction de p53 avant l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose des cellules.

Rb et E2F1 peuvent réprimer le gène hTERT, E2F1 exerçant alors des fonctions de suppresseur de tumeur. On ne sait pas actuellement si Rb et E2F1 agissent indépendamment ou en coopération dans un complexe represser Rb-E2F1, ni si RB et E2F1 répriment hTERT de façon indirecte en induisant l'arrêt du cycle et l'apoptose (Zheng et Lee 2001). Néanmoins des sites de fixation pour E2F1 ont été mis en évidence en amont du promoteur de hTERT (Crowe et al 2001a) et l'hyperexpression de E2F1 réprime l'activité de hTERT dans un essai luciférase reporter mettant en jeu ces sites de fixation de E2F1. L'hyper expression de E2F1 aboutit à une diminution de l'expression des ARNm de hTERT et de l'activité télomérase (Crowe et al 2001b). L'hyper expression de la cycline D1 et des cdk 2 et 4 restaurent une activité télomérase diminuée par Rb, vraisemblablement en induisant une forme inactivée de Rb hyperphosphorylée.

Une autre protéine WT1 (Wilms' tumor 1) réprime la transcription de hTERT en agissant sur son promoteur et une mutation du site de fixation de WT1 augmente l'activité du

promoteur de hTERT dans la lignée de cellules 293. A l'inverse, une hyper expression de WT1 réduit l'expression des ARNm de hTERT et l'activité télomérase (Oh et al 1999a). L'expression de WT1 est tissu dépendant (rein, gonades et rate), et son rôle dans la régulation de la transcription de hTERT est probablement restreint au contrôle de la différenciation et de la croissance des cellules rénales et gonadiques. L'inactivation de WT1 dans les tumeurs rénales ou gonadiques pourrait par contre favoriser l'activation de la télomérase

La protéine MZF-2 (myeloid cell-specific zinc finger protein 2) peut se fixer sur de nombreux sites du promoteur de hTERT, mais cette protéine étant exprimée de façon stable à la fois dans les cellules normales et dans les cellules tumorales ainsi qu'au cours de la différenciation, il n'est pas certain que MZF-2 joue un rôle majeur dans la répression du gène hTERT.

L'interféron alpha et le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor) peuvent inhiber l'expression de hTERT en agissant directement sur son promoteur.

### **Modification épigénétiques :**

L'inhibition par la trichostatine A des histones de- acétylases (HDAC) recrutées par les hétérodimères Myc/Mad dans les cellules télomérase négatives, entraîne une activité de la télomérase et une augmentation des ARNm de hTERT (Cong et Bachetti 2000). Si le promoteur de hTERT est dépourvu de boîtes E, d'autres facteurs peuvent recruter les HDAC et les inactiver comme Sp1, qui agit donc à la fois comme un activateur en coopération avec myc ou indépendamment, et comme répresseur de hTERT via son interaction avec P53 (Cong et al 1999). La région où débute la transcription de hTERT comporte un promoteur riche en GC localisé dans un îlot CpG. La déméthylation de l'ADN par la 5-azacytidine induit l'expression de hTERT suggérant un possible rôle de la méthylation du promoteur de hTERT dans la répression de la télomérase dans les cellules normales matures. Néanmoins, ces îlots CpG ne sont pas méthylés dans certains tissus télomérase négatifs ni dans des cellules en culture non immortalisées, suggérant que d'autres mécanismes que la méthylation contrecarrent l'expression de hTERT (Dessain et al 2000). Alternativement, la méthylation de hTERT dans certaines cellules transformées pourrait être considérée comme une forme de résistance transitoire contre la carcinogenèse avant le stade d'activation de la télomérase.

**Epissage alternatif :** les cellules et les tissus présentent de considérables différences en terme d'épissage alternatif, et le rôle de ces transcrits varie au cours de la régulation de la télomérase. Les protéines issues de ces différents transcrits n'ont jamais été détectées dans les

cellules mais il a été démontré que la transcription forcée d'un transcrit alpha, qui code pour une protéine dépourvue de domaine catalytique, inhibe l'activité télomérase endogène et induit l'entrée en sénescence de cellules HT 1080 et l'apoptose de fibroblastes jéjunaux en culture. Ainsi ces transcrits variants exerceraient un contrôle sur la télomérase et permettraient de réguler son activité notamment au cours du développement (Colgin et al 2000). Par exemple, la présence du transcript « full length » de hTERT et de hTERC ainsi qu'une activité télomérase sont détectés au cours de la gestation jusqu'à la 11<sup>ème</sup> semaine du développement dans le tissu cardiaque, pendant toute la gestation dans le foie. Dans le rein, l'activité télomérase et le transcript « full length » de hTERT ne sont détectés que jusqu'à la 15<sup>ème</sup> semaine, alors que les autres transcrits sont présents tout au long de la gestation. L'épissage alternatif n'interviendrait donc pas au hasard, répondant probablement de façon physiologique à certaines fonctions au cours du développement en contrôlant positivement ou négativement et en alternance l'activité télomérase de façon tissu spécifique (Ulaner et al 1998).

## **VI. Régulation de l'activité protéique de la télomérase**

### **1. Assemblage du complexe télomérase**

La télomérase se présente sous la forme d'un complexe de grande taille formant des dimères ou des polymères (Beattie et al 2001). Deux protéines hTERT inactives peuvent se compléter en *trans* pour former une protéine dotée d'une activité catalytique (Kanaya et al 2000). Ceci requiert l'intégrité d'une extrémité N terminale d'une protéine et de l'extrémité C terminale et du domaine reverse transcriptase d'une deuxième. Les ARN hTERC sont également interdépendants et fonctionnent en coopération (Wenz et al 2001). Ces données suggèrent que le cœur catalytique de la télomérase (hTERT + hTERC) fonctionne de façon coopérative comme d'autres reverse transcriptases sous la forme de deux dimères pour former un assemblage de quatre sous unités. L'assemblage de cet enzyme est également régulé par les protéines chaperones hsp90 et p23 (Akalin et al 2001). Une concentration élevée de ces protéines favorise la restauration d'une activité télomérase dans des extraits cellulaires (Akalin et al 2001). hsp90 et p23 en se fixant spécifiquement sur hTERT permettent son assemblage avec hTERC et restent fixées au complexe. La chronologie d'assemblage du complexe se fait en trois étapes : accumulation de hTERC, activation catalytique de hTERT et recrutement du complexe au niveau du télomère. D'autres protéines participent à

l'assemblage et au maintien du complexe telomerase et interfèrent probablement dans l'accessibilité de la telomerase aux télomères (Tableau III).

<b>Protéines</b>	<b>Région d'interaction</b>	<b>Fonction</b>
<b>Associées à hTERT</b>		
TEP1	Acides aminés 1-350, 601-927	Inconnue
P23/ hsp90	Acides aminés 1-195	Maintien de l'assemblage et de la conformation
14-3-3	Acides aminés 1004-1132	Localisation nucléaire
<b>Associées à hTERC</b>		
TEP1	Nucléotides 1-871	Inconnue
hGAR1	Domaine hTR H/ACA	Stabilité maturation, localisation
Dyskerin/NAP57	Domaine hTR H/ACA	Stabilité, maturation, localisation
hNOP10	Domaine hTR H/ACA	Inconnue
hNHP2	Domaine hTR H/ACA	Stabilité, maturation, localisation
C1/C2	Nucléotides 33-147	Stabilité, maturation, localisation
La	Nucléotides 1-205, 250-451	Accessibilité aux télomères?
A1/UP1	Nucléotides 1-208	Inconnue
hStau	Nucléotides 64-222	Accessibilité aux télomères?
L22	Nucléotides 64-222	Maturation de hTR, localisation?

**Tableau III: Protéines associées à hTERT et hTERC (d'après Cong et al 1999)**

## 2. Localisation sub cellulaire de hTERT

L'augmentation de l'activité télomérase dans les lymphocytes T s'associe à une délocalisation de l'enzyme qui du cytoplasme passe dans le noyau sans que l'on note une augmentation de l'expression de hTERT (Liu et al 2001). La protéine 14-3-3 est une protéine cible de la transcription P53 dépendante et permet la translocation et le verrouillage dans le noyau de nombreuses protéines aux fonctions essentielles ; p14.3.3 régule le passage de hTERT du cytoplasme dans le noyau en inhibant l'action de CRM1/exportin qui favorise la sortie de hTERT du noyau (Seimiya et al 2000). Par ailleurs, le site d'assemblage du complexe se situe dans le nucléole chez les vertébrés (Etheridge et al 2002), le nucléole étant également le lieu d'assemblage des ribosomes et d'autres ribonucléoprotéines ainsi que le site d'accumulation et de maturation de la composante ARN hTERC (Mitchell et al 1999b). Il a été démontré en immunofluorescence que hTERT était co-localisée dans le nucléole avec des protéines nucléolaires comme la fibrillarine ou la nucléoline (Etheridge et al 2002, Yang et al 2002), et cette localisation nucléolaire de hTERT ne dépend pas de celle de hTERC, qui possède par ailleurs la capacité d'entraîner hTERT avec lui dans le nucléole. En effet, hTERT, possède lui même un domaine NoLD (nucleolar localization domain) (Lukowiak et al 2001) et s'observe dans le nucléole dans des cellules dépourvues de la composante ARN du complexe télomérase et également en cas de mutation du domaine de fixation de hTERT sur hTERC. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la raison de cette localisation nucléolaire : il pourrait s'agir d'une séquestration de hTERT loin de ses cibles télomériques (Wong et al 2002), et en cela d'un mode de régulation de son activité, d'une forme de protection de hTERT contre une éventuelle dégradation ou encore d'un processus de maturation de la protéine. D'après Wong et al, la localisation de hTERT dépend du cycle cellulaire (étude à partir de fibroblastes pulmonaires IMR90 présentant au stade G1 une télomérase nucléolaire et au stade G2-S une télomérase diffuse intranucléaire), de l'état de cellules transformées (distribution nucléoplasmique de la télomérase dans des cellules tumorales fibrosarcomateuses HT1080 et dans des cellules épithéliales transformées de rein embryonnaire 293) et de l'existence de dommages de l'ADN (Wong et al 2002). Dans les cellules non tumorales, le passage de hTERT du nucléole au nucléoplasme se fait au moment de la réplication des télomères, et lors de dommages de l'ADN dus à des radiations ionisantes par exemple la télomérase se relocalise dans le nucléole afin d'éviter l'élongation de fragments d'ADN non télomériques. Cette localisation nucléolaire de la télomérase conviendrait à l'isoler des sites de réplication et de réparation de l'ADN. Dans les cellules



tumorales, la localisation de hTERT ne dépend plus du cycle cellulaire et hTERT est présent massivement dans le nucléoplasme à toutes les phases du cycle. Par contre, comme dans les cellules non tumorales, la télomérase se relocalise dans le nucléole sous l'effet de radiations ionisantes (cellules HT1080 irradiées présentant une distribution nucléolaire de la télomérase).

### **3. Phosphorylation de hTERT**

La sous unité hTERT est une phosphoprotéine dont l'activité est modulée par un complexe de protéines kinases suggérant l'existence des connections entre l'activité télomérase et les voies de signalisation impliquées dans la transduction. La protéine kinase C (PKC) est une kinase sérine/thréonine appartenant aux voies de signalisation de la transduction impliquées dans la différenciation, la prolifération et l'expression génique. PKC favorise l'activité de la télomérase via la phosphorylation de hTERT (Li et al 1998). A l'inverse, la protéine phosphatase 2A (PP2A) inhibe l'activité télomérase et PKC et PP2A sont vraisemblablement impliquées de façon alternative dans le contrôle de l'activité télomérase comme dans celui de la tumorigenèse (Li et al 1997).

La protéine kinase B (PKB ou Akt) favorise également une augmentation de l'activité télomérase en permettant la phosphorylation d'un résidu sérine de hTERT (en position 824) dans les tumeurs, cette phosphorylation étant impliquée dans l'activation de la voie de signalisation de la kinase PI3 (ou PI 3K). La télomérase semble être une cible de Akt, qui exerce par ailleurs des fonctions anti apoptotique et favorise la survie cellulaire et la prolifération au cours du vieillissement et de la tumorigenèse (Kang et al 1999). L'activation de Akt par les PIP3 via la Pi3K est inhibée par PTEN, qui possède ainsi des fonctions de gène suppresseur de tumeur en induisant l'apoptose, via l'inhibition de l'activation de Akt, mais aussi en interdisant la phosphorylation de la télomérase par cette même protéine. La tyrosine kinase c-Abl, activée lors de dommages de l'ADN, s'associe à hTERT et la phosphoryle, entraînant son activation (Kharbanda et al 2000).

### **Autres facteurs modulant l'activité catalytique de hTERT :**

La température, la concentration en dNTP, en amorces ou en potassium font varier l'activité télomérasique in vitro. Ainsi l'activité télomérasique augmente avec la température (jusqu'à 37 C), la concentration en dGTP, en amorces et en potassium (Sun et al 1999).

### **4. Rôle de hTERC**

Une mutation du gène hTERC observée dans la dyskératose congénitale est responsable de niveaux faibles de hTERC et d'une faible activité télomérase des cellules dotées de courts télomères (Mitchell et al 1999a). Par contre, à la différence de hTERT, l'expression de hTERC est constitutive, et hTERC est considéré comme un gène de ménage ubiquitaire exprimé à niveaux relativement constants, même si son expression est plus faible dans les cellules somatiques que dans les lignées cellulaires tumorales. Le gène hTERC est présent dans le génome en simple copie sur le chromosome 3q26. La sous unité ARN est transcrite par une ARN polymérase II et la forme mature de hTERC comporte un cap 5' triméthylguanosine caractéristique des particules snoRNP (small nuclear ribonucleoprotein) impliquées dans l'épissage de l'ARN. La demi-vie de hTERC dans les cellules télomérase négatives est de 5 jours environ et est augmentée 1.6 fois en présence de hTERT. Ainsi même si l'on n'observe pas de relation linéaire entre les niveaux d'expression de hTERC et l'activité télomérase, il existe une régulation de l'expression de hTERC. Le taux de transcription de hTERC est augmenté dans les cellules exprimant de façon endogène hTERT et une augmentation stable de ce taux est associée semble-t-il à une augmentation de la demi-vie de hTERC, celle-ci pouvant atteindre jusqu'à 4 semaines dans la lignée cellulaire tumorale H1299 (Yi et al 1999). Le gène de hTERC contient des îlots CpG et les éléments responsables de l'activité du promoteur appartiennent à une région de 231 bp en amont du site de début de la transcription. Le promoteur de hTERC est méthylé dans certains lignées cellulaires dotées d'un mécanisme de type ALT (Hoare et al 2001), mais néanmoins il n'y a pas d'évidence de méthylation du promoteur de hTERC dans les cellules somatiques normales. Par ailleurs hTERC comporte des motifs H/ACA qui ne sont pas indispensables à l'assemblage du complexe télomérase mais qui sont nécessaires à l'accumulation de hTERC, à son processing en 3' et donc à l'activité télomérase. Quatre protéines de type snoRNA (small nucleolar RNA) associées aux motifs H/ACA (hGAR1, NAP57/dyskerin, hNOP10 et hNHP2) fixent hTERC dont la dyskérine, protéine nucléolaire dont la mutation du gène est responsable d'une forme liée à l'X de la dyskératose congénitale (Mitchell et al 1999b). D'autres protéines de type

hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) C1 et C2 sont associées à hTERC et leur fixation conditionne la capacité de la télomérase à accéder aux télomères (Ford et al 2000). Enfin, comme hTERT, hTERC fonctionne sous la forme de dimères interdépendants agissant en coopération, permettant ainsi au complexe télomérase de réaliser l'élongation des deux extrémités de chromatides à la fois en une seule réplication.

## 5. Régulation de la télomérase par les télomères et les protéines télomériques

Il existe un rétrocontrôle négatif sur la télomérase en fonction de la longueur des télomères par l'intermédiaire d'un jeu complexe de protéines au niveau de la queue G et de la partie duplex de l'ADN télomérique qui agissent en *cis* sur l'activité télomérase. Une télomérase active n'est néanmoins pas capable de réaliser l'élongation des télomères lorsque la queue G forme des structures quadruplex, et procède uniquement à l'élongation sélective des télomères disponibles (Ford et al 2001b).

De plus les protéines télomériques TRF1 et TRF2 fixées à l'ADN double brin télomérique modulent l'activité de la télomérase (Bilaud et al 1997, Broccoli et al 1997a). Leur rôle consiste à maintenir la structure de la chromatine télomérique et à réguler la taille des télomères en modulant l'accès de la télomérase au niveau des extrémités des chromosomes. D'autres protéines qui interviennent dans la réparation de l'ADN (complexes Ku et Rad50/Mre11/NBS) semblent jouer également un rôle dans le maintien de la taille des télomères et interagiraient avec TRF1 et TRF2. TRF1 et TRF2 possèdent un domaine qui contient un motif hélice- tour- hélice apparenté aux domaines de type Myb (Bilaud et al 1997, Broccoli et al 1997a). Néanmoins la fixation à l'ADN nécessite deux domaines Myb, d'où la nécessité pour TRF1 et TRF2 de former des homodimères (Broccoli et al 1997a, Bianchi et al 1997).

La protéine TRF1 est codée par un gène en 8q13 chez l'homme et son ARNm est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus somatiques humains sous la forme d'un transcrit de 1.8 kb (Chong et al 1995). Cette protéine de 60 kb est composée de 439 acides aminés et comporte en plus de son domaine Myb carboxy-terminal, un signal de localisation nucléaire NLS et une région amino terminale acide permettant son homodimérisation et sa fixation à l'ADN télomérique. Le niveau d'expression de TRF1 ne varie pas en fonction du cycle cellulaire (Chong et al 1995, van Steensel et de Lange 1997, Broccoli et al 1997b). La protéine Pin2 est codée par le même gène que TRF1 mais est déletée de 20 acides aminés

(Shen et al 1997). Elle joue un rôle au point de contrôle G2/M en faisant le lien entre la machinerie de régulation de la taille des télomères et le contrôle de l'entrée en mitose, via une interaction avec une NIMA kinase codée par le gène *nimA* (never in mitosis A) et qui phosphorylée permet la transition en G2-M (Shen et al 1997). L'hyperexpression de Pin2 induit l'apoptose des cellules à courts télomères (Kishi et al 2001). TRF1 n'affecte pas par lui-même l'activité intrinsèque de la télomérase mais limite l'accessibilité du télomère à l'action de la télomérase (Van Steensel et de Lange, 1997). Il induit également un repli des télomères sous la forme d'une structure en boucle T au sein de laquelle l'extrémité simple brin 3' est enfouie (Smogorzewka et al 2000) et régule négativement la taille des télomères en *cis*. La surexpression de TRF1 dans une lignée de fibroblastes télomérase- positifs provoque une diminution de la taille des télomères (Van Steensel et de Lange 1997), tandis qu'à l'inverse, l'expression d'un dominant négatif de TRF1 provoque l'élongation de ceux ci.

L'expression de la protéine TRF1 ou de son ARN messager est diminuée dans les lésions inflammatoires gastro intestinales et disparaît dans les tumeurs gastro intestinales et mammaires (Yamada et al 2002, Kishi et al 2001). De même, les cellules de méningiomes et d'astrocytomes les plus différenciées et Ki67 négatives expriment TRF1 à l'inverse des astrocytomes prolifératifs et anaplasiques tous TRF1 négatifs (Aragona et al 2001). En revanche, une expression de l'ARNm de TRF1 a été rapportée dans 36% des hyperplasies alvéolaires atypiques (AAH) de bas grade, dans 65% des AAH de haut grade et dans 88% des carcinomes bronchioloalvéolaires parallèlement à une augmentation des niveaux des ARN messagers de hTERT. A noter que ces lésions pré-tumorales et tumorales ont de faibles capacités prolifératives par rapport aux adénocarcinomes classiques, leur comportement étant comparable à ceux des méningiomes ou des astrocytomes de bas grade (Nakanishi et al 2003). Dans les cellules tumorales télomérase positives à haute cadence de prolifération, les protéines Pin2/TRF1 fixées aux télomères agiraient comme un signal indiquant que les télomères sont suffisamment longs pour permettre aux cellules de continuer à se diviser. A l'inverse dans les cellules dépourvues de télomérase, une concentration élevée de ces protéines libres indiquerait que les télomères sont trop courts pour autoriser de nouvelles divisions cellulaires (Steinert et al 2000).

Le gène de TRF2 est situé en 16q22.1 et génère un transcrit majoritaire de 3kb et un transcrit alternatif de 1,8kb, codant pour un doublet de protéines de 65 et 69 kDa. La protéine

TRF2 comporte 460 AA et son architecture est similaire à celle de TRF1, excepté la présence d'une extrémité amino terminale basique, qui empêche la formation de dimères TRF1/TRF2,

Régulation positive	Régulation négative
<i>Facteurs de transcription :</i>	
<b>C-Myc</b>	<b>MAD1</b>
<b>SP1</b>	<b>MZF2</b>
<b>ER</b>	<b>Rétinoïdes</b>
<b>NF-kappa B</b>	<b>WT1</b>
<b>USF</b>	<b>MENIN</b>
<b>HPV16 E6</b>	<b>SP1, SP3</b>
<b>LANA</b>	<b>p53</b>
<b>SV40</b>	<b>E2F-1</b>
<b>Ras</b>	<b>3p14.2-p21.3</b>
<i>Kinases et phosphatases</i>	
<b>Protéine kinase C</b>	<b>Protéine phosphatase 2A</b>
<b>Akt</b>	<b>c-ABL</b>
	<b>Src</b>
<i>Autres modulateurs :</i>	
<b>HIF1</b>	<b>PTEN</b>
<b>Bcl-2</b>	
<i>Protéines télomériques :</i>	
<b>Tankyrase</b>	<b>TRF1</b>
<b>hnRNP A1</b>	<b>TIN2</b>
	<b>PINX1</b>
	<b>POT1</b>

**Tableau IV : Facteurs modulateurs de l'activité télomérase**

mais n'interfère pas dans la compétition entre TRF1 et TRF2 pour la fixation à l'ADN télomérique (Broccoli et al 1997a, Bianchi et al 1997, Bilaud et al 1997). TRF2 est impliquée dans le maintien de la structure simple brin de l'extrémité des télomères en jouant un rôle

majeur dans la formation des boucles T. Elle coiffe l'extrémité des chromosomes, y compris ceux dont les télomères sont très courts, les protégeant des fusions interchromosomiques et de l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire. A l'inverse l'inhibition de TRF2 induit une activation de la voie p53/ATM de réponse aux dommages de l'ADN et induit donc l'apoptose des cellules. Comme TRF1, TRF2 est un régulateur négatif de la taille des télomères, mais agit semble t il indépendamment de la télomérase. Dans les cancers gastriques, l'expression de TRF2 est selon les auteurs soit diminuée (Yamada et al 2002) soit augmentée notamment lorsque les tumeurs présentent de courts télomères (Matsutani et al 2001). Les ARN messagers de TRF2 sont détectés dans 82% des hyperplasies alvéolaires atypiques et dans 88% des carcinomes bronchioloalvéolaires (Nakanishi et al 2003).

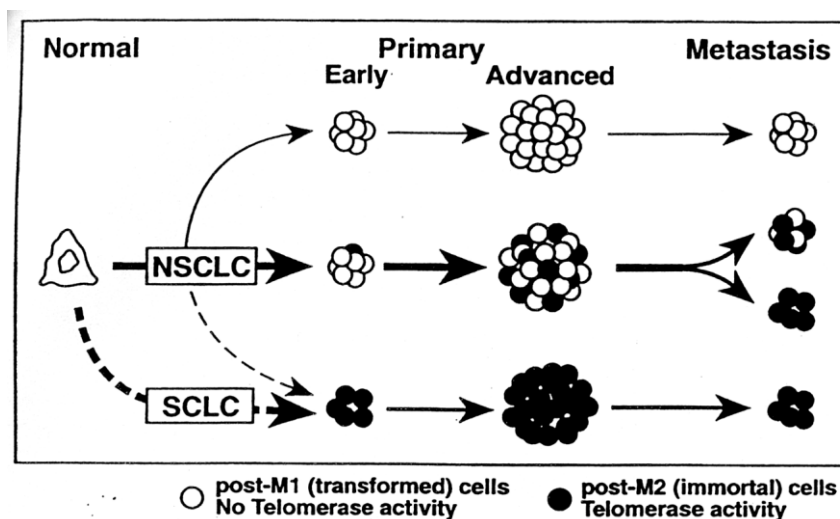
## **VII. Télomérase et cancers des voies aériennes supérieures et inférieures**

Environ 60% à 90% des carcinomes pulmonaires non à petites cellules expriment la télomérase, l'appréciation de cette activité se faisant soit par TRAP soit par étude des niveaux d'expression des ARN messagers de hTERT. Selon les séries, les adénocarcinomes et notamment les carcinomes bronchioloalvéolaires ont une place à part, exprimant moins fréquemment et a un plus faible niveau la télomérase que les carcinomes malpighiens ou les carcinomes à grandes cellules (Hiyama K et al 1995, Arendht et al 1997, Marchetti et al 1996, Kumaki et al 2001).

**Tableau V: Revue de la littérature concernant les niveaux d'activité télomérase évaluée par technique TRAP dans les différents types histologiques de carcinomes non à petites cellules pulmonaires (à l'exclusion des tumeurs NE) :**

	<b>Carcinomes malpighiens</b>	<b>Adénocarcinomes</b>	<b>Carcinomes à grandes cellules</b>
	<i>Nb de cas positifs/nb étudiés (%)</i>	<i>Nb de cas positifs/nb étudiés (%)</i>	<i>Nb de cas positifs/nb étudiés (%)</i>
<b>Albanell et al 1997</b>	30/36 (83.3%)	48/56 (85,7%)	6/7 (85.7%)
<b>Fujiwara et al 2000</b>		22/25 (92%)	
<b>Hiyama K et al 1995</b>	46/52 (88.5%)	45/65(69%)	
<b>Kumaki et al 2001</b>	41/45 (91.1%)	50/54 (92.6%)	12/12 (100%)
<b>Marchetti et al 1996</b>	34/57 (60%)	24/34 (71%)	4/6 (67%)
		BAC : 4/ 10(40%)	

L'expression de la télomérase dans les carcinomes à petites cellules serait retrouvée dans 90 à 100% des tumeurs, les niveaux d'expression étant soit comparables soit supérieurs à ceux observés dans les cancers non à petites cellules (Hiyama K et al 1995). Néanmoins, si l'on admet que le niveau d'activité de la télomérase reflète le rapport nombre de cellules mortelles /nombre de cellules immortelles, les carcinomes à petites cellules dont les cellules se situent en phase post M2 et surexpriment hTERT pour la plupart, présenteraient un avantage certain en terme d'immortalisation. A l'inverse, les carcinomes non à petites cellules, principalement composés de cellules mortelles « pré-M2 » dotées de télomères dont la taille n'est pas suffisamment critique pour entraîner une activation de la télomérase, contiennent un petit nombre de cellules qui pourront échapper à la crise M2 et acquérir l'immortalité (Figure 15). Les carcinomes à petites cellules présentent de nombreuses pertes alléliques en 3p, 13q14, 5q21, 17p13 et sur le chromosome 4 entre autres (Wistuba et al 2000b) traduisant une pression de sélection clonale s'exerçant de façon répétitive sur des cellules qui ont déjà par ailleurs subi de nombreuses divisions cellulaires à l'aide de la télomérase. A l'inverse la majorité des cellules des carcinomes non à petites cellules au moment du diagnostic n'ont pas subi autant de divisions cellulaires ni approché la crise.



**Figure 15: Chronologie d'expression de la télomérase dans les carcinomes à petites cellules et les carcinomes non à petites cellules (d'après Hiyama K et al 1995)**

Dans la série de Gomez-Roman et al (2000) portant sur l'activité télomérase dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires, les carcinoïdes typiques expriment tous la télomérase (4/4 cas) mais à un niveau d'activité enzymatique faible à la différence des carcinoïdes atypiques (3 cas étudiés), des carcinomes à grandes cellules (4 cas étudiés) et des carcinomes à petites cellules (2 cas) ( $p < 0.01$ ). Les auteurs en déduisent que ceci reflète probablement l'incapacité des cellules tumorales des carcinoïdes typiques à surmonter la crise M2, ce qui régule leur croissance, ces cellules étant pour la majorité hors du cycle, en quiescence réversible ou en phase terminale de différenciation. A l'inverse les autres tumeurs NE d'agressivité intermédiaire (carcinoïdes atypiques) ou élevée (carcinomes neuroendocrines à grandes cellules et carcinomes à petites cellules) peuvent surmonter la crise M2 et proliférer indéfiniment à l'aide de la télomérase. Plus récemment une étude portant sur une série plus conséquente de tumeurs neuroendocrines pulmonaires met en évidence un signal TRAP dans 93% des carcinomes à petites cellules, 97% des carcinomes neuroendocrines à grandes cellules et dans seulement 7% des carcinoïdes typiques, sans mention du statut des carcinoïdes atypiques (Zaffaroni et al 2003). L'absence d'expression de la télomérase dans les carcinoïdes typiques est corrélée à l'absence d'expression en immunohistochimie de Bcl2, p53 et c-kit tandis qu'à l'inverse, une hyperexpression de Bcl2, une accumulation de p53 ou une perte de Rb s'observent dans les tumeurs neuroendocrines de haut grade, exprimant fortement la télomérase dans leur grande majorité.

Enfin selon Hiyama K et al, il n'existerait pas de corrélation entre les niveaux d'activité de la télomérase et la longueur des fragments de restriction terminaux (appelés parfois TRF) dans les cancers pulmonaires. Une fois la télomérase activée, les télomères peuvent se stabiliser à n'importe quelle longueur, les TRF étant souvent plus courts dans les cancers pulmonaires que dans le poumon normal. A l'inverse, les cancers pulmonaires dépourvus d'activité télomérase présentent des fragments de restriction de taille équivalente à celle observée dans les cellules normales adjacentes. La proportion des cellules tumorales télomérase négatives à courts TRF serait alors vouée à la sénescence.

Enfin l'activité télomérase serait plus fréquente ou plus élevée dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules ayant une P53 mutée (Wu et al 1999, Maniwa et al 2001, Ohmura et al 2000).



## **1. Implication pronostique de l'expression de la télomérase dans les carcinomes non à petites cellules**

Plusieurs auteurs notent une influence de l'activité de la télomérase sur la survie dans les carcinomes non à petites cellules par étude TRAP (Albanell et al 1997, Taga et al 1999, Fujita et al 2003) avec pour certains une corrélation avec le degré de dédifférenciation et le stade (Hara et al 2001). A l'inverse selon Hirashima et al (2001) si l'activité télomérase varie selon l'histologie et est plus élevée dans les carcinomes à petites cellules que dans les non à petites cellules, elle n'est pas corrélée au stade.

Dans les cancers non à petites cellules pulmonaires de stade I, une corrélation inverse a été retrouvée entre les niveaux d'expression télomérasique (évaluée par technique TRAP ou par mesure des niveaux d'expression des ARN messagers de hTERT par RT-PCR quantitative) et le grade histologique, la survie ou le taux de récurrence de la maladie tumorale (Marchetti et al 1999, 2002). D'autres études montrent une association entre activité télomérase et diffusion métastatique aux ganglions médiastinaux (Hiyama K et al 1995, Hara et al 2001). L'expression de la protéine hTERT analysée par immunohistochimie serait également corrélée à la survenue de métastases (Toomey et al 2001).

A l'opposé, d'autres séries ne montrent pas de corrélation entre les données cliniques et l'expression des ARN messagers de hTERT (Arinaga et al 2000, Komya et al 2000) ni d'influence sur la survie (Toomey et al 2001, Lu et al 2004). Xinarianos et al (1999) observent une relation entre les niveaux élevés d'activité télomérase et la consommation tabagique.

Enfin Sozzi et al ont évalué la quantité d'ADN circulant chez des patients porteurs de cancer pulmonaire non à petites cellules en comparaison avec une population témoin de patients appariés par âge, sexe et consommation tabagique, par technique d'amplification PCR en temps réel du gène hTERT. Les niveaux d'ADN libre circulant détectés chez les patients porteurs de cancer sont supérieurs à ceux observés chez les patients fumeurs sans cancer dès le stade I, permettant de proposer ce test pour la détection précoce du cancer (Sozzi et al 2003).

## 2. Télomérase dans les lésions préneoplasiques pulmonaires

D'après Shibya et al (2001), une élévation des ARN messagers de hTERT et la présence d'une activité télomérase s'observent dans 33% des métaplasies malpighiennes (5/15), 35% des dysplasies (8/23) sans précision concernant le degré de sévérité de ces lésions, et dans 100% des carcinomes malpighiens étudiés soit 17 cas. D'autres auteurs mentionnent une absence de détection d'activité télomérase évaluée par technique TRAP ou par TRAP in situ dans des cellules dysplasiques bronchiques obtenues par brossage bronchique (Kakihana et al 2002). Soria et al (2001) ont étudié la présence par hybridation in situ de l'ARN messager de hTERT dans 266 biopsies bronchiques réalisées chez 57 patients fumeurs et renouvelées après traitement par rétinoïde N-(4-Hydroxyphenyl) rétinamide (4-HPR) ou placebo. L'ARNm de hTERT a été détecté dans 60% des cas toutes histologies confondues (170/266), dans 60% (93/154) des biopsies réalisées en muqueuse normale, 68% (73/107) des métaplasies malpighiennes et dans 4/5 dysplasies. Après traitement par 4-HPR, les niveaux d'expression de l'ARNm de hTERT étaient significativement diminués ( $p=0.01$ ) quelque soit le type de lésion histologique considéré, plaidant en faveur d'une possible efficacité d'un traitement chimiopréventif chez les patients à haut risque de cancer bronchique. D'autre part, l'étude de l'expression de la sous unité hTERC analysée par hybridation in situ (Yashima et al 1997) révèle de faibles niveaux de hTREC dans l'épithélium bronchique prédominant dans les cellules basales, des niveaux modérés d'expression dans les métaplasies, les dysplasies et les carcinomes in situ, et une augmentation abrupte et considérable de l'expression de hTERC au voisinage des zones d'invasion, témoignant d'un recrutement précoce de la sous unité ARN de la télomérase au cours du processus de carcinogénèse. Ces mêmes auteurs ne détectent pas de sous unité hTERC dans les hyperplasies alvéolaires atypiques en hybridation in situ à l'aide d'une sonde radioactive alors que Nakanishi et al (2003) mettent en évidence les ARNm de hTERT et hTERC par technique d'hybridation in situ non radioactive dans 27% des AAH de bas grade, 77% des AAH de haut grade et 97% des carcinomes bronchioloalvéolaires.

## VIII. Télomérase dans les autres cancers

Le niveau d'expression de la télomérase, que ce soit par mesure de l'activité par essai TRAP ou par quantification des ARNm de la sous unité hTERT ou encore par étude

immunohistochimique de la protéine, semble corrélé à l'évolution de la maladie cancéreuse dans bon nombre de tumeurs humaines, mammaires (Hiyama E et al 1996), gastriques (Tahara et al 1995, Hiyama E et al 1995b), colo-rectales (Tahara et al 1995 et 1999), rénales (Paradis et al 2001), les leucémies (Counter et al 1995) ou encore les neuroblastomes (Hiyama E et al 1995a, Poremba et al 2000). En ce qui concerne les tumeurs des tissus mous, l'évaluation de l'activité télomérase ne permet néanmoins pas de distinguer une lésion bénigne réactive d'une tumeur de bas grade toutes deux télomérase négatives quand seulement 55% des sarcomes de haut grade expriment la télomérase (Yan et al 1999a). Par contre, 98% des mésothéliomes expriment hTERT, quel que soit leur type histologique et se différencient ainsi des lésions pleurales bénignes (Kumaki et al 2002). Pour certains auteurs, l'étude du niveau d'activité télomérase dans les tumeurs humaines serait un outil à la fois diagnostique précoce (Hiyama K et al 1995) et pronostique (Tahara et al 1995, Hoos et al 1998), permettant également de suivre l'efficacité d'un traitement chimio ou radiothérapeutique (Hoos et al 1998).

Le dosage de l'activité télomérase à des fins diagnostiques précoces ou pronostiques est également réalisable à partir de nombreux prélèvements cytologiques, cervicaux (Takakura et al 1998), vésicaux (Lee DH et al 1998), coliques, buccaux ou bilio-pancréatiques, provenant de lavages, de ponctions de collections liquidiennes ou de sécrétions naturelles. La présence de cellules tumorales circulantes de cancer mammaire (Soria et al 1999) vésical (Soria et al 2002) ou colique (Gauthier et al 2001) a été détectée grâce à la mesure d'une activité télomérase par TRAP ELISA réalisée à partir d'extraits de cellules isolées par billes magnétiques couplées à l'anticorps BerEP4. D'autres équipes ont démontré la faisabilité de la détection des ARN hTERC et de hTERT par RT PCR quantitative dans le sérum de patients atteints de cancer (Chen et al 2000, Dasi et al 2001).

La plupart des études portant sur la carcinogenèse du col utérin ont mis en évidence une activité télomérase dans 23 à 56% des dysplasies de bas grade, dans 26 à 90% des dysplasies de haut grade et dans moins de 10% de l'épithélium cervical normal (Jarboe et al 2002). Selon Snijders et al, l'activité télomérase, détectée dans seulement 40% des lésions préneoplasiques cervicales de haut grade et dans les carcinomes du col utérin, est corrélée avec des niveaux élevés d'ARN messagers de la sous unité hTERT et d'ADN des sous types oncogéniques du papillomavirus (Snijders et al 1998).

Les lésions dysplasiques de haut grade de la cavité orale expriment également de hauts niveaux d'ARN messagers de hTERT observés dans 75% des dysplasies modérées et 100% des dysplasies sévères (Kim et al 2001). Au cours de la carcinogenèse colorectale, la télomérase est exprimée dans 100% des adénomes dysplasiques de haut grade et des cancers, et seulement dans 20% des adénomes dysplasiques de bas grades, survenant plus tardivement que la mutation de ras mais plus précocement que celle de p53 (Yan et al 1999b). Enfin 70% à 75% des carcinomes in situ mammaires présentent une activité télomérase déterminée par technique TRAP parfois à partir de prélèvements microdisséqués (Tsao et al 1997, Umbricht et al 1999).

## **IX. Thérapeutiques anti-télomérase**

Les inhibiteurs de la télomérase se divisent en fait en trois grandes catégories : les agents agissant au niveau génique de l'ADN et de l'ARN messager de hTERT ainsi qu'au niveau des protéines chaperones et des kinases qui participent à l'assemblage du complexe, les agents dont la cible est directement le cœur du complexe c'est à dire hTERT et hTERC, enfin les agents qui se fixent à l'ADN télomérique et qui gênent donc l'accessibilité de l'enzyme aux séquences télomériques.

### **1 Inhibiteurs de la télomérase anti hTERT ou hTERC (Figure 16)**

Leur principe est d'empêcher l'action de la télomérase dans les cellules tumorales uniquement et de générer le minimum d'effet cytotoxique dans les cellules normales d'autant que l'administration de ces drogues anti hTERT ou anti hTERC doit se faire à long terme. En effet, les télomères ayant une longueur moyenne de 5kb, 50 cycles de réplication environ sont nécessaires pour engendrer la sénescence ou l'apoptose ce qui, pour une tumeur ayant un temps de doublement de 24 heures, ne s'observera qu'au bout de 100 à 120 jours. L'utilisation de petites molécules d'ADN ou d'ARN présentant des modifications phosphodiester altère la pénétration intranucléaire de hTERC, son affinité et sa spécificité de fixation. L'inhibition de la télomérase est rendue possible grâce à l'utilisation de PNA (peptide nucleic acid) formant des liaisons N(2-aminoethyl) glycine entre les bases, ou d'oligomères DNA formant des liaisons phosphorothioate (PS), d'oligomères ADN formant des liaisons phosphormidite (PN), d'oligomères ARN dont les anneaux ribose sont méthyl

substitués ou méthoxyethyl substitués (2-OMe RNA et 2-MOE RNA respectivement) ou de molécules hybrides ARN-ADN. Les PNA s'hybrident avec des régions spécifiques de hTERC qui présentent une activité inhibitrice de la télomérase à des concentrations nano et pico moléculaires. Cependant ils présentent des propriétés pharmacologiques peu satisfaisantes et une forte toxicité. Les oligomères ADN comportent des séquences complémentaires de sites spécifiques de hTERC, mais se fixent également de façon non spécifique à des protéines, si bien que l'inhibition de la télomérase par ces molécules résulte probablement plus d'une interaction avec hTERT qu'avec hTERC.

Les oligomères ARN 2-OMe et 2-MOE et leur hybrides ADN ont une forte affinité pour hTERC et inhibent l'activité télomérase au niveau nano moléculaire. Une nouvelle molécule chimérique constituée d'un oligomère antisens ADN sur lequel est fixé un résidu 2',5'-oligoadenylate (2-5A) permet d'obtenir l'apoptose massive de cellules cancéreuses ovariennes sans affecter les cellules ovariennes normales. La partie ADN oligomère se fixe à hTERC tandis que la partie 2',5'-oligoadenylate (2-5A) recrute et active une endoribonucléase (RNaseL) qui clive la région proximale de hTERC.

L'activité télomérase est également inhibée par la fixation à hTERT de composés non nucléosidiques synthétiques comme le (2-((E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enoylamino)-benzoic acid) ou BIBR1532 développé par Boehringer qui provoque un raccourcissement des télomères de 4 à 1.5Kb sur une période de 140 doublements cellulaires et entraîne les cellules en sénescence. En fait les inhibiteurs de hTERT n'affectent pas l'activité télomérase en se fixant à hTERT mais plutôt en agissant comme compétiteurs avec les substrats déoxyribonucléotides utilisés par cette reverse transcriptase. Des analogues des nucléosides peuvent également être utilisés comme inhibiteurs de l'activité reverse transcriptase de hTERT comme le 6-thio-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (TDG-TP).

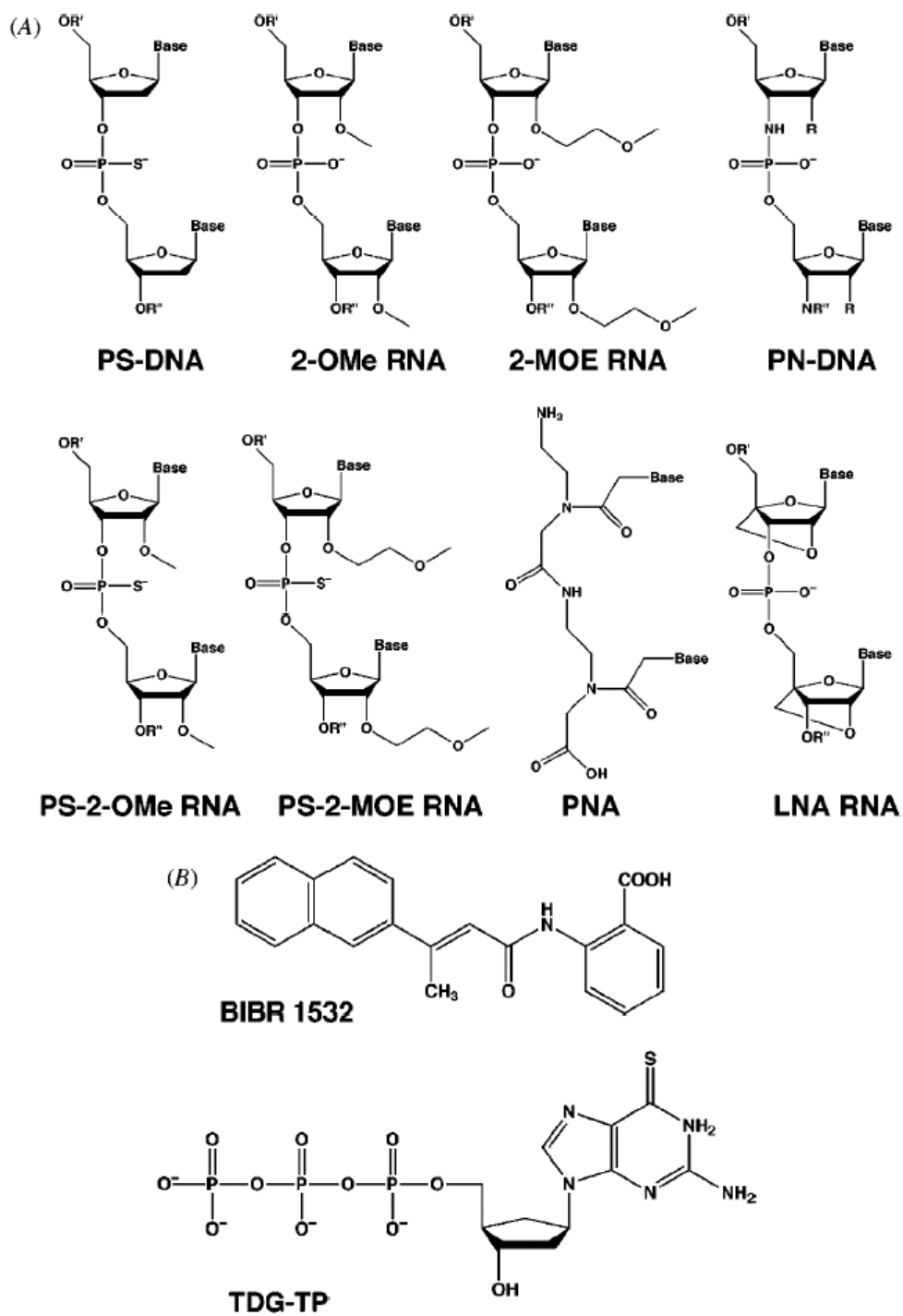
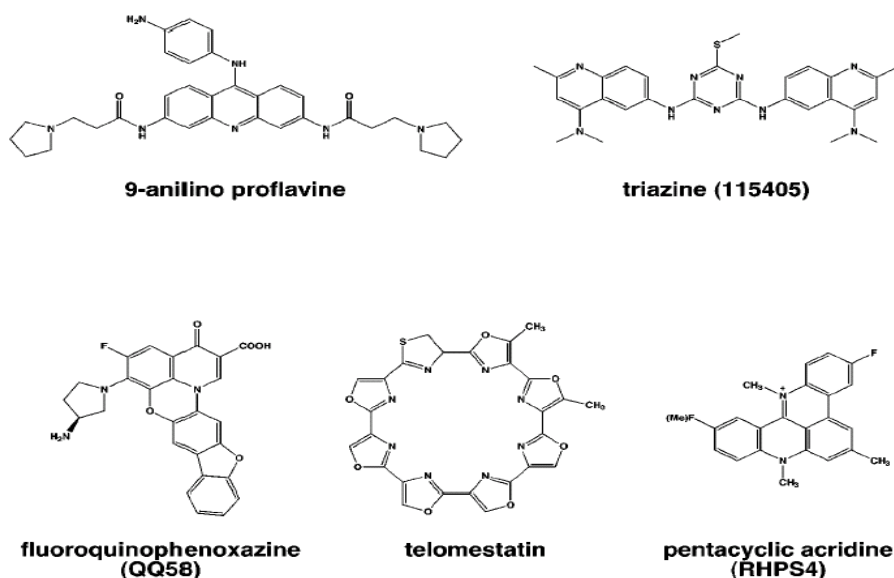


Figure 16: Différents oligonucléotides ciblant hTERC (A) ou hTERT (B)  
(D'après Rezler et al 2003).

## 2. Inhibition directe du maintien des télomères (Figure 17)

L'induction du « repli » des télomères en structures quadruplex permet d'empêcher l'action télomérase. Ces structures peuvent être stabilisées par un niveau approprié de potassium ou par leur fixation à un certain nombre de ligands, induisant une inhibition de la croissance cellulaire et l'entrée en sénescence ou en apoptose sans requérir une attrition télomérique. Les ligands partagent tous la propriété de comporter un chromophore aromatique qui ressemble aux intercalants de l'ADN, et qui peut s'intercaler entre les quatuors G des structures quadruplex télomériques. La 9-nilino proflavine interagit avec les structures quadruplex intra moléculaires et minimise la formation de structures ADN duplex. Les triazines entraînent un raccourcissement des télomères suivi d'un arrêt du cycle cellulaire et la sénescence cellulaire (Riou et al 2002). Les fluoroquinophenoxazines sont des poisons de la topoisomérase II qui interagissent avec les structures G quadruplex en produisant des ponts au cours de l'anaphase (Duan et al 2001). La télomestatine, qui est un produit naturel, présente une forte affinité pour les structures G quadruplex intramoléculaires, et l'acridine pentacyclique RHPS4 via ses interactions avec les structures quadruplex G permet l'entrée en sénescence des cellules tumorales au terme de 2 à 3 semaines de traitement à des doses non toxiques.

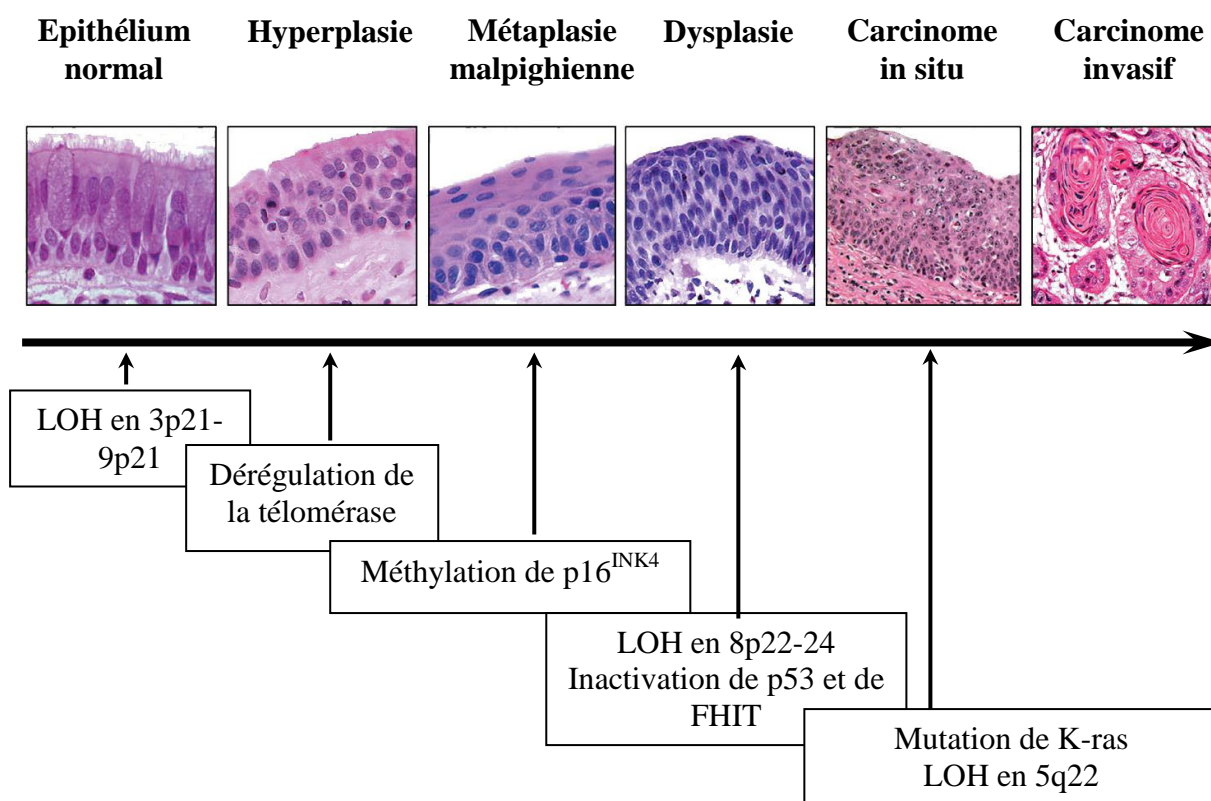


**Figure 17: Molécules inhibant le maintien des télomères (D'après Rezler et al 2003).**

## OBJECTIFS DE CETTE THESE

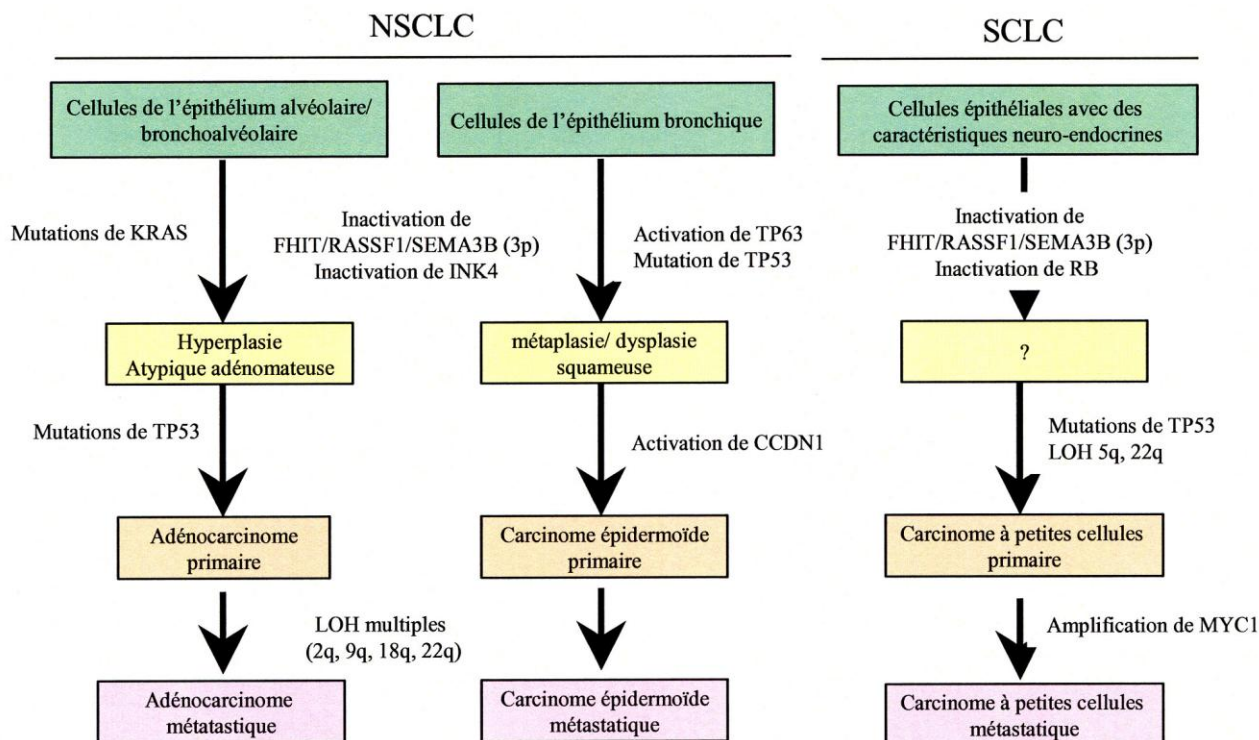
En dépit d'efforts constants dans le domaine du diagnostic et de la thérapeutique des cancers pulmonaires, la survie globale des patients reste faible, faisant du diagnostic précoce des cancers pulmonaires et de l'identification des patients à risque une priorité. Les nombreuses anomalies génétiques et moléculaires survenant au cours de la carcinogenèse bronchique, pourraient servir de biomarqueurs afin de permettre la détection précoce des cancers, d'évaluer le potentiel évolutif de lésions préneoplasiques, et de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les schémas des séquences d'apparition des anomalies moléculaires et génétiques au cours de la carcinogenèse pulmonaire actuellement proposés sont les suivants (figures 10 et 11):



**Figure 18: chronologie d'apparition des différentes anomalies génétiques et moléculaires au cours de la carcinogenèse bronchique (d'après Travis et al 2004)**





**Figure 19: Séquence d'apparition des anomalies génétiques et moléculaires au cours du développement des différents carcinomes pulmonaires, à petites cellules (SCLC) et non à petites cellules (NSCLC) (D'après Yokota et Kohno 2004)**

Les objectifs de ce travail ont été d'étudier l'expression de biomarqueurs pronostiques potentiels de la progression tumorale dans les lésions dysplasiques bronchiques et les carcinomes pulmonaires. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, en évaluant l'accumulation de la protéine en immunohistochimie, qui est un reflet relativement fidèle de la survenue de mutations du gène, et à l'inactivation des voies de signalisation du gène Rb révélée notamment par l'hyperexpression de la Cycline D1 et la perte d'expression de P16<sup>INK4</sup>. Nous nous sommes également intéressés à la perte de sensibilité à l'apoptose des cellules dysplasiques se traduisant par une inversion du rapport Bcl2 :Bax. Nous avons analysé la valeur pronostique de l'accumulation de ces anomalies moléculaires dans la prédiction de la progression de ces lésions vers des dysplasies de haut grade ou des cancers invasifs.

Nous nous sommes également intéressés à l'expression de la SEMA3F, dont le gène localisé en 3p21.3, site chromosomique à haute fréquence de délétion, est un candidat suppresseur de tumeur, et à ses récepteurs les neuropilines 1 et 2 (NP1 et NP2) qu'elle partage avec VEGF, ce dernier favorisant la survie et de migration des cellules tumorales via une boucle autocrine. Nous avons analysé la possible compétition entre VEGF et la SEMA3F sur les sites de fixations de leur récepteurs communs NP1 et 2 dans les lésions préneoplasiques et les cancers pulmonaires, en supposant que cette compétition se ferait au profit du ligand le plus exprimé, VEGF, au cours des différents états de pré invasion.

Nous avons enfin étudié l'expression de la sous unité catalytique hTERT de la télomérase dans les lésions préinvasives et invasives bronchiques comme biomarqueur potentiel de la progression tumorale. Nous avons au préalable validé l'emploi d'un nouvel anticorps monoclonal commercialisé anti hTERT afin d'évaluer son expression en immunohistochimie sur coupes tissulaires fixées dans les carcinomes pulmonaires. Les résultats de cette technique ont été comparés à ceux fournis par les techniques de référence d'évaluation de l'activité télomérase que sont la mesure de son activité par essai TRAP et la détection de l'ARN messager de hTERT par hybridation in situ. Nous avons analysé la localisation sub cellulaire de la sous unité catalytique hTERT et la valeur pronostique de son expression dans les tumeurs de stade I.

Nous avons analysé la chronologie de la réactivation de la télomérase au cours de la carcinogenèse bronchique, par rapport à l'inactivation des voies de signalisation des gènes p53 et Rb/p16, et par rapport à la séquence de raccourcissement des télomères dans les lésions préneoplasiques bronchiques dès le stade de métaplasie malpighienne par technique TEL-FISH.

## **MATERIEL et METHODES**

### **I. MATERIEL : LESIONS PRENEOPLASIQUES BRONCHIQUES ET CARCINOMES PULMONAIRES**

Les lésions préneoplasiques bronchiques que nous avons classées histologiquement selon les critères définis par la classification de l'OMS, proviennent soit de pièces opératoires de patients opérés pour cancer pulmonaire soit de biopsies bronchiques effectuées dans un but diagnostique, par endoscopie bronchique traditionnelle ou par fibroscope fluorescent LIFE. Cette dernière technique est plus particulièrement utilisée dans le cadre de la surveillance d'un patient à risque, fumeur, ayant déjà eu un cancer, ou présentant des lésions préneoplasiques bronchiques multiples. Parallèlement à l'étude de différents marqueurs pronostiques dans les lésions préneoplasiques bronchiques et leur carcinome correspondant, nous avons également procédé à leur étude dans les différentes classes histologiques de carcinomes pulmonaires non à petites cellules, comportant des adénocarcinomes, des carcinomes malpighiens, des carcinomes basaloïdes classés histologiquement selon la nouvelle classification de l'OMS (2004) et des carcinomes à petites cellules.

Nous disposons de prélèvements bronchiques congelés prélevés à l'état frais sur pièces opératoires. Les congélations sont réalisées dès acheminement de la pièce opératoire, soit dans les 15 min après l'exérèse chirurgicale. Les congélations sont effectuées en conditions stériles RNase free, les tissus étant soit congelés sur Tissue Tek OCTM compound (Sakura, Zoeterwoude, Netherlands) dans de l'isopentane immergé dans de l'azote liquide soit sur tube sec plongé immédiatement dans l'azote. Dans tous les cas, quelle que soit la technique de biologie moléculaire utilisée en aval, une coupe de 3 $\mu$  est réalisée sur cryostat et colorée au Giemsa afin de quantifier histologiquement le contingent tumoral et de statuer sur sa bonne conservation. En parallèle, nous disposons toujours de prélèvements fixés, biopsiques ou provenant des pièces opératoires, fixés en formol neutre 4% et inclus en paraffine.

## II. METHODES

### I Immunohistochimie

#### a. Immunohistochimie en technique manuelle sur coupes congelées:

Des coupes de 6  $\mu$  de prélèvements tissulaires, congelés au préalable enrobés dans du gel Tissue Tek OCTM compound (Sakura, Zoeterwoude, Netherlands) et conservés à - 80°C, sont réalisées au cryostat et recueillies sur lames de verre traitées par du 3 amino- propyltri ethoxy silane (APES). Ces coupes sont soit fixées en paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 10 min à température ambiante sous hotte (fixation des protéines nucléaires), soit séchées à l'air libre pendant 3 heures puis fixées dans de l'acétone à - 20°C pendant 10 minutes (fixation des protéines cytoplasmiques et membranaires).

PAF -solution mère 20%:

*paraformaldéhyde: 8g*

*H2O distillée: 40 ml*

*la solution est chauffée à 80°C puis tamponnée par du NaOH 10N (8 gouttes)*

On procède ensuite au blocage des sites de liaisons non spécifiques en raison d'une part de l'existence de liaisons électrostatiques et hydrophobes entre les protéines tissulaires et les réactifs utilisés et qui sont responsables de marquages non spécifiques qualifiés de "bruit de fond", d'autre part des liaisons immunologiques de faible affinité (ou réactions croisées) pouvant survenir entre les différents anticorps utilisés et les sites antigéniques tissulaires. La saturation des sites antigéniques non spécifiques s'effectue à l'aide de sérum provenant de l'animal ayant fourni l'anticorps secondaire (sérum d'âne 10% dans du PBS contenant 1% de BSA ou sérum albumine bovine) ou dans lait écrémé 2%.

Les anticorps primaires (se référer aux chapitres Matériel et Méthodes des articles correspondants pour les sources, dilutions et prétraitements) sont dilués dans une solution de PBS contenant 1% de BSA au pH 7,4. L'incubation se fera sur la nuit en chambre humide à 4°C.

L'amplification du signal utilise l'avidité de la biotine pour la streptavidine et se fait en trois étapes ou couches successives: la première concerne l'anticorps primaire, la deuxième met en jeu un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre les immunoglobulines de l'anticorps primaire (IgG d'âne anti souris ou IgG d'âne anti lapin, Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA, aux dilutions respectives de 1/500 et 1/250 dans du tampon PBS contenant 1% de BSA et à pH 8,6). L'anticorps secondaire est mis à incuber sur les lames 1 heure à température ambiante en atmosphère humide. La troisième couche est représentée par un complexe préformé de biotine streptavidine couplé à la peroxydase (StreptABCcomplex/HRP) (Dakopatts, Glostrup, Denmark) dilué dans du tampon Tris H Cl pH 7,6.

Tampon PBS 10X (Buffer Saline Phosphate):

*1,750 l NaCl 15M*

*50 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> M*

*200ml K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> L*

Tampon Tris:

*6g de Tris dans 1l d'H<sub>2</sub>O distillée*

La révélation du signal met en jeu une enzyme, la peroxydase qui en présence d'eau oxygénée fait précipiter un chromogène, la DAB (3-34 DiaminoBenzydine).

Solution de révélation

*200ml Tris Hcl pH 7,6*

*136 g Imidazole*

*100 mg DAB*

*35 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.*

Les lames sont ensuite contre colorées à l'hématoxyline de Harris puis déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante puis dans du toluène et montées au Merckoglass (Merck, Darmstadt, Germany).

Les contrôles négatifs de la technique d'immunohistochimie sont effectués en remplaçant l'anticorps primaire par une immunoglobuline provenant de la même espèce que l'anticorps et utilisé à la même dilution.

### **b. Technique d'immunohistochimie manuelle sur coupes en paraffine:**

Au préalable, les coupes dont l'épaisseur ne dépasse généralement pas 3 microns, sont déposées sur lames APES et mises à l'étuve une nuit à 56°C. Le lendemain, elles seront déparaffinées par passage dans trois bains de toluène puis dans trois bains d'alcool de concentration décroissante (100, 95 et 70%) puis rincées à l'eau distillée.

La technique d'immunohistochimie est ensuite relativement superposable à celle pratiquée sur coupes congelées. Néanmoins elle comporte quelques étapes supplémentaires que sont l'inhibition des peroxydases endogènes par immersion des lames dans 200 ml d'H<sub>2</sub>O contenant 7 ml d'eau distillée à 30% pendant 5 min, et éventuellement le démasquage antigénique par la chaleur effectué par immersion des lames au bain marie ou au micro onde (entre 5 et 60 min selon l'anticorps utilisé) dans différents tampons (tampon EDTA, MS Unmasker, Tampon citrate ou Tris citrate).

#### Tampon citrate 0,1M pH 6:

*Solution A: acide acétique 0,1 M ( C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 2H<sub>2</sub>O) 21,01 g dans 1l d'eau distillée*

*Solution B: citrate de sodium 0,1M (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>7</sub> Na<sub>3</sub> 2H<sub>2</sub>O) 29,41 g dans 1l d'eau distillée*

*Solution de travail: 41 ml de sol A , 9 ml de sol B et 500 ml d'H<sub>2</sub>O*

*(vérifier le pH et ajuster)*

#### Tampon Tris- Citrate 0,05 M:

*Solution Mère 0,5 M TRIZMA base: 60g ds 1l d'eau*

*Tampon Tris 0,05 M: dilution au 1/10 de la solution mère au pH 10,5*

*Solution de travail pH 9,15*

*tampon citrate 0,01M pH 6 : 125 ml*

*tampon Tris 0,05 M pH 10,5: 125 ml*

*MS Unmasker sol 10X (MicroStain, Martinengo, Italy)*

#### EDTA pH 8 :

*EDTA disodique 10 mmol/l*

*Hydroxyde de sodium 10 mmol/l*

**c. Technique d'immunohistochimie automatisée sur module Ventana (Tucson, USA)**

Cette technique nécessite au préalable de procéder aux étapes de déparaffinage des lames et au démasquage antigénique des sites antigéniques pour les coupes en paraffine uniquement.

Par ailleurs nous avons opté pour une titration manuelle des anticorps au lieu de l'utilisation d'une seringue d'anticorps dilué afin de diminuer le coût des anticorps en évitant le volume mort imposé par la mise en seringue.

Les lames sont disposées sur la platine du module Ventana et sont rincées par du tampon de rinçage (APK Wash Solution) chauffé à 41°C puis recouvertes d'huile (Liquid Coverslip). La chambre d'incubation est chauffée à 37°C. Une goutte d'Inhibitor (contenant de l'hydrogène peroxyde et une solution d'azide de sodium et permettant l'inhibition des peroxydases endogènes), est ensuite déposée et mise à incuber 4 min.

Les lames sont ensuite rincées et recouvertes à nouveau d'huile puis 100 µl d'anticorps primaire (dilué dans du tampon contenant de la BSA 1%, du Thimérozal 1%, du Triton 100X 1% dans du PBS pH 7,4) sont déposés manuellement et mis à incuber 32 min. Au terme de ces 32 min, les lames sont rincées et recouvertes à nouveau d'huile puis post fixées pendant 2 min avec une solution de glutaraldéhyde 25% en solution aqueuse diluée au 1/500 dans du NaCl 9°/°°.

Les lames sont ensuite rincées, recouvertes d'huile, puis une goutte d'Amplifier A (qui correspond à un anticorps IgG de lapin anti souris dilué dans du PBS et qui se fixe spécifiquement sur les immunoglobulines de souris présentes sur la coupe), est déposée sur chaque lame pour une incubation de 8 min. Après rinçage et dépôt d'huile, une goutte d'Amplifier B (contenant des IgG de souris anti lapin) est ensuite déposée sur chaque lame pendant 8 min. Ce kit d'amplification associant ces deux solutions Amplifier A et B est polyvalent, pouvant aussi bien s'utiliser avec des anticorps polyclonaux que monoclonaux.

Après rinçage, les lames reçoivent une goutte d'anticorps biotinylé universel anti souris et anti lapin pendant 8 min puis une goutte d'Avidine conjuguée à la peroxydase HRPO (Horse Radish PerOxidase) pendant également 8 min.

Après nouveaux rinçages et dépôts d'huile, une goutte de DAB (DiaminoBenzidine) et d'H2O2 est déposée sur chaque lame pendant 8 min, puis après rinçage, chaque lame reçoit une goutte de cuivre pendant 4 min. Les lames seront ensuite contre colorés à l'hématoxyline de Harris préparée manuellement (3 ml d'Hématoxyline, 4 ml d'acide acétique 90% et 3ml d'H2O) est déposée pendant 2 min.

Après rinçage, les lames sont sorties du module, et rincées dans de l'eau savonneuse puis déshydratées et montées au Merckoglass.

Pour l'immunomarquage anti télomérase, l'incubation de l'anticorps étant de 12 heures, on utilise le module Discovery qui permet d'allonger la durée d'incubation de l'anticorps au delà de 32 min au sein d'une chambre d'incubation à 42 °C. Le système d'amplification utilisé I-View associe un inhibiteur de peroxydases endogènes (I-View Inhibitor) déposé 4 min, un anticorps biotinylé (I-View Biotin Ig) mis à incuber 2 min, un complexe streptavidine-peroxydase (I-View SA-HRP) mis à incuber 8 min, une solution de DAB -H2O2 (I-View DAB et I-View H2O2) déposée 8 min et d'une solution de cuivre (I-View Copper) pendant 4 min. Les étapes de post fixation, de rinçages et de contre coloration sont identiques à celles décrites plus haut.

## **II. Western Blotting**

De 30 à 60 mg de tissus, préalablement congelés inclus dans du gel TissueTek et conservés à -80°C, sont lysés manuellement (par potérisation ou broyage manuel au bistouri en cas de tumeurs fermes) dans du tampon de lyse SDN (de 300 à 600 µl en fonction de la taille du prélèvement).

### *SDN buffer pour 1 ml de tampon*

*33,3 µl TRIS 3M*



30  $\mu$ l de NaCl 5M  
 10  $\mu$ l EDTA 0,5 M  
 25  $\mu$ l SDS 20%  
 5  $\mu$ l NP40  
 10  $\mu$ l e PMSF 100 mM  
 100  $\mu$ l Na desoxycholate 5%  
 1  $\mu$ l apostinin (1mg/ml)  
 2  $\mu$ l leupeptin (id)  
 2  $\mu$ l pepstatin (id)  
 781,7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O distillée

Les extraits sont mis à incuber 30 min dans de la glace puis centrifugés à haute vitesse (12000g) pendant 30 min. Le surnageant est récupéré et on procède au dosage des protéines (kit Bio Rad, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) afin de déterminer le volume nécessaire au dépôt de 40 mg de protéines. Chaque échantillon est re-suspendu dans du tampon de charge Laemmli à volume identique.

Tampon de charge Laemmli:

40  $\mu$ l de Tris 3M  
 200  $\mu$ l SDS 20%  
 300  $\mu$ l e de Glycérol  
 100  $\mu$ l  $\beta$  mercaptoethanol  
 pointe de bleu de bromophénol  
 260  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O distillée

Ces immunoprécipitats sont dénaturés 5 min à 100°C, puis laissés dans la glace et centrifugés brièvement. Les extraits sont alors déposés dans chaque puit, un puit étant réservé au marqueur de poids moléculaire coloré. Ils sont ensuite soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur gel d'électrophorèse, constitué d'un gel d'acrylamide 7,5% dit de concentration et d'un gel d'acrylamide 7,5% de séparation. La migration s'effectue à 100 Volts dans un tampon Tris-glycine contenant du Tris 50mM Tris, de la glycine 375 mM pH 8.3 et 0.1% SDS.

Gel de séparation:*5,425 ml d'H<sub>2</sub>O**1,875 ml acrylamide 29:1 40%**10,1 ml de SDS 10%**0,1 ml d'APS 10%**Temed 0,016 µl*Gel de concentration:*2,185 ml d'H<sub>2</sub>O**0,375 m d'acrylamide**0,38 ml de Tris**0,03ml de 10% SDS**0,03ml de 10% APS**Temed 0,006 µl*

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane d'Immobilon P par electroblotting, puis cette membrane est colorée au rouge ponceau pour vérifier l'intégrité des protéines et de leur transfert. Elle est ensuite mise à incuber pendant une heure dans un tampon de saturation contenant du Tris 25 mM, du NaCl 125 mM, du Tween 20 0.1% (tampon TBS-Tween) et 5% de lait écrémé lyophilisé. Après trois rinçages dans du tampon TBS Tween, la membrane est incubée 1 nuit à 4°C dans une solution de TBS-Tween contenant 0.8% et 1 µg/ml d'anticorps. la membrane set ensuite incubée avec un anticorps anti souris biotinylé et mis en présence d'un chromogène chémiluminescent Enhanced Chemilumiescence Reagent ECL (Amersham BioScience , Amersham, UK) déposé sur la membrane 5 min à l'abri de la lumière ; la membrane est ensuite exposée à un Hyperfilm ECL pendant 5 min.

**III. Hybridation in situ**

Le principe de l'hybridation in situ repose sur l'appariement de deux brins complémentaires d'acides nucléiques. Nous avons utilisé une sonde ARN simple brin ou ribosonde marquée à la digoxigénine dont la séquence est complémentaire de celle de l'ARN messenger de la protéine hTERT.

## 1. Synthèse de la ribosonde:

La ribosonde antisens hTERT a été synthétisée par le Dr JC Soria par transcription in vitro à l'aide d'un vecteur de clonage TOPO TA (pCR II- TOPO, Vitrogen, Carlsbad, CA) contenant un fragment de 430 bp EcoRV- BamH1 correspondant au cDNA entier de hTERT et fourni par les Drs RA Weinberg et WC Hahn (Whitehead Institute for Biomedical Research, MIT, Cambridge, MA). Les plasmides linéarisés ont été transcrits in vitro à l'aide d'une polymérase T7 ou SP6 RNA (Promega, Madison, WI) en présence de nucléotides dont l'UTP couplée à la digoxigénine pour permettre le marquage de la sonde (DIG RNA labelling kit, Roche, Diagnostics, Indianapolis, IN). La sonde a été aliquotée en présence de RNAsine (Sigma Chemicals, St Louis, MO) et stockée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les ribosondes sens et antisens actine ont été utilisés comme contrôles négatifs et positifs, le ribosonde sens hTERT ne pouvant servir de témoin négatif puisqu'elle coderait pour une protéine inconnue mais présente dans les tissus et les tumeurs pulmonaires (JC Soria, data non shown).

## 2. Protocole d'hybridation (technique manuelle):

Au préalable, la verrerie et les instruments doivent impérativement être stérilisés (6h à  $160^{\circ}\text{C}$ ) ou traités par des inhibiteurs des RNases (RNase ZAP, Sigma Chemicals, St Louis, MO) (cuves en plastique par exemple) puis rincés à l'eau DEPC (Di Ethyl Pyroxy Carbonate) (Sigma Chemical, St Louis, MO). Le port des gants est obligatoire et il faut s'abstenir de se tenir trop près des lames surtout au moment du dépôt de la sonde d'hybridation.

Des coupes de  $3\ \mu$  de tissus fixés en formol 4% et inclus en paraffine sont déposées sur lames stériles non traitées. Elles sont déparaffinées par des bains successifs de xylène (10 minutes deux fois) puis d'alcool de concentrations décroissantes (100% puis 95 % et 75%, 2 minutes pour chaque passage) et rincées dans du PBS stérile pH 7,2 (3x2 min). Les lames sont ensuite mises à incuber avec de la protéinase K (Roche Diagnostics, Meylan, France) à la concentration de  $2,5\ \mu\text{g/ml}$  15 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  (lyse des protéines couplées aux acides nucléiques). Elles sont ensuite rincées à nouveau avec du PBS puis post fixées avec du paraformaldéhyde 4 % pendant 8 minutes à température ambiante (inhibition de la protéinase K). Elles sont rincées puis traitées par du TEA (Triethanolamine 0,1M pH 8) additionné d'acide anhydride afin d'inhiber la fixation de protéines non spécifiques 10 min à température

ambiante et sur agitateur. Après un rinçage dans du PBS (3 fois deux minutes) les lames sont ensuite déshydratées par des bains d'alcool de concentrations croissantes (70, 95 puis 100%) et séchées à l'air libre 10 minutes dans un endroit protégé (sous hôte par exemple).

Entre temps, la ribosonde est diluée dans le tampon d'hybridation (40 ng de sonde à la concentration de 80 µg/ µl, dans 50 à 100 µl de tampon par lame) et dénaturée 15 minutes à 95 °C. Elle est ensuite conservée dans de la glace en attendant d'être déposée sur les lames. Celles ci sont alors recouvertes de fines lamelles plastiques (Coverslips, Grace Biolab) et placées à l'étuve 4 heures à 42 °C.

L'étape de post hybridation consiste à rincer les lames dans du SCC 2X (2 fois 5 minutes) puis à les laver dans une solution "NSS washing buffer" renfermant du sérum normal de mouton (Normal Serum Sheep) et du Triton 100X 2 h à température ambiante sous agitation; les lames sont ensuite rincées dans du tampon 1 cinq minutes puis saturées dans du tampon 1 comportant du sérum de mouton ("Tampon 1- NSS") 30 minutes à température ambiante sous agitateur. 50 à 100 µl environ d'anticorps anti digoxigénine conjugué à la phosphatase alcaline (Roche Diagnostics, Meylan, France) sont déposés par lame, l'incubation se faisant sur la nuit à 4 °C.

Le lendemain, les lames parvenues à température ambiante sont lavées dans du tampon 1 (2x10 min) puis dans du tampon 3 pendant 3 min. La phosphatase alcaline est détectée à l'aide des chromogènes suivants, le BCIP ( 5 bromo 4 chloro 3 indolyl phosphate) et le NBT (nitro blue tetrazolium chloride) (Roche Diagnostics, Meylan, France). Ainsi 300 µl de NBT/BCIP sont ensuite déposés sur chaque lame qui est placée ensuite à l'abri de la lumière. On surveille la réaction colorimétrique au cours des heures suivantes. Elle survient généralement entre 2 à 6 heures et s'arrête par immersion des lames dans du tampon 4. Les lames sont alors montées en milieu aqueux (Glycergel, DAKO Cytomation, Trappes, France).

### **Solutions:**

#### PFA 4%:

*chauffer 66.6 ml d'eau DEPC à 60°C puis ajouter 4 g de PFA, 6 gouttes de 4 NaOH et dissoudre complètement le PFA. Ajouter 33.3 ml de PBS 3X, ajuster le pH à 7.2 et filtrer la solution.*

TEA 0,1 M pH 8:

Ajouter 1,4 g de TEA -Cl à de l'eau DEPC pour faire une solution de 100 ml. Ajuster le pH à 8. Ajouter dans 50ml de TEA 125 µl d'anhydre acétique.

Tampon d'hybridation:

Pour un volume total de 10 ml, ajouter 5 ml de formamide 100% désionisé, 1ml de SCC 20X, 0,2 ml de Denhardt 100X, 1g de Dextran Sulfate, 0,16 ml de tRNA de levure à la concentration 25mg/ml, 0,5 ml de DNA de sperme de saumon à la concentration 10 mg/ml, 0,2 ml de DTT 1M et compléter avec 0,95 ml d'eau DEPC. On obtient un mélange très visqueux qui doit être mis au bain marie à 37°C sous agitateur une nuit.

Tampon de lavage NSS:

Ajouter à 50ml de SCC 2X 25 µl de Triton 100X et 1 ml de NSS (Normal Serum Sheep).

Tampon 1:

Dissoudre 14 g d'acide maléique (C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na, MW 138,1) et 8,77g de NaCl (MW 58,44) dans 900 ml d'eau DEPC. Ajouter 10g de NaOH pour ajuster le pH à 7,5 et compléter avec de l'eau jusqu'à 1 L. Autoclaver.

Tampon 1- NSS :

Ajouter 150 µl de Triton X et 1 ml de NSS dans 50ml de tampon 1.

Anticorps anti DIG-AP:

Ajouter 15 µl de Triton X et 50 µl de NSS (soit 0,3% de Triton X et 1% de tampon 1- NSS) dans 5 ml de tampon 1. Diluer l'anticorps au 1/500.

Tampon 3:

Mélanger 50ml de Tris-Cl 1M, 20ml de NaCl 5M et 25ml de MgCl<sub>2</sub> 1M avec 800 ml d'eau DEPC. Ajuster le pH à 9,5 et compléter avec de l'eau jusqu'à 1 litre. Filtrer si des précipités se forment.

NBT/BCIP:

Mélanger 45 µl de NBT dans 10 ml de tampon 3 et ajouter 35 µl de BCIP et mélanger encore. Ajouter 4 à 6 gouttes de levamisole (Vector Laboratories) et mélanger.

Tampon 4 (Tris -EDTA, TE):

Mélanger 10 ml de Tris-Cl 1M et 2ml de EDTA 0,5 M dans 1 l d'eau distillée et ajuster à 8.

### **3. Protocole d'hybridation sur automate DISCOVERY (Ventana Medical System, Strasbourg, France):**

Les grandes étapes du protocole d'hybridation sont identiques à celles de la technique manuelle. Seules changent les compositions des tampons de lavages et la durée d'hybridation.

Les lames déparaffinées sont transférées sur la platine à 42°C du module Discover et rincées dans du tampon APK Wash, puis recouvertes d'huile Liquid Coverslip. Après rinçage dans du tampon SCC 2X, elles sont traitées à la protéinase K (2,5 µg/ml) 14 min à 37°C puis après nouveaux rinçages post fixées avec du paraformaldéhyde 8% pendant 8 min à température ambiante. La ribosonde antisens est diluée à 800 ng/ml dans du tampon d'hybridation et dénaturée pendant 15 minutes à 95 °C puis déposée manuellement sur les lames pour une incubation de 8h à 42°C. Après rinçages dans du SCC 2X, les lames seront incubées sur la nuit à température ambiante avec un anticorps anti digoxigénine de mouton conjugué à la phosphatase alcaline (Roche Diagnostics, Meylan, France) et dilué au 1/100 dans une solution de NaCl 0.9 ‰ contenant du NSS 4% et du Triton 100X 0.3%. La détection de la phosphatase alcaline se fera manuellement à l'aide du NBT/ BCIP (Roche Diagnostics, Meylan, France) et le montage sera effectué en milieu aqueux.

#### *Solution de révélation NBT/BCIP*

*Préparer 100ml de Tris 0.1 M, contenant NaCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 0.5M à pH 9,5. Pour 10 ml, ajouter 50 µl de NBT et 37,5 µl de BCIP et 5 gouttes de levamisol.*

## **IV. Protocole TRAP ELISA**

### **1. Principe**

Le protocole TRAP ou Telomeric Repeat Assay Protocol permet de quantifier l'activité télomérase provenant d'extraits tissulaires ou cellulaires en mesurant le nombre de séquences télomériques produits par l'enzyme et ajoutés à un substrat TS (ou telomerase substrat). Nous avons utilisé le kit de quantification Telo TAGGG telomerase PCR ELISA<sup>plus</sup> (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) dont le principe de détection repose sur un immunoassay enzymatique photométrique. La quantification des produits d'élongation,

amplifiés par réaction de PCR, par procédé ELISA fait intervenir une sonde marquée à la digoxigénine qui va s'hybrider avec les produits d'élongation ou séquences télomériques, et sur laquelle se fixera un anticorps anti DIG couplé à la peroxydase. Celle ci va réagir avec un substrat TMB et produire une réaction colorimétrique mesurée par densité optique.

## **2. Préparation des extraits tissulaires**

Un fragment de 30 mg de tissu congelé est potérisé dans 200µl de « lysis buffer » contenant 1 µl de RNAsine puis mis à incubé dans de la glace pendant 30 min.. On procède ensuite à une centrifugation 20 min à 16 000g à 4°C. Puis on récupère le surnageant et on dose les protéines totales (kit Bio Rad, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA), afin de déterminer le volume final utile pour une concentration protéique optimale de 0.5 à 10 ng/µl. Les aliquots peuvent être stockés à – 80°C.

## **3. Réaction TRAP**

Toutes les étapes doivent se faire dans la glace en raison de la thermosensibilité de la télomérase et de la fragilité de son ARN template hTERC. La réaction TRAP comporte plusieurs étapes : la première concerne la synthèse séquences télomériques ajoutées au substrat TS par la télomérase suivie de l'amplification des produits d'élongation par réaction PCR.

En pratique, 1 à 3 µl de chaque extrait protéique tissulaire est ajouté à 25 µl de mix de PCR (Reaction Mix 2X contenant du tampon Tris, le substrat télomérase TS , les primers sens et antisens marqués à la biotine, les nucléotides et la Taq polymérase) complété avec de l'eau distillée stérile pour un volume final de 50 µl.

Les témoins négatifs sont représentés d'un part par les extraits dont la télomérase a été inactivée par chauffage 10 min à 85°C, d'autre par un échantillon contenant du Lysis Buffer sans extrait protéique. Le témoin positif est représenté par un extrait de cellules rénales humaines (293 cells) exprimant la télomérase

Les échantillons sont placés dans un thermocycler (Perkin Elmer Inc, MA, USA ) en vue de la PCR selon les modalités suivantes: élongation des primers pendant 20 min à 25°C, synthèse de cDNA et pré dénaturation pendant 5 min à 94°C, amplification par 30 cycles de

PCR (dénaturation 30 sec à 94°C, hybridation 30 sec à 50°C , extension 90 sec à 72°C, extension finale pendant 10 min à 72 °C.

#### **4. Détection de l'activité télomérase par hybridation et procédé ELISA**

Dans chaque puit d'une plaque non « coatée » de type MTP sont déposés 5 µl de produit PCR et 20 µl de solution dénaturante (contenant moins de 0.5% de sodium hydroxide), pendant 10 min à 20°C. Puis sont ajoutés 225 µl de tampon d'hybridation dans chaque puit et 100ml de cette solution sont transférés sur plaque « coatée » MTP fournie avec le kit, recouverte d'une membrane adhésive afin de limiter l'évaporation et mise à incuber à 37°C sur agitateur (300rpm) pendant 2h.

Au terme de ce délai, la solution d'hybridation est éliminée et les puits sont rincés 3x30 sec par 250 µl de solution de lavage (« Washing Buffer »). 100 µl d'anticorps anti DIG couplé à la peroxydase (polyclonal de mouton concentré à 10 mU/ml ) sont déposés par puits et mis à incubés à 20°C pendant 30 min sur agitateur (300 rpm). Les puits sont ensuite rincés et 100 µl de substrat TMB sont déposés dans chaque et mis à incubés à 20°C pendant 20 min sur agitateur (300 rpm). Lorsque la réaction colorimétrique s'est produite, la réaction est stoppée par 100 µl de « Stop Reagent ».

La lecture de l'absorbance se fait grâce à un lecteur de densité optique (Microplate Reader 3550, BIO Rad, Hercules, CA) à 450 nm de longueur d'onde, avec une longueur d'onde de référence à 690 nm 30 min après l'addition du « stop reagent ».

#### **5. Interprétation des résultats**

Pour que la technique soit valide, l'absorbance du témoin positif doit être supérieure à  $1.5 \times \text{Absorbance à } 450 \text{ nm} - \text{Absorbance à } 690 \text{ nm}$ . L'absorbance des témoins négatifs doit être inférieure à  $0.25 \times \text{Absorbance à } 450 \text{ nm} - \text{Absorbance à } 690 \text{ nm}$ .

Pour chaque échantillon, la valeur retenue correspondra à l'absorbance de l'échantillon dont on soustraira l'absorbance du témoin inactivé. Les échantillons seront considérés comme télomérase positifs si la différence entre l'absorbance lue à 450nm de celle de lue à 690 nm est supérieure à 0.2



## **V. Hybridation des séquences télomériques par technique TELO FISH (Kit DAKO Telomere PNA FISH)**

Les lames sont déparaffinées puis réhydratées dans de l'eau distillée contenant du Tween 20 0,1% pendant 5 min. On procède ensuite à une technique de démasquage par incubation des lames 3x5 min au micro onde dans du tampon citrate + saponine à pH 9,15. On laisse ensuite les lames revenir à température ambiante 15 minutes avant de les rincer dans du TBS Tween 0,1% 2 min puis dans du TBS 2x 5 min. On réalise ensuite un pré-traitement par une protéase ( Solution de prétraitement DAKO) à la concentration 1:20 dans du TBS 30 min à température ambiante. Puis les lames sont rincées 2x5 min dans du TBS et déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante et séchées à l'air.

On dépose 10 µl par lame de sonde PNA Cy3, préalablement dénaturée 10 min à 95°C, en vue d'une hybridation à température ambiante sur deux jours.

Le surlendemain, on rince les lames 1 min dans une solution de rinçage (Rinse solution 1 :50) puis 5 min dans de la Wash Solution (1 :50). Les lames sont ensuite déshydratées à l'éthanol, séchées à l'air et contre-colorées au DAPI 5 min (à la concentration de 250 ng/ml dans de l'eau distillée); elles seront ensuite rincées 2x 5 min dans du PBS puis montées en milieu anti fading Biomeda.

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

**I. Article 1 : Valeur pronostique des marqueurs immunohistochimiques dans les lésions prénéoplasiques bronchiques.** *Jeanmart M, Lantuéjoul S, Fievet F, Moro D, Sturm N, Brambilla C, Brambilla E.* Clin Cancer Res. 2003

La détection des cancers pulmonaires à un stade précoce pourrait potentiellement accroître la survie des patients de 10 à 50 fois (Wingo et al 1999). Néanmoins le dépistage des patients par la radiographie pulmonaire ou la cytologie sur expectoration n'a pas prouvé son efficacité en terme d'augmentation de la survie (Marcus 2001), d'où la nécessité de trouver des marqueurs spécifiques de la transformation maligne et d'expression précoce au cours de la carcinogenèse bronchique. L'approche idéale est donc d'identifier des biomarqueurs exprimés au cours des stades très précoces de la maladie cancéreuse, permettant de prédire l'évolution péjorative d'une lésion prénéoplasique ou l'efficacité d'une chimioprévention. Ces biomarqueurs se doivent d'être suffisamment accessibles par des approches non invasives pour les patients et d'être évaluables à une grande échelle à partir de techniques de routine comme l'immunohistochimie dans le cadre d'un dépistage. Enfin l'étude de l'expression d'une combinaison de plusieurs gènes (Kim et al 1998) devrait permettre d'accroître la signification pronostique.

L'étude de la valeur pronostique de l'accumulation d'anomalies moléculaires au cours de la carcinogenèse bronchique présentée dans ce travail s'est faite au terme de l'analyse de l'expression immunohistochimie de différents marqueurs dans les lésions prénéoplasiques bronchiques. Le but était double, préciser la séquence d'apparition de différentes anomalies moléculaires, mais surtout déterminer si l'accumulation de ces anomalies est corrélée à la sévérité et au grade des lésions prénéoplasiques ainsi qu'à la progression vers un carcinome invasif dans le champ de cancérisation. Les marqueurs d'intérêt étudiés ont été choisis parmi des éléments clés de la double voie de signalisation P53/Rb qui contrôle le cycle cellulaire et l'apoptose : il s'agit de l'accumulation de la protéine P53, étroitement corrélée à la survenue de mutation du gène, de l'expression différentielle des deux principales protéines impliquées

dans l'apoptose que sont Bax et Bcl2, évaluée par l'inversion du ration Bax:Bcl2, et de l'expression des protéines P16 et cyclines D1 et E, respectivement perdue ou hyperexprimées lors de l'inactivation de la protéine Rb par phosphorylation. Nous souhaitons ainsi confirmer l'intérêt prédictif de la progression tumorale de ces marqueurs que nous avons corrélés aux préneoplasies progressives dans deux séries rétrospectives (Brambilla et al 1998, 1999).

Cette étude prospective a été réalisée à partir de biopsies bronchiques fixées, prélevées par endoscopie bronchique classique ou grâce au bronchoscope à fluorescence LIFE. Au total, quatre vingt biopsies bronchiques ont été analysées, ces biopsies ayant été effectuées chez 48 patients, dont 31 ayant présenté un cancer pulmonaire 2 à 10 ans auparavant et 27 étant de gros fumeurs (25 à 95 paquets-années) symptomatiques, sans cancer. Ces biopsies incluaient 31 métaplasies malpighiennes, 12 dysplasies légères, 9 dysplasies modérées, 9 dysplasies sévères et 19 carcinomes in situ. Ces patients ont été suivis pendant 18 à 36 mois.

Il a été montré récemment dans une étude prospective (Breuer et al 2005) que la progression naturelle des lésions préneoplasiques de bas grade en lésions de haut grade et en cancer invasif n'est pas toujours pas systématique et que leur temps d'évolution vers le cancer invasif est imprévisible en fonction du degré de gravité de la dysplasie. La progression des lésions préneoplasiques dépendrait de signatures moléculaires traduisant la dérégulation du contrôle de la prolifération, de l'apoptose et de la migration cellulaire.

Notre étude illustre le concept de champ de cancérisation et d'accumulation d'anomalies moléculaires de façon diffuse par l'arbre bronchique, confirmant l'existence de lésions préneoplasiques multiples chez 41% des patients et l'association de la moitié des CIS à une autre lésion de haut grade, conformément aux études de Venmans et al (2000), Bota et al (2001) et de Moro-Sibilot et al (2004).

Par ailleurs, il existait une étroite corrélation entre le degré de sévérité des lésions histologiques si l'on compare les lésions de bas grade et de haut grade, et l'accumulation d'anomalies moléculaires. Chez 17 patients ayant développé un cancer invasif dans les 18 mois, aucune lésion histologique ou moléculaire prise isolément n'était corrélée à la survenue de ces cancers. On observait par contre que le nombre d'anomalies cumulées était significativement plus élevé dans les dysplasies modérées, dont le comportement est alors comparable à celui des dysplasies sévères et des CIS, que dans les dysplasies légères et les métaplasies malpighiennes ( $p=0.002$ ).

De façon encore plus intéressante, la présence de deux anomalies ou plus observées dans une lésion préneoplasique quel que soit son grade, était statistiquement corrélée à la survenue d'un CIS ou d'un cancer invasif dans les 18 mois qui suivent la première biopsie ( $p=0.02$ ) dans l'arbre bronchique. Cette étude permettait donc d'identifier certaines dysplasies légères ou métaplasies malpighiennes présentant un cumul d'anomalies phénotypiques, comme étant potentiellement associée à une lésion de haut grade ou un cancer à un autre endroit de l'arbre bronchique, traduisant donc un processus multicentrique et sévère de mutagenèse et de transformation de l'épithélium respiratoire. Ainsi la majorité des cancers de découverte synchrone ou métachrone se développait à un site proche ou distant mais indépendant du site de diagnostic des lésions préneoplasiques, et dans 24% des cas était controlatéral.

La valeur prédictive positive pour la survenue d'un cancer invasif à 18 mois était de 40% pour l'accumulation de p53, 37% pour l'inversion du ratio Bax:Bcl2, et de 31 et 50% respectivement pour l'hyperexpression des cyclines D1 et E, ce qui démontre que chacun de ces biomarqueurs pris isolément ne peut constituer à lui seul un marqueur d'indication et de contrôle d'effet d'une chimioprévention par exemple ("end point marker"). Par contre, leur inclusion dans un ensemble de marqueurs, dont l'expression est facilement analysable en immunohistochimie c'est à dire en technique de routine par tout laboratoire d'anatomie pathologique, paraît intéressante.

En somme, cette étude montre d'une part la faisabilité en technique de routine à un faible coût d'une analyse de l'expression de plusieurs biomarqueurs, traduisant la dérégulation de la croissance cellulaire en réponse à un dommage de l'ADN, sur biopsies bronchiques fixées, et met en évidence l'intérêt pronostique de l'accumulation de deux ou plus anomalies d'expression au cours du processus de carcinogenèse bronchique chez des patients fumeurs à risque, ou ayant déjà présenté un cancer pulmonaire ou des voies aériennes supérieures. L'intérêt d'une analyse combinée de plusieurs autres marqueurs dans les expectorations ou à partir de biopsies bronchiques comme la détection des LOH et des altérations des microsatellites ou l'altération de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur, par mutation ou méthylation des promoteurs, a déjà été suggérée. Ces marqueurs pris isolément n'offrent pas une sensibilité de détection supérieure à 70% sur expectorations chez des patients identifiés comme porteurs de dysplasies et carcinomes in situ ou invasif sur leurs biopsies bronchiques (Hirsch et al 2002). La faisabilité des recherches de mutations (p53 et ras) et de méthylations (p16, O6MGMT) a été démontrée dans des fluides biologiques (expectorations, lavages bronchiques, sérum/plasma) (Arhent et al 1999, Palmisano et al 2000, Sozzi et al

1992), ces approches non invasives présentant par ailleurs une sensibilité et une valeur pronostique limitées. La recherche de cancer chez les sujets à haut risque autorise la réalisation de biopsies bronchiques répétées et leur exploitation biologique doit conduire à la surveillance rapprochées de ces patients.

**II. Article 2: Expression de VEGF, de la Sémaphorine SEMA3F et de leurs récepteurs communs les neuropilines dans les lésions préneoplasiques bronchiques, les tumeurs pulmonaires et les lignées cellulaires.** *Lantuéjoul S, Constantin B, Roche J, Drabkin H, Brambilla C, Brambilla E. J Pathol 2003.*

La sémaphorine 3F, dont le gène est localisé en 3p21.3, région délétée dans les cancers pulmonaires, est à ce titre est un candidat gène suppresseur de tumeur. Elle partage avec VEGF 165, un des facteurs clés de l'angiogenèse, deux récepteurs que sont les neuropilines 1 et 2 exprimés par les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Une compétition entre la SEMA3A, qui appartient à la même classe de sémaphorines que la SEMA3F, et VEGF165 a été démontrée vis à vis des récepteurs NP1 et NP2, et cette compétition pourrait réguler la migration et l'apoptose des précurseurs neuronaux. Brambilla et al (2000) ont démontré que l'expression de VEGF dans les cellules tumorales était corrélée à diminution des niveaux d'expression de la SEMA3F et à sa délocalisation cytoplasmique. En faisant l'hypothèse qu'une telle compétition à la faveur du VEGF existe au cours de la carcinogenèse bronchique et serait impliquée dans la régulation de la prolifération puis dans la migration des cellules tumorales au cours du processus d'invasion, nous avons analysé 50 lésions préneoplasiques bronchiques et 112 carcinomes pulmonaires, incluant 42 carcinomes malpighiens dont 16 concomitants de lésions préneoplasiques, 4 carcinomes basaloïdes, 34 adénocarcinomes, 9 carcinomes à petites cellules, 12 carcinomes neuroendocrines à grandes cellules et 11 tumeurs carcinoïdes, vis à vis de l'expression en immunohistochimie de VEGF, SEMA3F et NP1 et 2, assortie d'une étude au microscope confocal de la localisation de ces protéines en culture in vitro.

Nous avons observé une expression croissante de VEGF en fonction de la sévérité des lésions préneoplasiques, cette expression étant significativement plus faible dans les lésions dysplasiques de bas grade que dans les lésions de haut grade. Cette expression atteignait son maximum dans les carcinomes in situ, stade précédant le processus d'invasion. A l'inverse, la SEMA3F était faiblement exprimée dans les lésions préneoplasiques et les carcinomes, les niveaux d'expression étant discrètement plus élevés dans les lésions dysplasiques de haut grade mais sans différence statistique. On notait en parallèle une expression cytoplasmique prédominante de la SEMA3F. L'expression des neuropilines 1 et 2 était tout à fait comparable à celle de VEGF, avec une corrélation statistique des expressions de VEGF, NP1 et NP2.

Dans les tumeurs pulmonaires, VEGF et les neuropilines étaient plus exprimés dans les carcinomes non à petites cellules que dans les tumeurs neuroendocrines ; quant à la SEMA3F, son expression était perdue dans 37% des carcinomes non à petites cellules et dans les carcinomes de stade avancés, les adénocarcinomes et les carcinoïdes présentant les scores d'expression les plus élevés. L'expression de la SEMA3F était plus volontiers cytoplasmique et membranaire dans ces tumeurs par opposition aux autres tumeurs où l'expression était plutôt cytoplasmique. Surtout les cellules tumorales en migration exprimaient le plus souvent de façon concomitant et à un haut niveau le VEGF, la SEMA3F et les neuropilines avec une prédominance cytoplasmique. Enfin l'analyse au microscope confocal de l'expression des neuropilines 1 et 2 dans des lignées de cellules bronchiques normales ou d'adénocarcinomes, montrait une expression cytoplasmique nette de NP1 au voisinage d'une plaie dans la monocouche cellulaire, impliquant une translocation de la membrane au cytoplasme de ces récepteurs au moment de la migration cellulaire, qui s'accompagnait d'une augmentation transitoire de l'expression cytoplasmique de la SEMA3F, confirmant in vitro l'expression transitoire et la délocalisation cytoplasmique de ces expressions.

La voie de signalisation VEGF/ sémaphorine/ neuropilines semble donc impliquée en premier lieu dans la migration cellulaire : VEGF favorise l'invasion tumorale via le chimiotactisme des cellules carcinomateuses, comme le suggère son expression maximum dans les carcinomes in situ précédant l'effraction de la membrane basale. L'implication du VEGF dans la migration a été observée dans les mélanomes ou dans les cancers mammaires et est médiée par la voie de signalisation de la PI3 kinase- Akt (Byzova et al 2000, Price et al 2001). Une des hypothèses est que l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  impliquée dans la progression carcinomateuse active la PI3-kinase qui active Akt en Akt phosphorylée qui à son tour active mTOR (mammalian target of rapamycin) lequel active la transcription de VEGF. Celui ci, en étant sécrété par les cellules carcinomateuses, se fixe à ses récepteurs dont NP1 et permettrait la migration des cellules tumorales par chimiotactisme (Bachelder et al 2003, Mercurio et al 2004). En raison de la compétition entre VEGF et SEMA3A pour la fixation au récepteur commun NP1, une perte d'expression de la SEMA3A (ou plexine 1) favorise la fixation de VEGF au récepteur NP1 et donc stimule la migration des cellules carcinomateuses mammaires (Bachelder et al 2003).

La voie de signalisation VEGF/ sémaphorine /neuropilines est également impliquée dans la prolifération cellulaire. La liaison de VEGF à NP-1 entraîne une élévation des niveaux

constitutifs d'Akt et permet la survie des cellules tumorales. Il favorise ainsi la survie de cellules carcinomateuses mammaires de façon indépendante de KDR dans des cellules tumorales dépourvues de séquence consensus tyrosine kinase et qui n'expriment pas KDR (Bachelder et al 2001). Les propriétés anti-prolifératives et pro-migratrices de NP1 ont déjà été rapportées dans d'autres carcinomes, gastriques, prostatiques et le poumon (Miao et al 2000, Tian et al 2001, Latil et al 2000b, Tomizawa et al 2001). Par ailleurs la SEMA3F induit l'apoptose de cellules adénocarcinomateuses mammaires (Nasarre et al 2003) de la même manière que la SEMA3B, située à 70 Kb de la SEMA3F dans la même région 3p21.3, induit l'apoptose dans des lignées carcinomateuses pulmonaires et mammaires (Tomizawa et al 2001, Castro-Rivera et al 2004). La SEMA3A, qui est également un répellent pour les cellules progénitrices des neurones, entraîne en se fixant à NP1, leur apoptose après une exposition prolongée à la SEMA3A sur un mode dose dépendant et probablement caspase dépendant. Elle permet également leur mobilité par répulsion. Ces phénomènes sont abolis par VEGF165 qui se fixe de façon compétitive sur NP1, ou par VEGF121 qui se fixe à KDR et NP1. A l'inverse de SEMA3A ou F, VEGF et NP1 stimulent la survie et la prolifération des cellules nerveuses ou des cellules tumorales dans les médulloblastomes et les carcinomes mammaires, où SEMA3A et VEGF ont des effets antagonistes pour l'apoptose et la migration des cellules (Bagnard et al 2001, Bachelder et al 2003), SEMA3F exerçant des effets pro-apoptotiques et « immobilisants » par opposition à VEGF.

En conclusion, la perte d'expression de la SEMA3F, qui est un évènement fréquent dans les tumeurs pulmonaires, excepté dans les carcinoïdes, survient précocement dans la carcinogenèse bronchique par opposition à l'expression du VEGF et de ses récepteurs NP1 et NP2 dont l'expression augmente avec le degré de dysplasie. Nous interprétons cette perte d'expression de la SEMA3F comme une diminution de la sensibilité à l'apoptose et de l'inhibition de la migration cellulaire dans les lésions préneoplasiques bronchiques, tandis que l'acquisition de niveaux élevés de VEGF favoriserait via une boucle autocrine la prolifération cellulaire.



**III. Article 3: Expression différentielle de la sous- unité catalytique de la télomérase hTERT dans les cancers pulmonaires.** *Lantuéjoul S, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Lorimier P, Brichon PY, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Br J Cancer. 2004*

Parmi les paramètres qui traduisent l'accélération de la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose et dont l'expression pourrait être prédictive de la progression tumorale dans les lésions préneoplasiques bronchiques, nous avons examiné la ré expression de la télomérase comme agent de l'immortalisation tumorale. Nous avons au préalable analysé sa ré expression protéique et en ARN messagers dans les tumeurs pulmonaires, en prenant comme technique de référence la mesure de l'activité relative de l'enzyme par essai TRAP (Telomeric Repeat Assay Protocol).

En effet, la plupart des données sur l'expression de la télomérase dans les cancers pulmonaires repose sur des mesures d'activité de l'enzyme par essai TRAP. Néanmoins cette technique nécessite un matériel tissulaire frais en conditions RNAses free. Jusqu'à présent, plusieurs anticorps non commercialisés ont été proposés dans l'étude de l'expression en immunohistochimie ou en Western Blot de la sous unité hTERT dans différents cancers comme les mésothéliomes ou les cancers coliques, ou dans les tissus hépatiques. Nous avons voulu valider l'utilisation d'un anticorps commercial pour l'étude de l'expression de hTERT, applicable en activité de routine sur prélèvements fixés de façon standard en formol neutre.

Une première étape nécessaire consistait à tester cet anticorps sur une série de cancers pulmonaires, dans le but ultime d'étudier l'expression de hTERT dans les lésions préneoplasiques bronchiques. Nous avons ainsi comparé l'expression de hTERT en immunohistochimie et en Western Blot, avec l'étude des niveaux d'expression des ARN messagers de hTERT et de la mesure de l'activité relative de l'enzyme. Notre étude a porté sur 122 tumeurs pulmonaires dont 42 carcinomes malpighiens, 43 adénocarcinomes, 19 basaloïdes et 19 carcinomes à petites cellules. Dans un second temps, nous avons comparé l'expression de hTERT en fonction de l'histologie des cancers pulmonaires mais aussi en fonction du stade pTNM afin d'évaluer le rôle pronostic de l'expression de la télomérase dans les cancers pulmonaires, comme cela a été démontré dans les neuroblastomes et les carcinomes gastriques.

Nous avons ainsi constaté une expression moindre de la télomérase dans les adénocarcinomes, et notamment les carcinomes bronchioloalvéolaires ou dans les plages d'architecture bronchioloalvéolaire en périphérie des adénocarcinomes mixtes. Par opposition, les carcinomes les plus agressifs, comme les carcinomes à petites cellules et les carcinomes basaloïdes, exprimaient les plus forts niveaux de hTERT. Toutes histologies confondues, les cancers de stade I exprimaient plus faiblement la télomérase, mais nous n'avons pu mettre en évidence, probablement en raison d'un nombre trop faible de cas, d'incidence pronostique de l'expression de hTERT, à la différence d'autres auteurs comme Marchetti et al (1999, 2002) et Wang et al (2002) qui ont démontré une forte corrélation entre des niveaux élevés d'hTERT et un pronostic défavorable dans les carcinomes non à petites cellules de stade I. Plus récemment, Iniesta et al (2004) ont rapporté une association entre l'activation de la télomérase et la présence de LOH en 3p, région contenant très probablement un gène répresseur de hTERT, impliquant notamment les loci des gènes FHIT (en 3p14.3) et DLEC1 (Deleted Lung and Esophageal Cancer) ( en 3p21.33), avec une corrélation statistique franche entre la survenue de ces LOH et une survie plus courte des patients.

Nous avons observé une bonne corrélation dans l'appréciation de l'expression de la télomérase entre les résultats fournis par l'immunohistochimie, le TRAP et l'hybridation in situ. Dans 5 cas pourtant, la protéine a été détectée en immunohistochimie sans qu'une activité de l'enzyme ne soit mise en évidence. Il peut s'agir d'artéfacts techniques (mis en évidence d'inhibiteurs de la télomérase) mais plus vraisemblablement d'un problème d'échantillonnage des tumeurs, hétérogènes vis à vis de l'expression de hTERT. A ce titre, cette hétérogénéité déjà rapportée par d'autres auteurs (Paradis et al 2001) pose le problème de l'analyse de l'expression de hTERT à partir d'échantillons de petite taille ou pauvres en cellules tumorales, et donc de l'interprétation d'une telle analyse à partir de prélèvements comme les TMA ou tissus miroarrays qui n'offrent qu'une vision très partielle du comportement d'une prolifération tumorale. Dans notre étude, nous avons essayé autant que possible de choisir des prélèvements congelés destinés au TRAP les plus représentatifs de la tumeur, dépourvus de lymphocytes (moins de 30% de la population cellulaire totale) et sans nécrose, en faisant un control morphologique des échantillons. Pour 10 autres cas, les niveaux de télomérase étaient discordants entre ceux obtenus par immunohistochimie et ceux obtenus par TRAP, suggérant là encore une différence d'échantillonnage des tumeurs, qui présentent un certain degré d'hétérogénéité vis à vis de l'expression de la télomérase, ou des

modifications post transcriptionnelles ou post translationnelles de la protéine aboutissant à des variations quantitatives ou qualitatives de la protéine. On sait notamment que des phosphorylations de hTERT peuvent être responsables d'une modulation de son activité ou influencer sa localisation intracellulaire.

Nous avons également démontré que hTERT pouvait se localiser préférentiellement dans le nucléole des cellules tumorales dans respectivement 45 et 42% des carcinomes malpighiens et des adénocarcinomes, par opposition aux carcinomes à petites cellules et aux carcinomes basaloïdes qui présentent une expression nucléaire diffuse de hTERT. La localisation nucléolaire de hTERT a déjà été démontrée par co-marquage hTERT/ nucléoline (une phosphoprotéine nucléolaire) en immunofluorescence. Le nucléole est le lieu d'assemblage des sous unités hTERT et hTERC, ce qui permet la maturation de hTERC et stabilise le complexe. Récemment, une interaction hTERC dépendante entre hTERT et la nucléoline, à vocation d'ARN chaperonne ou de protéine navette, a été démontrée par Khurts et al (2004). Par ailleurs, la relocalisation nucléolaire de hTERT est également observée dans les cellules dépourvues de hTERC, notamment au cours de la réparation de cassures de l'ADN, et ceci afin d'empêcher l'élongation par la télomérase de brins d'ADN (Etheridge et al 2002, Wong et al 2002). A l'opposé, lors de la phase S, hTERT est diffuse dans le nucléoplasme et participe à la réplication des chromosomes. Dans les tumeurs, la compartimentalisation nucléolaire de hTERT, qui va de pair avec un niveau moyen de télomérase, est corrélée à un moins bon pronostic et serait une façon d'accumuler hTERT tout en prévenant une aggravation de l'instabilité génétique. A l'inverse, dans les carcinomes à petites cellules et dans la majorité des carcinomes basaloïdes, qui représentent des tumeurs agressives caractérisées par une grande instabilité génétique, hTERT est exprimée à de hauts niveaux et est à la fois nucléolaire et nucléaire. Cette expression diffuse pourrait résulter d'une dérégulation du mécanisme de navette de hTERT entre le nucléole et le nucléoplasme.

En somme, nous avons démontré que si l'expression de la sous unité catalytique de la télomérase s'observe dans plus de 85% des cancers, elle reste dans les cancers pulmonaires relativement dépendante du type histologique des tumeurs. hTERT est particulièrement élevée dans les carcinomes de haute agressivité que sont les carcinomes à petites cellules et les carcinomes basaloïdes, faisant de ces tumeurs des cibles préférentielles des thérapeutiques anti télomérases ou anti télomères. A l'opposé, des tumeurs de bas grade comme les adénocarcinomes de type bronchioloalvéolaire semblent peu accessibles à ce type de

thérapeutique. Enfin des tumeurs de malignité intermédiaire, comme la majorité des carcinomes malpighiens et des adénocarcinomes, présentent une expression de hTERT variable d'une tumeur à une autre. Ainsi l'évaluation de cette expression, à l'aide d'une technique aisément réalisable en routine comme l'immunohistochimie, pourrait permettre d'inclure certains patients dans des protocoles d'essai thérapeutiques.

**IV. Article 4: Raccourcissement des télomères et expression de la sous-unité catalytique hTERT dans les lésions préneoplasiques bronchiques.** Lantuéjoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. *Clin Cancer Res* 2005.

Le but de ce travail est, toujours dans le cadre de la recherche de biomarqueurs prédictifs de la progression des lésions préneoplasiques et de cibles potentielles d'une chimioprévention, d'évaluer l'intérêt de l'étude de l'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase. Cette évaluation passe également par l'analyse de la chronologie de la réactivation de hTERT par rapport à des événements moléculaires prépondérants qu'est l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et Rb, étape indispensable à la transformation cellulaire et qui précéderait la ré-expression de hTERT. On sait que l'acquisition de l'immortalité et de la capacité à proliférer indéfiniment requiert la coopération de la télomérase, qui permet aux cellules tumorales d'échapper à la crise de mortalité M2 et de stabiliser les télomères, dont le raccourcissement soumet les cellules à une grande instabilité génétique et/ou à la sénescence répllicative. La réactivation de la télomérase a déjà été rapportée dans les lésions préneoplasiques orales, mammaires et du col utérin, où de hauts niveaux d'ARN messagers de hTERT sont détectés préférentiellement dans les lésions dysplasiques de haut grade (Snijders et al 1998, Kim et al 2001, Umbricht et al 1999). Au cours de la carcinogenèse bronchique, l'expression de la télomérase, évaluée dans de petites séries à partir de la mesure de l'activité enzymatique par essai TRAP ou par mesure des niveaux d'ARN messagers de hTERT, augmente de façon parallèle au degré de sévérité des lésions dysplasiques. Par ailleurs, Yashima et al (1997) ont rapporté une augmentation dès le stade de métaplasie malpighienne des niveaux de hTERT qui atteignent un plateau dans les dysplasies. Ce phénomène précéderait ainsi l'augmentation de l'expression de hTERT, qui reste le facteur limitant de l'activité du complexe enzymatique. Les mécanismes de la ré-expression de la télomérase ne sont néanmoins pas complètement connus, cette ré-expression étant très vraisemblablement précédée d'un raccourcissement des télomères. L'attrition télomérique a été démontrée au cours de la carcinogenèse prostatique et pancréatique, où les néoplasies intraépithéliales présentent une diminution du nombre de répétitions télomériques évaluables par technique TEL-FISH permettant par hybridation de mesurer les répétitions télomériques. Cette technique qualitative permet, à la différence de la technique de Southern Blot, d'analyser sur coupes tissulaires des signaux télomériques à l'échelle de clones dysplasiques de quelques dizaines de cellules.

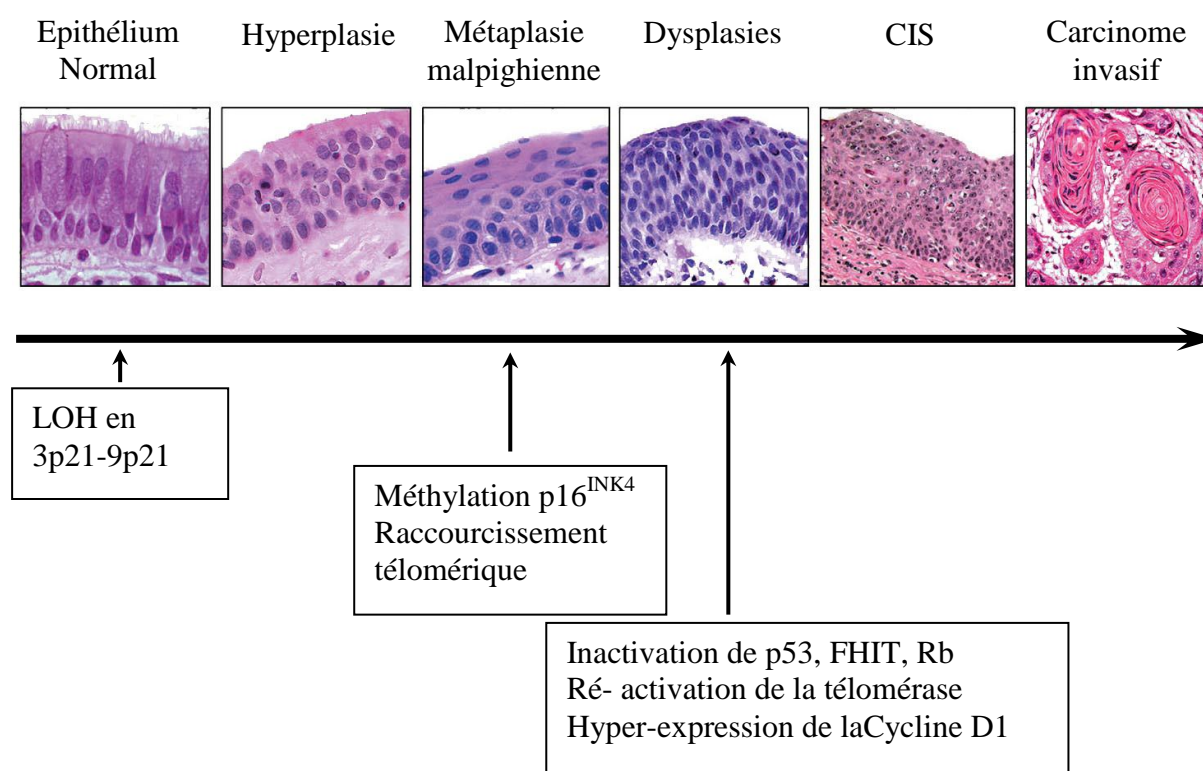
Afin d'établir la chronologie d'apparition de la ré expression de la télomérase et sa relation avec le raccourcissement des télomères et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur p53 et Rb, nous avons analysé par immunohistochimie l'expression de P53, P16<sup>INK4</sup>, de la Cycline D1, de Bax et Bcl2 et de hTERT en parallèle à l'évaluation de la longueur des télomères par TEL-FISH. L'étude immunohistochimique de l'expression de ces différentes protéines a été réalisée dans 106 lésions préneoplasiques bronchiques fixées, provenant de pièces opératoires de patients porteurs de carcinomes pulmonaires, et a été comparée à celle observée dans 27 carcinomes invasifs correspondants et dans la muqueuse bronchique normale. L'évaluation des niveaux d'expression des ARN messagers de hTERT et de la longueur des télomères a été effectuée dans un sous groupe de lésions préneoplasiques, de carcinomes invasifs et de muqueuses bronchiques normales ou hyperplasiques.

Comme supposé, nous avons constaté une corrélation entre l'expression de hTERT et l'accumulation de la protéine P53 d'une part et l'inversion du ratio Bax :Bcl2 d'autre part, suggérant que la résistance à l'apoptose se fait en parallèle de la réactivation de la télomérase. Nous n'avons par contre pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de hTERT et la perte d'expression de P16<sup>INK4</sup> ou l'hyperexpression de la Cycline D1. On ne peut éliminer la possibilité d'artéfacts techniques concernant l'étude de P16<sup>INK4</sup>, et/ou d'une série trop limitée. Cependant, l'ensemble des résultats immunohistochimiques témoigne d'une accumulation croissante des anomalies moléculaires avec le degré de sévérité des lésions préneoplasiques, la dysplasie modérée présentant définitivement le phénotype d'une lésion de haut grade moléculaire.

On sait que la prolifération tumorale par elle-même provoque, en l'absence de réactivation de la télomérase, une attrition télomérique, perçue comme un dommage de l'ADN et qui entraînant la phosphorylation de H2AX et de CHK2, l'accumulation de P53, P21 et P16 et l'entrée en senescence répllicative ou la mort des cellules. A l'inverse dans les lésions précancéreuses, CHK2, ATM et H2AX sont phosphorylés et donc inactifs et les voies p53/Rb sont inactivées, précipitant les cellules dans une grande instabilité génétique qui précède la réactivation de la télomérase. Récemment, il a été proposé que les dommages de l'ADN provoqués par les oncogènes soient responsables d'une augmentation de la réplication de l'ADN, et donc favorisent très précocement au cours de de la carcinogenèse, la transformation maligne en exerçant une pression de sélection via la survenue de mutations de p53 et l'instabilité génétique (Bartkova et al 2005, Gorgoulis et al 2005).

Nous avons constaté que le raccourcissement des télomères précède la réactivation de la télomérase et survient dès la métaplasie malpighienne. Cette attrition télomérique précède la survenue de la crise et la réactivation de la télomérase, et favorise donc la survenue d'anomalies moléculaires et de ponts interchromosomiques pendant l'anaphase et préfigure la crise de mortalité M1. La valeur prédictive du raccourcissement télomérique dans les métaplasies malpighiennes devra cependant être investiguée à une plus grande échelle, en comparant ces lésions chez des patients fumeurs porteurs de dysplasies ou de cancer, à celles survenant de façon non spécifique chez des patients témoins. Par la suite, la réactivation de la télomérase s'opère de façon progressive de la dysplasie légère au CIS et prédomine dans les dysplasies de haut grade (DS et CIS) où on note en parallèle grâce à l'action de la télomérase une augmentation de la longueur des télomères qui va de pair avec leur stabilisation par « capping ». Ainsi de façon intéressante, la dysplasie modérée apparaît comme une étape cruciale dans la carcinogenèse et semble figurer la crise M2 : les cellules dysplasiques ayant accumulé de façon significative un certain nombre d'anomalies moléculaires, échappent au control de P53 et de Rb, prolifèrent (augmentation des niveaux de Ki67 et inversion du ratio Bax :Bcl2) et se dotent d'une activité télomérase élevée afin de protéger leurs télomères.

Finalement nous proposons le schéma suivant d'apparition d'anomalies moléculaires au cours de la carcinogenèse bronchique:



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans les pays industrialisés et en voie de développement et reste malgré de nombreux progrès dans les domaines du diagnostic et du traitement, un cancer redoutable dont la survie à 5 ans est inférieure à 10%. La principale raison en est un diagnostic encore trop tardif, à un stade souvent inopérable. D'un point de vue diagnostique, chaque anomalie moléculaire survenant au cours de la carcinogenèse bronchique peut être utilisée comme biomarqueur à condition que cette anomalie soit précoce et spécifique de la transformation maligne, prédictive de la progression tumorale et qu'elle puisse être détectée chez les patients à partir de prélèvements réalisés sur un mode peu invasif si possible. L'étape suivante sera la validation à grande échelle de l'utilisation de biomarqueurs à la fois sensibles et spécifiques pour le diagnostic précoce des cancers pulmonaires. L'intérêt de tels marqueurs est également de permettre de mieux définir une population à risque élevé de cancer pulmonaire et de déterminer des facteurs pronostiques de la progression tumorale d'un cancer ou d'une lésion préneoplasique donnés.

### **Quel(s) biomarqueur (s) privilégier pour le dépistage des cancers pulmonaires chez les patients à risque**

La détection de biomarqueurs dans les expectorations, le sang ou le lavage bronchiolo alvéolaire semble plus intéressante que le simple « screening » des patients par radiographie pulmonaire annuelle (Marcus 2001). La majorité des études menées sont basées sur la détection de mutations spécifiques de l'ADN, d'altérations microsatellites ou de méthylations des îlots CpG des gènes suppresseurs de tumeur, portées par quelques clones de cellules dysplasiques parmi de nombreuses cellules normales. Plusieurs études ont montré l'intérêt de la mise en évidence de mutations de K-ras et de p53 dans des expectorations de patients présentant des carcinomes non à petites cellules, les mutations de K ras étant détectables avant le diagnostic clinique d'adénocarcinome (Mills et al 1995, Arhendt et al 1999). Cependant les mutations de K ras ne sont présentes que dans une fraction de carcinomes non à petites



cellules (30 à 50%), essentiellement des adénocarcinomes, ce qui limite leur intérêt à ce type de tumeur dans un dépistage à grande échelle. Ceci est également valable pour la plupart des biomarqueurs qui ne sont exprimés que par une fraction de cancers pulmonaires, et en fonction de l'exposition tabagique des sujets d'où la nécessité d'un panel de biomarqueurs. La valeur pronostique de l'accumulation d'anomalies moléculaires dans les lésions préneoplasiques bronchiques, défendue dans l'article de Jeanmart et al (2003), est une illustration de la nécessité de définir un profil de biomarqueurs. Arhent et al (1999) ont proposé l'étude de quatre marqueurs moléculaires tels que les mutations de p53, de K ras (pour les adénocarcinomes), de la méthylation du promoteur de p16 et de l'instabilité microsatellite. Ainsi chez 50 patients présentant un cancer pulmonaire, 43 (86%) présentent au moins une de ces anomalies dans le liquide de lavage bronchiolo alvéolaire. Plus récemment a été développée la technique de PCR spécifique de méthylation nestée qui offre une sensibilité 50 fois supérieure à la technique de PCR spécifique de méthylation classique, et qui permet la détection dans 100% des expectorations de patients atteints de cancers pulmonaires de méthylations de p16 identiques à celles présentées par la tumeur, et de méthylation aberrante de la MGMT dans les expectorations de 67% des patients 5 à 35 mois avant la survenue d'un cancer cliniquement décelable. Néanmoins des méthylations aberrantes ont été également détectées chez des patients sans cancer mais fumeurs de longue date, ainsi que des altérations microsatellites chez des patients sans cancer porteurs de maladie pulmonaire chronique obstructive (Field et al 1999). La détection de la méthylation de p16 à des fins de « screening » des patients à risque reste donc limitée en raison de sa relative faible prévalence (38 à 68%) et des faux positifs (fumeurs). En effet, la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur n'implique pas nécessairement qu'il s'agisse d'un processus spécifique de la nature tumorale, l'hyperméthylation îlots CpG pouvant également survenir dans des épithéliums normaux chez des sujets tabagiques ou âgés (Belinsky et al 2002, Kim DH 2001). L'hyperméthylation du promoteur de p16 s'observe dans le cancer pulmonaire en réponse à une inhalation de fumée de cigarettes chez les rats F344/N ou dans l'épithélium bronchiques et les expectorations des fumeurs (Belinsky et al 2002). Cette méthylation est associée à la durée du tabagisme (Kim DH et al 2001) et est induite par la 4(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1 butanone (NKK) dans les adénocarcinomes du rat (Belinsky et al 1998). Des méthylations des gènes des récepteurs aux oestrogènes ou de l'insulin-like growth factor 2 entre autres sont présentes dans les muqueuses coliques de sujets âgés (Ahuja et Issa 2000). Néanmoins Kim H et al (2004) ont récemment montré que la méthylation du promoteur de FHIT est dépendante de l'âge et du tabagisme, tandis que les

méthylations des promoteurs de p16, RASSF1A, H-cadherine et de RAR beta apparaissent spécifiques du cancer pulmonaire.

La mise en évidence d'altérations spécifiques du cancer dans le sang des patients s'est avérée également prometteuse au début, révélant des concentrations d'ADN circulants chez les patients cancéreux significativement supérieures à celles des patients sans cancer dès les premiers stades de la maladie (Sozzi et al 2001). Néanmoins des niveaux élevés d'ADN circulants ont été également retrouvés chez les patients gros fumeurs de plus de 60 ans. Par contre récemment, l'hyperméthylation aberrante du promoteur de gène APC (adenomatous polyposis coli) a été rapportée dans 96% des cancers pulmonaires (Usadel et al 2002) et serait détectée dans le sérum de 47% de patients cancéreux mais dans aucun échantillon provenant de patients sains.

### **Intérêt des biomarqueurs dans la chimioprévention des cancers bronchiques**

La chimioprévention se définit par l'utilisation de substances chimiques permettant de prévenir, d'inhiber ou de rendre réversible un évènement impliqué dans la carcinogenèse. Le choix d'une chimioprévention sera donc grandement facilité par le diagnostic précoce des lésions préneoplasiques grâce au fibroscope à fluorescence LIFE par exemple et par leur identification sur le plan histologique et moléculaire. Plusieurs essais thérapeutiques ont été menés utilisant notamment des inhibiteurs de EGFR, des inhibiteurs de l'angiogenèse, du cycle cellulaire, de COX-2, de la lipoxigenase, des analogues des prostacyclines, des inhibiteurs de ras, des rétinoïdes ou encore des agents déméthylants. De façon intéressante, certains de ces essais incluent une évaluation de l'efficacité du traitement chimiopréventif par l'analyse intermédiaire des variations d'expression d'un biomarqueur. Ainsi différentes études basées sur l'utilisation de Folate et de B12 (Heimburger et al 1988), d'Etretinate (Arnold et al 1992), d'Isotrétinoïne (Lee et al 1994) ou encore de fenrétinide couplée à une évaluation de l'expression de la sous unité hTERT (Soria et al 2001) ont été menées. L'intérêt d'un tel biomarqueur est d'être le reflet de la réversibilité d'un état préneoplasique sous l'effet de la chimioprévention et l'expression de ce marqueur se doit donc d'être étroitement corrélée au processus de progression tumorale. Plusieurs études ont proposé l'utilisation de Ki 67, de MCM2, de p53, de EGFR ou encore de HER2 comme biomarqueurs d'indication et de contrôle d'effet (« end point marker ») dont l'expression pourrait être évaluée en

immunohistochimie à partir de biopsies bronchiques. Néanmoins l'utilisation de ces marqueurs doit être précédée de leur validation dans des études clinico-pathologiques rétrospectives classiques et prospectives avant qu'ils ne soient utilisés en routine dans des essais thérapeutiques, afin de confirmer leur valeur prédictive.

### **Qu'en est-il pour les autres lésions prénéoplasiques pulmonaires et notamment des précurseurs des adénocarcinomes**

Tout comme pour les lésions prénéoplasiques bronchiques le concept de carcinogenèse multi étapes proposé par Miller et al en 1988 est également validé pour les lésions précurseurs des adénocarcinomes pulmonaires. Actuellement la classification de l'OMS reconnaît comme précurseurs des adénocarcinomes pulmonaires les hyperplasies alvéolaires atypiques ou AAH. En 1995, l'équipe de Noguchi propose un système de classification pour les petits adénocarcinomes de moins de 2 cm incluant les carcinomes bronchioloalvéolaires ou « well differentiated localized bronchioloalveolar carcinoma (LBAC) » se divisant en type A où les cellules atypiques colonisent les parois alvéolaires sans destruction de l'architecture sous jacente, le type B comportant un collapsus alvéolaire et le type C caractérisé par une prolifération fibroblastique et un foyer de microinvasion. La survie à 5 ans des adénocarcinomes de type A et B est de 100% tandis que celle des types C, les plus fréquents est de 75% environ. Biologiquement les types A et B sont très proches des hyperplasies alvéolaires atypiques. Ainsi la fréquence des LOH sur le locus de p53 ne dépasse pas 6% alors que les pertes sur le locus de p16 en 9p peuvent atteindre 33% et les délétions en 3p 25% (Yamasaki et al 2000). On observe une augmentation croissante de la fréquence de ces anomalies moléculaires des AAH aux BAC de type A, B et C qui présentent des délétions en 3p, 17, 18q et 22q (Aoyagi et al 2001), et de la zone lépidique pure à la zone centrale invasive microdisséminée dans la même tumeur de type C. D'après Kitaguchi et al, 18% des AAH présentent des LOH en 3p, 13% en 9p et 6% en 17p (Kitaguchi et al 1998). Les mutations de K-ras affectant le codon 12 s'observent dans des proportions comparables à celles des adénocarcinomes (15 à 39 contre 41%) et dans les AAH de bas grade comme les AAH de haut grade. A l'inverse les LOH en 3p, 9p et 17p semblent restreintes aux AAH de haut grade. Plus récemment, Nakamura et al ont défini le phénotype des fibroblastes composant le stroma des petits adénocarcinomes, hyperexprimant MLH1 et sous exprimant Cox1, FGFR4, p120 et Smad3 (Nakamura et al 2004).

Tout comme les lésions préneoplasiques bronchiques, les AAH sont des lésions multifocales et la présence d'une AAH indique fortement l'existence d'autres lésions identiques. Néanmoins ni leur présence ni leur multiplicité n'affectent défavorablement le pronostic, et certains auteurs observent même que la présence d'AAH au voisinage d'un adénocarcinome pulmonaire est un indicateur de bon pronostic (Takigawa et al 1999). Il existe une corrélation de 85% entre la présence d'une AAH ou d'un BAC non invasif et la détection d'une opacité en verre dépoli (Travis et al 2005). En tout état de cause la présence d'AAH sur un scanner thoracique ou une biopsie ne doit pas se traduire par une sanction chirurgicale à type de lobectomie, mais sa détection chez un patient à risque doit être suivie de l'arrêt du tabac et d'une surveillance plus étroite du patient.

### **Prise en charge des patients présentant des lésions préneoplasiques bronchiques**

Si la surveillance par fibroscopie LIFE des lésions préneoplasiques bronchiques doit permettre de réduire la mortalité par cancer du poumon, se pose la question de leur évolutivité alors que ces lésions, prélevées pour la plupart en totalité pour l'analyse histologique, ont été soustraites à toute surveillance et donc à la possibilité de déterminer avec certitude leur potentiel d'évolutivité. Se pose également le problème du traitement des CIS réséqués de façon incomplète lors de la biopsie ou persistant après traitement local : doit-on être agressif et procéder à leur résection, alors que l'on ne connaît pas exactement leur évolutivité ? Et ce d'autant que les patients porteurs de CIS sont des patients à risque pour la survenue d'autres lésions dysplasiques et donc amenés à subir d'autres résections de cancer invasif. D'après l'étude de Moro et al (2004), 17% des CIS et les carcinomes microinvasifs évoluent vers un cancer avéré à 1 an, et 63% à 3 ans. Par ailleurs cette étude met en exergue les problèmes liés à l'interprétation anatomopathologique et notamment la difficulté d'affirmer une rupture de la membrane basale et un processus de microinvasion. L'idéal serait d'effectuer de larges biopsies et de pouvoir les répéter. Il est fort possible qu'un certain nombre de biopsies montrant des lésions de CIS aient en fait été réalisées à proximité (200 à 500 microns) d'un authentique carcinome invasif ou microinvasif ce qui expliquerait leur évolution anormalement péjorative. Par ailleurs ces auteurs ne retrouvent pas d'impact sur l'évolution des lésions de la réalisation de biopsies itératives antérieures, qui peuvent avoir emporté toute

la lésion ou avoir favorisé l'évolution vers une lésion invasive par l'inflammation qu'elles auraient généré, (Bota et al 2001).

Enfin si on admet que les CIS sont définitivement des lésions préinvasives à haut risque d'évolutivité, il y a-t-il avantage à les diagnostiquer et à les traiter précocement, sachant que d'après les études du NCI basées sur un screening des patients à partir d'expectorations bronchiques, la détection précoce de cancers pulmonaires n'a pas été suivie d'une réduction nette de la mortalité par cancer ? La réponse passe probablement par la nécessité d'identifier avec plus de certitude des biomarqueurs de la progression tumorale. Cette identification doit impliquer les anatomopathologistes qui doivent non seulement se conformer aux critères érigés par la classification de l'OMS pour identifier et classer histologiquement les lésions préneoplasiques, mais aussi devront probablement dans le futur procéder à leur analyse au niveau moléculaire. L'approche recommandée est celle de l'immunohistochimie par l'identification in situ d'expression ou de perte d'expression de protéines impliquées dans la carcinogenèse. Une autre approche potentielle in situ est l'analyse des amplifications géniques par FISH (ex : EGF-R) et des anomalies multinumériques par multi-FISH. Elle nécessitera peut être parallèlement des techniques de microdissection afin d'isoler les clones cellulaires dysplasiques des cellules épithéliales ou stromales normales adjacentes et de les étudier au niveau génomique ou protéomique. Ces approches in situ ont par comparaison avec les études biomoléculaires globales, l'avantage de ne soustraire aucune lésion à l'évaluation diagnostique histopathologique concomitante.

<b>REFERENCES</b>
-------------------

Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. Interaction of c-Abl and p73 alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999, 399: 809- 813.

Ahuja N, Issa JP. Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol.* 2000, 15:835-42.

Ahrendt SA, Yang SC, Wu L, Westra WH, Jen J, Califano JA, Sidransky D. Comparison of oncogene mutation detection and telomerase activity for the molecular staging of non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997, 3: 1207- 1214.

Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J, Sidransky D. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999, 91:332-9.

Albanell J, Lonardo F, Rush V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman R, Moore MA, Dimitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 1609- 1615.

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Golstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 1992, 89: 10114- 8.

Akalin A, Elmore LW, Forsythe HL, Amaker BA, McCollum ED, Nelson PS, Ware JL, Holt SE. A novel mechanism for chaperone-mediated telomerase regulation during prostate cancer progression. *Cancer Res* 2001, 61 : 4791- 4796.

Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt, Langenfeld J, han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MAS, Dimitrovsky. High telomerase activity in primary lung cancers : association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 1609- 1615.

Aldous WK, Marean AJ, DeHart MJ, Moore KH. Effects of tamoxifen on telomerase activity in breast carcinoma cell lines. *Cancer* 1999, 123- 129.

Antoniades HN, Galapoulos T, Neville- Golden J, O'Hara CJ. Malignant epithelial cells in primary human lung carcinoma coexpress in vivo platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor RNAm and their protein products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89 : 3942- 3946.

Aoyagi Y, Yokose T, Minami Y, Ochiai A, Iijima T, Morishita Y, Oda T, Fukao K, Noguchi M. Accumulation of losses of heterozygosity and multistep carcinogenesis in primary adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001, 61 : 7950- 7954.

Apolinario RM, van der Valk P, de Jong JS, Deville W, van Ark-Otte J, Dingemans AM, van Mourik JC, Postmus PE, Pinedo HM, Giaccone G. Prognostic value of the expression of p53,

bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997, 15: 2456- 2466.

Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 2001, 268: 2764-72.

Aragona M, De Divitiis O, La Torre D, Panetta S, D'Avella D, Pontoriero A, Morelli M, La Torre I, Tomasello F. Immunohistochemical TRF1 expression in human primary intracranial tumors. *Anticancer Res* 2001, 21: 2135- 2139.

Arinaga M, Shimizu S, Gotoh K, Haruki N, Takahashi T, Takahashi T, Mitsudomi T. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance. *Ann Thorac Surg.* 2000, 70: 401-5.

Arnold AM, Browman GP, Levine MN, D'Souza T, Johnstone B, Skingley P, Turner-Smith L, Cayco R, Booker L, Newhouse M. The effect of the synthetic retinoid etretinate on sputum cytology: results from a randomised trial. *Br J Cancer.* 1992, 65:737-43.

Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors : more than just expression. *The Oncologist* 2002, 7: 31- 39.

Auerbach O, Garfinkel L, Hammond EC. Relation of smoking and age to findings in lung parenchyma: a microscopic study. *Chest* 1974; 65 :29-35.

Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking, 1955-1960 vs. 1970-1977. *N Engl J Med.* 1979, 300:381-5.

Bacchetti S and Counter CM. Telomeres and telomerase in human cancer. *Int J Oncol* 1995, 7: 423- 432.

Bachelder R, Crago A, Chung J, Wendt M, Shaw L, Robinson G, Mercurio A. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001, 61: 5736-5740.

Bachelder RE, Lipscomb EA, Lin X, Wendt MA, Chadborn NH, Eickholt BJ, Mercurio AM. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res* 2003, 63:5230-3.

Bagnard D, Vaillant C, Khuth ST, Dufay N, Lohrum M, Puschel AW, Belin MF, Bolz J, Thomasset N. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci* 2001, 21: 3332-41.

Band PR, Felstein M, Saccomano G. Reversibility of bronchial marked atypia: implication of bronchial prevention. *Cancer Detect Prev* 1986, 9: 157- 160.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood* 1996, 87: 3336- 3343.

Barr LF, Campbell SE, Diette GB, Gabrielson EW, Kim S, Shim H, Dang CV. C-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 2000, 60: 143-149.

Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005, 434: 864- 870.

Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*. 1998, 395:124-5.

Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect in human cells. *Science* 2001, 292 : 2075- 2077.

Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S, Chu WS, Hasleton PS, Travis WD, Brambilla E. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *Hum Pathol* 2003, 34: 136-42.

Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 2001, 21 : 6151- 6160.

Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003 : 22 : 4212-4222.

Berli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 1995, 15:6496-505.

Belair CD, Yeager TR, Lopez PM, Reznikoff CA. Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 13677- 13682.

Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95:11891-6.

Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, Crooks LA, Divine KK, Winters SA, Grimes MJ, Harms HJ, Tellez CS, Smith TM, Moots PP, Lechner JF, Stidley CA, Crowell RE. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res*. 2002, 62: 2370-7.

Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, Brockmoller J, Clapper ML, Daly A, Dolzan V, Ford J, Gaspari L, Haugen A, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kihara M, Kremers P, Le Marchand L, London SJ, Nazar-Stewart V, Onon-Kihara M, Rannug A, Romkes M, Ryberg D, Seidegard J, Shields P, Strange RC, Stucker I, To-Figueras J, Brennan P, Taioli E. Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*. 2002, 23:1343-50.



Bennett WP, Colby TV, Travis WD, Borkowski A, Jones RT, Lane DP, Metcalf RA, Samet JM, Takeshima Y, Gu JR, et al.. P53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 1993, 53 : 4817- 4822.

Bertrand P, Rouillard D, Boulet A, Levalois C, Soussi T, Lopez BS. Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* 1997, 14: 1117- 1112.

Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P, de Lange T. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *EMBO J*. 1997, 16:1785-94.

Bianchi A, Stansel RM, Fairall L, Griffith JD, Rhodes D, de Lange T. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J* 1999, 18: 5735- 5744.

Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel telobox protein. *Nat Genet* 1997, 17: 236- 239.

Blake MC, Azizkhan JC. Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 1989, 9:4994-5002.

Boers JE, ten Velde GPM, Thunissen FBJM. P53 in squamous metaplasia : a marker for risk of respiratory tract carcinoma. *Am J Resip Crit Care Med* 1996, 153 : 411- 416.

Bota S, Auliac JB, Paris C, Metayer J, Sesboue R, Nouvet G, Thiberville L. Follow-up of bronchial precancerous lesions and carcinoma *in situ* using fluorescence endoscopy. *Am J Resip Crit Care Med* 2001, 164: 1688- 1693.

Brambilla E, Moro D, Veale D, Brichon PY, Stoebner P, Paramelle B, Brambilla C. Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung. A new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance. *Hum Pathol* 1992, 23: 993- 1003.

Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl-2 and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 1996, 149: 1941- 1952.

Brambilla E. Basaloid carcinoma of the lung. In *Pathology of lung tumors*, Corrin B (ed), pp 71- 82. Churchill-Livingstone : New York, 1997.

Brambilla E, Gazzeri S, Lantuejoul S, Coll JL, Moro D, Negoescu A, Brambilla C. p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998, 4:1609-18.

(a) Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Lantuejoul S, Veyrenc S, Brambilla C. Alterations of Rb pathway (Rb-p16INK4-cyclin D1) in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res*. 1999 5:243-50.

(b) Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 1999 188:351-60.

Brambilla E, Brambilla C. Les oncogènes et les anti-oncogènes dans la dynamique de progression des cancers bronchiques. *Rev Mal Respir* 2000, 17 : 313- 327

Brambilla E, Constantin B, Drabkin H, Roche J. Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: a suggested role in cell adhesion and migration. *Am J Pathol* 2000, 156: 939-950.

Breuer RH, Pasic A, Smit EF, van Vliet E, Vonk Noordegraaf A, Risse EJ, Postmus PE, Sutedja TG. The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium. *Clin Cancer Res*. 2005, 11:537-43.

(a) Broccoli D, Smorgorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related protein, TRF1 and TRF1. *Nat Genet* 1997, 17 : 213- 235.

(b) Broccoli D, Chong L, Oelmann S, Fernald AA, Marziliano N, van Steensel B, Kipling D, Le Beau MM, de Lange T. Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression, and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 69- 76.

Broers JLV, Viallet J, Jensen SM, Pass H, Travis WD, Minna JD, Linnoila RI. Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993, 9: 33- 43.

Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Med* 1997, 3 : 1271- 1274.

Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN. Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2000, 2: 197- 201.

Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF : activation of the integrins. *Mol Cell* 2000, 6: 851-60.

Buick RN, Pullano R, Trent JM. Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1985, 45 : 3668- 3676.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96:4240-5.

Carey LA, Hedican CA, Henderson GS, Umbricht CB, Dome JS, Varon D, Sukumar S. Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase negative breast cancers. *Clin Cancer Res* 1998, 4: 435- 440.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000, 6: 389–395.

Carter D. Precancer in the lung. *Cancer Surv* 1983, 2: 425- 435.

Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M, Karlan B, Slamon DJ. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 1996, 13: 1971- 1981.

Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, Minna JD. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101:11432-7.

Cerny T, Barnes DM, Hasleton P. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human lung tumours. *Br J Cancer* 1986, 54: 265- 269.

Chaussade L, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. Expression of p15 and p15.5 products in neuroendocrine lung tumours: relationship with p15(INK4b) methylation status. *Oncogene*. 2001, 20:6587-96.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991, 65:1053-61.

Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M: Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins SemaE and SemaIV but not SemaIII. *Neuron* 1997, 19: 547-559.

Chen H, He Z, Bagri A, Tessier-Lavigne M. Semaphorin- neuropilin interactions underlying sympathetic axon to class III semaphorins. *Neuron* 1998, 21: 1283-1290.

Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989, 58:1193-8.

Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroum M, Anker P. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000, 6 : 3823- 3826.

Chen Y, Robles AI, Martinez LA, Liu F, Gimenez-Conti IB, Conti CJ. Expression of G1 cyclins, cyclin-dependent kinases, and cyclin-dependent kinase inhibitors in androgen-induced prostate proliferation in castrated rats. *Cell Growth Differ* 1996, 7:1571-8.

Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a bax-like death effector by caspases. *Science* 1997, 278 : 1966- 1968.

Cheng JF, Smith CL, Cantor CR. Isolation and characterization of a human telomere. *Nucleic Acids Res*. 1989,17:6109-27.

Chong L, van Steensel B, Brocoli D, Erdjument- Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T. A human telomeric protein. *Science* 1995, 270 : 1663- 1667.

Christensen CR, Klingelhofer J, Tarabykina S, Hulgaard EF, Kramerov D, Lukanidin E. Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res* 1998, 58:1238-1244.

Chung GT, Sundaresan V, Hasleton P, Rudd R, Taylor R, Rabbitts PH Clonal evolution of lung tumors. *Cancer Res* 1996; 56:1609-14.

Civenni G, Holbro T, Hynes NE. Wnt1 and Wnt5a induce cyclin D1 expression through ErbB1 transactivation in HC11 mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* 2003, 4:166-71.

Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR. The alpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* 2000, 2: 426- 432.

Cooper CA, Carby FA, Bubb VJ, Lamb D, Kerr KM, Wyllie AH. The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumor development in human lung. *J Pathol* 1997, 181: 401- 404.

Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT : organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999, 8: 137- 142.

Cong YS, Bachetti S. Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem* 2000, 275: 35665- 35668.

Counter CM, Avilion AA, Le Feuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bachetti S. Telomerase shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells with express telomerase activity. *EMBO J* 1992, 11: 1921- 1929.

Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leucocytes and in haematology malignancies. *Blood* 1995, 85: 2315- 2320.

(a) Crowe DL, Nguyen DC, Tsang KJ, Kyo S. E2F1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Nucleic Acids Res* 2001, 13: 2789- 2794

(a) Crowe DL, Nguyen DC. Rb and E2F1 regulate telomerase activity in human cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1518: 1-6

Cunningham VJ, Markham N, Shroyer LA. Detection of telomerase expression in fine needle aspirations and fluids. *Diagn Cytopathol* 1998, 18 : 431- 436.

Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, Broni J, Mariott A, Khoudoli G, Parkinson EK, Cooper CS, Newbold RF. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 37- 45.

Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985, 316: 823- 826.

Damstrup L, Rygaard K, Spang- Thomsen M, Poulsen HS. Expression of the epidermal growth factor in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1992, 52: 3089- 3093.

Dasi F, Lledo S, Garcia- Granero E, Ripoll R, Marugan M, Tormo M, Garcia- Conde J, Alino SF. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001, 81 : 767- 769.

De Caprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988, 54: 275-83.

Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, Brambilla E. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999, 188: 369-377.

Del Sal G, Ruaro EM, Utreta R, Cole CN, Levine AJ, Schneider C. Gas1 induced growth arrest suppression requires a trans-activation-independent p53 function. *Mol Cell Biol* 1995, 15: 7152- 7160.

Denhart BC, Guidi AJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Lab Invest* 1997, 6: 659-664.

Dessain SK, Yu HY, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res* 2000, 60: 537- 541.

Deygas N, Froudarakis M, Ozenne G, Vergnon JM. Cryotherapy in early superficial bronchogenic carcinoma. *Chest* 2001, 120 : 26- 31.

Di Como CJ, Gaiddon C, Prives C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1999, 19 : 1438- 1449.

Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994, 8: 2540- 2551.

Di Leonardo A, Khan SH, Linke SP, Greco V, Seidita G, Wahl GM. DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res.* 1997, 57:1013-9.

Ding H, Wu X, Roncari L, Lau N, Shannon P, Nagy A, Guha A. Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int J Cancer* 2000, 88: 584-592

Dobbs SP, Hewette PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1997, 76: 1410-1415

Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking : 40 years' observations on male British doctors. *Br Med J* 1994, 309 : 901- 911.

D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2002, 4:11-9.

Dorfman DM, Shahsafaei A, Nadler LM, Freeman GJ. The leukocyte semaphorin CD100 is expressed in most T-cell, but few B-cell, non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol.* 1998, 153:255-62.

Duan W, Rangan A, Vankayalapati H, Kim MY, Zeng Q, Sun D, Han H, Fedoroff OY, Nishioka D, Rha SY, Izbicka E, Von Hoff DD, Hurley LH.. Design and synthesis of fluoroquinophenoxazines that interact with human telomeric G-quadruplexes and their biological effects. *Mol Cancer Ther* 2001, 1: 103- 120

Duddenhoffer C, Kurth M, Janus F, Deppert W, Wiesmuller L. Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene* 1999, 18: 5773- 5784.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989, 243: 934-7.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998, 12: 2245-62.

El-Deiry WS. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998, 227:121-37.

Etheridge KT, Banik SSR, Armbruster BN, Zhu Y, Terns RM, Terns MP, Counter CM. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J Biol Chem* 2002, 27: 24764- 24770.

(a) Eymin B, Karayan L, Seite P, Brambilla C, Brambilla E, Larsen CJ, Gazzeri S. Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* 2001, 10: 1033- 1041.

(b) Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2001: 1678- 1687.

Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene.* 2002, 21:2750-61.

Eymin B, Leduc C, Coll JL, Brambilla E, Gazzeri S. p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene.* 2003, 22:1822-35.

Fathi Z, Way JW, Corjay MH, Viallet J, Sausville EA, Battey JF. Bombesin receptor structure and expression in human lung carcinoma cell lines. *J Cell Biochem Suppl* 1996, 24 : 237-246.

Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995, 269: 1236-1241.

Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido RE, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000, 14: 2015- 2027.

Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000, 11, 617–624.

Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Prime W, Fielding P, Walshaw MJ, Turnbull L Genetic alterations in bronchial lavage as a potential marker for individuals with a high risk of developing lung cancer. *Cancer Res.* 1999, 59:2690-5.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995, 376: 66- 70.

Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, Basolo F, Bevilacqua G. Bcl-2 protein : a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1995, 71: 1003- 1007.

Fontanini G, Calcinai A, Boldrini L, Lucchi M, Mussi A, Angeletti O, Cagno C, Tognetti MA, Basolo F. Modulation of neoangiogenesis in bronchial preneoplastic lesions. *Oncol Rep* 1999, 6: 813-817.

Ford LP, Suh JM, Wright WE, Shay JW. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 9084-909.

(a) Ford LP, Shay JW, Wright WE. The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length *in vivo*. *RNA* 2001, 7:1068-1075.

(b) Ford LP, Zou Y, Pongracz K, Gryaznov SM, Shay JW, Wright WE. Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomere maintenance in human cells. *J Biol Chem.* 2001, 276:32198-203.

Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostal GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003, 22 : 8983- 8998.

Friedman KL, Cech TR. Essential functions of amino- terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection of viable mutants. *Genes Dev* 1999, 13 : 2863- 2874.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986, 323: 643-6.

Frost JK, Ball WCJr, Levein MI, Tockamn MS, Erozan YS, Gupta PK, Eggleston JC, Pressman NJ, Donithan MP, Kimball AW Jr. Sputum cytology : use and potential in monitoring the workplace environment by screening for biological effects of exposure. *J Occup Med* 1986, 28 : 692- 703.

Fujita Y, Fujikane T, Fujiuchi S, Nishigaki Y, Yamazaki Y, Nagase A, Shimizu T, Ohsaki Y, Kikuchi K. The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected *in situ* in patients with non small cell lung carcinoma. *Cancer* 2003, 98: 1008- 1013.

Fujiwara M, Okayasu I, Takemura T, tanaka I, masuda R, Furuhashi Y, Noji M, Oritsu M, Kato M, Oshimura M. Telomerase activity significantly correlates with chromosome alterations, and proliferation in lung adenocarcinomas. *Mod pathol* 2000, 13 : 723- 729.

Fukahi K, Fukasawa M, Neufeld G, Itakura J, Korc M. Aberrant expression of neuropilin-1 and -2 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004, 10:581-90.

Garvik B, Carson M, Hartwell L. Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol*. 1995, 15:6128-38.

Gauthier LR, Granotier C, Soria JC, Faivre S, Boige V, Raymond E, Boussin FD. Detection of circulating carcinoma cells of telomerase activity. *Br J Cancer* 2001, 84: 631- 635.

Gazdar AF. The molecular and cellular basis of human lung cancer. *Anticancer Res* 1994, 13: 561-568

Gazzeri S, Brambilla E, Caron de Fromentel C, Gouyer V, Moro D, Perron P, Berger F, Brambilla C. p53 genetic abnormalities and myc activation in human lung carcinoma. *Int J Cancer* 1994, 58: 24- 32.

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

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

Geng Y, Whoriskey W, Park MY, Bronson RT, Medema RH, Li T, Weinberg RA, Sicinski P. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* 1999, 97: 767-77.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998, 273:30336-43.

Giger RJ, Urquart ER, Gillespie SKH, Levenson DV, Ginty DD, Kolodkin AL. Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 1998, 21: 1079-1092.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996, 379: 88- 91

Grandori C and Eisenman RN. Myc target genes. *Trends Biochem Sci* 1997, 22: 177- 181.

Graziano SL, Pfeifer AM, Testa JR, Mark GE, Johnson BE, Halliman EJ, et al. Involvement of the RAF1 locus at band 3p25, in the 3p deletion of small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1991, 3: 283- 293.



Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng HY, Xiao QR, Hann SR, Adams RR, Lichtsteiner S, Chin L, Morin GB, De Pinho RA. Telomerase transcriptase reverse gene is a direct target of c-myc but is not functionally equivalent to cellular transformation. *Oncogene* 1999, 18: 1219- 1226

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene : clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994, 54: 4855- 4878.

Greider CW. Telomeres to D loop T loop. *Cell* 1999, 97: 419- 422.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics 2000. *CA Cancer J Clin* 2000, 50: 7- 33.

Gomez-Roman JJ, Romero Fontalba A, Sanchez Castro L, Hernandez Nieto E, Fernandez Luna JL, Val- Bernal JF. Telomerase activity in pulmonary neuroendocrine tumors. *Am J Surg Pathol* 2000, 24 : 417- 421.

Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 2005, 434: 907- 913.

Gouyer V, Gazzeri S, Bolon I, Drevet C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanism of retinoblastoma gene inactivation in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998, 18:188-96.

Gunes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP, Englert C. Expression of hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res* 2000, 60: 2116- 2121.

(a) Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Counter CM, Beijersbergen RL, Knoll JHL, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Med* 1999, 5: 1164- 1170.

(b) Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999, 400: 464- 468.

Hainaut P, Milner J. Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res*. 1993, 53: 4469-73.

Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G-->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 2001, 22 : 367- 374.

Halmos G and Schally AV. Reduction in receptors for bombesin and epidermal growth factor in xenografts of human small- cell lung cancer after treatment with bombesin antagonist RC-3095. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94 : 956- 960.

Halvorsen TL, Leibowitz G, Levine F. Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol Cell Biol* 1999, 19 : 1864- 1870.

Handa A, Tokunaga T, Tsuchida T, Lee YH, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Fukuda H, Nakamura M. Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Int J Oncol* 2000, 17: 291-295.

Hara H, Yamashita, Shinada J, Yoshimura H, Kameya T. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001, 34: 219- 226.

Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988, 241: 353-357.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shortening during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990, 345: 458- 460.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, 75: 805- 816.

Harrington LM, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev* 1997, 11: 3109- 3115.

Harvey P, Warn A, Newman P, Perry LJ, Ball RY, Warn RM. Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol* 1996, 180: 389- 394.

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990, 346: 866- 868.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965, 37 : 614- 636.

He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell* 1997, 90: 739-751.

He Y, Armanious MK, Thomas MJ, Cress WD. Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene*. 2000, 19: 3422-33.

Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nature Med* 2001, 7: 833-839.

Heimbürger DC, Alexander CB, Birch R, Butterworth CE Jr, Bailey WC, Krumdieck CL. Improvement in bronchial squamous metaplasia in smokers treated with folate and vitamin B12. Report of a preliminary randomized, double-blind intervention trial. *JAMA*. 1988, 259:1525-30.

Heinrich MC. Is Kit an important therapeutic target in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9: 5825- 5828.

Henderson EH. Telomere DNA structure. In *Telomeres*. E. Blackburn and C. Greider (ed) pp11-34. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York 1995.

Henderson YC, Breau RL, Liu TJ, Clayman GL. Telomerase activity in head and neck tumors after introduction of wild type p53, p21, p16 and E2F1 genes by means of recombinant adenovirus. *Head Neck* 2000, 347- 354.

Henschke CI, Miettinen OS. Women's susceptibility to tobacco carcinogens. *Lung Cancer* 2004, 43: 1- 5.

Herbst RS, Bunn A Jr. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9: 5813- 5824.

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997, 1: 3-11.

Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, Riede D, Buttler A, Reissere C, Fusenig NE, Mueller MM. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. *Lab Invest* 1999, 79:1573.

Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97: 5462-7.

Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Nakamori S, Tateishi R. Bcl-2 oncoprotein in surgically resected non- small cell lung cancer: possibly defavorable prognostic factor in association with low incidence of distant metastasis. *J Surg Oncol* 1997, 64: 48- 54.

Hirashima T, Yoshitaka O, Nitta T, Sasada S, Kobayashi M, Masuda N, Matsui K, Nakagawa K, Yasumitsu T, Takada Y, Kikui M, Kawase I. Telomerase activity in endoscopically visible lung cancer. *Anticancer Res*. 2001, 21: 3685-9.

Hirayama T. Non smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *Br Med J* 1981, 282: 183- 185.

Hirsch E, Hu L-J, Prigent A, Constantin B, Agid Y, Drabkin H, Roche J. Distribution of semaphorin IV in adult human brain. *Brain Res* 1999, 823: 67- 79.

Hirsch FR, Prindiville SA, Miller YE, Franklin WA, Dempsey EC, Murphy JR, Bunn PA, Kennedy TC. Fluorescence versus white light bronchoscopy for detection of preneoplastic lesions: a randomized study. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93: 1385- 1391.

Hirsch FR, Merrick DT, Franklin WA. Role of biomarkers for early detection of lung cancer and chemoprevention. *Eur Respir J*. 2002, 19:1151-8.

(a) Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995, 1: 249- 255.

(b) Hiyama E, Hokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995, 55: 3258-3262.

Hiyama E, Gollahon L, kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996, 88: 116-122.

Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small cell and non small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87: 895- 902.

Hoare SF, Bryce LA, Wisman GBA, Burns S, Going JJ, van der Zee AGJ, Keith WN. Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with methylation of the hTERC promoter. *Cancer Res* 2001, 61: 27- 32.

Hofmann TG, Moller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Droge W, Will H, Schmitz ML. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol.* 2002, 4:1-10.

(a) Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE, White MA. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 1999, 13: 817- 826.

(b) Holt SE and Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol* 1999, 180: 10- 18.

Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer* 1998, 79; 8- 12.

Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87: 2775-9.

Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mittnacht S, Zhong S, Lu X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 1999, 3: 181-93.

Huang HJ, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EY, Lee WH. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 1988, 242:1563-6.

Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997, 88: 333- 346.

Hurley LH. Secondary DNA structures as molecular targets for cancer therapeutics. *Biochem Soc Trans.* 2001, 29:692-6.

Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96 : 424- 428.

Hynes NE, Horsch K, Olyayioye MA, Badache A. The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endoc Relat Cancer* 2001, 8: 151- 159.

Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn J Cancer Res* 1996, 87: 1063- 1069.

Ide T, Tsuji Y, Ishibashi S, Mitsui Y. Reinitiation of host DNA synthesis in senescent human diploid cells by infection with Simian virus 40. *Exp Cell Res* 1983, 143 : 343- 349.

Ijima AS, Greider CW. Short telomeres induce a DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2003, 14 : 987-1001.

Iniesta P, Gonzalez-Quevedo R, Moran A, Garcia-Aranda C, de Juan C, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Relationship between 3p deletions and telomerase activity in non-small-cell lung cancer: prognostic implications. *Br J Cancer*. 2004, 90:1983-8.

Irwin M, Marin MC, Phillipps AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH, Kaelin WG. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 2000, 407: 645- 648.

Irwin MS, Kaelin WG. p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ* 2001, 12:337-49.

Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, Goshima Y, Kitamura H, Teramoto S, Matsuse T. Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells. *Eur Respir J*. 2004, 23:665-70.

Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001, 268:2784-91.

Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beauséjour C, Jacobs JJ, Van Lohuizen M, Band V, Campisi J, Dimri GP. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 2003, 23 : 389- 401.

Ito T, Kagoshima M, Sasaki Y, Li C, Udaka N, Kitsukawa T, Fujisawa H, Taniguchi M, Yagi T, Kitamura H, Goshima Y. Repulsive axon guidance molecule Sema3A inhibits branching morphogenesis of fetal mouse lung. *Mech Dev*. 2000, 97:35-45.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 1992, 359: 295-300.

Jacobson DR. Ras mutations in lung cancer. *Fundamental biology and clinical management*. Brambilla E, Brambilla C. Eds M Dekker New York- Basel, 1998, pp: 139- 156.

Jarboe EA, Liaw KL, Thompson LC, Heinz DE, Baker PL, McGregor JA, Dunn T, Woods JE, Shroyer KR. Analysis as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene* 2002, 21: 664- 673.

Jeanmart M, Lantuejoul S, Fievet F, Moro D, Sturm N, Brambilla C, Brambilla E. Value of immunohistochemical markers in preinvasive bronchial lesions in risk assessment of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2003, 9:2195-203.

Jiang SX, Sato Y, Kuwao S, Kameya T. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol* 1995, 177: 135- 138.

Jiang SX, Kameya T, Sato Y, Yanase N, Yoshimura H, Kodama T. Bcl-2 protein expression in lung cancer and close correlation with neuroendocrine differentiation. *Am J Pathol* 1996, 148: 837- 846.

Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlisty TD, Chiu CP. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nature Genet* 1999, 21: 111- 114.

Johnson BE, Russell E, Simmons AM, Phelps R, Steinberg SM, Ihde DC, Gazdar AF. MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Cell Biochem* 1996, 24: 210- 217.

Johnson BE, Fischer T, Fischer B, Dunlop D, Rischin D, Silberman S, Kowalski MO, Sayles D, Dimitrijevic S, Fletcher C, Hornick J, Salgia R, Le Chevallier T. Phase II study of Imatimib in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9: 5880- 5887.

Kagoshima M, Ito T. Diverse gene expression and function of semaphorins in developing lung: positive and negative regulatory roles of semaphorins in lung branching and morphogenesis. *Genes to Cells* 2001, 6: 559-571.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995, 92: 3566- 3570.

Kaiser U, Schilli M, Haag U, Neumann K, Kreipe H, Kogan E et al. Expression of bcl-2 protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1996, 15: 31- 40.

Kakahana M, Yahata N, Hirano T, Honda H, Ikeda N, Kawate N, Kona C, Ebihara Y, Ohyashi K, Kato H. Telomerase activity during carcinogenesis in the bronchus, *Oncol Rep* 2002, 9 : 43- 49.

Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95:8292-7.

Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H, Inoue M. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through downregulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 2000, 6 : 1239- 1247.

Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 1999, 274 : 13085- 13090.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991, 51: 6304-11.

Katabami M, Dosaka-Akita H, Honma K, Kimura K, Fujino M, Uchida Y, Mikami H, Ohsaki Y, Kawakami Y, Kikuchi K. P53 and Bcl-2 expression in pneumoconiosis- related pre-cancerous lesions and lung cancers: frequent and preferential p53 expression in pneumoconiotic bronchiolar dysplasia. *Int J Cancer* 1998, 75 : 504- 511.

Kato H, Ikeda N. The role of fluorescence diagnosis in the early detection of high risk bronchial lesions. *Journal of Bronchology* 1998, 5 : 273- 274.

Kawakami Y, Kitamoto M, Nakanishi T, Yasui W, Tahara E, Nakayama JI, Ishakawa F, Tahara H, Ide T, Kajiyama G. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in human liver tissues. *Oncogene* 2000, 19: 3888- 3893.

Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y, Osamura Y, Inoue H, Ueyama Y, Nakamura M. Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2002, 95:2196-201.

Kaye FJ. RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer. *Oncogene.* 2002, 21:6908-14.

Keith RL, Miller YE, Gemmill RM, Drabkin HA, Dempsey EC, Haney J, la Rosa FG, Folkvord J, Kenedy TC, Prindville S, Franklin WA. Angiogenic squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6: 1616-1625.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 226: 324- 328.

Keohavong P, Demichele MAA, Malacrinis AC, Landreneau RJ, Weynant RJ, Siegfried RJW. Detection of K- ras mutations in lung carcinomas: relationships to prognosis. *Clin Cancer Res* 1996, 2: 411- 418 .

Keohavong P, Mady HH, Gao WM, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF. Topographic analysis of K-ras mutations in histologically normal lung tissues and tumours of lung cancer patients. *Br J Cancer* 2001, 85 : 235- 241.

Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, Robinson RA. p185neu expression in human adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 1990, 50 : 5184- 5191.

Kern JA, Torney L, Weiner D, Gazdar A, Sheppard HM, Fendly B. Inhibition of human lung cancer cell line growth by an anti-p185HER2 antibody. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993, 9 : 448- 454.

Kern JA, Slebos RJ, Top B, Rodenhuis S, Lager D, Robinson RA, Weiner D, Schwartz DA. C-erbB2 expression and codon 12k-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest* 1994, 93 : 516- 520.

Kerr KM, Carey FA, King G, Lamb D. Atypical adenomatous hyperplasia : relationship with pulmonary adenocarcinoma, p53, and c-erbB-2 expression. *J Pathol* 1994; 174 : 249- 256.  
Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol* 2001, 54: 257- 271.

Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol*. 2000, 18:3221-9.

Kharbanda S, Kumar V, Dhar S, Pandey P, Chen C, Majumber P, Yuan ZM, Whang Y, Strauss W, Pandita TK, Weaver D, Kufe D. Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr Biol* 2000, 10 : 568- 575.

Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 1997, 6 : 2011-2019.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini G, Gillett N, Philipps HS, Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993, 362: 841-844.

Kim YC, Park KO, Kern JA, Park CS, Lim SC, Jang AS, Yang JB. The interactive effect of Ras, HER2, P53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 1998, 22:181-90.

Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2001, 61: 3419-24.

Kim H, Kwon YM, Kim JS, Lee H, Park JH, Shim YM, Han J, Park J, Kim DH Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004, 22:2363-70.

Kim HR, Christensen R, Park NH, Sapp P, Kang ML, Park NH. Elevated expression of hTERT is associated with dysplastic cell transformation during human oral carcinogenesis in situ. *Clin Cancer Res* 2001, 7: 3079- 3086.

Kishi S, Wulf G, Nakamura M, Lu KP. Telomeric protein Pin2/TRF1 induces mitotic entry and apoptosis in cells with short telomeres and is down-regulated in human breast tumors. *Oncogene* 2001, 20: 1497- 1508.

Kitagawa Y, Wong F, Lo P, Elliott M, Verbugt LM, Hogg JC, Daya M. Overexpression of Bcl2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers. *Am J Resp Cell Biol* 1996, 15: 45- 54.



Kitaguchi S, Takeshima Y, Nishisaka T, Inai K. Proliferative activity, p53 expression and loss of heterozygosity on 3p, 9p and 17p in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Hiroshima J Med Sci.* 1998, 47:17-2.

Kodama T, Biyajima S, Watanabe S, et al. Morphometric study of adenocarcinomas and hyperplastic epithelial lesions of peripheral lung. *Am J Clin Pathol* 1986; 85 : 146- 151.

Kohno H, Hiroshima K, Toyozaki T, Fujisawa T, Ohwada H. p53 mutation and allelic loss of chromosome 3p, 9p of preneoplastic lesions in patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 1999, 85: 341- 347.

Kok K, van Den Berg A, Buchhagen DL, Carritt B, Buys CHCM. A PCR- aided transcript titration assay revealing very low expression of a gene at 3p21.3 in 33 cell lines derived from all types of lung cancer. *Eur J Hum genet* 1993, 1 : 156- 163.

Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encodes a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993, 75 : 1389- 1399.

Kolodkin AL, Levengood D, Rowe E, Tai Y, Giger R, Ginty D: Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997, 90:753-762.

Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, Meyerson M, Tan LK, Weinberg RA, Haber DA, Gerald WL. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet* 1998, 19 : 182- 186.

Komiya T, Kawasa I, Nitta T, Yasumitsu T, Kikui M, Fukuoda M, Nakagawa K, Hirashima T. Prognostic significance of hTERT expression in non small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2000, 16: 1173- 1177.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Deprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis : a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 12072- 12077.

Krystal G, Birrer M, Way J, Nau M, Sausville E, Thompson C, Minna J, Battey J. Multiple mechanisms for transcriptional regulation of the myc gene family in small cell lung cancer. *Mol Cell Biol* 1988, 8: 3373- 3381.

Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res.* 1996, 56: 370-6.

Kubo A, Kaye FJ. Searching for selective cyclin-dependent kinase inhibitors to target the retinoblastoma/p16 cancer gene pathway. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93: 415-7.

Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, Shinomiya N, Ozeki Y, Ferrans VJ, Torikata C. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol* 2001, 32: 188- 195.

Kumaki K, Kawai T, Churg A, Galateau- Sallé FB, Hasleton P, Henderson D, Roggli V, Travis WD, Cagle PT, Ferrans VJ. Expression of telomerase reverse transcriptase (TERT) in malignant mesotheliomas. *Am J Surg Pathol* 2002, 26: 365- 370.

Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Arai K, Oishi N, Mizuno H, Hayashi N, Hahn WC, Murakami S. Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem*. 2004, 279:51508-15.

Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610- 614.

Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res* 1999, 9: 917- 921.

Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, Ariga H, Inoue M. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res*. 2000 28:669-77.

Kyo S and Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy ? *Oncogene* 2002, 21: 688- 697.

Lacal PM, Faila CM, Pagani E, Odorisio T, Scietroma C, Falcinelli S, Zambruno G, D'Astri S. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 2000, 115: 1000-1007.

Lam S, Kennedy T, Unger M, Miller Y, Gelmont D, Rush V. Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 1998, 113: 696- 702.

Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC, Shay JW. Telomerase activity in human brain tumors. *Lancet* 199, 346: 1267- 1268.

(a) Latil A, Vidaud D, Valeri A, Fournier G, Vidaud M, Lidereau R, Cussenot O, Biache I. Htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer. *Int J Cancer*. 2000, 89:172-6.

(b) Latil A, Bieche I, Pesche S, Valeri A, Fournier G, Cussenot O, Lidereau R. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer* 2000, 89: 167-172.

Le S, Sternglanz R, Greider CW. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol. Biol Cell* 2000, 11: 999-1010

Lee DH, yang SC, Hong SJ, Chung BH, Kim IY. Telomerase: a potential marker of transitional cell carcinoma in bladder washes. *Clin Cancer Res* 1998, 4: 535- 538.

Lee EY, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 1988, 241: 218-21.

Lee JO, Russo AA, Pavletich NP. Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* 1998, 391: 859-65.

Lee JS, Lippman SM, Benner SE, Lee JJ, Ro JY, Lukeman JM, Morice RC, Peters EJ, Pang AC, Fritsche HA Jr. Randomized placebo-controlled trial of isotretinoin in chemoprevention of bronchial squamous metaplasia. *J Clin Oncol.* 1994, 12:937-45.

Lee TC, Li L, Philipson L, Ziff EB. Myc represses transcription of the growth arrest gene *gas1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 12886- 12891.

Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 2000, 60: 6116- 6133.

Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997, 88 : 323- 331.

Li H, Zhao LL, Funder JW, Liu JP. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1997, 272: 16729- 16732.

Li H, Zhao LL, Funder JW, Liu JP. Telomerase is controlled by protein kinase C alpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1998, 273: 3346- 3342.

Linke SP, Clarkin KC, Di Leonardo A, Tsou A, Wahl GM. A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev.* 1996, 10: 934-47.

Liu K, Schoonmaker MM, levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase hTERT in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 5147- 5152.

Liu Y, Snow BE , Hande MP, Baerlocher G, Kickhoefer VA, Yeung D, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L. Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol* 2000, 20:8178-8184.

Liu K, Hodes RJ, Weng N. Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *J Immunol* 2001, 166: 4826- 4830.

Lonardo F, Rush V, Langenfeld J, Dmitrovsky E, Klimstra DS. Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 1999, 15: 2470-2476.

Lu C, Soria JC, Tang X, Xu XC, Wang L, Mao L, Lotan R, Kemp B, Bekele BN, Feng L, Hong WK, Khuri FR. Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. *J Clin Oncol.* 2004, 22:4575-83.

Lukowiak AA, Narayanan A, Li ZH, Terns RM, Terns MP. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* 2001, 7:1833-44.

Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 1998, 18: 753-61.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004, 350:2129-39.

Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 1998, 273:13375-8.

Makarov VL, Horose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 1997, 88 : 657- 666.

Malumbres M, Perez De Castro I, Hernandez MI, Jimenez M, Corral T, Pellicer A. Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol Cell Biol*. 2000, 20:2915-25.

Maniwa Y, Yoshimura M, Obayashi C, Inaba M, Kiyooka K, Kanki M, Okita Y. Association of p53 gene mutation and telomerase activity in resectable non-small cell lung cancer. *Chest*. 2001, 120: 589-94.

Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lipman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89 : 857- 862.

Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi M, Buttitta F, Pellegrini S, Bertacca G, Chella A, Merlo G, Angeletti CA, Dalla Palma P, Bevilacqua G. p21 RNA and protein expression in non – small cell lung carcinomas: evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene* 1996, 12 : 1319- 1324.

Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, Bevilacqua G. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999, 5: 2077- 2081.

Marchetti A, Pellegrini C, Buttitta F, Falleni M, Romagnoli S, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Angeletti CA, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. *Lab Invest* 2002, 82: 729- 736.

Marcus PM. Lung cancer screening: an update. *J Clin Oncol*. 2001, 19:83S-86S.

Marhin WW, Chen S, Facchini LM, Fornace AJ, Penn LZ. Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene* 1997, 14: 2825- 2834.

Masuda A, Osada H, Yatabe Y, Kozaki K, Tatematsu Y, Takahashi T, Hida T, Takahashi T, Takahashi T. Protective function of p27(KIP1) against apoptosis in small cell lung cancer cells in unfavorable microenvironments. *Am J Pathol*. 2001, 158: 87-96.

- Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E, Tahara H, Kuniyasu H, Haruma K, Chayama K, Yasui W, Tahara E. Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. *Int J Oncol*. 2001, 19: 507-12.
- McWilliams A, Mayo J, MacDonald S, leRiche JC, Palcic B, Szabo E, Lam S. Lung cancer screening: a different paradigm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003, 168:1167-73.
- Melamed MR, Zaman MB. Pathogenesis of epidermoid carcinoma of lung. In : Shimostao Y, Melamed MR, Nettesheim P, eds. *Morphogenesis of lung cancer*, vol 1. Boca Raton, FL : CRC Press, 1982 : 37- 64.
- Mercurio AM, Bachelder RE, Bates RC, Chung J. Autocrine signaling in carcinoma: VEGF and the  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrin. *Semin Cancer Biol*. 2004, 14:115-22.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziauwgra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Harber DA, Weinberg RA. HEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997, 90: 785- 795.
- Miao HQ, Soker S, Feiner L, Alonso JL, Raper JA, Klagsbrun M. Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol* 1999, 146: 233-42.
- Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J* 2000, 14: 2532-9.
- Michelland S, Gazzeri S, Brambilla E, Robert-Nicoud M. Comparison of chromosomal imbalances in neuroendocrine and non-small-cell lung carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999, 114:22-30.
- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995, 376: 337- 314
- Miettinen PJ, Warburton D, Bu D, Zhao JS, Berger JE, Minoo P, Koivisto T, Allen L, Dobbs L, Werb Z, Derynck R. Impaired lung branching morphogenesis in the absence of functional EGF receptor. *Dev Biol* 1997, 186: 224- 236.
- Miller RR, Nelems B, Evans KG, Muller NL, Ostrow DN. Glandular neoplasia of the lung. A proposed analogy to colonic tumors. *Cancer* 1988, 61:1009-14.
- Miller RR . Bronchioloalveolar cell adenomas. *Am J Surg Pathol* 1990, 14: 904- 912.
- Mills NE, Fishman CL, Scholes J, Anderson SE, Rom WN, Jacobson DR. Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 1995, 87:1056-60.
- Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen JP, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S, Farsetti A. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol* 2000, 20 : 3764- 3771.

(a) Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human dyskeratosis congenita. *Nature* 1999, 402: 551- 555.

(b) Mitchell JR, Cheng J, Collins K. A box H/ACA small nucleolar RNA like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol* 1999, 19: 567- 576.

Miura N, Oniki N, Rathi A, Virmani A, Nakamoto S, Kishimoto Y, Murawaki Y, Kawasaki H, Hasegawa J, Ishimura M, Travis WD, Gazdar AF. HTR repressor related gene on human chromosome 10p15.1. *Br J Cancer* 2001, 85: 1510- 1514.

Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995, 80: 293-9.

Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW. Absence of cancer associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genet* 1999, 21: 115- 118.

Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature*. 1994, 371: 72-4.

Moro-Sibilot D, Fievet F, jenamart M, lantuejoul S, Arbib F, Laverrière MH, Brambilla E, Brambilla C. Clinical prognostic indicators of high grade pre-invasive bronchial lesions. *Eur Respir J* 2004, 24 : 1-6.

Moroni MC, Hickman ES, Denchi EL, Caprara G, Colli E, Cecconi F, Muller H, Helin K. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol*. 2001, 3: 552-8.

Mountain CF. Revisions in the international system for staging of lung cancer. *Chest* 1997, 111: 1710- 1717.

Munro J, Steeghs K, Morrison V, Ireland H, Parkinson EK. Human fibroblast replicative senescence can occur in the absence of extensive cell division and short telomeres. *Oncogene*. 2001, 20:3541-52.

Myers MP, Tonks NK. PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. *Am J Hum Genet*. 1997, 61:1234-8.

Nakamura N, Iijima T, Mase K, Furuya S, Kano J, Morishita Y, Noguchi M. Phenotypic differences of proliferating fibroblasts in the stroma of lung adenocarcinoma and normal bronchus tissue. *Cancer Sci*. 2004, 95:226-32.

Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Linger J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science (Wash DC)* 1997, 277: 955- 959.

Nakamura TM and Cech TR. Reversing time: Origin of telomerase. *Cell* 1998, 92: 587- 590.

Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiroi S, Mukai M, Ikeda E. Expression of human telomerase RNA component and telomerase reverse transcriptase mRNA in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Hum Pathol* 2002, 33 : 697- 702.

Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiroi S, Mukai M, Ikeda E, Koering CE, Gilson E. Expression of mRNAs for telomeric repeat binding factor (TRF)-1 and TRF2 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* 2003, 9 : 1105-1111.

Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003, 113:703-16.

Nasarre P, Constantin B, Rouhaud L, Harnois T, Raymond G, Drabkin HA, Bourmeyster N, Roche J. Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading. *Neoplasia*. 2003, 5:83-92.

Nasiell M, Auer G, Kato H. Cytological studies in man and animals on the development of bronchogenic carcinoma. In : Mc Dowell EM. Ed. *Lung carcinoma*. Edinburgh : Churchill Livingstone, 1987 : 207- 242.

Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD. L-myc, a new myc- related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 1985, 318: 69- 73.

Nettesheim P, Klein-Szanto AJP, Yarita T. Experimental models for the study of morphogenesis of lung cancer. In : Shimostao Y, Melamed MR, Nettesheim P, eds. *Morphogenesis of lung cancer*, vol 2. Boca Raton, FL : CRC Press, 1982 : 131- 166.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999, 13: 9-22.

Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* 1998, 9: 585-93.

Nigro JM, Aldape KD, Hess SM, Tlsty TD. Cellular adhesion regulates p53 protein levels in primary human keratinocytes. *Cancer Res* 1997, 57: 3635-9.

Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Niklinski J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC): association with p53 gene mutation and prognosis. *Lung Cancer*. 2001, 34S:S59-64.

Nishimoto A, Miura N, Horikawa I, Kugoh H, Murakami Y, Hirohashi S, Kawasaki H, Gazdar AF, Shay JW, Barrett JC, Oshimura M. Functional evidence for a telomerase repressor gene on chromosome 10p15.1. *Oncogene* 2001, 20: 828- 835.

Nishio M, Koshikawa T, Kuroidhi T. Prognostic of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1996, 14 : 497- 502.

Noguchi M, Murakami M, Bennett W, Lupu R, Hui F Jr, Harris CC, Gerwin BI. Biological consequences of overexpression of a transfected c-erbB2 gene in immortalized human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 1993, 53 : 2035- 2043.

Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Autio-Harmanen H, Risteli L, Risteli J, Vahakangas K, Paakko P. Concurrent p53 expression in bronchial dysplasias and squamous cell lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993, 142: 725- 732.

Oh H, Takagi H, Otani A, Koyama S, Kemmochi S, Uemura A, Honda Y. Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): A mechanism contributing to VEGF- induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 383- 388.

(a) Oh S, Song YH, Kim UJ, Kim TK. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem* 1999, 274 : 37473- 37478.

(b) Oh S, Song YH, Kim UJ, Kim TK. In vivo and in vitro analyses of Myc for differential promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 263: 361- 365.

Oh S, Song YH, Yim J, Kim TK. Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* 2000; 19: 1485- 1490.

Ohmori T, Podack ER, Nishio K, Takahashi M, Miyahara Y, Takeda Y, Kubota N, Funayama Y, Ogasawara H, Ohira T, et al Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 192: 30- 36.

Ohmura Y, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Telomerase activity and Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000, 6:2980-7.

Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, Prat M, Maggi G, Arena N, Natali PG, Comoglio PM, Di Renzo MF. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non- small- cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1996, 74: 1862- 1868.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004, 304:1497-500

Palmero I, Pantoja C, Serrano M. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*. 1998, 395: 125-6.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000, 60: 5954- 8.

Pan H, Griep AE. Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev* 1995, 9: 2157-69.



Pan H, Yin C, Dyson NJ, Harlow E, Yamasaki L, Van Dyke T. Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol Cell* 1998, 2: 283-92.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101:13306-11.

Paradis V, Bieche I, Dargere D, Bonvoust F, Ferlicot S, Olivi M, Ben Lagha N, Blanchet P, Benoit G, Vidaud M, Bedossa P. HTERT expression in sporadic renal cell carcinomas. *J Pathol* 2001, 195: 209- 217.

Pearson M, Pelicci PG. PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence. *Oncogene*. 2001, 20: 7250-6.

Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K, du Manoir S, Cremer T, Dietel M, Ried T. Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res*. 1997, 57:2331-5.

Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter KC, Mason DY. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993, 329 : 690-694

Pfeiffer P, Clausen PP, Andersen K, Rose C. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185HER-2 in patients with systematically untreated non –small- cell lung cancer : an immunohistochemical study on cryosections . *Br J Cancer* 1996, 74: 86- 91.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 1997, 389:300-5.

Pommier JP, Lebeau J, Ducray C, Sabatier L. Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequences. *Biochimie* 1995, 77:817-25.

Ponticiello A, Barra E, Giani E, Bocchino M, Sanduzzi A. p53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer : a prospective study. *Eur Respir J* 2000, 15 : 547- 552.

Poremba C, Scheel C, Hero B, Chirstiansen H, Schaefer KL, Nakayama JI, Berthold F, Juergens H, Boecker W, Dockhorn- Dworniczak B. Telomerase activity and telomerase subunits gene expression patterns in neuroblastomas : a molecular and immunohistochemical study establishing prognostic tools for fresh- frozen and paraffin embedded tissues. *J Clin Oncol* 2000, 18: 2582- 2592.

Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Diff* 2001, 12: 129-135.

- Prives C, Manley JL. Why is p53 acetylated? *Cell*. 2001, 107: 815-8.
- Prives C and Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999, 187:112-26.
- Püschel AW. Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains for axonal extension. *Neuron* 1995, 14 : 941- 948.
- Qin XQ, Chittenden T, Livingston DM, Kaelin WG Jr. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev* 1992, 6: 953-64.
- Quinn KA, Treston AM, Unsworth EJ, Miller MJ, Vos M, Grimley C, Battey J, Mulshine JL, Cuttitta F. Insulin- like growth factor expression in human cancer cell lines. *J Biol Chem* 1996, 271: 11477- 11483.
- Quinn TP, Peters KG, de Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase-1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium *Proc Nat Acad Sci USA* 1993, 90: 7533- 7537.
- Rachwal WJ, Bongiorno PF, Orringer MB, Whyte RI, Ethier SP, Beer DG. Expression and activation of c-erbB2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1995, 72:56- 64.
- Ramet M, Castren K, Jarvinen K, Pekkala K, Turpeenniemi-Hujanen T, Soini Y, Paakko P, Vahakangas K. p53 protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*. 1995, 16: 2117-24.
- Rezler EM, Bearss DJ, Hurley LH. Telomere inhibition and telomere disruption as processes for drug targeting. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003, 43:359-79.
- Ratovitski EA, Patturajan M, Hibi K, Trink B, Yamaguchi K, Sidransky D. p53 associates with and targets Delta Np63 into a protein degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98: 1817-22.
- Richardson GE and Johnson BE. The biology of lung cancer. *Sem Oncol* 1993, 20 : 105- 127.
- Riou JF, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, Megnin-Chanet F, Helene C, Mergny JL. Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 99 : 2672- 2677
- Risse EK, Vooijs GP, van't Hof MA. Diagnostic significance of « severe dysplasia » in sputum cytology. *Acta Cytologica* 1988, 32: 629- 634.
- Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Science* 2001, 114: 853- 865.
- Robles AI, Linke SP, Harris CC. The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*. 2002, 21:6898-907.
- Roche J, Boldog F, Robinson M, Robinson L, Varella- Garcia M, Swanton M, Waggoner B, Fishel R, Franklin W, Gemmill R, Drabkin H. Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene* 1996, 12: 1289- 1297.

Rodenhuis S, Slebos RJC. Significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992, 52: 2665- 2669.

Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, Slebos RJ, Mooi WJ, van't Veer L, van Zandwijk N. Mutational activation of the K ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung. A prospective study. *J Clin Oncol* 1997, 15: 285- 291.

Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Xong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161 : 1355- 1367.

Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 2003, 63: 2705- 2715.

Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, Tolosa E, Armengol P, Barnadas A, Ariza A. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 1993, 8 : 2407- 2412

Rossi G, Cavazza A, Marchioni A, Migaldi M, Bavieri M, Facciolongo N, Petruzzelli S, Longo L, Tamberi S, Crino L. Kit expression in small cell carcinomas of the lung : effects of chemotherapy. *Mod Pathol* 2003: 16 : 1041-1047.

Roz L, Gramegna M, Ishii H, Croce CM, Sozzi G. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99:3615-20.

Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinomas in mice and humans. *Nat Genet* 2001, 28: 155-159

Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, McIntosh J, Kurie J, Dmitrovsky E. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non- small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 1993, 53: 2379- 2385.

Rusch V, Klimstra D, Linkov I, Dmitrovsky E. 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*. 1995, 55:1365-72.

Ryberg D, Hoyer A, Philipps DH, Haugen A. Different susceptibility to smoked induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res* 1994, 54: 5801- 5803.

Rygaard K, Nakamura T, Spang-Thomsen M. Expression of the proto oncogene c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor, in SCLC cell lines and xenografts. *Br J Cancer* 1993, 67: 37- 46.

Sagawa Y, Nishi H, Isaka K, Fujito A, Takayama M. The correlation of TERT expression with c-myc expression in cervical cancer. *Cancer Lett* 2001, 168:45-50.

Saito Y, Nagamoto N, Ota S, Sato M, Sagawa M, Kamma K, Takahashi S, Usuda K, Endo C, Imai T, et al. Results of surgical treatment for roentgenographically occult bronchogenic squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992, 104: 401- 407.

Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP<sub>short</sub>. *Cell Growth and Differentiation* 2005 (in press).

Sato N, Takahashi H. Hepatocyte growth factor promotes growth and lumen formation of fetal lung epithelial cells in primary culture. *Respirology*. 1997, 2: 185-91.

Schlichtholz B, Trédaniel J, Lubin R, Zalcman G, Hirsh A, Soussi T. Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br J Cancer* 1994, 69: 809- 816.

Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM, Manning J, Zhao XY, Fang K, Roth JA.. Differential expression of the c-erbB2 gene in human small cell lung and non small cell lung cancer. *Cancer Res* 1989, 49: 4968- 4971

Schwendel A, Langreck H, Reichel M, Schrock E, Ried T, Dietel M, Petersen I. Primary small-cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations. *Int J Cancer* 1997, 74:86-93.

Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J* 2000, 19: 2652- 2661.

Sekido Y, Bader S, Latif F, Chen JY, Duh FM, Wei MH, Albanesi JP, Lee CC, Lerman MI, Minna JD. Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 4120- 4125.

Sellers WR, Rodgers JW, Kaelin WG Jr. A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92:11544-8.

Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA, Nichols G, Khaled Z, Telang NT, Narayanan R. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 12343- 12346

Sharp TV, Munoz F, Bourbouli D, Presneau N, darai E, Wang HW, cannon M, Butcher DN, Nicholson AG, Klein G, Imreh S, Boshoff C. LIM domains containing protein 1 (LIMD1), a tumor suppressor encoded at chromosome 3p21.3, binds pRb and represses E2F- driven transcription. *Proc Natl Aca Sci USA* 2004, 101: 16531- 16536

Shay JW, Pereira-Smith O, Wright WE. A role for both Rb and p53 in the regulation of the cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991, 196: 33- 39.

Shay JW. Toward identifying a cellular determinant of telomerase repression. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 4- 6.

Shen M, Haggblom C, Vogt M, Hunter T, Lu KP. Characterization and cell cycle regulation of the related human proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 13618- 13626.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996, 274:1672-7.

Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* 1998, 12: 2984-91.

Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000, 60: 3689-95.

Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001, 2:731-7.

Shi D, He G, Cao S, Pan W, Zhang HZ, Yu D, Hung MC. Overexpression of the c-erbB2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinogenesis* 1992, 5 : 213- 218.

Shih JY, Yang SC, Hong TM, Yuan A, Chen JJW, Yu CJ, Chang YL, Lee YC, Peck K, Wu CW, Yang PC. Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:1392-1400.

Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino, Baba M, Saitoh Y, Lizasa T, Sekine Y, Suzuki M, Hiroshima K, Ohwada H. Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* 2001, 92 : 849- 85.

Shigemitsu K, Sekido Y, Usami N, Mori S, Sato M, Horio Y, Hasegawa Y, Bader SA, Gazdar AF, Minna JD, Hida T, Yoshioka H, Imaizumi M, Ueda Y, Takahashi M, Shimokata K. Genetic alteration of the beta-catenin gene (CTNNB1) in human lung cancer and malignant mesothelioma and identification of a new 3p21.3 homozygous deletion. *Oncogene.* 2001, 20:4249-57.

Shimizu T, Miwa W, Nakamori S, Ishikawa O, Konishi Y, Sekiya T. Absence of a mutation of the p21/WAF1 gene in human lung and pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* 1996, 87 : 275- 278.

Shimosato Y, Kodama T, Kameya T. Morphogenesis of peripheral type adenocarcinoma of the lung. In : Shimosato Y, Melamed MR, Nettesheim P, eds. *Morphogenesis of lung cancer*, vol 1 Boca Raton, KL : CRC Press, 1982 : 65- 90.

(a) Siegfried JM, Gillespie AT, Mera R, Casey TJ, Keohavong P, Testa JR, Hunt JD. Prognostic value of specific KRAS mutations in lung adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997, 6: 841- 847 .

(b) Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weynant RJ, Testa JR, Landreneau RJ. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997, 57: 433- 439.

Siemeister G, Martigny-Baron G, Marme D. The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis* 1998, 17: 241-248.

Singh Kaw P, Zarnegar R, Siegfried JM. Stimulatory effects of hepatocyte growth factor on normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1995, 268: L112-L1020.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 6:963-8.

Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio MDO. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990, 323 : 561- 565.

Smith ML, Seo YR. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis*. 2002, 17:149-56.

Smorgorzewka A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF1. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 1659- 1668.

Smogorzewska A, de Lange T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J* 2002, 21: 4338-4348,.

Snijders PJ, van Duin M, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Meijer CJ. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions : strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res* 1998, 58: 3812- 3818.

Soker S, Fidler H, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*. 1996, 271:5761-7.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform- specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998, 92: 735-745.

Somers VA, van Henten AM, ten Velde GP, Arends JW, Thunnissen FB. Additional value of K-ras point mutations in bronchial wash fluids for diagnosis of peripheral lung tumours. *Eur Respir J*. 1999, 13:1120-4.

Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP, Boussin FD, Sabatier L. Molecular detection of telomerase positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999, 5 : 971- 975.

Soria JC, Moon C, Wang L, HittelmanWN, Jang SJ, Sun SY, Lee JJ, Liu D, Kurie JM, Morice RC, Lee SJ, Hong WK, Mao L. Effects of N-(4-Hydroxyphenyl) Retinamide on hTERT Expression in the Bronchial Epithelium of Smokers. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93: 1257-63.

Soria JC, Morat L, Durdux C, Housset M, Cortez A, Blaise R, Sabatier L. The molecular detection of circulating tumor cells in bladder cancer using telomerase activity. *J Urol* 2002, 167: 352- 356.

Souhami R. Lung cancer. *Br Med J* 1992, 304: 1298-1301

Sozzi G, Miozzo M, Donghi R, Pilotti S, Cariani CT, Pastorino U, Della Porta G, Pierotti MA. Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res* 1992, 52: 6079- 6082.

Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, Pierotti MA, Tavecchio L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res*. 2001, 61:4675-8.

Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelosi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *Clin Oncol*. 2003; 21:3902-8.

Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, Kaminsky LS. The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicol* 1997, 27: 319- 365.

Spurzem JR, Rennard SI, Romberger DJ. Bombesin-like peptides and airway repair: a recapitulation of lung development ? *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, 16: 209- 211.

Sreeramaneni R, Chaudhry A, McMahon M, Sherr CJ, Inoue K. Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Mol Cell Biol*. 2005, 25:220-32.

Steinert S, Shay JW, Wright WE Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 273:1095-1098.

Sterner JM, Dew-Knight S, Musahl C, Kornbluth S, Horowitz JM Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol*. 1998, 18: 2748-57.

Strano S, Blandino G. p73-mediated chemosensitivity: a preferential target of oncogenic mutant p53. *Cell Cycle* 2003, 2: 348-9.

Strong MS, Incze J, Vaughan CW. Field cancerization in the aerodigestive tract: its etiology, manifestations, and significance. *J Otolaryngol* 1984, 13:1-6.

Sturm N, Rossi G, Lantuejoul S, Laverriere MH, Papotti M, Brichon PY, Brambilla C, Brambilla E. 34BetaE12 expression along the whole spectrum of neuroendocrine proliferations of the lung, from neuroendocrine cell hyperplasia to small cell carcinoma. *Histopathology*. 2003, 42:156-66.

Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K, Sasazuki T. Ras gene mutation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. *Cancer Res* 1992, 52 : 2903- 2906.

Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY, Gazdar AF. K-ras mutations are relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1994, 54 : 5811- 5815.

Sun D, Lopez-Guajardo CC, Quada J, Hurley LH, Von Hoff DD. Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. *Biochemistry* 1999; 38: 4037-44.

Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehen NM, Rabbitts P. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene*. 1992, 7:1989-97.

Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yasumoto K. Prognostic impact of telomerase activity in non small cell lung cancers. *Ann Surg* 1999, 230: 715- 720.

Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T, Tahara E. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1995, 1: 1245-1251.

Tahara H, Yasui W. Tahara E, Fujimoto J, Ito K, Tamai K, Nakayama JI, Ishakawa F, Tahara E, Ide T. Immunohistochemical detection of human telomerase catalytic component hTERT in human colorectal tumor and non tumor tissue sections. *Oncogene* 1999, 18: 1561- 1567.

Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H, Strittmatter SM. Plexin-neuropilin-1 complexes from functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 1999, 99: 59-69.

Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M. Expression of telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res* 1998, 58 : 1558- 1561.

Takigawa N, Segawa Y, Nakata M, Saeki H, Mandai K, Kishino D, Shimono M, Ida M, Eguchi K. Clinical investigation of atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Lung Cancer*. 1999, 25:115-21.

Tamagone L, Comoglio PM. Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends cell Biol* 2000, 109: 377- 383.

Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factor in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 1990, 50 : 7077-7080

Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 1991, 27 : 1372- 1375.

Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, LeRiche J, Horsman D, Nouvet G, Palcic B, Lam S. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res* 1995, 55: 5133-9.

Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Inst Cancer* 1997, 89 : 1580- 1586.

Tian X, Song S, Wu J, Meng L, Dong Z, Shou C. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 286: 505- 512



Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:13954-9.

Toomey D, Smyth G, Condron C, Kay E, Conroy R, Foley D, Hong C, Hogan B, Toner S, McCormick P, Broe P, Kelly C, Bouchier-Hayes D. Immune function, telomerase and angiogenesis in patients with primary, operable non small cell lung carcinoma: tumor size and lymph node status remain the most important prognostic features. *Cancer* 2001, 92: 2648-2657.

Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, 264:781-8.

Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. Histological typing of lung and pleural tumors. World Health Organization. International Histological Classification of tumors. 3rd ed. Springer-Verlag: Berlin 1999.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (Eds). WHO classification of tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press: Lyon 2004.

Travis WD, Garg K, Franklin W, Wistuba II, Sabloff B, Noguchi M, Kakinuma R, Zakowski M, Ginsberg M, Padera R, Jacobson F, Johnson BE, Hirsch F, Brambilla E, Flieder DB, Geisinger KR, Thunnissen F, Kerr K, Yankelevitz D, Franks TJ, Galvin JR, Henderson DW, Nicholson AG, Hasleton PS, Roggli V, Tsao MS, Capuzzo F, Vasquez M. Evolving concepts in the pathology and CT imaging of lung adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma. *J Clin Oncol* 2005, submitted

Tsai CM, Chang KT, Perng RP, Mitsudomi T, Chen MH, Kadoyama C, Gazdar AF. Correlation of intrinsic chemoresistance of non small cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85: 897- 901

Tsai CM, Yu D, Chang KT, Wu LH, Perng RP, Ibrahim NK, Hung MC. Enhanced chemoresistance by elevation of p185neu levels in Her-2/neu- transfected human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87: 682- 684.

Tsai CM, Chang KT, Wu LH, Chen JY, Gazdar AF, Mitsudomi T, Chen MH, Perng RP. Correlations between intrinsic chemoresistance and Her-2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996, 56: 206- 209

Tsao JI, Zhao Y, Lukas X, Shah A, Press M, Shibata D. Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin Cancer Res* 1997, 3: 627- 631.

Tsao AS, McDonnell T, Lam S, Putnam JB, Bekele N, Hong WK, Kurie JM. Increased phospho-AKT (Ser(473)) expression in bronchial dysplasia: implications for lung cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003,12:660-4

Tsuchiya E, Furuta R, Wada N, Nakagawa K, Ishikawa Y, Kawabuchi B, Nakamura Y, Sugano H. High K-ras mutation rates in goblet- cell- type adenocarcinomas of the lung. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995, 577- 581

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelman H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee PS, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002, 415:45-53.

Ueda M, Ouhtit A, Bito T, Nakazawa K, Lubbe J, Ichihashi M, Yamasaki H, Nakazawa H. Evidence for UV associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res* 1997, 57: 370- 374.

UICC. International Union Against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumours. 6<sup>th</sup> edition 2002. Wiley and Sons. New York.

Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 1998, 8 : 4168- 4172.

Umbricht CB, Sherman ME, Dome J, Carey LA, Marks J, Kim N, Sukumar S. Telomerase activity in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Oncogene* 1999, 18 : 3407- 3414.

Unified Nomenclature for the Semaphorins/ Collapsins. *Cell* 1999, 97: 551- 552.

Urban T, Ricci S, Lacave R, Antoine M, Kambouchner M, Capron F, Bernaudin JF. Codon 12 Ki-ras mutation in non small cell lung cancer: a comparative evaluation in tumoural and non tumoural lung. *Br J Cancer* 1996, 74: 1051- 1055.

Urban T, Ricci S, Danel C, Antoine M, Kambouchner M, Godard V, Lacave R, Bernaudin JF. Detection of codon K-ras mutations in non-neoplastic mucosae from bronchial carina in patients with lung cancer. *Br J Cancer* 2000, 82: 412- 417.

Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res*. 2002, 62:371-5.

Usami N, Sekido Y, Maeda O, Yamamoto K, Minna JD, Hasegawa Y, Yoshioka H, Imaizumi M, Ueda Y, Takahashi M, Shimokata K. Beta-catenin inhibits cell growth of a malignant mesothelioma cell line, NCI-H28, with a 3p21.3 homozygous deletion. *Oncogene*. 2003, 22:7923-30.

Van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997, 385: 740- 743.

Veldman T, Hrikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 oncoprotein. *J Virol* 2001, 7: 4467- 4472.

Venmans B, Van Der Linden H, Van Boxem T, Postmus P, Smit E, Sutedja T. early detection, Thiberville L, Cluduk H, Metayer J, Dominiuqe S, Labbé D, Nouvet G. Auto fluorescence versus white light endoscopy: improvement in preinvasive lesions detection and false positive images. *Eur Resp J* 1996, 9: S23, 11S.

Venmans B, van Boxem T, Smit E, Postmus P, Sutedja T. Outcome of bronchial carcinoma in situ. *Chest* 2000, 117: 1572- 1576.

Vermeylen P, Pierard P, Roufosse C, Bosschaert T, Verhest A, Sculier JP, Ninane V. detection of bronchial preneoplastic lesions and early lung cancer with fluorescence bronchoscopy: a study about its ambulatory feasibility under local anaesthesia. *Lung Cancer* 1999, 25: 161-168.

Vermeylen C, Roufosse V, Sculier J. Biology of pulmonary preneoplastic lesions. *Cancer Treat Rev* 1997, 23: 241- 262.

Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, McIntire D, Hung J, Tonk V et al. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes Chromosomes Cancer* 1998, 21: 308- 319.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor of vascular endothelial growth factor. *Science* 1992, 55: 898- 991.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993, 9: 138- 141

Waltenberg J, Claesson-Welch L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994, 269: 26988- 26995.

Wang H et Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of Flt-1. *Circ Res* 1998, 83: 832-840.

Wang XW, Tseng A, Ellis NA, Spillare EA, Linke SP, Robles AI, Seker H, Yang Q, Hu P, Beresten S, Bemmels NA, Garfield S, Harris CC. Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis. *J Biol Chem*. 2001, 276:32948-55.

Wang L, Soria JC, Kemp BL, Liu DD, Mao L, Khuri FR (2002). hTERT expression is a prognostic factor of survival in patients with stage I non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002, 8: 2883 – 2889.

Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, Sun P. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol*. 2002, 22:3389-403.

Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*. 1999, 1: 20-6.

Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res* 1996, 56: 4103- 4107.

Weinberg RA. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci.* 1995, 758: 331-8.

Weiner DB, Nordberg J, Robinson R, Nowell PC, Gazdar A, Greene MI, Williams WV, Cohen JA, Kern JA. Expression of the neu gene-encoded protein (p185<sup>neu</sup>) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1990, 50 : 421- 425.

Welch PJ, Wang JY. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell.* 1993, 75: 779-90.

Wenz C, Enenkel B, Amacker M, Kelleher C, Damm K, Lingner J. Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J* 2001, 20: 3526- 3534.

Westra WH, Baas IO, Hruban RH : Atypical alveolar hyperplasia (AAHs) of the lung harbor K-ras mutations : evidence to implicate AAH as the precursor lesion of lung adenocarcinoma. *Modern Pathol* 1996: 164A.

Whang- Peng J, Kao- Shan CS, Lee EC, Bunn PA, Carney DN, Gazdar AF et al. Specific chromosome defect associated with human small cell lung cancer : deletion « p(14-23). *Science* 1982, 215: 181- 182.

Whyte P, Williamson NM, Harlow E. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell.* 1989, 56: 67-75.

Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 1999, 232: 97-106.

Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst.* 1999, 91: 675-90

Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997, 89:1366-73.

(a) Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S; Girard L, Fondon JW 3<sup>rd</sup>, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res* 2000, 60:1 949-1960.

(b) Wistuba II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2604-10

Wong JMY, Kusdra L, Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nature Cell Biol* 2002, 4: 731- 736.

Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence : implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989, 9: 3088- 3092.

Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, Meng RD, Kao G, Muschel R, Yen T, el-Deiry WS. Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*. 1999, 18: 6411-8.

Wu X, Kemp B, Amos CI, Honn SE, Zhang W, Walsh GL, Spitz MR Associations among telomerase activity, p53 protein overexpression, and genetic instability in lung cancer. *Br J Cancer*. 1999, 80: 453-7.

Xiang RH, Hensel CH, Garcia DK, Carlson HC, Kok K, Daly MC, Kerbacher K, van den Berg A, Veldhuis P, Buys CH, Naylor SL. Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics*. 1996, 32:39-48.

Xiang RH, Davalos AR, Hensel CH, Zhou HJ, Tse C, Naylor SL. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res* 2002, 62 : 2637- 2643.

Xinarianos G, Scott FM, Liloglou T, Prime W, Callaghan J, Gosney JR, Field JK. Telomerase activity in non small cell lung carcinomas correlates with smoking status. *Int J Oncol* 1999, 15: 961- 965.

Xinarianos G, Scott FM, Liloglou T, Prime W, Callaghan J, Gosney JR, Field JK. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer* 2000, 28 : 37- 42.

Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995, 375: 694-8.

(a) Xu DW, Erickson S, Szeps M, Gruber A, Sangfelt O, Einhorn S, Pisa P, Grander D. Interferon down regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and non malignant hematopoietic cells. *Blood* 2000, 96: 4313- 4318.

(b) Xu DW, Wang Q, gruber A, Bjorkholm M, Chen ZG, Zaid A, Selivanova G, Peterson C, Wiman KG, Pisa P. Down regulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000, 19: 5123- 5133.

Yakubovskaya, MS, Speilgelman V, Luo FC, Malaev F, Salnew A, Zborovskaya I, Gasparyan A, Polotsky B, Machaladze Z, Trachtenberg AC, Belitsky GA, Ronai Z. High frequency of K-ras mutations in normal bearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. *Int J Cancer* 1995, 63: 810- 814.

Yamada T, Endo R, Gotoh M, Hiroshashi S. Identification of semaphorin E as a non MDR drug resistance gene of human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 14713- 14718.

Yamada M, Tsuji N, Nakamura M, Moriai R, Kobayashi D, Yagihashi A, Watanabe N. Down regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers. *Anticancer Res* 2002, 22: 3303- 3307.

Yamasaki M, Takeshima Y, Fujii S, Kitaguchi S, Matsuura M, Tagawa K, Inai K. Correlation between genetic alterations and histopathological subtypes in bronchiolo-alveolar carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Pathol Int.* 2000, 50:778-85.

(a) Yan P, Coindre JM, Benhattar J, Bosman FT, Guillou L. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology, and proliferative activity. *Cancer Res* 1999, 59: 3166- 3170.

(b) Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, Bosman FT, Benhattar J. Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999, 189: 207- 212.

Yanagita K, Matsumoto K, Sekiguchi K, Ishibashi H, Niho Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute lung injury. *J Biol Chem* 1993, 21: 212- 217.

Yang E and Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis : a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996, 88: 386- 401.

Yang H, Kyo S, Takatura M, Sun LZ. Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001, 12: 119- 127.

Yang Y, Chen Y, Zhang C, Huang H, Weissman SM. Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Exp Cell Res* 2002, 277: 201- 209.

Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam I, Wistuba II, Milchgrub S, Srivastava S, Piatyszek MA, Shay JW, Gazdar AF. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997, 57: 2373- 2377.

Yi XM, Tesmer VM, Savre- Train I, Shay JW, Wright WE. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol Cell Biol* 1999, 19: 3989- 3997.

Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997, 385: 637- 640.

Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, Koshikawa K, Iizasa T, Fujisawa T, Terasaki T, Horii A, Takahashi T, Hirohashi S, Inazawa J. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *Am J Pathol.* 2002 16: 207-16.

Yokota J, Akiyama T, Fung YK, Benedict WF, Namba Y, Hanaoka M, Wada M, Terasaki T, Shimosato Y, Sugimura T, et al. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988, 3: 471-5.

Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 2004, 95:197-204.

Yu D, Wang SS, Dulski KM, Tsai CM, Nicolson GL, Hung MC. *CerbB-2/neu* overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res* 1994, 54: 3260- 3266.

Zachary I and Glick G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001, 49: 568–581.

Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 2003, 31:1171-7.

Zaffaroni N, De Polo D, Villa R, Della Porta C, Collini P, Fabbri A, Pilotti S, Daidone MG. Differential expression of telomerase activity in neuroendocrine lung tumours: correlation with gene product immunophenotyping. *J Pathol.* 2003, 201:127-33.

Ziegler A, Luedke GH, Fabbro D, Altmann KH, Stahel R, Zangemeister Wittke U. Induction of apoptosis in small-cell lung cancer by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the *Bcl-2* coding sequence. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89: 1027- 1036.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996, 87:619-28.

(a) Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, Harbour JW, Dean DC. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 2000, 101: 79-89.

(b) Zhang A, Zheng C, Lindvall C, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, Zan Z, yang X, Henriksson M, Blennow E, Nordenskjold M, Zetterberg A, Bjorkholm M, Gruber A, Xu D. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res* 2000, 60: 6230- 6235.

Zheng L, Lee WH. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001, 264: 2- 18.

Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* 2001, 20:914-23.

Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res.* 2001, 61:3581-5.