



HAL
open science

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MÉCANISME DE RÉSISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CANCER DU POUMON NON-À PETITES CELLULES : ROLE DE L'AMPHIRÉGULINE

Benoit Busser

► **To cite this version:**

Benoit Busser. IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MÉCANISME DE RÉSISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CANCER DU POUMON NON-À PETITES CELLULES : ROLE DE L'AMPHIRÉGULINE. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00446892v2

HAL Id: tel-00446892

<https://theses.hal.science/tel-00446892v2>

Submitted on 7 Dec 2010

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

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

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Spécialité : Biologie Cellulaire

Présentée par
Benoît BUSSER

Le 25 Novembre 2009

**Identification et caractérisation d'un nouveau mécanisme
de résistance au gefitinib dans le cancer du poumon
non-à petites cellules : Rôle de l'amphiréguline**

Membres du Jury :

Professeur Marie Wislez, Lyon	Rapporteur
Docteur Patrick Auberger, Nice	Rapporteur
Professeur Denis Moro-Sibilot, Grenoble	Examineur
Docteur Laurence Dubrez-Daloz, Dijon	Examineur
Docteur Amandine Hurbin, Grenoble	Directrice Scientifique
Professeur Marie Christine Favrot, Grenoble	Directrice de Thèse

Remerciements

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

Au directeur de Thèse, Madame le Professeur Marie Favrot,

Je vous remercie pour m'avoir accueilli dès mon Master 2 dans votre équipe "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer du poumon" de l'unité Inserm U823. J'ai apprécié la pertinence de vos conseils qui reflètent la grande expérience que vous avez acquise de la recherche. Je vous remercie pour votre esprit d'ouverture et votre disponibilité à mon égard. Vous m'avez conseillé tout au long de mon cursus d'interne où j'ai effectué de nombreux semestres dans votre service au sein du Département de Biologie Intégrée du CHU de Grenoble. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect.

Au directeur scientifique, Madame le Docteur Amandine Hurbin,

Je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer au sein de l'équipe dès mon arrivée à l'Institut Albert Bonniot. Tu as su m'enseigner la méthodologie et la rigueur requises en recherche fondamentale. Merci pour tout le temps que tu as consacré à ma formation, et pour ton aide précieuse dans la fastidieuse correction de ce mémoire, faisant de moi un "thésard privilégié".

À Madame le Professeur Marie Wislez,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

À Monsieur le Docteur Patrick Auberger

Je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur d'être rapporteur afin de juger mon travail. Merci aussi pour votre accord si spontané contrastant avec notre sollicitation tardive.

À Monsieur le Professeur Denis Moro-Sibilot,

Je vous remercie d'avoir immédiatement accepté de participer à mon jury de thèse et de consacrer du temps pour examiner ce mémoire. Vous nous avez prodigué de précieux conseils pour la délicate gestion des statistiques dans nos travaux. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

À Madame le Docteur Laurence Dubrez-Daloz,

Je vous remercie d'avoir eu la gentillesse d'accepter spontanément de faire partie de mon jury. Quelle chance pour moi d'avoir comme examinateur l'initiatrice et la spécialiste de la voie de signalisation sur laquelle je travaille depuis quatre ans.

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

Au Docteur Jean-Luc Coll,

Je te remercie pour ta relecture attentive de ce manuscrit, et tes nombreux conseils avisés, qui m'ont permis de trouver des solutions à nombre de mes récurrents problèmes de manip. Dans cette équipe 5 ultraféminisée (88%, $p < 0,001$) notre frêle solidarité masculine aura survécu.

Au Docteur Lucie Sancey,

Je te remercie pour ton aide précieuse et ton inconditionnelle disponibilité à mon égard. Quel plaisir d'avoir été ton coloc' de bureau pendant ces quelques années. Je garderai en mémoire tous nos fous rires, les qpuç et les top-*dixit*, ainsi que toutes les activités physiques et festives que nous avons partagées.

À Mmes Carole Niang et Corine Tenaud,

Vous possédez de grandes compétences techniques et avez eu la patience de m'encadrer pour me les enseigner, et toujours de façon joyeuse. Pour cela je vous remercie profondément.

Aux membres des équipes 2 et 5,

Chercheurs, techniciens, étudiants, merci pour tous vos conseils tant sur le plan technique que méthodologique. Merci pour vos nombreux coups de main, ainsi que pour tous les bons moments passés en votre compagnie. Un merci tout particulier à Céline Barrial dont la bonne humeur permanente et communicative participe grandement à l'optimisation du moral des troupes.

Aux Professeurs Alain Favier, Michel Sève et Patrice Faure,

J'ai effectué certains de mes stages hospitaliers dans vos services respectifs, et je vous remercie pour m'avoir prodigué vos nombreux conseils. J'ai bénéficié de votre confiance pour pouvoir enseigner à l'université en tant qu'interne, puis de votre soutien logistique et moral pour devenir assistant. Je vous adresse à ce titre ma profonde gratitude.

Au Docteur Jean-Charles Renversez,

J'ai effectué mon dernier semestre d'interne dans le secteur des électrophorèses que vous dirigez. Je vous remercie pour votre enseignement ainsi que pour la grande compréhension et le soutien dont vous avez fait part à mon égard au moment de la rédaction de cette thèse. Je suis persuadé que notre future collaboration au sein de l'UM BEP sera des plus efficaces.

Au Docteur Dorra Guergour et à ma co-interne Noémie Delouche

Merci pour m'avoir remplacé à la validation des "électros" pour que je puisse dégager du temps hospitalier afin de me consacrer pleinement à la rédaction de ce mémoire.

Au Dr Ausecci avec qui j'ai entretenu d'excellents rapports. Nos relations professionnelles ont été particulièrement efficaces et agréables. J'espère que notre collaboration se poursuivra sur la même lancée.

Aux Docteurs Julia Tonini et Xavier Fonrose, grands manitous PS

Merci pour vos nombreux conseils, qui m'auront permis d'effectuer un cursus PS efficace. Merci aussi pour l'aide logistique, utile à la rédaction de ce mémoire et pour les nombreux articles scientifiques récupérés sur GAEL en urgence !

À l'Association pour la Recherche sur le Cancer,

Merci pour l'allocation pré-doctorale de 2ème année de master recherche, qui m'a permis d'initier ce travail sereinement.

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

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

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

Enfin, je remercie tendrement **Isabelle** qui a la patience de me supporter au quotidien. Ton soutien permanent a énormément contribué à la réalisation de cette thèse.

Je dédie ce travail à mes parents.

« **Les 10 commandements du scientifique** », tiré des mémoires de Bob Wandapa.

Mon vrai point d'honneur n'est pas d'être toujours dans le vrai. Il est d'oser, de proposer des idées neuves, et ensuite de les vérifier.

Pierre Gilles De Gennes

Etre un bon scientifique consiste à passer d'un étonnement à un autre.

Aristote

Rien ne nous trompe autant que notre jugement.

Léonard De Vinci

C'est l'imagination qui est plus importante que le savoir.

Albert Einstein

Il faut admettre que le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses mais celui qui pose les vraies questions.

Claude Lévi-Strauss.

La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés.

Louis Pasteur

Une manière d'examiner la vérité serait, une fois dans sa vie, de mettre toutes choses en doute autant qu'il se peut.

René Descartes

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

Louis Pasteur

Imagination - C'est cette partie décevante dans l'homme, cette maîtresse d'erreur et de fausseté, et d'autant plus fourbe qu'elle ne l'est pas toujours; car elle serait règle infaillible de vérité...

Blaise Pascal

En sciences, la rigueur vient toujours à bout de l'obstacle.

Léonard De Vinci

Avant-propos

Ce travail de thèse a été effectué lors de mon internat de pharmacie au CHU de Grenoble, dans le centre de recherche INSERM/UJF **U823**, au sein de l'équipe 5 "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer du poumon", à l'institut Albert Bonniot.

Il a donné lieu aux publications/communications suivantes :

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

- 1) Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancers. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print. (voir **Article 1**)

- 2) Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Khochbin S., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells by regulating Ku70 acetylation. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print. (voir **Article 2**)

- 3) Busser B., Coll J-L., and Hurbin A. The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. **Pathologie Biologie**, Décembre 2008. Vol 57 (7-8): 511-12. (voir **annexe VI**).

Communications orales

Busser B., L'Amphiréguline induit la résistance au gefitinib des Cancers Bronchiques Non-à Petites Cellules en contrôlant l'inactivation de BAX par Ku70. Session plénière. Journées de la recherche respiratoire, J2R, octobre **2008**, Grenoble.

Busser B., Amphiregulin induces resistance to gefitinib *via* BAX sequestration by Ku70. Session plénière. XXVII^e Forum of Cancer Research (French Cancer Society), Eurocancer, juin **2007**, Paris.

Communications affichées

Busser B., Sancey L., Josserand V., Coll JL., et Hurbin A. L'amphiréguline : un nouveau biomarqueur de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans le cancer du poumon. Journées Internationales de Biologie (JIB), novembre **2009**, Paris.

Busser B., Federspiel I., Rey C., et Hurbin A. Nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge du cancer du poumon. VII^{èmes} journées de la Société Française de Pharmacie Oncologique (SFPO), octobre **2009**, Mandelieu.

Busser B., Sancey L., Josserand V., Khochbin S., Coll JL., et Hurbin A. Identification d'un nouveau mécanisme de résistance au gefitinib impliquant l'amphiréguline dans le cancer bronchique non-à petites cellules. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2009**, Strasbourg.

Busser B., Sancey L., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin induces resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. 4^{èmes} Journées scientifiques du Cancéropole Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), mars **2009**, Archamps.

Busser B., Brambilla E., Moro-Sibilot D., Coll JL., Poulot V., Wislez M., Favrot M., Cadranet J. et Hurbin A. Analyse immunohistochimique des voies de survie mises en jeu dans des adénocarcinomes bronchiques. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2008**, Grenoble.

Busser B., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. L'Amphiréguline induit la résistance au gefitinib des Cancers Bronchiques Non-à Petites Cellules en contrôlant l'inactivation de BAX par Ku70. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2008**, Grenoble.

Busser B., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin-dependant deacetylation of Ku70 promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells. 3^{èmes} Journées scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), mars **2008**, Lyon.

Busser B., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin-dependant deacetylation of Ku70 promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells. Workshop "Apoptosis **2008** - From Mechanisms to applications", Janvier 2008, Luxembourg.

Busser B., Josserand V., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. L'Amphiréguline induit la résistance au gefitinib *via* la séquestration de BAX par Ku70. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2007**, Paris.

Busser B., Brambilla E., Moro-Sibilot D., Escales L., Poulot V., Wislez M., Cadranel J., Favrot M., Hurbin A. Analyse immunohistochimique de la voie anti-apoptotique mise en jeu par l'Amphiréguline et l'Insulin-like Growth Factor-1 dans les tumeurs bronchiques humaines. Journées de la Recherche Respiratoire (J2R), octobre **2007**, Paris.

Busser B., Niang C., Favrot M.C., et Hurbin A. L'Amphiréguline : un facteur de résistance au gefitinib dans la lignée H358 de cancer bronchique non à petites cellules. 2^{èmes} Journées scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), mars **2007**, Grenoble.

Busser B., Niang C., Favrot M.C., et Hurbin A. L'Amphiréguline : un facteur de résistance au gefitinib dans la lignée H358 de Cancer Bronchique Non à Petites Cellules. Journées ARC Jeunes Chercheurs, octobre **2006**, Paris.

Prix et distinctions honorifiques

Lauréat du Prix "Innovation diagnostiques" de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), "l'amphiréguline, un nouveau biomarqueur de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans le cancer du poumon." Journées Internationales de Biologie (JIB), novembre **2009**, Paris.

Lauréat du Prix Jacques Rocipon. "Imagerie non invasive du petit animal par bioluminescence". Décembre **2007**, Grenoble.

Lauréat du Prix de la Société Française du Cancer (SFC), catégorie "recherche fondamentale". XXVII^e Forum de Cancérologie de la SFC, Congrès Eurocancer. Juin **2007**, Paris.

Lauréat de la Bourse "Vivier de la recherche médicale" de la faculté de médecine de l'Université Joseph Fourier. Décembre **2006**, Grenoble.

Lauréat du prix Alexandre Joël, Meilleure communication scientifique, catégorie Master 2. Journées ARC Jeunes Chercheurs, Hôpital Pitié-Salpêtrière. Octobre **2006**, Paris

Allocation Jeune Chercheur, Association pour la Recherche sur le Cancer, Octobre **2005**.

Sommaire

Remerciements	
Avant-Propos	
Sommaire	I
Index des Illustrations.....	VI
Liste des Abréviations.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
PARTIE I. LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES.....	2
1. ÉPIDEMIOLOGIE DES CANCERS PULMONAIRES	2
1.1 Données chiffrées.....	2
1.2 Facteurs étiologiques.....	3
2. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE DES CANCERS PULMONAIRES	5
2.1 Classification histologique selon l'OMS.....	5
a) Les Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules	6
b) Les Carcinomes Broncho-pulmonaires Non-à Petites Cellules.....	6
i) Les carcinomes malpighiens.....	6
ii) Les adénocarcinomes	7
iii) Les carcinomes à grandes cellules	7
2.2 Classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC.....	8
3. LE CANCER BRONCHIQUE NON-A PETITES CELLULES (CBNPC)	9
3.1 Caractéristiques moléculaires de la carcinogenèse du CBNPC.....	9
3.2 Oncogènes et signaux prolifératifs	10
3.3 Gènes suppresseurs de tumeurs et signaux inhibiteurs de croissance.....	11
3.4 Prise en charge thérapeutique du CBNPC.....	13
a) La chirurgie.....	13
b) La radiothérapie.....	14
c) La chimiothérapie anti-cancéreuse	15

PARTIE II. APOPTOSE ET CANCER DU POUMON.....17

1. GENERALITES SUR L'APOPTOSE.....	18
1.1 Définition et rôles	18
1.2 Modifications morphologiques au cours de l'apoptose.....	20
1.3 Principaux effecteurs.....	21
a) Les caspases et leurs cofacteurs.....	21
b) Les facteurs antiapoptotiques et proapoptotiques	22
2. DEUX GRANDES VOIES DE SIGNALISATION	23
2.1 La voie mitochondriale.....	23
2.2 La voie des récepteurs de mort.....	25
3. DEREGLATION DES VOIES APOPTOTIQUES DANS LES CARCINOMES PULMONAIRES	26
3.1 Inactivation de facteurs proapoptotiques.....	26
3.2 Activation de facteurs antiapoptotiques.....	28

**PARTIE III. LE RECEPTEUR DE L'EGF EN CANCEROLOGIE
PULMONAIRE.....30**

1. LA FAMILLE DE L'EGFR ET LEURS LIGANDS.....	30
1.1 La famille ERBB	30
1.2 Les ligands des récepteurs de la famille EGFR.....	31
2. ACTIVATION DE L'EGFR ET VOIES DE SIGNALISATION	32
3. LES FONCTIONS DE L'EGFR.....	34
3.1 Rôle physiologique de l'EGFR.....	34
3.2 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse	34
3.3 Rôle de l'EGFR dans la tumorigenèse pulmonaire.....	35
4. EGFR : UNE CIBLE PRIVILEGIEE DANS LE CBNPC	36
4.1 Les anticorps monoclonaux.....	37
a) Le cetuximab.....	37
b) Le panitumumab	39
c) Tolérance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR	39

4.2 Les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR : EGFR-TKI	40
a) Le gefitinib	41
b) L'erlotinib	43
c) Autres inhibiteurs de tyrosine kinase	44
d) Tolérance aux TKI	44
e) Facteurs de sensibilité ou de résistance aux EGFR-TKI	45
i) Marqueurs prédictifs de réponse aux EGFR-TKI	45
ii) Marqueurs de résistance	46
PARTIE IV. L'AMPHIREGULINE DANS LE CANCER BRONCHIQUE NON-A PETITES CELLULES.....	48
1. L'AMPHIREGULINE: DECOUVERTE, STRUCTURE ET FONCTION.....	48
2. ROLE DE L'AMPHIREGULINE DANS LA CARCINOGENESE GENERALE ET DANS LES CBNPC.	50
2.1 Autosuffisance en facteurs de croissance.....	51
2.2 Potentiel répliatif illimité.....	51
2.3 Angiogenèse tumorale	51
2.4 Envahissement tissulaire et métastase	52
2.5 Résistance à l'apoptose	52
2.6 Résistance au traitement	53
OBJECTIFS DE THÈSE.....	54
RÉSULTATS.....	56
I L'AMPHIREGULINE INDUIT L'INHIBITION DE BAX ET LA RESISTANCE AU GEFITINIB DANS LES CBNPC.	56
1.1 PRESENTATION DE L'ETUDE ET PRINCIPAUX RESULTATS	56
1.2 ARTICLE 1	57
1.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES	59
a) Le gefitinib possède une toxicité variable sur différentes lignées de CBNPC.....	59
b) L'AREG protège les cellules H3255 du gefitinib.	59
c) Les SiRNAs anti-AREG ont une activité anti-tumorale <i>in vivo</i>	60
1.4 CONCLUSION	60

II L'AMPHIREGULINE INDUIT LA RESISTANCE DU CBNPC AU GEFITINIB EN REGULANT L'ACETYLATION DE KU70.....61

2.1 PRESENTATION DE L'ETUDE.....	61
2.2 ARTICLE 2	62
2.3 RESULTATS COMPLEMENTAIRES	63
a) Implication des HAT dans la résistance au gefitinib.....	63
b) Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib	64
c) Autres intermédiaires intervenant dans la voie de résistance	65
2.4 CONCLUSION	66

DISCUSSION.....67

I. UN NOUVEAU MECANISME DE RESISTANCE AU GEFITINIB : LE ROLE PREPONDERANT DE L'AREG.....67

1. L'AREG : UN ACTEUR DE LA RESISTANCE AU GEFITINIB	67
2. MECANISME D'ACTION DE L'AREG	69
2.1. <i>Expression de l'AREG et mode d'action autocrine/paracrine/endocrine.....</i>	69
2.2. <i>Mécanisme d'inhibition de l'apoptose : inactivation de BAX par Ku70</i>	70
2.3. <i>Le rôle de l'acétylation.....</i>	71
3. D'AUTRES ACTEURS A IDENTIFIER : LA VOIE RELIANT L'AREG A L'INHIBITION DE L' APOPTOSE.....	72
3.1. <i>L'IGF1-R.....</i>	73
3.2. <i>La voie de signalisation : rôle des PKC et de STAT3.....</i>	74
4. INFLUENCE DES MUTATIONS DE L'EGFR, DE P53 ET DE K-RAS	75
4.1 <i>Les mutations de l'EGFR</i>	75
4.2 <i>Les mutations de P53 et K-RAS.....</i>	76

II. APPLICATIONS CLINIQUES DE NOS RESULTATS77

1. L'AREG : UN BIOMARQUEUR PREDICTIF POUR LE DIAGNOSTIC DE RESISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CBNPC ?.....	78
2. L'AREG : UNE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE CBNPC.....	80
3. AUTRES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES	83
3.1. <i>Les inhibiteurs de l'IGF1-R.....</i>	83
3.2. <i>Les HDACi.....</i>	84

CONCLUSION.....86

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....88

ANNEXES.....103

ANNEXE I	Classification histologique des cancers pulmonaires.....	103
ANNEXE II	Principaux effets secondaires des chimiothérapies anticancéreuses	104
ANNEXE III	Référentiel Régional de prise en en charge thérapeutique des CBNPC.....	105
ANNEXE IV	Essais cliniques français d'oncologie thoracique comprenant l'usage de gefitinib..	117
ANNEXE V (1)	Profil d'expression de l'AREG dans les tissus sains	118
ANNEXE V (2)	Profil d'expression de l'AREG dans les tissus pathologiques.....	119
ANNEXE VI	Editorial, <u>Busser, B. et al.</u> , Pathologie biologie , 2008.....	120

Index des Illustrations

Figures

Figure 1. Evolution des taux de décès par grande catégorie de causes de décès, 1980-2004, France métropolitaine, deux sexes	2'
Figure 2. Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006.....	2'
Figure 3. Corrélation entre consommation de cigarettes et cancer du poumon.....	3'
Figure 4. Histogenèse du cancer bronchique.....	9'
Figure 5. Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse de CBNPC.....	9'
Figure 6. Stratégie thérapeutique du CBNPC.....	12
Figure 7. Modifications ultrastructurales séquentielles de l'apoptose et de la nécrose	20'
Figure 8. Structure et mode d'activation des caspases.....	21'
Figure 9. Les deux grandes voies apoptotiques	23'
Figure 10. La famille des récepteurs de mort	24'
Figure 11. Représentation schématique des quatre récepteurs de la famille ERBB	30'
Figure 12. Structure schématique des récepteurs de la famille ERBB.....	30'
Figure 13. Représentation schématique de la libération d'un ligand de l'EGFR.....	31'
Figure 14. Représentation des différents hétérodimères de récepteurs ERBB.....	32'
Figure 15. Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR.	33'
Figure 16. Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR	37'
Figure 17. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'EGFR.....	40'
Figure 18. Schéma des Relations Structure-Activité des 4-anilinoquinazolines	40'
Figure 19. Structure chimique des inhibiteurs réversibles de l'EGFR	41'
Figure 20. Mutations de sensibilisation et de résistance aux EGFR-TKI dans les CBNPC...45'	45'
Figure 21. AREG, EGF et TGF- α : Séquences protéiques et homologie structurale.....	48'
Figure 22. Effet du gefitinib sur 7 lignées de CBNPC.....	59'
Figure 23. Effet du gefitinib sur la lignée H3255	59'
Figure 24. Effet des SiRNAs anti-AREG <i>in vivo</i>	60'
Figure 25. Implication de Tip60 dans la résistance au gefitinib	63'
Figure 26. Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib.....	64'
Figure 27. Identification de partenaires impliqués dans la voie de résistance au gefitinib	65'
Figure 28. Mécanisme de résistance au gefitinib des cellules de CBNPC.....	86

Ce travail de thèse a porté sur le rôle de l'Amphiréguline, un ligand du récepteur de l'EGF, dans la résistance à l'apoptose induite par un traitement (le gefitinib) dans les cancers broncho-pulmonaires.

L'introduction de ce manuscrit sera donc composée des quatre parties suivantes :

Partie I. LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES

Partie II. APOPTOSE ET CANCER DU POU MON

Partie III. LE RÉCEPTEUR DE L'EGF EN CANCÉROLOGIE PULMONAIRE

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

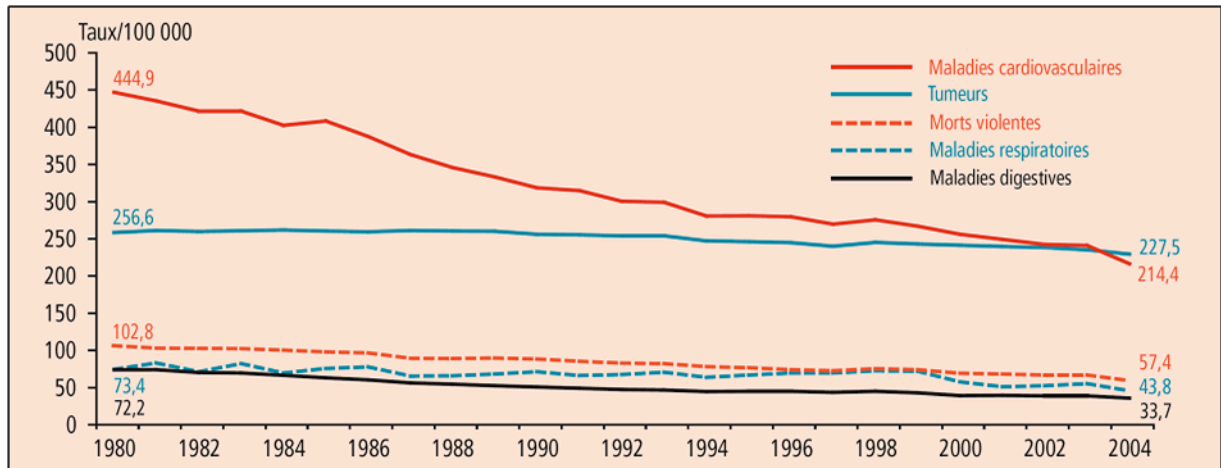


Figure 1. Evolution des taux* de décès par grande catégorie de causes de décès, 1980-2004, France métropolitaine, deux sexes (* Taux de décès standardisé pour 100000)

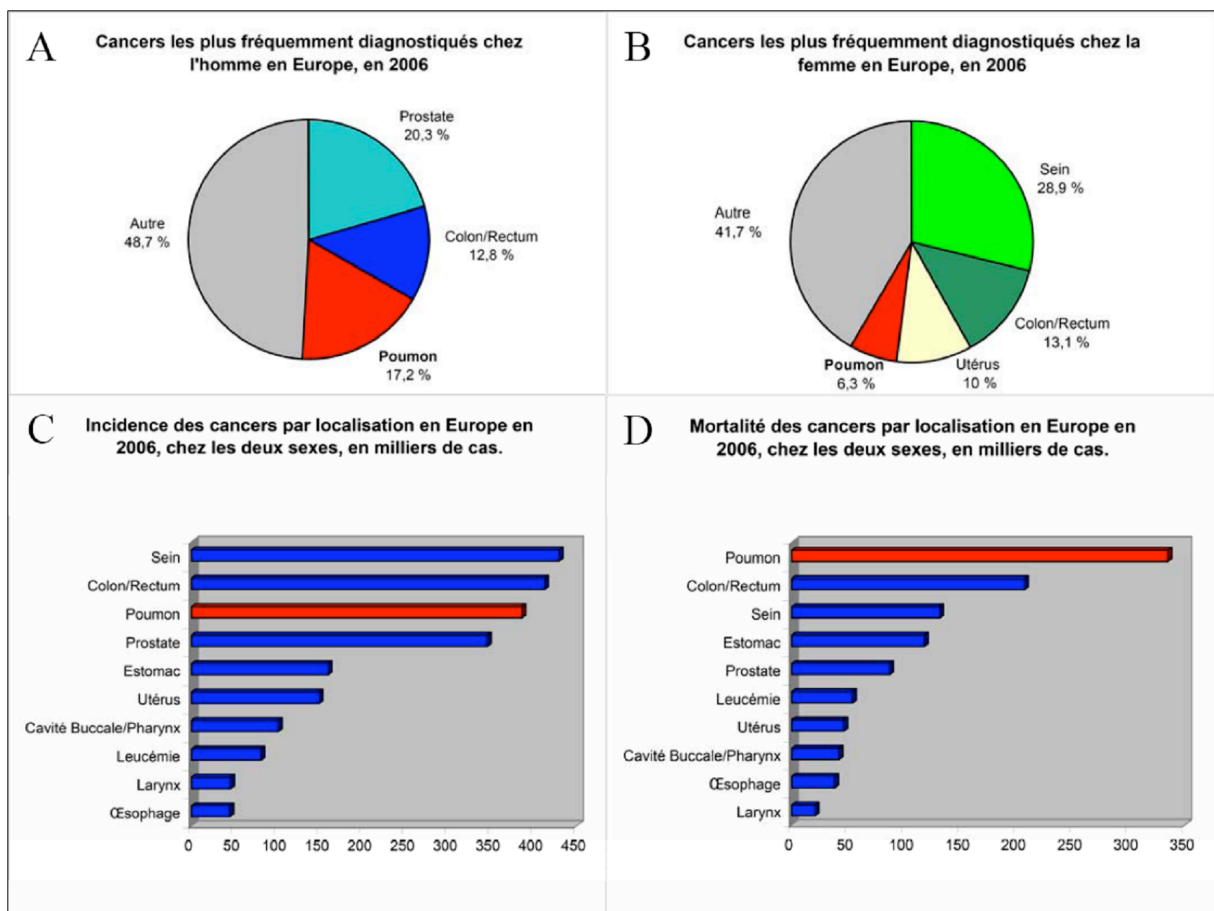


Figure 2. Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers en Europe en 2006

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

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

Adapté d'après (Ferlay, et al., 2007)

Partie I. LES CANCERS BRONCHO-PULMONAIRES

Dans ce chapitre, nous allons décrire l'épidémiologie et l'histopathologie des cancers broncho-pulmonaires, puis nous développerons plus particulièrement les cancers bronchiques non-à petites cellules et leurs approches thérapeutiques.

1. Épidémiologie des cancers pulmonaires

1.1 Données chiffrées

Longtemps deuxième cause de mortalité en France derrière les maladies cardiovasculaires, le cancer est aujourd'hui la principale cause de mortalité (**Figure 1**) puisque 30% des décès toutes causes confondues sont liés au cancer (Aouba, *et al.*, 2007). De nos jours le cancer du poumon représente 1/5 des décès par cancer. En conséquence, 1 décès sur 15 est attribuable au cancer broncho-pulmonaire, ce qui fait de cette pathologie un problème majeur de santé publique, provoquant plus de 3000 morts par jour dans le monde (Hecht, *et al.*, 2009). En Europe (**Figure 2**), le cancer du poumon est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué (386000 cas, soit 12,1% de tous les cas de cancer), après le cancer du sein (13,5%) et le cancer colorectal (12,9%) et il y est la première cause de mortalité par cancer (Ferlay, *et al.*, 2007). Il est important de relever que le cancer du poumon est le seul cancer pour lequel l'incidence est à peine supérieure à la mortalité (**Figure 2**). En France, chaque année, 25000 à 30000 patients décèdent d'un cancer du poumon, soit plus que les cancers du sein, du pancréas et de la prostate réunis (Hill, *et al.*, Mai 2009). Depuis quelques années, le nombre de nouveaux cas de cancers broncho-pulmonaires tend à se stabiliser dans la population masculine, alors qu'une augmentation est constatée dans la population féminine (Eilstein, *et al.*, 2008).

Une étude récente indique que le taux de survie à 5 ans du cancer du poumon reste inférieur à 15% (Brambilla and Gazdar, 2009), ce qui le place au troisième rang des cancers les plus agressifs, derrière les cancers du pancréas et du foie, qui possèdent une survie à 5 ans de 5% et 11%, respectivement (Jemal, *et al.*, 2009). La survie à 5 ans est étroitement liée au stade auquel le cancer broncho-pulmonaire est diagnostiqué. En effet, 50% des patients possédant une tumeur pulmonaire localisée et opérable sont encore en vie 5 ans après le diagnostic.

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

3.1 Caractéristiques moléculaires de la carcinogenèse du CBNPC

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

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

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

Partie II. APOPTOSE ET CANCER DU POUMON

La cellule cancéreuse présente fréquemment divers dysfonctionnements des voies de signalisation qui conduisent à la mort cellulaire. Bien que la résistance à l'apoptose soit étroitement liée à la cancérogenèse, les cellules tumorales peuvent également mourir par des mécanismes non apoptotiques comme la nécrose, la sénescence, l'autophagie, ou la catastrophe mitotique ((Okada and Mak, 2004) pour revue).

La nécrose, jusqu'alors considérée comme un phénomène de mort passif et désorganisé, est apparue comme une alternative à la mort cellulaire par apoptose. Elle est principalement causée par des processus physiopathologiques comme les infections, l'inflammation, ou l'ischémie et elle se termine par le relargage des composants intracellulaires dans le milieu extracellulaire. Plus récemment, la description de voies de signalisations caractérisant la nécrose programmée ou nécroptose ont suggéré que ce processus permettait d'induire la mort cellulaire quand l'activation de l'apoptose était impossible (Galluzzi and Kroemer, 2008). D'un point de vue moléculaire, l'initiation et la modulation de la mort par nécrose commencent à être décrites (Tait and Green, 2008) mais la majeure partie du mécanisme reste encore à identifier.

La sénescence peut être considérée comme un type de "mort pour cellules toujours vivantes", car ces dernières arrêtent leur cycle cellulaire et perdent leur clonogénicité, tout en conservant l'intégrité de leur membrane plasmique (Okada and Mak, 2004).

L'autophagie est décrite comme un système non sélectif de dégradation vacuolaire, très conservé chez les eucaryotes, par lequel la cellule recycle son cytoplasme et élimine les organites défectueux ou en excès. L'autophagie semble être une réponse cellulaire au stress, et peut conduire à la mort cellulaire dans certaines circonstances. On l'observe notamment dans les cellules où l'apoptose est bloquée (Levine and Kroemer, 2008).

D'autres phénomènes de mort comme l'autoschizis et la catastrophe mitotique sont également connus, cependant les voies moléculaires qui supportent ces réponses non apoptotiques sont moins bien décrites que pour l'apoptose.

Partie III. LE RÉCEPTEUR DE L'EGF EN CANCÉROLOGIE PULMONAIRE

L'EGFR est un intervenant majeur de la signalisation cellulaire. Il participe à de nombreux processus physiologiques comme la prolifération cellulaire, la survie ou la migration. Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre de l'introduction, ce récepteur constitue une cible thérapeutique majeure en cancérologie, et notamment dans les cancers broncho-pulmonaires. Après avoir fait des rappels sur la famille du récepteur de l'EGF, ses ligands et ses voies de signalisation, nous aborderons ses fonctions dans la tumorigenèse pulmonaire. Enfin, nous nous attacherons à décrire les différentes thérapies ciblées anti-EGFR.

1. La famille de l'EGFR et leurs ligands

1.1 La famille ERBB

Le récepteur de l'EGF, glycoprotéine transmembranaire de 170 kDaltons, est le chef de file des récepteurs à activité enzymatique de type tyrosine kinase. Cette famille multigénique et ubiquitaire nommée HER (*Human Epidermal growth factor Receptor*), ou ERBB (pour leur analogie avec un oncogène d'un virus d'érythroblastose aviaire) comprend quatre membres : EGFR (ou ERBB1 ou HER1), ERBB2 (ou HER2, ou *neu*), ERBB3 (HER3) et ERBB4 (HER4). (**Figure 11**)

Les récepteurs de cette famille possèdent une grande homologie de structure primaire (40 à 50%) se traduisant par une organisation structurale caractéristique (**Figure 12**). Ils possèdent donc des structures globales proches comprenant un domaine extracellulaire liant le ligand. Ce domaine extracellulaire est composé de 4 sous-domaines (I à IV) répétés 2 à 2, se succédant en alternance. Les domaines I et III sont analogues à ceux de l'Insulin-like Growth Factor type-1 Receptor (IGF1-R), un autre récepteur à activité tyrosine kinase. Ces deux domaines ont été identifiés comme étant le siège de la fixation du ligand, d'où leur dénomination L1 et L2.

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

1. L'amphiréguline : découverte, structure et fonction

L'Amphiréguline (AREG) est une protéine de 84 acides aminés découverte à la fin des années 1980 par M. Shoyab *et al.* L'AREG a d'abord été isolée dans le milieu de culture de cellules de cancer du sein humain MCF-7 traitées par du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Shoyab, *et al.*, 1988). Le gène de l'AREG (Gene ID 374) est situé sur le bras long du chromosome 4, en position q13-q21, et est composé de 6 exons. L'AREG a été intégrée à la famille des ligands de l'EGFR de par son homologie de séquence avec le TGF- α (32%) et l'EGF (38%) (**Figure 21**). De plus, l'AREG présente également une homologie fonctionnelle avec cette classe de facteurs de croissance (Plowman, *et al.*, 1990) puisqu'elle est capable de remplacer l'EGF pour maintenir la croissance de kératinocytes en culture.

L'AREG est synthétisée sous forme d'un précurseur membranaire, composé de 252 acides aminés (pro-AREG), qui est soumis à un clivage protéolytique au niveau de la membrane plasmique libérant ainsi la partie mature et diffusible de la protéine AREG (**Figure 13**). Ce clivage est médié essentiellement par le tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE ou ADAM-17), membre de la famille des disintégrines et métalloprotéinases ADAM (Sahin, *et al.*, 2004, Sunnarborg, *et al.*, 2002). L'AREG soluble se fixe et active l'EGFR *via* des mécanismes autocrines (Li, *et al.*, 1992), paracrines (Sternlicht, *et al.*, 2005) et/ou juxtacrines (Willmarth and Ethier, 2006).

L'AREG est constitutivement exprimée dans de nombreux tissus, principalement dans le système génito-urinaire et reproductif (sein-utérus-placenta-prostate), ainsi que dans le tractus gastro-intestinal (œsophage-estomac-intestins) et le foie, le système sanguin (parois vasculaires-moelle osseuse-lymphe-sang), et le tractus respiratoire (poumons-trachée). Une liste exhaustive des tissus sains qui produisent de l'AREG est présentée en **Annexe V**.

Objectifs du Travail de Thèse

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, tant chez l'homme que chez la femme. Le cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC) représente 80% des cancers du poumon et possède un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 15%, et ce malgré l'emploi de traitements comme la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. Un des enjeux actuels de la recherche est d'adapter le traitement du CBNPC pour proposer des thérapies ciblées plus efficaces et moins agressives. Cependant la réponse à ces thérapies varie en fonction du profil d'expression génique et protéique de la tumeur. Il est donc primordial d'améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la carcinogenèse bronchique afin d'identifier 1/ des marqueurs pronostiques et prédictifs de la réponse aux traitements, et 2/ de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer des stratégies adaptées à chaque profil tumoral.

Notre équipe travaille depuis plusieurs années sur le développement de nouveaux traitements des CBNPC destinés à rétablir les voies d'induction de l'apoptose ou à réguler la prolifération non contrôlée de ces cancers. Dans ce contexte, le laboratoire a mis en évidence d'importants mécanismes de résistance à l'apoptose développés par les cellules d'adénocarcinome pulmonaire qui résistent à l'apoptose induite par chimiothérapie, privation sérique ou surexpression de la protéine p53 (Dubrez, *et al.*, 2001a, Dubrez, *et al.*, 2001b, Hurbin, *et al.*, 2002). Nous avons identifié notamment une boucle de survie autocrine/paracrine faisant intervenir la coopération de 2 facteurs de croissances AREG et IGF1. L'association de ces deux ligands induit l'activation de leurs récepteurs respectifs EGFR et IGF1-R et permet d'initier une voie de signalisation anti-apoptotique dépendante des PKC, et indépendante des MAPK et PI3K. Cette voie de signalisation aboutit à l'inactivation de Bax par séquestration cytoplasmique (Dubrez, *et al.*, 2001b, Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002).

En parallèle, de nouveaux traitements de thérapie ciblée ont été développés pour les CBNPC. Parmi eux, le gefitinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) a montré de puissants effets anti-prolifératifs dans les CBNPC de stades avancés, après échec de deux lignes de chimiothérapie (Fukuoka, *et al.*, 2003). Le gefitinib ne confère cependant pas d'avantage de survie par rapport au placebo sur des cohortes de patients non sélectionnés (Thatcher, *et al.*, 2005).

Toutefois, certains sous-groupes de patients répondent mieux à ce traitement, en particulier les patients de sexe féminin, non-fumeurs, d'origine asiatique, et porteurs de tumeurs de type adénocarcinome, et/ou avec des mutations activatrices de l'EGFR (Lynch, *et al.*, 2004).

En revanche, d'autres facteurs, comme les mutations activatrices de K-RAS (Sharma, *et al.*, 2007), l'amplification de MET (Engelman, *et al.*, 2007), ou l'expression de l'IGF1-R (Morgillo, *et al.*, 2007), sont prédictifs d'une résistance aux EGFR-TKI dans les CBNPC. Cependant, aucun facteur isolé ne permet actuellement de parfaitement prédire la sensibilité des patients aux EGFR-TKI.

Une étude clinique a montré que les patients porteurs de CBNPC de stade avancé qui résistent au gefitinib ont des taux d'AREG sérique élevés (Ishikawa, *et al.*, 2005). Sur la base des résultats du laboratoire montrant le rôle anti-apoptotique de l'AREG, nous avons émis l'hypothèse que l'AREG participe à la résistance à ces thérapies anti-EGFR. Les objectifs définis dans le cadre de mon travail de thèse s'appuient directement sur ces données.

Dans un premier temps nous avons cherché à démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib, et notamment la résistance à l'apoptose induite par le gefitinib. Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer que l'AREG inhibe l'effet antitumoral du gefitinib en inactivant Bax et font l'objet d'une première publication dans *Molecular Therapy*. Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les acteurs moléculaires qui interviennent dans la voie de résistance au gefitinib mise en jeu par l'AREG et qui aboutissent à l'inactivation de Bax. Nous avons ainsi caractérisé une nouvelle voie de signalisation induisant la résistance aux EGFR-TKI, qui dépend de l'acétylation de Ku70. Ce mécanisme d'action original suggère de nouvelles applications thérapeutiques pour contourner la résistance au gefitinib. Ce travail fait l'objet d'une seconde publication dans *Molecular Therapy*.

Résultats

I L'Amphiréguline induit l'inhibition de BAX et la résistance au gefitinib dans les CBNPC.

1.1 Présentation de l'étude et principaux résultats

En amont de ce travail, notre équipe avait montré le rôle de l'AREG dans la résistance à l'apoptose induite par privation sérique dans les CBNPC (Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002). La significativité clinique potentielle de ce résultat a été soulignée par une étude montrant qu'un niveau élevé d'AREG et de TGF- α dans le sérum des patients porteurs de CBNPC avancés est un facteur prédictif d'une résistance au gefitinib (Ishikawa, *et al.*, 2005), suggérant l'implication de l'AREG dans la résistance au gefitinib.

Pour démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib, nous avons utilisé deux lignées cellulaires de CBNPC : les cellules d'adénocarcinome H322, qui ne sécrètent pas d'AREG et les cellules H358 qui sécrètent beaucoup d'AREG (Hurbin, *et al.*, 2002). Les cellules H358 résistent à l'apoptose induite par le gefitinib, contrairement aux cellules H322. L'ajout d'AREG recombinante inhibe l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules H322. Inversement, l'inactivation de l'expression de l'AREG par ARN interférence (SiRNAs) dans les cellules H358, rétablit l'apoptose induite par le gefitinib. Ces données confirment le rôle important et spécifique de l'AREG dans la résistance au gefitinib.

L'activité du gefitinib a été reliée aux molécules de la famille de Bcl-2 (Ariyama, *et al.*, 2006) et le laboratoire a démontré que l'AREG inhibe l'apoptose induite par privation sérique en inactivant Bax dans le cytoplasme des cellules (Hurbin, *et al.*, 2005). Nous avons analysé dans notre modèle cellulaire le lien entre l'AREG, le gefitinib et l'inactivation de Bax. Nous avons analysé l'expression de Bax par western blot, son activation par cytométrie en flux avec un anticorps spécifique de la forme active de Bax et sa localisation subcellulaire par western blot après fractionnement cellulaire. Nos résultats montrent que l'AREG, en présence de gefitinib, diminue le niveau d'expression de Bax par un mécanisme dépendant du protéasome, inhibe son changement de conformation et sa translocation à la mitochondrie. Ces effets sont tous abolis par les SiRNAs anti-AREG. Ces données suggèrent que l'AREG inhibe l'apoptose

induite par le gefitinib dans les cellules de CBNPC en inactivant Bax dans le cytoplasme des cellules.

Nous avons également analysé l'effet des SiRNAs anti-AREG *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cellules H358 chez la souris Nude. Les souris ont été traitées par SiRNAs anti-AREG ou par gefitinib, ou par les deux traitements associés. Nous montrons que les SiRNAs anti-AREG contrecarrent la résistance au gefitinib.

1.2 Article 1

Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancers. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print.

Supplementary material and methods S1

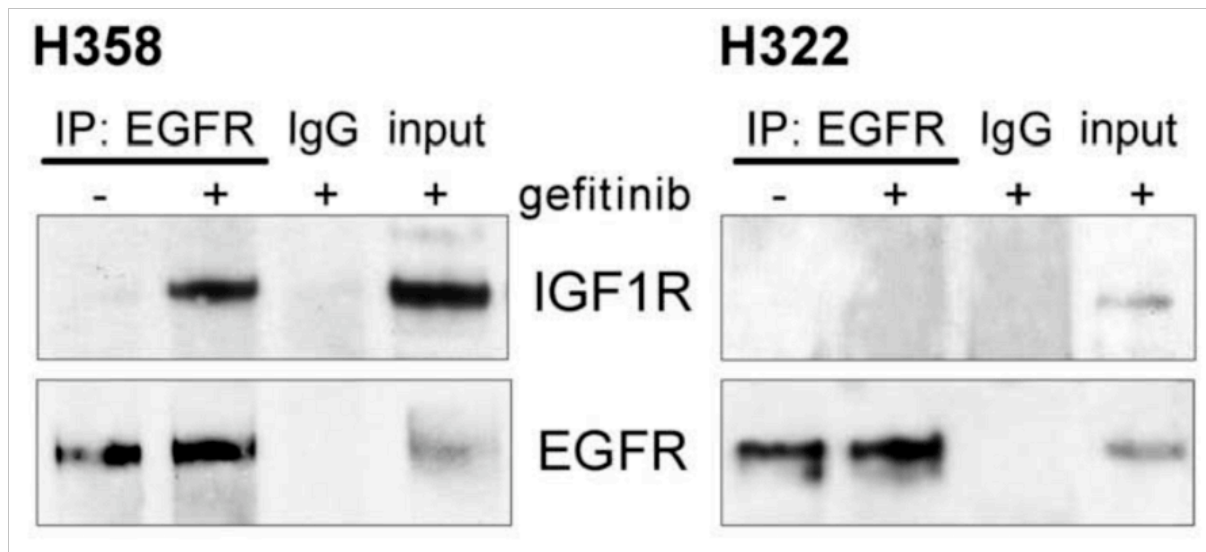


Figure S1. Co-immunoprecipitation of EGFR and IGF1R.

Whole-cell extracts from H358 and H322 cells treated with 0.5 μ M gefitinib for 96 h were immunoprecipitated (IP) with EGFR antibody (Santa Cruz) and subjected to immunoblot analysis with IGF1R (Santa Cruz) or EGFR antibodies. IgG: immunoglobulin control for immunoprecipitation, used as negative control. Input: cell lysates that are not subjected to immunoprecipitation.

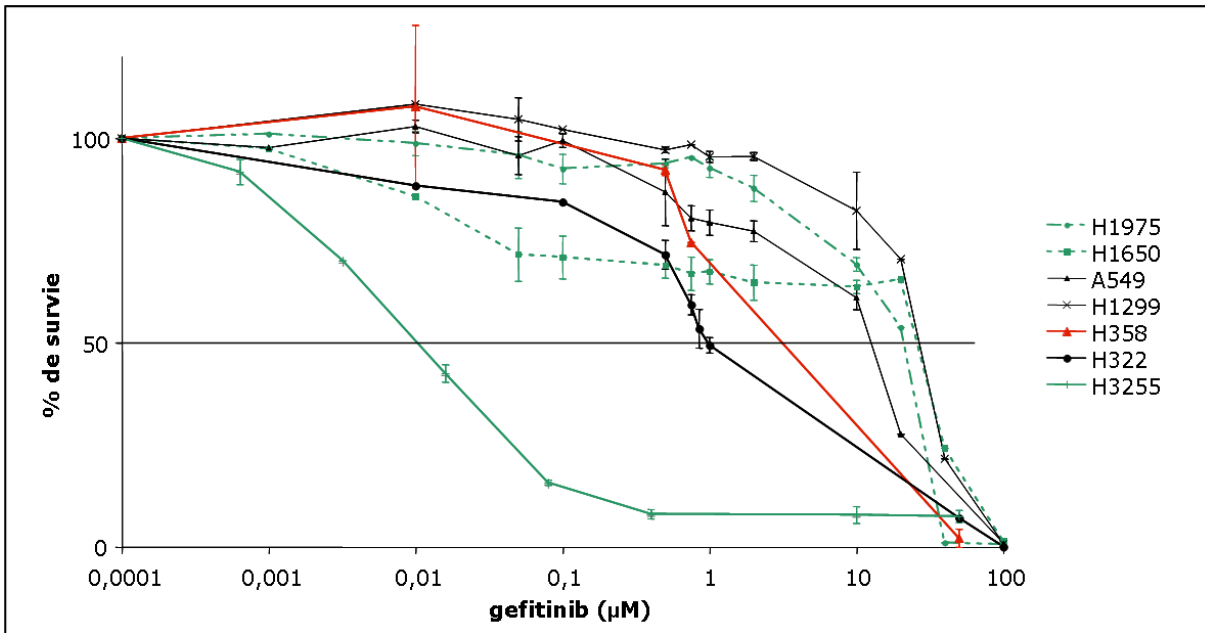


Figure 22. Effet du gefitinib sur 7 lignées de CBNPC

Un test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) a permis d'évaluer l'effet du gefitinib aux concentrations indiquées pendant 96 h sur la prolifération cellulaire de différentes lignées de CBNPC.

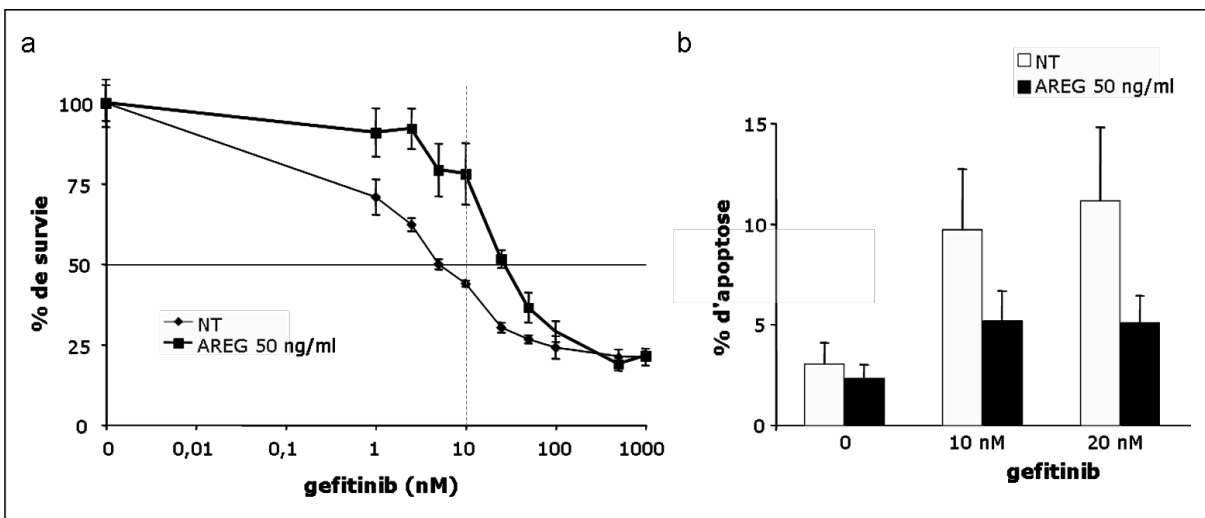


Figure 23. Effet du gefitinib sur la lignée H3255

(a) Viabilité des cellules de CBNPC H3255 mesurée par un test MTT, en présence de gefitinib aux concentrations indiquées pendant 72 h, en présence ou non de 50 ng/ml d'AREG recombinante. (b) Effet de l'AREG sur l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules H3255. Les cellules H3255 ont été traitées par 50 ng/ml d'AREG recombinante et/ou du gefitinib aux concentrations indiquées pendant 72 heures. L'apoptose est évaluée après marquage nucléaire au Hoechst 33342 et comptage d'au moins 500 cellules au microscope à fluorescence.

1.3 Résultats complémentaires

a) Le gefitinib possède une toxicité variable sur différentes lignées de CBNPC.

La toxicité du gefitinib a été testée sur 7 lignées de CBNPC, en présence de gefitinib par un test de viabilité cellulaire MTT (**Figure 22**). Cette toxicité est évaluée par la mesure de l'IC₅₀ (half-maximal inhibitory concentration) du gefitinib pour chaque lignée. Cette IC₅₀ correspond à la concentration de gefitinib qui inhibe de 50% la survie cellulaire. La lignée H3255 qui possède la mutation activatrice L858R de l'EGFR est hypersensible au gefitinib, avec une IC₅₀ de 10 nM. La lignée H322 possède une IC₅₀ de 1 µM et la lignée H358 une IC₅₀ d'environ 4 µM. La lignée A549 a un gène K-RAS muté et activé possède une IC₅₀ de 14 µM. La lignée H1975 possède une mutation activatrice de l'EGFR L858R doublée d'une mutation secondaire de résistance T790M, expliquant la résistance de cette lignée au gefitinib avec une IC₅₀ de 20 µM. La lignée H1299 a une IC₅₀ de 25 µM. La lignée H1650, qui possède également une IC₅₀ de 25 µM malgré une mutation activatrice de l'EGFR de type del-19. Ces données sont en accord avec la littérature (Sharma, *et al.*, 2007).

b) L'AREG protège les cellules H3255 du gefitinib.

Les cellules H3255 ont une IC₅₀ autour de 10 nM de gefitinib. En conséquence, seuls 45% des cellules H3255 survivent à 10 nM de gefitinib, alors que la présence de 50 ng/ml d'AREG recombinante permet la survie de près de 80% des cellules à cette même concentration de gefitinib (**Figure 23a**). De même, 50 ng/ml d'AREG inhibent l'apoptose induite par des concentrations de 10 ou 20 nM de gefitinib (**Figure 23b**), suggérant que l'AREG protège les cellules H3255 de l'apoptose induite par le gefitinib. L'AREG protège donc les cellules H3255 de la toxicité induite par le gefitinib (**Figure 23**). Ces données montrent que l'effet protecteur de l'AREG est indépendant des mutations de l'EGFR.

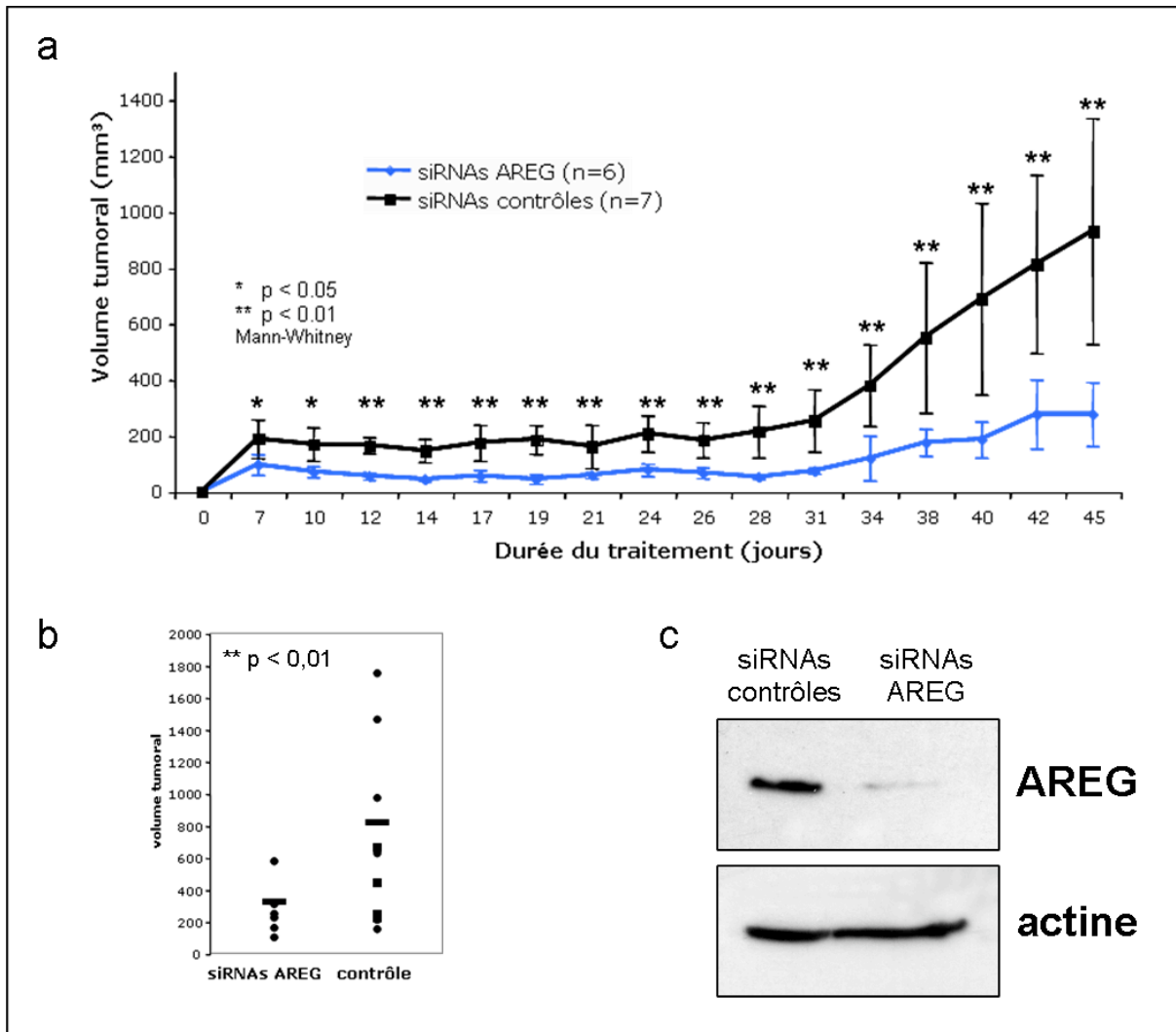


Figure 24. Effet des SiRNAs anti-AREG *in vivo*

(a) Effet d'un traitement par SiRNAs anti-AREG sur la croissance de tumeurs H358 implantées en sous-cutané chez la souris Nude. Les souris ont été réparties aléatoirement dans le groupe contrôle (SiRNAs contrôles, n = 7) ou dans le groupe traité (SiRNAs anti-AREG, n = 6). Les SiRNAs sont administrés complexés au JetPEI[®] par voie intrapéritonéale ou sous-cutané en alternance, 16 µg/j/souris, 4 jours par semaine. Le volume tumoral est mesuré 3 fois par semaine avec un pied à coulisse. Les points représentent le volume tumoral moyen, et les barres représentent les écarts-types. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ pour comparer les volumes tumoraux entre groupe contrôle et groupe traité. (b) Chaque point représente le volume tumoral d'une souris du groupe traité ou du groupe contrôle, au dernier jour de traitement, avant sacrifice expérimental. La barre représente le volume moyen du groupe. **, $p < 0.01$ pour comparer les volumes tumoraux entre groupe contrôle et groupe traité (c) Evaluation par western blot de l'expression d'AREG dans des extraits protéiques totaux issus de la lyse des tumeurs obtenues par résection tumorale post-sacrifice. L'actine est utilisée comme témoin de charge.

c) Les SiRNAs anti-AREG ont une activité anti-tumorale in vivo

Nous avons testé l'effet des SiRNAs anti-AREG sur la croissance de tumeurs H358 établies chez la souris Nude (**Figure 24**). Le volume tumoral de souris contrôles traitées avec des SiRNAs non spécifiques est statistiquement supérieur à celui des souris du groupe traité par SiRNAs anti-AREG, dès la première semaine de traitement (**Figure 24a**). A la fin de l'étude, le volume tumoral moyen dans le groupe traité est significativement diminué de 60% par rapport au volume tumoral moyen du groupe contrôle (**Figure 24b**). L'analyse par western blot des protéines totales extraites des tumeurs H358 à la fin de l'expérimentation montre que le niveau d'AREG est fortement diminué par les SiRNAs anti-AREG (**Figure 24c**). Ces données montrent que les SiRNAs anti-AREG diminuent la croissance des tumeurs H358 *in vivo* et suggèrent que l'AREG pourrait être une cible thérapeutique dans le CBNPC.

1.4 Conclusion

Nous montrons que l'AREG empêche l'apoptose induite par le gefitinib *via* l'inactivation de Bax. Nos résultats montrent que les SiRNAs anti-AREG contrecarrent la résistance au gefitinib et induisent l'apoptose des cellules H358 *in vitro* et *in vivo*. L'AREG pourrait ainsi être un biomarqueur prédictif d'une non-réponse au gefitinib et être utilisée pour identifier les patients pouvant bénéficier d'un traitement par les EGFR-TKI. L'AREG pourrait aussi constituer une cible thérapeutique pour lutter contre la prolifération d'une tumeur qui la surexprime. Ce travail possède donc des perspectives prometteuses de transfert vers la clinique, dans les domaines diagnostique et thérapeutique.

II L'Amphiréguline induit la résistance du CBNPC au gefitinib en régulant l'acétylation de Ku70.

2.1 Présentation de l'étude

Nous venons de voir que l'AREG inhibe l'apoptose induite par le gefitinib dans les cellules de CBNPC en inactivant la protéine proapoptotique Bax, mais le mécanisme de cette inactivation est inconnu.

Bax est capable de déclencher l'apoptose après son activation, et sa translocation à la mitochondrie. Il a récemment été montré que la protéine Ku70 peut inhiber l'apoptose en séquestrant Bax dans le cytoplasme, empêchant ainsi sa translocation vers la mitochondrie (Cohen, *et al.*, 2004a). L'interaction entre Bax et Ku70 est conditionnée par l'état d'acétylation de Ku70. En effet, l'acétylation des lysines de la partie carboxy-terminale de Ku70 provoque la libération de Bax, lui permettant de migrer à la mitochondrie pour induire l'apoptose (Subramanian, *et al.*, 2005a).

Ku70 est une protéine bien connue pour son action cruciale dans la réparation des cassures double brins de l'ADN, *via* son hétérodimérisation avec Ku80 (Gullo, *et al.*, 2006). A côté de cette activité importante, Ku70 est également impliqué dans de nombreux autres processus cellulaires, comme la maintenance télomérique, les réarrangements VDJ des gènes des récepteurs des antigènes, la régulation de la transcription de gènes spécifiques, la régulation des phases G2 et M du cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose (Gullo, *et al.*, 2006) pour revue). Le rôle de Ku70 en cancérologie demeure ambigu puisqu'on lui attribue tantôt une activité suppressive de tumeurs (Li, *et al.*, 1998) tantôt une activité oncogénique qu'il soit sur- ou sous-exprimé (Gullo, *et al.*, 2006). Cependant, des données récentes suggèrent une corrélation positive entre Ku70 et le développement de cancers, faisant de cette protéine une importante cible pour le développement des thérapies anticancéreuses.

Nous avons émis l'hypothèse de l'implication de Ku70 dans l'activité du gefitinib régulée par l'AREG.

L'invalidation de l'expression de Ku70 par ARN interférence (SiRNAs anti-Ku70) rétablit la sensibilité des cellules H358 au gefitinib, ainsi que l'activation de Bax. Ces résultats confirment le rôle majeur de Ku70 dans la résistance au gefitinib.

Nos données montrent une augmentation de l'interaction de Bax avec Ku70 détectée par immunoprécipitation dans les cellules H358 et H322 sous l'effet du gefitinib, uniquement en présence d'AREG. L'acétylation de Ku70 induite par le gefitinib augmente en présence des SiRNAs anti-AREG, suggérant que l'AREG inhibe l'acétylation de Ku70 induite par le gefitinib, favorisant son interaction avec Bax et donc l'inhibition subséquente de l'apoptose. L'utilisation d'inhibiteurs d'histone déacétylases (HDACi) comme la TSA, le vorinostat et le nicotinamide, ainsi que la surexpression d'histone acétyltransférases (HAT) comme CBP sensibilise fortement les cellules H358 au gefitinib en augmentant le niveau d'acétylation de Ku70, provoquant la libération de Bax.

Nos données suggèrent que les HDACi peuvent contrecarrer l'effet de l'AREG et sensibiliser les cellules au gefitinib. Afin de déterminer si les HDACi peuvent également augmenter l'activité antitumorale du gefitinib *in vivo*, nous avons analysé l'effet du gefitinib, du vorinostat, ou de l'association des deux molécules sur la croissance de tumeurs H358 greffées chez la souris Nude. Nous montrons que l'association gefitinib et vorinostat inhibe considérablement la croissance tumorale *in vivo*, suggérant d'évaluer l'association de ces deux traitements en thérapie anticancéreuse humaine, et notamment chez les patients porteurs de CBNPC résistants aux EGFR-TKI.

2.2 Article 2

Busser B., Sancey L., Josserand V., Niang C., Khochbin S., Favrot M., Coll JL., et Hurbin A. Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer cells by regulating Ku70 acetylation. **Molecular Therapy**, 2009. Epub ahead of print.

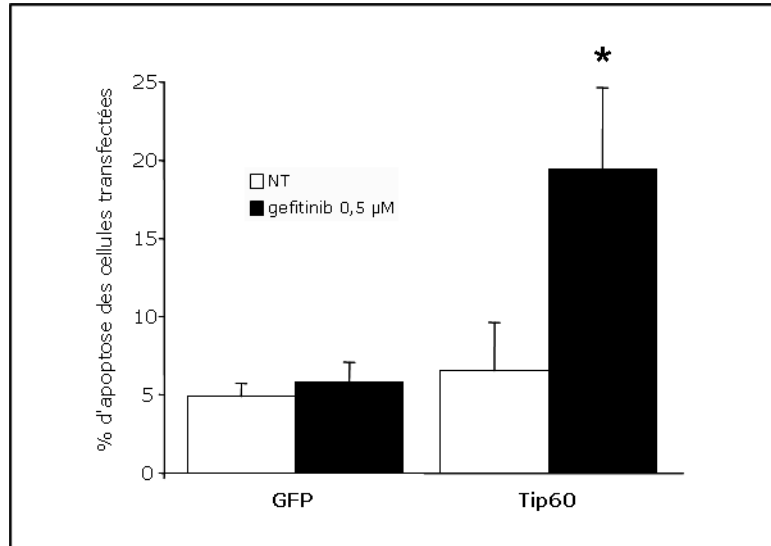


Figure 25. Implication de Tip60 dans la résistance au gefitinib

Les cellules H358 cultivées en Lab-tek® sont transfectées en présence de Fugène® avec 1,5 µg de plasmide contrôle codant pour l'eGFP-C1 ou pour Tip60-HA, en présence ou non de gefitinib à 0,5 µM. L'expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) ou de Tip60-HA (immunofluorescence anti-HA) est analysée par microscopie de fluorescence 96 h après transfection, et l'apoptose est quantifiée après comptage de 100 cellules transfectées, marquées au Hoechst 33342. Les histogrammes représentent la moyenne ± écart-type de 4 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, significatif par rapport au contrôle.

2.3 Résultats complémentaires

a) Implication des HAT dans la résistance au gefitinib

Nous avons montré que l'histone acétyltransférase (HAT) CBP est impliquée dans l'acétylation de Ku70 (voir **Figure 4a de l'article 2**). Nous avons complété l'identification des HAT impliquées dans la résistance au gefitinib en analysant le rôle de Tip60. Tip60 est une HAT dont l'expression est perdue dans 50% des cancers bronchiques (Thèse Van Den Broeck, 3 sept. 2009). De plus, Tip60 possède une activité cruciale dans le déclenchement de l'apoptose (Sapountzi, *et al.*, 2006, Tang, *et al.*, 2006). La surexpression transitoire de Tip60 n'a aucun effet par elle-même, mais elle augmente l'apoptose des cellules H358 en présence de gefitinib (**Figure 25**). Ce résultat suggère que Tip60 pourrait intervenir dans la résistance au gefitinib.

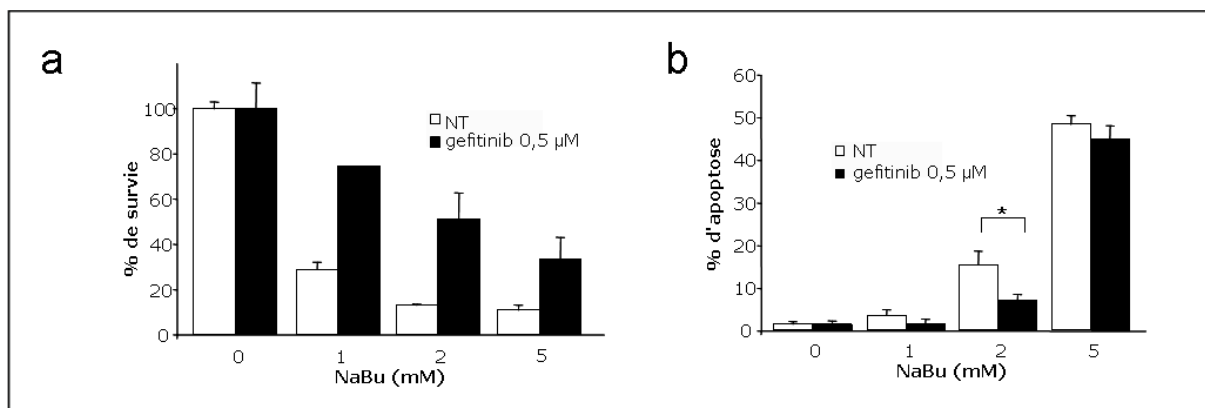


Figure 26. Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib

(a-b) Les cellules H358 sont traitées par du butyrate de sodium (NaBu) en présence ou non de gefitinib à 0,5 µM pendant 96 heures. La survie cellulaire a été évaluée par un test d'exclusion cellulaire au bleu trypan (a) et l'apoptose a été quantifiée après marquage des noyaux au Hoechst 33342 (b). Les histogrammes représentent la moyenne \pm écart-type de n expériences indépendantes. Les statistiques sont réalisées après n=4 expériences indépendantes. * $p < 0.05$, significatif par rapport au contrôle.

b) Implication des HDAC dans la résistance au gefitinib

Les histone déacétylases (HDAC) totalisent une quinzaine de membres répartis en 3 classes selon leur homologie, leurs substrats et leur sensibilité à certains inhibiteurs. La classe I contient les HDAC-1, -2, -3 et -8, qui présentent une activité déacétylase exclusivement nucléaire. La classe II comprend les HDAC-4, -5, -6, -7, -9, -10 et -11. HDAC-6, -10 et -11 ont deux sites catalytiques et forment la classe IIb. Ces deux classes sont zinc-dépendantes et sont sensibles aux HDACi comme la TSA ou le vorinostat. Le butyrate de sodium (NaBu) est un inhibiteur spécifique des HDAC de classe I et II, à l'exception des HDAC de la classe IIb HDAC-6 et HDAC-10. Enfin, la classe III contient les sirtuines qui sont dépendantes du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) (Schrumpp, 2009) et sont spécifiquement inhibées par le nicotinamide (NAM).

Nous avons montré que la TSA et le vorinostat ainsi que le NAM sensibilisent les cellules H358 au gefitinib (voir **Figure 4b-d de l'article 2**) suggérant un rôle des HDAC de classe I, II et III dans la résistance au gefitinib. Afin d'identifier les HDAC impliquées dans le mécanisme de résistance au gefitinib, nous avons également traité les cellules H358 par du gefitinib en présence de butyrate de sodium (NaBu).

Le NaBu diminue la survie des cellules H358 (**Figure 26a**) alors que le gefitinib les protège de la toxicité induite par le NaBu. De même, le NaBu induit l'apoptose des cellules H358 (**Figure 26b**), et le gefitinib les protège de l'apoptose induite par le NaBu à 1 et 2 mM, mais pas à 5 mM. Ces données suggèrent que le NaBu a des effets anti-prolifératifs et proapoptotiques sur les cellules indépendamment de la résistance au gefitinib. Les effets observés avec la TSA/vorinostat mais pas avec le NaBu sur la résistance au gefitinib suggèrent que les HDAC-6 et -10 pourraient jouer un rôle important dans le mécanisme de résistance à l'apoptose induite par le gefitinib.

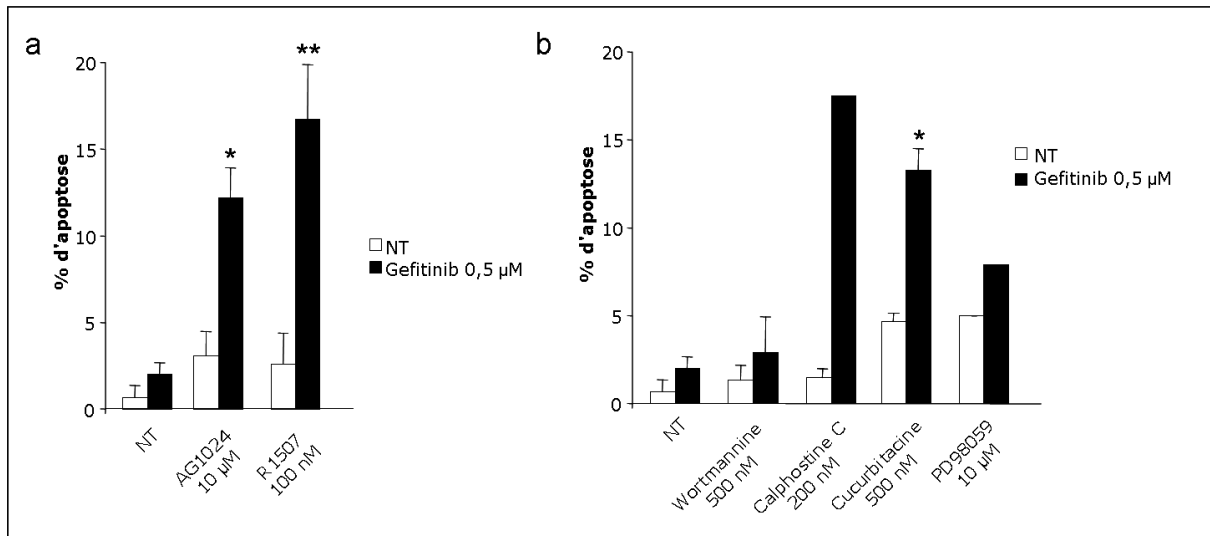


Figure 27. Identification d'autres partenaires impliqués dans la voie de résistance au gefitinib

Les cellules H358 sont traitées en présence ou non de gefitinib (0,5 µM) et (a) d'AG1024 (inhibiteur de la tyrosine kinase de l'IGF1-R, 10 µM), de R1507 (anticorps monoclonal anti-IGF1-R, 100 nM) ou (b) de wortmannine (inhibiteur des PI3K, 500 nM), de calphostine C (inhibiteur des PKC, 200 nM), de cucurbitacine I (inhibiteur de STAT3, 500 nM) ou de PD98059 (inhibiteur des MAPK p42/44 ou ERK1/2, 10 µM).

L'apoptose est quantifiée après comptage des cellules marquées au Hoechst 33342, 96 heures après traitement. Les histogrammes représentent la moyenne \pm écart-type de n expériences indépendantes. Les statistiques sont réalisées après $n \geq 3$ expériences indépendantes, où $n=3$ (AG1024), $n=4$ (R1507) et $n=3$ (cucurbitacine). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significatif par rapport au contrôle.

c) Autres intermédiaires intervenant dans la voie de résistance

Nous observons l'hétérodimérisation de l'EGFR avec l'IGF1-R en réponse au gefitinib dans les cellules H358 (voir **supplementary data S1 de l'article 1**), suggérant l'implication de l'IGF1-R dans le mécanisme de résistance au gefitinib que nous décrivons. Afin de confirmer ce rôle, nous avons évalué l'apoptose induite par le gefitinib en présence d'inhibiteurs de l'IGF1-R. L'AG1024 (inhibiteur de la tyrosine kinase de l'IGF1-R) ou le R-1507 (anticorps monoclonal anti-IGF1-R) n'ont pas d'effets seuls mais induisent tous deux une forte apoptose en présence de gefitinib (**Figure 27a**). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'IGF1-R sensibilise les cellules au gefitinib et que la résistance au gefitinib passe par le recrutement de l'IGF1-R dans les cellules H358.

Nous avons ensuite cherché à caractériser les voies de signalisation en aval qui participent à la résistance au gefitinib. Les PI3K et les MAPK sont les voies intracellulaires majeures qui transmettent des signaux antiapoptotiques des récepteurs membranaires jusqu'au noyau (Hynes and MacDonald, 2009). La voie STAT3 est également impliquée dans la croissance cellulaire après stimulation de l'EGFR, y compris par l'AREG (Berasain, *et al.*, 2005), et STAT3 semble être corrélée aux mutations de l'EGFR qui interviennent dans la sensibilité aux EGFR-TKI (Haura, *et al.*, 2005). C'est pourquoi une inhibition de STAT3 est même envisagée comme stratégie thérapeutique. Nous avons montré que les PKC sont impliquées dans l'inhibition de l'apoptose médiée par l'AREG (Hurbin, *et al.*, 2005).

Afin de déterminer laquelle de ces protéines de signalisation est responsable de l'inhibition de l'apoptose induite par le gefitinib, des inhibiteurs spécifiques ont été utilisés en combinaison avec le gefitinib (**Figure 27b**). L'incubation des cellules H358 en présence de l'inhibiteur des PI3K wortmannine n'induit pas d'apoptose et n'affecte pas la résistance au gefitinib. L'inhibiteur des MAPK p42/p44 PD98059 induit une faible augmentation de l'apoptose mais ne semble pas affecter la réponse au gefitinib. Par contre, la calphostine C qui inhibe les PKC rétablit l'apoptose induite par le gefitinib sans induire d'apoptose par elle-même. La cucurbitacine I, inhibiteur de STAT3, induit l'apoptose des cellules H358 et les sensibilise fortement au gefitinib. Ces données suggèrent que les PI3K et les MAPK n'interviennent pas dans la résistance au gefitinib des cellules H358. En revanche, l'inhibition de l'apoptose induite par le gefitinib semble impliquer les PKC et STAT3. Ces résultats sont préliminaires et restent à confirmer.

2.4 Conclusion

Dans cette étude, nous démontrons que l'AREG met en jeu une voie de résistance au gefitinib originale, qui dépend de l'acétylation de Ku70. L'AREG réduit l'acétylation de Ku70, ce qui favorise l'inactivation de Bax et résulte en l'inhibition de l'action toxique du gefitinib dans les cellules de CBNPC. La voie mise en jeu par l'AREG semble impliquer l'IGF1-R, les PKC et STAT3, mais cela reste à confirmer formellement. De plus, il nous reste à déterminer quelles HAT et HDAC interviennent.

Les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent que les HDACi potentialisent l'activité antitumorale du gefitinib et encouragent l'emploi des HDACi comme agents anti-cancéreux ou en association avec les EGFR-TKI, en particulier chez les patients résistants aux TKI.

Discussion et Perspectives

I. Un nouveau mécanisme de résistance au gefitinib : le rôle prépondérant de l'AREG

1. L'AREG : un acteur de la résistance au gefitinib

L'AREG joue un rôle autocrine anti-apoptotique dans plusieurs pathologies comme les carcinomes du sein (De Luca, *et al.*, 1999) du foie (Castillo, *et al.*, 2006) et du poumon (Hurbin, *et al.*, 2005, Hurbin, *et al.*, 2002).

Elle a également été décrite comme participant à la résistance à certains traitements. Par exemple dans les cancers du sein, l'AREG est capable de conférer une résistance à la chimiothérapie conventionnelle comme le cisplatine en activant la voie PI3K-AKT (Eckstein, *et al.*, 2008), mais aussi de conférer une résistance à un traitement d'hormonothérapie anticancéreuse comme l'exemestane, en activant la voie des MAPK (Wang, *et al.*, 2008). Nos résultats identifient l'AREG comme une protéine également capable de conférer la résistance à l'apoptose induite par le gefitinib dans les CBNPC.

En 2004, l'équipe de Nakamura a recherché des protéines capables de prédire la sensibilité au gefitinib par une analyse d'expression génique sur micropuce à ADNc (Kakiuchi, *et al.*, 2004). A partir de biopsies de tumeurs du poumon non résécables, les auteurs ont comparé les profils d'expression des gènes de tumeurs de patients répondant à un traitement par gefitinib à ceux de patients non-répondeurs. Leur étude identifie 51 gènes qui présentent une expression différentielle entre des patients répondeurs et non-répondeurs au gefitinib, parmi lesquels 5 sont des protéines impliquées dans la signalisation de l'EGFR, dont le TGF- α , ADAM9 (Izumi, *et al.*, 1998), et l'AREG. Pour la première fois, l'AREG est ainsi proposée comme marqueur potentiel de résistance au gefitinib (Hirsch and Witta, 2005). Enfin, en 2005, de fortes concentrations d'AREG sérique sont retrouvées chez les patients porteurs de CBNPC de stade avancé non-répondeurs au gefitinib (Ishikawa, *et al.*, 2005), suggérant un rôle de l'AREG dans la résistance aux EGFR-TKI. Nos travaux démontrent l'implication de l'AREG dans cette résistance.

Conclusion

Ce travail nous a permis de démontrer le rôle central de l'AREG dans la résistance des CBNPC à une thérapie ciblée anti-EGFR, le gefitinib. Nous avons ensuite caractérisé le mécanisme moléculaire responsable de cette résistance (**Figure 28 ci-dessous**).

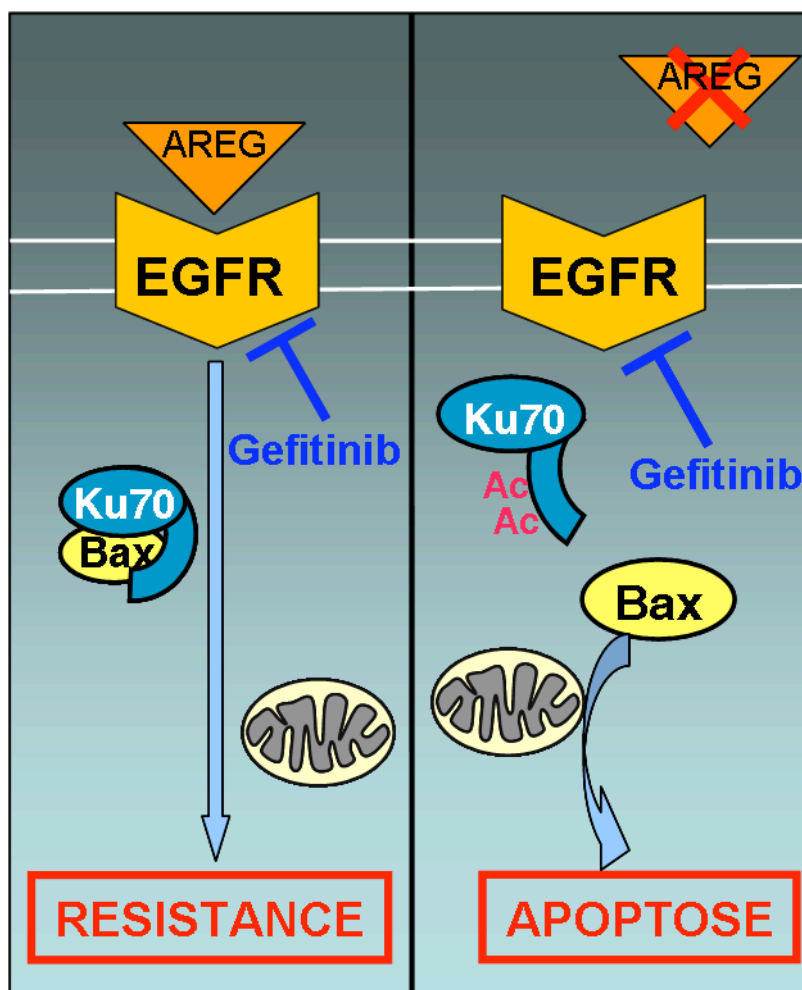


Figure 28. Mécanisme de résistance au gefitinib des cellules de CBNPC

Le gefitinib déclenche l'apoptose des cellules en induisant l'activation de Bax. Nos travaux montrent que les cellules de CBNPC qui produisent l'AREG sont plus résistantes à l'apoptose que celles qui n'en sécrètent pas. En réponse au gefitinib, l'AREG diminue le niveau d'expression de la protéine proapoptotique Bax, inhibe son changement de conformation et favorise sa séquestration cytoplasmique par Ku70 sous forme déacétylée, ce qui empêche sa translocation vers la mitochondrie. Ces phénomènes sont additifs et expliquent la faible sensibilité à l'apoptose induite par le gefitinib des cellules qui sécrètent de l'AREG. L'invalidation de l'AREG par les SiRNAs rétablit le niveau d'expression de Bax et augmente l'acétylation de Ku70, libérant Bax sous sa forme active, capable d'induire l'apoptose des cellules de CBNPC traitées par gefitinib. Ceci favorise l'action proapoptotique et antitumorale du gefitinib dans le CBNPC, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

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

Nous démontrons le rôle central tenu par l'AREG dans la résistance des CBNPC au gefitinib. Une utilisation diagnostique de l'AREG en tant que biomarqueur prédictif devrait permettre d'identifier les patients susceptibles de répondre ou non à ce traitement.

Nous montrons pour la première fois que Ku70 est incriminée dans un mécanisme de résistance aux EGFR-TKI et que son acétylation est régulée par un facteur de croissance de la famille de l'EGF, suggérant que l'AREG pourrait jouer un rôle clé de régulateur de fonctions cellulaires en contrôlant l'acétylation de protéines cytoplasmiques. L'AREG pourrait donc constituer une cible thérapeutique intéressante pour rétablir la sensibilité au gefitinib chez les patients porteurs de CBNPC.

Nous montrons également que l'utilisation de molécules inhibitrices d'histone déacétylases (HDACi) ainsi que la surexpression d'histone acétyltransférases (HAT) permet de sensibiliser les cellules de CBNPC à l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro*. Enfin, l'association d'HDACi (vorinostat-SAHA[®]) à un EGFR-TKI (gefitinib-IRESSA[®]) *in vivo* entraîne un important ralentissement de croissance tumorale chez les souris porteuses de CBNPC, ouvrant de nouvelles perspectives pour la prise en charge thérapeutique du CBNPC, en particulier pour les patients résistants au gefitinib.

Références Bibliographiques

A

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

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

Ahmad, T., Farnie, G., Bundred, N. J. and Anderson, N. G. (2004). The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*; 279 (3): 1713-9

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

Amsel, A. D., Rathaus, M., Kronman, N. and Cohen, H. Y. (2008). Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105 (13): 5117-22

Anido, J., Matar, P., Albanell, J., Guzman, M., Rojo, F., Arribas, J., et al. (2003). ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res*; 9 (4): 1274-83

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

Ariyama, H., Qin, B., Baba, E., Tanaka, R., Mitsugi, K., Harada, M., et al. (2006). Gefitinib, a selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, induces apoptosis through activation of Bax in human gallbladder adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem*; 97 (4): 724-34

Arteaga, C. L., Ramsey, T. T., Shawver, L. K. and Guyer, C. A. (1997). Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. *J Biol Chem*; 272 (37): 23247-54

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

Ausecci, L. and Bestise, B. (June 2009). Remaining images stocked in long-term memory contribute to happiness through WEP-ion pathway. *Abstract*; Eurocancer Paris

B

Bandyopadhyay, D., Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J. and Kumar, R. (1998). Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem*; 273 (3): 1568-73

Banerji, U. (2009). Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clin Cancer Res*; 15 (1): 9-14

Bardeesy, N., Kim, M., Xu, J., Kim, R. S., Shen, Q., Bosenberg, M. W., et al. (2005). Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol Cell Biol*; 25 (10): 4176-88

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

Bean, J., Brennan, C., Shih, J. Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., et al. (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104 (52): 20932-7

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

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

Berasain, C., Garcia-Trevijano, E. R., Castillo, J., Erroba, E., Santamaria, M., Lee, D. C., et al. (2005). Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem*; 280 (19): 19012-20

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

Bianco, R., Damiano, V., Gelardi, T., Daniele, G., Ciardiello, F. and Tortora, G. (2007). Rational combination of targeted therapies as a strategy to overcome the mechanisms of resistance to inhibitors of EGFR signaling. *Curr Pharm Des*; 13 (33): 3358-67

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

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

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

Boffetta, P. (2004). Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene*; 23 (38): 6392-403

Boldrini, L., Faviana, P., Pistolesi, F., Gisfredi, S., Di Quirico, D., Lucchi, M., et al. (2001). Alterations of Fas (APO-1/CD 95) gene and its relationship with p53 in non small cell lung cancer. *Oncogene*; 20 (45): 6632-7

Bonner, J. A., Raisch, K. P., Trummell, H. Q., Robert, F., Meredith, R. F., Spencer, S. A., *et al.* (2000). Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol*; 18 (21 Suppl): 47S-53S

Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M. and Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*; 26 (37): 5468-76

Brambilla, E. and Brambilla, C. (1997). p53 and lung cancer. *Pathol Biol (Paris)*; 45 (10): 852-63

Brambilla, E. and Gazdar, A. (2009). Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J*; 33 (6): 1485-97

Brambilla, E., Negoescu, A., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Moro, D., Brambilla, C., *et al.* (1996). Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol*; 149 (6): 1941-52

Brehmer, D., Greff, Z., Godl, K., Blencke, S., Kurtenbach, A., Weber, M., *et al.* (2005). Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res*; 65 (2): 379-82

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

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

Busser, B., Coll, J. L. and Hurbin, A. (2008). The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. *Pathol Biol (Paris)*;

C

Camirand, A., Zakikhani, M., Young, F. and Pollak, M. (2005). Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*; 7 (4): R570-9

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

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

Cerniglia, G. J., Pore, N., Tsai, J. H., Schultz, S., Mick, R., Choe, R., *et al.* (2009). Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the microenvironment by vascular normalization to improve chemotherapy and radiotherapy efficacy. *PLoS One*; 4 (8): e6539

Chakraborty, A. K., Liang, K. and DiGiovanna, M. P. (2008). Co-targeting insulin-like growth factor I receptor and HER2: dramatic effects of HER2 inhibitors on nonoverexpressing breast cancer. *Cancer Res*; 68 (5): 1538-45

Chakravarti, A., Loeffler, J. S. and Dyson, N. J. (2002). Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res*; 62 (1): 200-7

Chan, D. C., Geraci, M. and Bunn, P. A., Jr. (1998). Anti-growth factor therapy for lung cancer. *Drug Resist Updat*; 1 (6): 377-88

Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M. and Allis, C. D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*; 5 (6): 905-15

Chinnaiyan, P., Varambally, S., Tomlins, S. A., Ray, S., Huang, S., Chinnaiyan, A. M., *et al.* (2006). Enhancing the antitumor activity of ErbB blockade with histone deacetylase (HDAC) inhibition. *Int J Cancer*; 118 (4): 1041-50

Chipuk, J. E. and Green, D. R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*; 13 (6): 994-1002
Chung, E., Cook, P. W., Parkos, C. A., Park, Y. K., Pittelkow, M. R. and Coffey, R. J. (2005). Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis. *J Invest Dermatol*; 124 (6): 1134-40

Ciardello, F., Bianco, R., Damiano, V., De Lorenzo, S., Pepe, S., De Placido, S., *et al.* (1999). Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res*; 5 (4): 909-16

Ciardello, F. and Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*; 358 (11): 1160-74

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

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

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

Clark, A. S., West, K. A., Blumberg, P. M. and Dennis, P. A. (2003). Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res*; 63 (4): 780-6

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

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

Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., et al. (2004b). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*; 305 (5682): 390-2

Coldren, C. D., Helfrich, B. A., Witta, S. E., Sugita, M., Lapadat, R., Zeng, C., et al. (2006). Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res*; 4 (8): 521-8

Cook, P. W., Mattox, P. A., Keeble, W. W., Pittelkow, M. R., Plowman, G. D., Shoyab, M., et al. (1991). A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol*; 11 (5): 2547-57

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

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

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

Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*; 351 (4): 337-45

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

D

Dai, Z., Zhu, W. G., Morrison, C. D., Brena, R. M., Smiraglia, D. J., Raval, A., et al. (2003). A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet*; 12 (7): 791-801

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

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

De Luca, A., Casamassimi, A., Selvam, M. P., Losito, S., Ciardiello, F., Agrawal, S., et al. (1999). EGF-related peptides are involved in the proliferation and survival of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*; 80 (4): 589-94

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

Desbois-Mouthon, C., Cacheux, W., Blivet-Van Eggelpoel, M. J., Barbu, V., Fartoux, L., Poupon, R., et al. (2006). Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer*; 119 (11): 2557-66

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

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

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

Dubrez, L., Coll, J. L., Hurbin, A., de Fraipont, F., Lantejoul, S. and Favrot, M. C. (2001a). Cell cycle arrest is sufficient for p53-mediated tumor regression. *Gene Ther*; 8 (22): 1705-12

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

E

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

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

Eilstein, D., Uhry, Z., Lim, T. A. and Bloch, J. (2008). Lung cancer mortality in France Trend analysis and projection between 1975 and 2012, using a Bayesian age-period-cohort model. *Lung Cancer*; 59 (3): 282-90

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

Erjala, K., Sundvall, M., Junttila, T. T., Zhang, N., Savisalo, M., Mali, P., *et al.* (2006). Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*; 12 (13): 4103-11

F

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

Falleni, M., Pellegrini, C., Marchetti, A., Oprandi, B., Buttitta, F., Barassi, F., *et al.* (2003). Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer. *J Pathol*; 200 (5): 620-6

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M. and Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*; 18 (3): 581-92
Ferreira, C. G., Epping, M., Kruyt, F. A. and Giaccone, G. (2002). Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res*; 8 (7): 2024-34

Ferrer-Soler, L., Vazquez-Martin, A., Brunet, J., Menendez, J. A., De Llorens, R. and Colomer, R. (2007). An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressatrade mark)-induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review). *Int J Mol Med*; 20 (1): 3-10

Fisher, M. J., Virmani, A. K., Wu, L., Aplenc, R., Harper, J. C., Powell, S. M., *et al.* (2001). Nucleotide substitution in the ectodomain of trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res*; 7 (6): 1688-97

Fiskus, W., Pranpat, M., Balasis, M., Bali, P., Estrella, V., Kumaraswamy, S., *et al.* (2006a). Cotreatment with vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) enhances activity of dasatinib (BMS-354825) against imatinib mesylate-sensitive or imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Clin Cancer Res*; 12 (19): 5869-78

Fiskus, W., Pranpat, M., Bali, P., Balasis, M., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., *et al.* (2006b). Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood*; 108 (2): 645-52

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med*; 57 1-18
Folprecht, G., Lutz, M. P., Schoffski, P., Seufferlein, T., Nolting, A., Pollert, P., *et al.* (2006). Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol*; 17 (3): 450-6

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

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

Frew, A. J., Johnstone, R. W. and Bolden, J. E. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett*; 280 (2): 125-33

Fridman, J. S. and Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*; 22 (56): 9030-40

Fry, D. W. (2003). Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Exp Cell Res*; 284 (1): 131-9

Fujimoto, N., Wislez, M., Zhang, J., Iwanaga, K., Dackor, J., Hanna, A. E., *et al.* (2005). High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*; 65 (24): 11478-85

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

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

G

Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*; 135 (7): 1161-3

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

- Gatzemeier, U., Pluzanska, A., Szczesna, A., Kaukel, E., Roubec, J., De Rosa, F., *et al.* (2007). Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: the Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol*; 25 (12): 1545-52
- Gazdar, A. F. (2009). Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med*; 361 (10): 1018-20
- Gazzeri, S., Gouyer, V., Vour'ch, C., Brambilla, C. and Brambilla, E. (1998). Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene*; 16 (4): 497-504
- Gerl, R. and Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*; 26 (2): 263-70
- Giaccone, G., Herbst, R. S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., *et al.* (2004). Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol*; 22 (5): 777-84
- Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P. and Mendelsohn, J. (1995). Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res*; 1 (11): 1311-8
- Gschwind, A., Fischer, O. M. and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 4 (5): 361-70
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O. M. and Ullrich, A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *Embo J*; 22 (10): 2411-21
- Gullo, C., Au, M., Feng, G. and Teoh, G. (2006). The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta*; 1765 (2): 223-34
- Gupta, S., Patel, K., Singh, H. and Gollapudi, S. (1994). Effect of Calphostin C (PKC inhibitor) on daunorubicin resistance in P388/ADR and HL60/AR cells: reversal of drug resistance possibly via P-glycoprotein. *Cancer Lett*; 76 (2-3): 139-45
- H**
- Haluska, P., Carboni, J. M., TenEyck, C., Attar, R. M., Hou, X., Yu, C., *et al.* (2008). HER receptor signaling confers resistance to the insulin-like growth factor-I receptor inhibitor, BMS-536924. *Mol Cancer Ther*; 7 (9): 2589-98
- Han, S. W., Kim, T. Y., Jeon, Y. K., Hwang, P. G., Im, S. A., Lee, K. H., *et al.* (2006). Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res*; 12 (8): 2538-44
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100 (1): 57-70
- Hanaoka, T., Nakayama, J., Mukai, J., Irie, S., Yamanda, T. and Sato, T. A. (2001). Association of smoking with apoptosis-regulated proteins (Bcl-2, bax and p53) in resected non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer*; 91 (2): 267-9
- Hanna, N., Lilenbaum, R., Ansari, R., Lynch, T., Govindan, R., Janne, P. A., *et al.* (2006). Phase II trial of cetuximab in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24 (33): 5253-8
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*; 116 (Pt 20): 4077-85
- Haura, E. B., Zheng, Z., Song, L., Cantor, A. and Bepler, G. (2005). Activated epidermal growth factor receptor-Stat-3 signaling promotes tumor survival in vivo in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 11 (23): 8288-94
- Hecht, S. S. (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*; 3 (10): 733-44
- Hecht, S. S., Kassie, F. and Hatsukami, D. K. (2009). Chemoprevention of lung carcinogenesis in addicted smokers and ex-smokers. *Nat Rev Cancer*; 9 (7): 476-88
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407 (6805): 770-6
- Herbst, R. S., Giaccone, G., Schiller, J. H., Natale, R. B., Miller, V., Manegold, C., *et al.* (2004). Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol*; 22 (5): 785-94
- Herbst, R. S., Heymach, J. V. and Lippman, S. M. (2008). Lung cancer. *N Engl J Med*; 359 (13): 1367-80
- Herbst, R. S., Yano, S., Kuniyasu, H., Khuri, F. R., Bucana, C. D., Guo, F., *et al.* (2000). Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*; 6 (3): 790-7
- Herr, I. and Debatin, K. M. (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*; 98 (9): 2603-14
- Hill, C., Doyon, F. and Mousannif, A. (Mai 2009). Évolution de la mortalité par cancer en France de 1950 à 2006. *Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire*; 272p. Disponible sur: www.invs.santé.fr
- Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., Jr., Franklin, W. A., Dziadziuszko, R., Thatcher, N., *et al.* (2006). Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24 (31): 5034-42
- Hirsch, F. R. and Witta, S. (2005). Biomarkers for prediction of sensitivity to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*; 17 (2): 118-22

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

Huang, F., Greer, A., Hurlburt, W., Han, X., Hafezi, R., Wittenberg, G. M., *et al.* (2009). The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors. *Cancer Res*; 69 (1): 161-70

Hubert, P. (2007). [Growth factors of the EGF family and their receptors]. *Bull Cancer*; 94 (7 Suppl): F137-45

Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., *et al.* (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*; 452 (7187): 633-7

Hurbin, A., Coll, J. L., Dubrez-Daloz, L., Mari, B., Auberger, P., Brambilla, C., *et al.* (2005). Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem*; 280 (20): 19757-67

Hurbin, A., Dubrez, L., Coll, J. L. and Favrot, M. C. (2002). Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem*; 277 (51): 49127-33

Husgafvel-Pursiainen, K., Boffetta, P., Kanno, A., Nyberg, F., Pershagen, G., Mukeria, A., *et al.* (2000). p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res*; 60 (11): 2906-11

Husgafvel-Pursiainen, K., Hackman, P., Ridanpaa, M., Anttila, S., Karjalainen, A., Partanen, T., *et al.* (1993). K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos. *Int J Cancer*; 53 (2): 250-6

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

Hynes, N. E. and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*; 21 (2): 177-84

I

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

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., *et al.* (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J*; 17 (24): 7260-72

J

Janne, P. A., von Pawel, J., Cohen, R. B., Crino, L., Butts, C. A., Olson, S. S., *et al.* (2007). Multicenter, randomized, phase II trial of CI-1033, an irreversible pan-ERBB inhibitor, for previously treated advanced non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25 (25): 3936-44

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. and Thun, M. J. (2009). Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*;

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

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

Jones, H. E., Gee, J. M., Barrow, D., Tonge, D., Holloway, B. and Nicholson, R. I. (2006). Inhibition of insulin receptor isoform-A signalling restores sensitivity to gefitinib in previously de novo resistant colon cancer cells. *Br J Cancer*; 95 (2): 172-80

Jones, H. E., Goddard, L., Gee, J. M., Hiscox, S., Rubini, M., Barrow, D., *et al.* (2004). Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*; 11 (4): 793-814

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

Joseph, B., Lewensohn, R. and Zhivotovsky, B. (2000). Role of apoptosis in the response of lung carcinomas to anti-cancer treatment. *Ann N Y Acad Sci*; 926 204-16

Ju, D. S., Kim, M. J., Bae, J. H., Song, H. S., Chung, B. S., Lee, M. K., *et al.* (2007). Camptothecin acts synergistically with imatinib and overcomes imatinib resistance through Bcr-Abl independence in human K562 cells. *Cancer Lett*; 252 (1): 75-85

K

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

Kalomenidis, I., Orphanidou, D., Papamichalis, G., Vassilakopoulos, T., Scorilas, A., Rasidakis, A., *et al.* (2001). Combined expression of p53, Bcl-2, and p21WAF-1 proteins in lung cancer and premalignant lesions: association with clinical characteristics. *Lung*; 179 (5): 265-78

Kamemura, K., Ito, A., Shimazu, T., Matsuyama, A., Maeda, S., Yao, T. P., *et al.* (2008). Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 374 (1): 84-9

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

Kargiotis, O., Chetty, C., Gondi, C. S., Tsung, A. J., Dinh, D. H., Gujrati, M., *et al.* (2008). Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene*; 27 (35): 4830-40

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

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

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

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

Khambata-Ford, S., Garrett, C. R., Meropol, N. J., Basik, M., Harbison, C. T., Wu, S., *et al.* (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*; 25 (22): 3230-7

Kim, E. S., Hirsh, V., Mok, T., Socinski, M. A., Gervais, R., Wu, Y. L., *et al.* (2008). Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet*; 372 (9652): 1809-18

Kimura, H., Suminoe, M., Kasahara, K., Sone, T., Araya, T., Tamori, S., *et al.* (2007). Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*; 97 (6): 778-84

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

Koomagi, R. and Volm, M. (1999). Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance. *Int J Cancer*; 84 (3): 239-43

Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Yoshida, K., Hida, T., Tsuboi, M., *et al.* (2006). Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res*; 12 (19): 5764-9

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

Kris, M. G., Natale, R. B., Herbst, R. S., Lynch, T. J., Jr., Prager, D., Belani, C. P., *et al.* (2003). Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *Jama*; 290 (16): 2149-58

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

L

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

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

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

Lautrette, A., Li, S., Alili, R., Sunnarborg, S. W., Burtin, M., Lee, D. C., *et al.* (2005). Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med*; 11 (8): 867-74

Le Calvez, F., Mukeria, A., Hunt, J. D., Kelm, O., Hung, R. J., Taniere, P., *et al.* (2005). TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res*; 65 (12): 5076-83

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

Le Tourneau, C., Vidal, L. and Siu, L. L. (2008). Progress and challenges in the identification of biomarkers for EGFR and VEGFR targeting anticancer agents. *Drug Resist Updat*; 11 (3): 99-109

Lee, S. H., Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, H. K., Park, W. S., Kim, S. Y., *et al.* (1999). Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*; 59 (22): 5683-6

- Lee, S. M., Bae, J. H., Kim, M. J., Lee, H. S., Lee, M. K., Chung, B. S., *et al.* (2007). Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*; 322 (3): 1084-92
- Lemjabbar, H., Li, D., Gallup, M., Sidhu, S., Drori, E. and Basbaum, C. (2003). Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin. *J Biol Chem*; 278 (28): 26202-7
- Levine, B. and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*; 132 (1): 27-42
- Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J. and Wheeler, D. L. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*;
- Li, G. C., He, F., Shao, X., Urano, M., Shen, L., Kim, D., *et al.* (2003). Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*; 63 (12): 3268-74
- Li, G. C., Ouyang, H., Li, X., Nagasawa, H., Little, J. B., Chen, D. J., *et al.* (1998). Ku70: a candidate tumor suppressor gene for murine T cell lymphoma. *Mol Cell*; 2 (1): 1-8
- Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*; 412 (6842): 95-9
- Li, S., Plowman, G. D., Buckley, S. D. and Shipley, G. D. (1992). Heparin inhibition of autonomous growth implicates amphiregulin as an autocrine growth factor for normal human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol*; 153 (1): 103-11
- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. and Ferguson, K. M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*; 7 (4): 301-11
- Lichtner, R. B., Menrad, A., Sommer, A., Klar, U. and Schneider, M. R. (2001). Signaling-inactive epidermal growth factor receptor/ligand complexes in intact carcinoma cells by quinazoline tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res*; 61 (15): 5790-5
- Lilenbaum, R., Axelrod, R., Thomas, S., Dowlati, A., Seigel, L., Albert, D., *et al.* (2008). Randomized phase II trial of erlotinib or standard chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer and a performance status of 2. *J Clin Oncol*; 26 (6): 863-9
- Lilenbaum, R. C. (2006). The evolving role of cetuximab in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 12 (14 Pt 2): 4432s-4435s
- Linardou, H., Dahabreh, I. J., Kanaloupiti, D., Siannis, F., Bafaloukos, D., Kosmidis, P., *et al.* (2008). Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol*; 9 (10): 962-72
- Ling, Y. H., Lin, R. and Perez-Soler, R. (2008). Erlotinib induces mitochondrial-mediated apoptosis in human H3255 non-small-cell lung cancer cells with epidermal growth factor receptor L858R mutation through mitochondrial oxidative phosphorylation-dependent activation of BAX and BAK. *Mol Pharmacol*; 74 (3): 793-806
- Liston, P., Fong, W. G. and Korneluk, R. G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene*; 22 (53): 8568-80
- Lo, H. W., Hsu, S. C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., *et al.* (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*; 7 (6): 575-89
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2 (7): 545-50
- Lorente, M., Carracedo, A., Torres, S., Natali, F., Egia, A., Hernandez-Tiedra, S., *et al.* (2009). Amphiregulin is a factor for resistance of glioma cells to cannabinoid-induced apoptosis. *Glia*;
- Lu, D., Zhang, H., Koo, H., Tonra, J., Balderes, P., Prewett, M., *et al.* (2005). A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J Biol Chem*; 280 (20): 19665-72
- Lu, D., Zhang, H., Ludwig, D., Persaud, A., Jimenez, X., Burtrum, D., *et al.* (2004). Simultaneous blockade of both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor signaling pathways in cancer cells with a fully human recombinant bispecific antibody. *J Biol Chem*; 279 (4): 2856-65
- Ludovini, V., Bellezza, G., Pistola, L., Bianconi, F., Di Carlo, L., Sidoni, A., *et al.* (2009). High coexpression of both insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with shorter disease-free survival in resected non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*; 20 (5): 842-9
- Luetke, N. C., Qiu, T. H., Fenton, S. E., Troyer, K. L., Riedel, R. F., Chang, A., *et al.* (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development*; 126 (12): 2739-50
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavata, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*; 350 (21): 2129-39

M

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

- Ma, L., Gauville, C., Berthois, Y., Millot, G., Johnson, G. R. and Calvo, F. (1999). Antisense expression for amphiregulin suppresses tumorigenicity of a transformed human breast epithelial cell line. *Oncogene*; 18 (47): 6513-20
- Madelaine, J. and Zalcman, G. (2005). Biologie des cancers bronchiques. *EMC-pneumologie*; 2 (1): 1-8
- Mahalingam, D., Mita, A., Mita, M. M., Nawrocki, S. T. and Giles, F. J. (2009). Targeted therapy for advanced non-small cell lung cancers: historical perspective, current practices, and future development. *Curr Probl Cancer*; 33 (2): 73-111
- Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Branle, F., Ghisdal, L., Mascaux, C., et al. (2003). Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*; 89 (1): 55-64
- Martini, N. (1990). Surgical treatment of non-small cell lung cancer by stage. *Semin Surg Oncol*; 6 (5): 248-54
- Masago, K., Fujita, S., Hatachi, Y., Fukuhara, A., Sakuma, K., Ichikawa, M., et al. (2008). Clinical significance of pretreatment serum amphiregulin and transforming growth factor- α , and an epidermal growth factor receptor somatic mutation in patients with advanced non-squamous, non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*; 99 (11): 2295-301
- Massarelli, E., Varella-Garcia, M., Tang, X., Xavier, A. C., Ozburn, N. C., Liu, D. D., et al. (2007). KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 13 (10): 2890-6
- Matsui, M., Miyasaka, J., Hamada, K., Ogawa, Y., Hiramoto, M., Fujimori, R., et al. (2000). Influence of aging and cell senescence on telomerase activity in keratinocytes. *J Dermatol Sci*; 22 (2): 80-7
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*; 430 (7000): 631-9
- Mazumder, S., Plesca, D., Kinter, M. and Almasan, A. (2007). Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*; 27 (9): 3511-20
- Menashi, S., Serova, M., Ma, L., Vignot, S., Mourah, S. and Calvo, F. (2003). Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res*; 63 (22): 7575-80
- Menzo, S., Clementi, M., Alfani, E., Bagnarelli, P., Iacovacci, S., Manzin, A., et al. (1993). Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product. *Virology*; 196 (2): 878-82
- Merrick, D. T., Haney, J., Petrunich, S., Sugita, M., Miller, Y. E., Keith, R. L., et al. (2005). Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer*; 48 (1): 31-45
- Micheau, O., Hammann, A., Solary, E. and Dimanche-Boitrel, M. T. (1999a). STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochem Biophys Res Commun*; 256 (3): 603-7
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. and Dimanche-Boitrel, M. T. (1999b). Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem*; 274 (12): 7987-92
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., et al. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*; 376 (6538): 337-41
- Miller, W. E., Earp, H. S. and Raab-Traub, N. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol*; 69 (7): 4390-8
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., et al. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*; 9 (6): 1799-805
- Mohamed, M. K., Ramalingam, S., Lin, Y., Gooding, W. and Belani, C. P. (2005). Skin rash and good performance status predict improved survival with gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*; 16 (5): 780-5
- Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Saijo, N., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*; 361 (10): 947-57
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D. and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*; 17 (6): 631-6
- Morgillo, F., Kim, W. Y., Kim, E. S., Ciardiello, F., Hong, W. K. and Lee, H. Y. (2007). Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res*; 13 (9): 2795-803
- Morgillo, F., Woo, J. K., Kim, E. S., Hong, W. K. and Lee, H. Y. (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res*; 66 (20): 10100-11
- Moscato, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., et al. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res*; 55 (23): 5536-9
- Motoyama, A. B., Hynes, N. E. and Lane, H. A. (2002). The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res*; 62 (11): 3151-8

Myong, N. H. (2005). Tissue microarray analysis of Fas and FasL expressions in human non-small cell lung carcinomas; with reference to the p53 and bcl-2 overexpressions. *J Korean Med Sci*; 20 (5): 770-6

N

Nabha, S. M., Glaros, S., Hong, M., Lykkesfeldt, A. E., Schiff, R., Osborne, K., *et al.* (2005). Upregulation of PKC-delta contributes to antiestrogen resistance in mammary tumor cells. *Oncogene*; 24 (19): 3166-76

Nahta, R., Yuan, L. X., Zhang, B., Kobayashi, R. and Esteva, F. J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res*; 65 (23): 11118-28

Nambu, Y., Hughes, S. J., Rehemtulla, A., Hamstra, D., Orringer, M. B. and Beer, D. G. (1998). Lack of cell surface Fas/APO-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest*; 101 (5): 1102-10

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

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

Normanno, N., Ciardiello, F., Brandt, R. and Salomon, D. S. (1994a). Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Treat Res*; 29 (1): 11-27

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

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

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

O

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

Okada, H. and Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*; 4 (8): 592-603

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

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

Orniskov, D., Nexø, E. and Sorensen, B. S. (2006). Insulin-induced proliferation of bladder cancer cells is mediated through activation of the epidermal growth factor system. *Febs J*; 273 (23): 5479-89

Overholser, J. P., Prewett, M. C., Hooper, A. T., Waksal, H. W. and Hicklin, D. J. (2000). Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer*; 89 (1): 74-82

P

Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*; 304 (5676): 1497-500

Pallis, A. G., Serfass, L., Dziadziusko, R., van Meerbeeck, J. P., Fennell, D., Lacombe, D., *et al.* (2009). Targeted therapies in the treatment of advanced/metastatic NSCLC. *Eur J Cancer*;

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

Patel, D., Bassi, R., Hooper, A., Prewett, M., Hicklin, D. J. and Kang, X. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *Int J Oncol*; 34 (1): 25-32

Peng, X. H., Karna, P., Cao, Z., Jiang, B. H., Zhou, M. and Yang, L. (2006). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1alpha signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem*; 281 (36): 25903-14

Perez-Soler, R. (2004). HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *Oncologist*; 9 (1): 58-67

Perez-Soler, R. (2006). Rash as a surrogate marker for efficacy of epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clin Lung Cancer*; 8 Suppl 1 S7-14

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

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

R

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

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

Pirker, R., Pereira, J. R., Szczesna, A., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., *et al.* (2009). Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*; 373 (9674): 1525-31

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., *et al.* (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*; 396 (6712): 699-703

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

Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*; 8 (12): 915-28

Prewett, M. C., Hooper, A. T., Bassi, R., Ellis, L. M., Waksal, H. W. and Hicklin, D. J. (2002). Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res*; 8 (5): 994-1003

Prince, H. M., Bishton, M. J. and Harrison, S. J. (2009). Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*; 15 (12): 3958-69

Puri, N. and Salgia, R. (2008). Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J Carcinog*; 7 9

Q

Qin, L., Tamasi, J., Raggatt, L., Li, X., Feyen, J. H., Lee, D. C., *et al.* (2005). Amphiregulin is a novel growth factor involved in normal bone development and in the cellular response to parathyroid hormone stimulation. *J Biol Chem*; 280 (5): 3974-81

Qin, Q., Patil, K. and Sharma, S. C. (2004). The role of Bax-inhibiting peptide in retinal ganglion cell apoptosis after optic nerve transection. *Neurosci Lett*; 372 (1-2): 17-21

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

Rapport-EMeA (Juillet 2009).

<http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/iressa/iressa.htm>. Iressa - European Public Assessment Report

Rasheed, W. K., Johnstone, R. W. and Prince, H. M. (2007). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*; 16 (5): 659-78

Rashmi, R., Kumar, S. and Karunakaran, D. (2004). Ectopic expression of Bcl-XL or Ku70 protects human colon cancer cells (SW480) against curcumin-induced apoptosis while their down-regulation potentiates it. *Carcinogenesis*; 25 (10): 1867-77

Recchia, A. G., Musti, A. M., Lanzino, M., Panno, M. L., Turano, E., Zumpano, R., *et al.* (2009). A cross-talk between the androgen receptor and the epidermal growth factor receptor leads to p38MAPK-dependent activation of mTOR and cyclinD1 expression in prostate and lung cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*; 41 (3): 603-14

Reck, M. and Crino, L. (2009). Advances in anti-VEGF and anti-EGFR therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*; 63 (1): 1-9

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

Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A., Tang, W., Yang, X., Maguire, A. M., *et al.* (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vis*; 9 210-6

Ricci, F., Pucci, S., Sesti, F., Missiroli, F., Cerulli, L. and Spagnoli, L. G. (2007). Modulation of Ku70/80, clusterin/ApoJ isoforms and Bax expression in indocyanine-green-mediated photo-oxidative cell damage. *Ophthalmic Res*; 39 (3): 164-73

Ricono, J. M., Huang, M., Barnes, L. A., Lau, S. K., Weis, S. M., Schlaepfer, D. D., *et al.* (2009). Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin alphavbeta5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis. *Cancer Res*; 69 (4): 1383-91

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

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

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

Robles, A. I., Linke, S. P. and Harris, C. C. (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*; 21 (45): 6898-907

Rodland, K. D., Bollinger, N., Ippolito, D., Opresko, L. K., Coffey, R. J., Zangar, R., *et al.* (2008). Multiple mechanisms are responsible for transactivation of the epidermal growth factor receptor in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*; 283 (46): 31477-87

Rogers, S. J., Box, C., Chambers, P., Barbachano, Y., Nutting, C. M., Rhys-Evans, P., *et al.* (2009). Determinants of response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Pathol*;

Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., *et al.* (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*; 361 (10): 958-67

Rosell, R., Robinet, G., Szczesna, A., Ramlau, R., Constenla, M., Mennecier, B. C., *et al.* (2008). Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*; 19 (2): 362-9

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

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

Rusch, V., Baselga, J., Cordon-Cardo, C., Orazem, J., Zaman, M., Hoda, S., *et al.* (1993). Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res*; 53 (10 Suppl): 2379-85

S

Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenaebelle, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*; 23 (16): 2861-74

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

Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K. and Berk, B. C. (2001). Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol*; 21 (19): 6387-94

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

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

Saltz, L. B., Lenz, H. J., Kindler, H. L., Hochster, H. S., Wadler, S., Hoff, P. M., *et al.* (2007). Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol*; 25 (29): 4557-61

Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Sr., Needle, M. N., Kopit, J. and Mayer, R. J. (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*; 22 (7): 1201-8

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

Sapountzi, V., Logan, I. R. and Robson, C. N. (2006). Cellular functions of TIP60. *Int J Biochem Cell Biol*; 38 (9): 1496-509

Sartorius, U. A. and Krammer, P. H. (2002). Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer*; 97 (5): 584-92

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

Sawada, M., Hayes, P. and Matsuyama, S. (2003). Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nat Cell Biol*; 5 (4): 352-7

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

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

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

Schrump, D. S. (2009). Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin Cancer Res*; 15 (12): 3947-57

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

Sculier, J. P. and Moro-Sibilot, D. (2009). First- and second-line therapy for advanced nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*; 33 (4): 915-30

- Sequist, L. V., Bell, D. W., Lynch, T. J. and Haber, D. A. (2007). Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25 (5): 587-95
- Shah, N. T., Kris, M. G., Pao, W., Tyson, L. B., Pizzo, B. M., Heinemann, M. H., *et al.* (2005). Practical management of patients with non-small-cell lung cancer treated with gefitinib. *J Clin Oncol*; 23 (1): 165-74
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. and Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*; 7 (3): 169-81
- Shepherd, F. A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E. H., Hirsh, V., Thongprasert, S., *et al.* (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 353 (2): 123-32
- Shields, T. W. (1993). Surgical therapy for carcinoma of the lung. *Clin Chest Med*; 14 (1): 121-47
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P. M. and Gazdar, A. F. (2003). Apoptosis and lung cancer: a review. *J Cell Biochem*; 88 (5): 885-98
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Matta, H., Sathyanarayana, U. G., Huang, C. X., Toyooka, S., *et al.* (2002a). Loss of expression of death-inducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of MYC amplification. *Oncogene*; 21 (55): 8510-4
- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Eby, M. T., Huang, C. X., Sathyanarayana, U. G., Cunningham, H. T., *et al.* (2002b). Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol Ther*; 1 (1): 65-9
- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Toyooka, K. O., Reddy, J., Miyajima, K., Suzuki, M., *et al.* (2004). Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer*; 109 (5): 786-92
- Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. and Todaro, G. J. (1988). Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85 (17): 6528
- Sibilia, M. and Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*; 269 (5221): 234-8
- Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*; 23 (48): 8017-23
- Sizemore, N., Cox, A. D., Barnard, J. A., Oldham, S. M., Reynolds, E. R., Der, C. J., *et al.* (1999). Pharmacological inhibition of Ras-transformed epithelial cell growth is linked to down-regulation of epidermal growth factor-related peptides. *Gastroenterology*; 117 (3): 567-76
- Sobrero, A. F., Maurel, J., Fehrenbacher, L., Scheithauer, W., Abubakr, Y. A., Lutz, M. P., *et al.* (2008). EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*; 26 (14): 2311-9
- Socinski, M. A. (2007). Antibodies to the epidermal growth factor receptor in non small cell lung cancer: current status of matuzumab and panitumumab. *Clin Cancer Res*; 13 (15 Pt 2): s4597-601
- Solic, N. and Davies, D. E. (1997). Differential effects of EGF and amphiregulin on adhesion molecule expression and migration of colon carcinoma cells. *Exp Cell Res*; 234 (2): 465-76
- Soria, J. C., Lee, H. Y., Lee, J. I., Wang, L., Issa, J. P., Kemp, B. L., *et al.* (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res*; 8 (5): 1178-84
- Soria, J. C., Cortes, J., Armand, J. P., Taleb, A., van Bree, L. and Lopez, E., *et al.* (2005). Phase I pharmacokinetic profile and early clinical evaluation of the PAN-HER inhibitor BMS-599626. *ASCO Meeting Abstracts*; (23): 3109
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Timens, W., Groen, H. J., Boezen, H. M. and de Jong, S. (2003). Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clin Cancer Res*; 9 (9): 3397-405
- Spiro, S. G. and Porter, J. C. (2002). Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*; 166 (9): 1166-96
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*; 267 (5203): 1445-9
- Stennicke, H. R. and Salvesen, G. S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*; 1477 (1-2): 299-306
- Sternlicht, M. D., Sunnarborg, S. W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D. C. and Werb, Z. (2005). Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*; 132 (17): 3923-33
- Stinchcombe, T. E. and Socinski, M. A. (2009). Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*; 6 (2): 233-41
- Subramanian, C., Jarzembowski, J. A., Opiari, A. W., Jr., Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2007). CREB-binding protein is a mediator of neuroblastoma cell death induced by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Neoplasia*; 9 (6): 495-503
- Subramanian, C., Opiari, A. W., Jr., Bian, X., Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2005a). Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102 (13): 4842-7
- Subramanian, C., Opiari, A. W., Jr., Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2005b). Histone deacetylase inhibition induces apoptosis in neuroblastoma. *Cell Cycle*; 4 (12): 1741-3
- Sunnarborg, S. W., Hinkle, C. L., Stevenson, M., Russell, W. E., Raska, C. S., Peschon, J. J., *et al.* (2002). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem*; 277 (15): 12838-45

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

Sutheesophon, K., Kobayashi, Y., Takatoku, M. A., Ozawa, K., Kano, Y., Ishii, H., *et al.* (2006). Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol*; 115 (1-2): 78-90

T

Taberero, J., Van Cutsem, E., Diaz-Rubio, E., Cervantes, A., Humblet, Y., Andre, T., *et al.* (2007). Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*; 25 (33): 5225-32

Tait, S. W. and Green, D. R. (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*; 27 (50): 6452-61

Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*; 24 (6): 827-39

Tao, Y., Pinzi, V., Bourhis, J. and Deutsch, E. (2007). Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*; 4 (10): 591-602

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

Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., von Pawel, J., *et al.* (2005). Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet*; 366 (9496): 1527-37

Thèse Van Den Broeck, A. (3 sept. 2009). Aspects épigénétiques des cancers broncho-pulmonaires et implication de l'histone acétyltransférase Tip60. *Mémoire de Thèse d'Université (Ph.D.)*; (Université Joseph Fourier): Grenoble

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

Thomas, S. M., Bhole, N. E., Zhang, Q., Contrucci, S. C., Wentzel, A. L., Freilino, M. L., *et al.* (2006). Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*; 66 (24): 11831-9

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

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

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

Torrington, N., Sorensen, B. S., Bosch, S. T., Klocker, H. and Nexø, E. (1998). Amphiregulin is expressed in primary cultures of prostate myofibroblasts, fibroblasts, epithelial cells, and in prostate tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis*; 1 (5): 262-267

Toyooka, S., Toyooka, K. O., Miyajima, K., Reddy, J. L., Toyota, M., Sathyanarayana, U. G., *et al.* (2003). Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin Cancer Res*; 9 (8): 3034-41

Tracy, S., Mukohara, T., Hansen, M., Meyerson, M., Johnson, B. E. and Janne, P. A. (2004). Gefitinib induces apoptosis in the EGFR858R non-small-cell lung cancer cell line H3255. *Cancer Res*; 64 (20): 7241-4

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

Tsao, D. A., Yang, M. J., Chang, H. J., Yen, L. C., Chiu, H. H., Hsueh, E. J., *et al.* (2009). A fast and convenient new technique to detect the therapeutic target, K-ras mutant, from peripheral blood in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*;

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

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., *et al.* (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo J*; 23 (8): 1889-99

U

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

V

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

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

W

Wang, X. D., Reeves, K., Luo, F. R., Xu, L. A., Lee, F., Clark, E., *et al.* (2007). Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol*; 8 (11): R255

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

Ward, W. H., Cook, P. N., Slater, A. M., Davies, D. H., Holdgate, G. A. and Green, L. R. (1994). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol*; 48 (4): 659-66

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

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

Ettinger and S. David, Eds. (2001). Thoracic Oncology. Part I-2 : The epidemiology of Lung Cancer.

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

Witta, S. E., Dziadziuszko, R., Yoshida, K., Hedman, K., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., Jr., *et al.* (2009). ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol*; 20 (4): 689-95

Witta, S. E., Gemmill, R. M., Hirsch, F. R., Coldren, C. D., Hedman, K., Ravdel, L., *et al.* (2006). Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer Res*; 66 (2): 944-50

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

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

Wu, W. G., Soria, J. C., Wang, L., Kemp, B. L. and Mao, L. (2000). TRAIL-R2 is not correlated with p53 status and is rarely mutated in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*; 20 (6B): 4525-9

X

Xin, M., Gao, F., May, W. S., Flagg, T. and Deng, X. (2007). Protein kinase Czeta abrogates the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem*; 282 (29): 21268-77

Y

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

Yamane, S., Ishida, S., Hanamoto, Y., Kumagai, K., Masuda, R., Tanaka, K., *et al.* (2008). Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. *J Inflamm (Lond)*; 5 5

Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2 (2): 127-37

Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Lindeman, N., Homes, A. J., Jackman, D. M., Zhao, F., *et al.* (2008). Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin Cancer Res*; 14 (21): 6963-73

Yoo, J. Y., Kim, J. H., Kim, J., Huang, J. H., Zhang, S. N., Kang, Y. A., *et al.* (2008). Short hairpin RNA-expressing oncolytic adenovirus-mediated inhibition of IL-8: effects on angiogenesis and tumor growth inhibition. *Gene Ther*; 15 (9): 635-51

Yosypiv, I. V., Schroeder, M. and El-Dahr, S. S. (2006). Angiotensin II type 1 receptor-EGF receptor cross-talk regulates ureteric bud branching morphogenesis. *J Am Soc Nephrol*; 17 (4): 1005-14

Z

Zembutsu, H., Ohnishi, Y., Daigo, Y., Katagiri, T., Kikuchi, T., Kakiuchi, S., *et al.* (2003). Gene-expression profiles of human tumor xenografts in nude mice treated orally with the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839. *Int J Oncol*; 23 (1): 29-39

Zhang, W., Peyton, M., Xie, Y., Soh, J., Minna, J. D., Gazdar, A. F., *et al.* (2009). Histone deacetylase inhibitor romidepsin enhances anti-tumor effect of erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. *J Thorac Oncol*; 4 (2): 161-6

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

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

Annexes

Classification histologique des tumeurs malignes du poumon

Carcinome à petites cellules

Variantes : Carcinome composite à petites cellules

Carcinome épidermoïde*

Variantes : Papillaire
À cellules claires
À petites cellules
Basaloïde

Adénocarcinome*

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

Carcinome à grandes cellules

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

Carcinome adénosquameux

Carcinomes avec éléments pléomorphes, sarcomatoïdes ou sarcomateux

Carcinomes à cellules fusiformes ou à cellules géantes
Carcinome pléomorphe
Carcinome à cellules fusiformes
Carcinome à cellules géantes
Carcinosarcome
Blastome pulmonaire

Tumeur carcinoïde

Carcinoïde typique
Carcinoïde atypique

Tumeurs des glandes bronchiques

Carcinome mucoépidermoïde
Carcinome adénoïde kystique
Autres

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

Annexe 1. Classification histologique des tumeurs malignes pulmonaires selon l'OMS

Adapté d'après Brambilla *et al.*, 2001

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

Hb=Hémoglobine, L=Leucocytes
PNN=Polynucléaires neutrophiles
P=Plaquettes, G/l=Giga/l=10⁹/l

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

EXIGENCES DE QUALITE DANS LA PRISE EN CHARGE DES CANCERS BRONCHIQUES

- Les modalités de prise en charge du patient font l'objet d'une discussion pluridisciplinaire, tenant compte de son âge, de ses co-morbidités, le stade TNM et la situation sociale. Les informations sont transmises dans les meilleurs délais au médecin traitant.
- Les différents aspects de la maladie et des traitements sont expliqués au patient et à sa famille.
- Des documents d'information sur les différents aspects de la maladie et des thérapeutiques sont disponibles et remis au patient.
- Les protocoles et schémas thérapeutiques sont écrits, disponibles, connus et régulièrement actualisés. Il existe des protocoles relatifs à la prise en charge des effets secondaires
- Le patient doit pouvoir bénéficier d'une aide à l'arrêt du tabagisme
- Le patient doit bénéficier d'une prise en charge de la douleur
- Le patient peut bénéficier de soins palliatifs par une équipe et/ou une structure spécialisée, fixe ou mobile
- Le patient et sa famille peuvent bénéficier d'une prise en charge par un psychologue
- Le patient et sa famille peuvent bénéficier d'une prise en charge par une assistante sociale
- Une recherche d'exposition professionnelle, en vue d'une éventuelle déclaration et réparation, doit être systématique.
- En cas de constatation de plusieurs cas de cancers dans la famille du patient, une consultation d'onco-génétique sera proposée
- Le patient a la possibilité de participer à des protocoles de recherche clinique

Méthodes de notation

Evidence	Bénéfice Substantiel	Bénéfice modéré	Bénéfice minime	Pas de bénéfice
Bonne	A	B	C	D
Modeste	B	B	C	D
Faible	C	C	C	D

Abréviations

- AUC : aire sous la courbe
- CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules
- cTNM : TNM clinique
- EFR : exploration fonctionnelle respiratoire
- EPO : erythropoïétine
- IRM : imagerie par résonance magnétique
- IV : Intra veineux
- J : jour
- PS : Performance Status
- pTNM : TNM pathologique
- RC : réponse complète
- RP : réponse partielle
- TDM : tomodynamométrie
- TEP : tomographie par émission de positons
- TNM : Tumor – Nodes – Metastasis

Référentiel Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules - Octobre 2008 - 2 - Réseau Régional Rhône Alpes Auvergne

REFERENTIEL REGIONAL

CANCER BRONCHIQUE NON A PETITES CELLULES

CTEURS : D ARPIN, A AUBERT, M AUBERT, A BELLIERE, M BERTOCCHI, PY BRICHON, P BRUN, B ET, O CHAPET, E DE LA ROCHE, S DIAB, L FALCHERO, E FAUCHON, P FOURNEL, P FOURNERET, N MOND, L GERINIERE, B GUIBERT, S LARIVE, I MARTEL-LAFAY, B MASTROIANNI, P MERLE, D D-SIBILOT, P MULSANT, H NAGY-MIGNOTTE, A NAMEE, M PEROL, R RIOU, PJ SOUQUET (onco-athérapeute), B TAVIOT, F TRONC, M ZOUAI

Référentiel Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules - Octobre 2008 - 1 - Réseau Régional Rhône Alpes Auvergne

Classification Union Internationale pour la Classification des Cancers 1997

Mountain CF. Revisions in the international item for staging lung cancer. Chest 1997;111:1710-1717.

T : TUMEUR PRIMAIRE

TX : Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.

T0 : Absence de tumeur identifiable

Tis : Carcinomes in situ

T1 : Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches)

T2 : Tumeur avec l'un quelconque des éléments suivants d'extension

* plus de 3 cm de plus grand diamètre

* envahissement de la plèvre viscérale quelle que soit la taille de la tumeur, envahissement d'une bronche souche et une distance supérieure à 2 cm de la carène.

* existence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive étendue à la région hilare mais ne s'étendant pas à tout le poumon.

T3 : Tumeur quelle que soit sa taille, ayant au moins l'un des caractères invasifs suivants :

* atteinte de la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet)

* atteinte du diaphragme

* atteinte de la plèvre médiastinale ou du péricarde

* tumeur dans les bronches souches à moins de 2 cm de la carène sans envahissement carénaire

* association à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive de tout le poumon

T4 : Tumeur quelles que soient ses dimensions, comportant un envahissement quelconque parmi les suivants :

* médiastin

* coeur

* gros vaisseaux

* trachée

* oesophage

* corps vertébraux

* carène

* tumeur avec épanchement pleural malin

Introduction

Le cancer bronchique non à petites cellules représente la forme histologique la plus fréquente des cancers bronchiques. Il est la première cause de décès par cancer dans la population masculine. Son incidence est estimée entre 40 et 70 pour 100 000 en France pour l'homme.

Les facteurs pronostiques défavorables connus restent toujours le stade avancé et le *Performance Status* élevé pour les patients opérés (Fry WA, The National Cancer Data Base report on lung cancer. Cancer, 1996 ; 7 : 1947-55) et pour les patients non opérés le stade élevé, le mauvais *Performance Status*, taux de LDH élevé, anémie et hyperleucocytose (Paesmans M, Prognostic factors for survival in advanced non-small cell lung cancer: uni and multivariate analysis including RECPAM in 1052 patients. J Clin Oncol, 1995 ; 13 : 1221-30).

N : GANGLIONS REGIONAUX (cf schéma)

- NX** envahissement loco-régional inconnu
- N0** : absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux
- N1** : métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe
- N2** : métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous carinaires
- N3** : métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scapulaire, sus-claviculaires homo ou contro latérales

M : METASTASES

- M0** : pas de métastase à distance
- M1** : existence de métastases à distance

Une nouvelle classification est en cours d'élaboration et devrait être appliquée fin 2009.

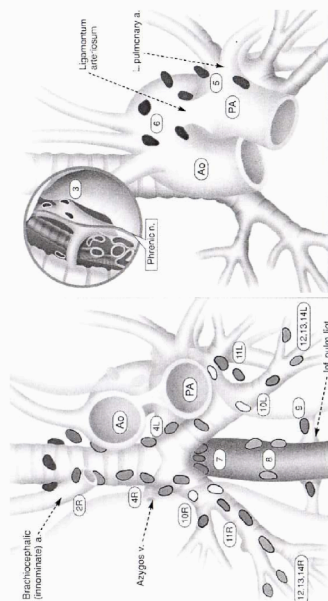
Remarques

- La classification TNM est une classification clinique.
- En post-opératoire, avec les données anatomopathologiques, les patients sont reclassés en pTNM suivant les mêmes critères que précédemment.
- NB En cas de 2 foyers néoplasiques dans le même lobe, le cancer est classé T4. En cas de foyers néoplasiques de même histologie dans 2 lobes différents, la tumeur est classée M1.

CLASSIFICATION PAR STADE

La classification par stade, permettant de regrouper les patients en stades de pronostic différent

- o **carcinome occulte** Tx N0 M0
- o **stade 0** Tis N0 M0
- o **stade I A** T1 N0 M0
- o **I B** T2 N0 M0
- o **stade II A** T1 N1 M0
- o **II B** T2 N1 M0
- o **stade III A** T3 N0 M0
- o **III B** T1, T2, T3 N2 M0
- o **stade III B** regroupe les patients N3 M0 quel que soit le T et les patients T4 M0 quel que soit le N
- o **stade IV** regroupe les patients M1 quel que soit le T et le N



2R-4R : chaîne paratrachéale droite
 5 : ganglions sous aortiques
 7 : ganglions intertrachéobronchiques
 9 : ganglions du ligament triangulaire
 12-13-14 : ganglions intralobaires

2L-4L : chaîne paratrachéale gauche
 6 : ganglions para-aortiques
 8 : ganglions latéro-oesophagiques
 10-11 : ganglions intrapulmonaires et extra lobaires

Bilan pré thérapeutique

Le bilan pré-thérapeutique doit être réalisé dans des délais les plus courts possibles et dépend évidemment des possibilités d'accès aux examens et de l'état physiologique du patient.

I. Comment évaluer l'extension anatomique médiastinale de la tumeur ?

La tomodensitométrie (TDM) est l'examen de référence et de première intention pour détecter une extension anatomique de la tumeur. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) peut être utile pour apprécier les rapports avec les vaisseaux et le coeur

La fibroscopie bronchique, examen diagnostique, est également un moyen indirect de suspecter les atteintes médiastinales (refoulement, infiltration ou bourgeonnement). La localisation anatomique de ces anomalies oriente la suite des examens.

L'écho-endoscopie est un examen particulièrement performant pour dépister l'extension à la paroi oesophagienne et à l'aorte. Elle permet aussi de réaliser des ponctions de masses tumorales

2. Comment évaluer l'extension pariétale ? Quelle est la place de la thoracoscopie ?

La radiographie conventionnelle permet de voir les lésions évidentes (lyse costale, atteinte pleurale majeure). La TDM affine le diagnostic d'extension pleuro-pariétale : s'il existe une lyse costale, l'atteinte pariétale est certaine. A l'opposé, si la lésion est à distance de la paroi, on peut conclure à l'intégrité de la plèvre. Si un liséré graisseux extrapleurale est visible entre la tumeur et la paroi, l'extension pariétale peut être écartée.

suite

4. Comment évaluer l'extension métastatique ?

La recherche de tous les sites métastatiques n'est pas forcément nécessaire chez le sujet avec déjà un ou plusieurs sites métastatiques.

La recherche de la preuve histologique d'une lésion métastatique n'est justifiée que si celle-ci est unique et si cela peut modifier la stratégie thérapeutique.

La radiographie thoracique, l'endoscopie et le scanner thoracique effectués dans le cadre de bilan focorégional permettent la recherche d'une éventuelle extension métastatique pulmonaire homo ou controlatérale. Seul un nodule isolé controlatéral non accessible à l'endoscopie peut justifier une démarche complémentaire (ponction trans-thoracique guidée par TDM, et/ou TEP)

Le scanner thoracique initial doit comporter une exploration des surrénales. L'exploration abdominale fait appel à un scanner abdominal et/ou une échographie abdominale.

La scintigraphie osseuse n'est réalisée qu'en cas de suspicion clinique de métastases osseuses. Il faut néanmoins souligner que seule la présence d'une lyse osseuse visualisée par les radiographies dirigées et/ou la TDM et/ou l'IRM affirmera avec une bonne fiabilité, l'extension osseuse. Les zones fixantes doivent être explorées par des examens radiologiques appropriés

La recherche de métastases cérébrales est recommandée en cas de signes cliniques neurologiques. L'examen de référence est l'IRM (TDM en cas de délai excessif).

La TEP a un intérêt pour dépister les extensions métastatiques intra-abdominales, intrathoraciques, et osseuses (elle peut remplacer la scintigraphie osseuse). Elle ne permet pas, par contre, d'explorer le cerveau.

5. Place de marqueurs tumoraux dans le bilan d'extension (Utilisation des marqueurs tumoraux sériques, dans le cancer bronchique primitif. Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française. Rev. Mal. Resp., 1997, 14, Suppl.3, 3SS-3S39).

Dans l'état actuel des connaissances, compte tenu des faibles sensibilités et spécificités des marqueurs sériques utilisables dans les CBNPC, ils ne peuvent influencer ni le bilan d'extension ni la décision thérapeutique initiale.

Ils n'ont aucune utilité en dehors d'essais cliniques prospectifs (RMO - Niveau de preuve B).

6. Les données cliniques et biologiques non spécifiques influencent-elles le bilan d'extension ?

Le traitement chirurgical doit être d'emblée abandonné sur certains arguments cliniques : en cas d'affection associée contre-indiquant définitivement une excision ou une anesthésie générale, en cas de cancer manifestement disséminé (métastases ganglionnaires superficielles, cutanées...), en cas de patients physiologiquement très âgés. L'âge n'est pas à lui seul une contre-indication à une thérapeutique curative. Dans ces éventualités, on s'attachera à réaliser uniquement des investigations qui permettent d'adapter la thérapeutique palliative.

En cas de doute sur l'extension pariétale à l'examen TDM, pouvant influencer l'indication chirurgicale, l'IRM précise : l'atteinte de la gouttière costo-vertébrale, des trous de conjugaison, et de l'espace périural. L'extension vertébrale, vasculaire et nerveuse des tumeurs de l'apex, l'extension diaphragmatique.

En cas d'épanchement pleural visible à la radiographie ou au scanner, la ponction pleurale pour examen cytologique est recommandée. Si l'épanchement est minime, l'échographie en facilite le repérage. En cas de négativité de la cytologie, une thoracoscopie est recommandée lorsqu'il n'existe pas d'autre contre-indication à l'excision, afin de préciser le caractère néoplasique ou non de l'épanchement.

3. Comment évaluer l'extension ganglionnaire intrathoracique ?

Dès la fibroscopie, on peut suspecter la présence d'adénopathies comprimant les voies aériennes. Des ponctions per-endoscopiques trans-bronchiques à l'aiguille de Wang peuvent être réalisées.

L'examen tomodensitométrique s'attache à décrire les ganglions anormaux (adénopathies) par leur taille, leur nombre, et leur topographie. Le caractère anormal de ces adénopathies ne préjuge pas de leur nature néoplasique. Toutefois, il a été démontré que plus la taille est grande, plus l'envahissement néoplasique est fréquent (de l'ordre de 30 % pour les adénopathies entre 1 et 2 cm, et de plus de 70 % au-delà de 2 cm). Dans cette indication, l'IRM n'est pas supérieure à la TDM, et le couplage de ces deux méthodes de donne pas d'information supplémentaire.

L'échographie endo-oesophagienne permet l'exploration et la ponction éventuelle d'adénopathies sous carénaires (7) para oesophagiques (8,9) ou dans la fenêtre aortopulmonaire (5) (B).
L'échographie endo-bronchique permet l'exploration et la ponction des adénopathies 2,3,4,7,10,11 (B)

La tomographie par émission de positons (TEP) a une plus grande spécificité et sensibilité que le scanner pour dépister les extensions ganglionnaires, même s'il existe des faux positifs et négatifs.

Une TEP devrait être réalisée chez les patients potentiellement opérables, si l'examen ne rallonge pas le délai de prise en charge.

Une TEP devrait être réalisée pour les patients relevant d'une radiothérapie curative, sans allonger le délai de prise en charge.

L'extension ganglionnaire dépisée à la TEP, doit néanmoins être confirmée, si cela est réalisable, par une médiastinoscopie ou une échographie avec ponction trans-bronchique.

La médiastinoscopie est un acte chirurgical à faible morbidité (entre 0,5 et 1 % selon les séries publiées) ; elle permet d'explorer la face latérale droite et antérieure de la trachée, et la face latérale gauche, la carène, l'axe de la bronche souche droite (2, 4 R et 4 L, 7, 10 R)

La médiastinoscopie n'est pas indispensable en l'absence d'atteinte ganglionnaire en TDM et/ou TEP.

Une thoracoscopie gauche est possible pour explorer les chaînes ganglionnaires 5 et 6

TRAITEMENT**1. Stade I et II clinique (bilan pré-thérapeutique), patient opérable****1.1. L'artitude thérapeutique :**

- La chirurgie d'exérèse complète large (lobectomie minimum), comportant un curage ganglionnaire complet (A)
- Le curage ganglionnaire minimal recommandé est le suivant :
Pour l'exérèse lobe supérieur droit ou lobe moyen = 2,4,7,8,10,11 et intra-pulmonaire
Pour l'exérèse des lobes inférieurs droits et gauches = 4,7,8,9,10,11 et intra-pulmonaire
Pour l'exérèse du lobe supérieur gauche = 5,6,7,8,10,11 et intra-pulmonaire

Si atteinte 7 ou 4L, indication de curage du médiastin supérieur (2&3)

- La suite du traitement dépend des résultats anatomopathologiques.

Il est recommandé

- que l'acte chirurgical soit réalisé par un chirurgien spécialiste expérimenté (A)
- dans une structure hospitalière pouvant assumer des suites post-opératoires compliquées (Silverstein GA. Specialists achieve better outcomes than generalists for lung cancer surgery. Chest 1998 ; 114 : 675-80).
- La chirurgie du cancer bronchique doit viser les valeurs de référence suivantes :
Mortalité opératoire : 5 à 10 % pour la pneumectomie, 2 à 4 % pour la lobectomie

1.1.1. Exérèse incomplète

Il y a une indication d'une association chimio-radiothérapie comme pour un cancer localement avancé (cf chapitre) ou d'une radiothérapie isolée (résidu microscopique)(B).

1.1.2. Tranche de section envahie (R1)

Un traitement complémentaire est licite, à discuter en concertation multidisciplinaire : soit la chirurgie si elle est possible, soit la radiothérapie (B), suivant l'état clinique et fonctionnel du patient.

S'il s'agit que d'un simple carcinome in situ aux alentours de la tranche de section ou si l'exérèse est limitée (< 1 cm de la tumeur), une simple surveillance est logique (C).

1.1.3. pN0-N1-N2 :

- Il n'y a pas d'indication de radiothérapie post opératoire pour les pN0-I (A) ; (Port Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in NSCLC: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. Lancet. 1999; 352: 257-63).
- Option : la radiothérapie post opératoire peut diminuer le risque de rechute locale pour les stades III A N2 sans démonstration actuelle d'une amélioration de la survie (C).
- La chimiothérapie post opératoire systématique chez tous les patients en état physique et physiologique de la recevoir est indiquée pour les stades II et III (A)

La recherche complète de métastase(s) est impérative en cas de symptômes cliniques : altération sévère de l'état général avec un PS supérieur à 2 ; perte de poids supérieure à 10 % du poids habituel ; douleurs osseuses, adénomégalies, signes neurologiques ...

Des anomalies biologiques imposent la même attitude : hyperleucocytose, hypocalcémie, viscosité de sédimentation très élevée, hypercalcémie, phosphatases alcalines et LDH fortement élevées ...

Recommandations

- 1) En cas de cancer bronchique avéré ou suspecté un scanner thoracique doit être réalisé (A)
- 2) En cas d'adénomégalies médiastinales au scanner (> 1 cm petit axe), des explorations complémentaires sont utiles (B)
- 3) Pour les patients opérables avec tumeur résecable, une TEP est recommandée (B)
- 4) Pour les patients relevant d'une radiothérapie curative une TEP est recommandée (B)
- 5) En cas de fixation ganglionnaire médiastinale à la TEP, une confirmation histocytologique est recommandée (B)
- 6) Une IRM thoracique n'est justifiée que pour préciser une atteinte vasculaire ou pariétale suspectée au scanner (B)
- 7) En cas de suspicion de maladie oligométastatique il est recommandé d'obtenir une preuve histo-cytologique. Le dossier devra être systématiquement présenté en RCP. (B)
- 8) La médiastinoscopie est la méthode de choix pour explorer les chaînes ganglionnaires, en cas d'adénomégalies au scanner thoracique et/ou fixant à la TEP et en l'absence de diffusion métastatique (B). Une ponction transbronchique et/ou oesophagienne sous echo endoscopie est une alternative à la médiastinoscopie .
- 9) Les marqueurs tumoraux sanguins ne sont d'aucune utilité pour le diagnostic, suivi et pronostic des cancers bronchiques (B)

Evaluation cardio respiratoire

- 10) Les patients devant être opérés d'un cancer bronchique doivent bénéficier d'une évaluation cardiovasculaire clinique au minimum et si besoin para-clinique (B)
- 11) En cas de pathologie artérielle non contrôlée (coronopathie, artériopathie des membres inférieurs ou carotidiennes, une technique de revascularisation ou stent peut précéder l'intervention thoracique
- 12) Une évaluation fonctionnelle respiratoire complète doit être réalisée (A) avant une chirurgie ou une radiothérapie à visée curative
- 13) L'évaluation du VEMS post opératoire doit être faite en fonction de l'exérèse envisagée, et éventuellement de la scintigraphie pulmonaire de ventilation et perfusion
- 14) Les patients avec une V0 2 max < 15 ml/kg/min (pre-opératoire) et/ou VEMS et DLCO < 40 % théorique en post opératoire, ou Sa O2 < 90 % doivent être considérés comme à haut risque opératoire (C)
- 15) Néanmoins, si le cancer atteint un lobe non fonctionnel, une chirurgie peut être licite, malgré les constantes fonctionnelles (C).

suite

3. Formes localement avancées (stades III A et III B)

L'attitude thérapeutique dépend de la possibilité d'une résection complète de la tumeur. Les stades III B (T4 ou N3) sont jugés inopérables sauf quelques cas particuliers (cf. infra). Les limites de la résectabilité concernent les stades III A, en fonction de l'envahissement ganglionnaire homolatéral (N2). En effet, si les adénopathies circonscrites de petit volume à droite, para-trachéales basses ou inter-trachéo-bronchiques, à gauche sous aortiques, para aortiques ou intertrachéo-bronchiques, peuvent être résectées en totalité, les adénopathies para-trachéales hautes volumineuses avec rupture capsulaire, témoignant d'un envahissement médiastinal "en bloc", constituent une contre-indication opératoire. La réalisation d'une médiastinoscopie dans les cas difficiles permet de mieux juger de l'opérabilité. Il est démontré qu'un envahissement microscopique est de moins mauvais pronostic qu'un envahissement massif et qu'une atteinte d'un seul relais ganglionnaire est moins péjorative qu'une atteinte de plusieurs niveaux (Riquet M. Factors determining survival in resected N2 lung cancer. Eur J Cardio-thorac Surg; 1995; 9:300-4) (A).

Tous les dossiers doivent être discutés en RCP pour déterminer la stratégie optimale (séquence traitement chimiothérapique et traitement local)

3.1. Stades III A (T1- T2 -T3 N2 M0) résectables chez des patients médicalement opérables

3.1.1 Deux attitudes peuvent être proposées :

* chirurgie d'exérèse avec un curage ganglionnaire médiastinal complet, précédée de 2 à 4 cycles de chimiothérapie à base de Cisplatine, si l'état général du patient le permet et en l'absence de contre indication. Un doublet contenant du Carboplatine est recommandé en cas de contre indication au Cisplatine (B).

* chirurgie première avec chimiothérapie post opératoire (association Cisplatine Navelbine, 4 cycles)
Les dossiers doivent être discutés en RCP.

3.1.2. En cas d'exérèse incomplète une radiothérapie post opératoire est réalisée (C)

3.1.3 Option : la radiothérapie post opératoire peut diminuer le risque de rechute locale pour les stades III A N2 sans démonstration actuelle d'une amélioration de la survie (C).

3.1.4. La chimio-radiothérapie pré opératoire ne doit être réalisée que dans le cadre d'essais thérapeutiques.

3.1.5. Pour les IIIA N2 marginalement résectables, l'indication opératoire devra être discutée en cas d'absence de réponse à la chimiothérapie, d'autant plus si le geste chirurgical envisagé est une pneumonectomie (B).

L'utilisation d'un protocole contenant du Cisplatine et de la Vinorelbine est recommandée (A) suivant un schéma 21 jours, 4 cycles.

- o Cisplatine 80 mg/m² J1, Vinorelbine 30 mg/m² J1 et 8 tous les 21 jours

La chimiothérapie doit être débutée dans les 4 à 8 semaines suivant l'acte chirurgical. En cas de contre indication au cisplatine (âge>75 ans, PS, comorbidités...), l'efficacité d'une chimiothérapie n'a pas été démontrée.

Option : En cas de contre indication au Cisplatine, une chimiothérapie à base de Carboplatine pourra être réalisée dans des cas particuliers après avis d'une RCP.

En cas d'effets secondaires graves constatés à la Vinorelbine, l'utilisation d'une drogue de troisième génération associée au cisplatine est possible et doit être discutée en RCP.

En cas de décision de radiothérapie, elle sera réalisée après la fin de la chimiothérapie.

Pour les stades p IA, la chimiothérapie post opératoire n'est pas recommandée en dehors d'essai thérapeutique (C). Pour les stades p IB, il n'y a pas d'argument actuel pour recommander de façon systématique une chimiothérapie post opératoire. Dans certains cas pour lesquels le risque de rechute estimé est important, l'indication doit être discutée en RCP.

1.2 Divers

- Dans le cas de patient ayant une EFR " limitée", âgé ou fragile, il est licite de n'effectuer qu'un geste limité (wedge resection ou résection non réglée) même si la fréquence des résidues locaux est plus importante et doit être discuté en réunion de concertation multidisciplinaire.
- En cas de tumeur de petite taille (moins de 2 cm), une exérèse limitée par segmentectomie avec curage peut être discutée (C).
- En cas de T3 par atteinte pariétale, si l'exérèse a été complète, il n'y a pas de nécessité de réaliser une radiothérapie post opératoire (C).

2. Stades I et II cliniques inopérables du fait d'une exploration fonctionnelle respiratoire médiocre ou médicalement inopérable.

Si l'état général du patient le permet, une radiothérapie à visée "curative" est proposée (B). En fonction de l'accessibilité du plateau technique : radiothérapie stéréotaxique (stade I avec tumeur inférieure ou égale à 4 cm) ou radiothérapie de conformation « 3 dimensions » (66 à 74 Gy) avec collimateur multifilament et vérification du positionnement, ciblée sur le volume tumoral après avoir éliminé une atteinte médiastinale par une TEP.

Options : Chimiothérapie : associée à la radiothérapie (séquentielle ou concomitante)
Ablation thermique pour les tumeurs de moins de 3 cm

3.2. Stades III A non résecables et III B ou patients non médicalement opérables

3.2.1. Il y a lieu de réaliser une association de chimiothérapie et de radiothérapie si l'état du patient le permet. La chimiothérapie doit comporter 2 à 4 cures à base de sels de platine, associée à une radiothérapie à une dose au moins égale à 66 à 70 Gy en étalé classique. (A) Les critères de qualité de la radiothérapie sont disponibles à l'adresse internet suivante <http://concoranet.lyon.fnclcc.fr/radiotherapie/>

3.2.2. La radiothérapie en split course ne se conçoit que pour des patients en mauvais état général ou avec une espérance de vie courte (C)

3.2.3. L'association chimio-radiothérapie concomitante est recommandée chez les patients avec PS 0 ou 1, sans comorbidité, de moins de 70 ans (entre 70 et 75 ans, peut être discutée) compte tenu de ses meilleurs résultats (A). Une technique de radiothérapie de conformation est indispensable avec évaluation précise des volumes pulmonaires irradiés. La chimiothérapie doit être à base de Cisplatine (à dose cytotoxique), mais sans gemcitabine (sauf essai).

3.2.4 L'association chimiothérapie-radiothérapie séquentielle est préconisée chez les patients PS>1 et/ou âgés et/ou fragiles (B)

3.2.5 La radiosensibilisation par sel de platine (cisplatine ou carboplatine) ou autre drogue, hebdomadaire, à très faible dose, dans le but unique de radiosensibilisation sans action systémique, ne doit être réalisée que dans le cadre d'essais cliniques (C).

3.3. Stade III B : cas particulier des T4

T4 épine et T4 trachée, N0 ou 1, : chirurgie ou radiothérapie exclusive possible, de même que pour des cas sélectionnés avec atteinte, veine cave supérieure, oreillette gauche, corps vertébral. Ces cas doivent être discutés dans le cadre des RCP.

3.4. Cas particulier de tumeurs de l'apex (syndrome de PANCOAST-TOBIAS « pur » ou « assimilés »).

Il est recommandé de réaliser une association de chimiothérapie et de radiothérapie jusqu'à 45 Gray, puis une réévaluation en vue d'une chirurgie et/ou poursuite de la radiothérapie jusqu'à une dose de 65 à 70 Gy (B). Chez les patients fragiles, une association radio-chimiothérapie est réalisée (C), voire une radiothérapie seule en « split course » pour les patients douloureux en mauvais état général

En cas de N2 prouvé (médiastinoscopie ou ponction) les patients ne tirent aucun bénéfice d'un acte chirurgical.

Option : Association radiothérapie préopératoire et chirurgie – chimiothérapie post opératoire

4.1 Résultats

La chimiothérapie palliative permet : d'augmenter la durée de vie (A) et d'augmenter la qualité de vie (A). La chimiothérapie est à base de sels de platine pour les patients PS 0 ou 1 (A), et adaptée pour les PS 2 (B) et chez les patients âgés de plus de 75 ans (B)

4.2. Les protocoles de chimiothérapie de première ligne

▪ Pour les patients PS 0 ou 1

Aucun protocole n'a démontré une supériorité par rapport à un autre (B). Une bi-thérapie associant un sel de platine avec une « nouvelle » drogue est plus efficace qu'une monothérapie (B), et aussi efficace et moins toxique qu'une trithérapie (B). Ainsi sont recommandés au sein du réseau les protocoles suivants

- ✓ **CISPLATINE-VINORELBINE**
- CISPLATINE 80 mg/m2 J1-22
- VINORELBINE 30 mg/m2 J1 et 8 dans le schéma 21 jours
- ✓ **CISPLATINE-GEMCITABINE**
- CISPLATINE 80 mg/m2 J1-22
- GEMCITABINE 1250 mg/m2 J1, J 8 tous les 21 jours
- ✓ **CARBOPLATINE-TAXOL**
- CARBOPLATINE AUC 6 J1-22 (Calvert)
- PACLITAXEL 200 mg/m2 en 3 heures.
- ✓ **CISPLATINE-DOCETAXEL**
- CISPLATINE 75 mg/m2 J1
- DOCETAXEL 75 mg/m2 J1 tous les 21 jours
- ✓ **CISPLATINE-PEMETREXED**
- CISPLATINE 75 mg/m2 J1
- PEMETREXED 500 mg/m2 J1 tous les 21 jours (sous convert d'acide folique et vitamine B12) uniquement pour les cancers bronchiques non à petites cellules non épidermoïdes

- **Recommandations** : l'adjonction de Bevacizumab à la chimiothérapie, à la dose de 15 mg/kg toutes les trois semaines, puis poursuivi en monothérapie jusqu'à progression ou toxicité a démontré **pour les carcinomes non épidermoïdes** un bénéfice en terme de survie en association avec une chimiothérapie de type carboplatine-paclitaxel et de survie sans progression aux doses de 7,5 ou 15 mg/kg avec une chimiothérapie de type carboplatine-paclitaxel et cisplatine-gemcitabine. L'AMM préconise son administration à la dose de 7,5 ou 15 mg/kg en association avec une chimiothérapie à base de sel de platine ; les précautions d'emploi et la sélection des patients candidats à recevoir du bevacizumab doivent tenir compte des recommandations de l'AMM. Les doses recommandées sont 7,5 mg/kg avec le cisplatine, et 15 mg/kg avec le Carboplatine Taxol.

▪ Pour les patients PS 2 (ou contre indication au cisplatine, patient fragile) :

suite

- ERLOTINIB 150 mg/j (B)
- PEMETREXED (uniquement pour les cancers bronchiques non épidermoïdes)
- DOCETAXEL

4.4 Traitement de ligne ultérieure

Chez des patients sélectionnés, la reprise de la chimiothérapie doit se discuter en RCP (C).

4.5. Questions diverses

4.5.1 Quand évaluer la réponse ?

La réponse est évaluée après 2 ou 3 cures (B).

4.5.2 Comment évaluer la réponse ?

Elle s'effectue par tomodynamométrie (C) et éventuellement une fibroscopie bronchique.

4.5.3 Durée optimale de la chimiothérapie de première ligne dans les stades IV ?

On réalise 4 à 6 cures (B), moindre si progression ou intolérance.

L'intérêt d'une chimiothérapie de maintenance n'est pas démontré en dehors du Bevacizumab qui doit être poursuivi jusqu'à progression ou toxicité.

4.5.4. Métastase unique de cancer bronchique

- En cas de métastase cérébrale unique, résécable, et de cancer bronchique résécable, on peut proposer une intervention neurochirurgicale première (C) avec irradiation pancérébrale en postopératoire. Une radiothérapie stéréotaxique pourra aussi être réalisée dans des conditions précises (1 à 2 lésions, moins de 3 cm au total). Une irradiation pan-encéphalique sera aussi réalisée.
- Les traitements associés sont à discuter en réunion de concertation multidisciplinaire : chirurgie pulmonaire ?, irradiation thoracique ?, chimiothérapie complémentaire ? En cas de contre indication chirurgicale et de radiothérapie stéréotaxique, une radiothérapie cérébrale totale, sera pratiquée.
- Pour les autres sites métastatiques (foie, surrénale), aucune attitude consensuelle n'existe, la discussion se fait au cas par cas en réunion de concertation multidisciplinaire.

4.5.5. Métastases cérébrales multiples

- ✓ CARBOPLATINE- PACLITAXEL (A)
 - CARBOPLATINE AUC 6 J1+22 (Calvert)
 - PACLITAXEL 200 à 225 mg/m² en 3 heures.
- ✓ CARBOPLATINE- GEMCITABINE (B)
 - CARBOPLATINE AUC 5 J1
 - GEMCITABINE 1000 mg/m² J1 et 8 tous les 21 jours
- ✓ TAXOTERE-GEMCITABINE (B)
 - DOCETAXEL 75 mg/m² J8
 - GEMCITABINE 1000 mg/m² J1 et 8 tous les 21 jours
- ✓ CARBOPLATINE-PEMETREXED (B) pour les tumeurs non épidermoïdes
 - CARBOPLATINE AUC 5 (Calvert) J1
 - PEMETREXED 500 mg/m² J1 tous les 21 jours

Option : monothérapie (Gemcitabine – Vinorelbine),....

▪ Sujet âgé de plus de 70 ou 75 ans et/ou comorbidité :

Une monothérapie (B) ou une chimiothérapie sans cisplatine (C) est licite.

- ✓ GEMCITABINE 1000 à 1250 mg/m² J1, 8 tous les 21 jours
- ✓ VINOURELBINE 30 mg/m² J1 et 8 tous les 21 jours
- ✓ VINOURELBINE per os 60 à 80 mg/m² hebdomadaire
- ✓ CARBOPLATINE –PACLITAXEL
- ✓ DOCETAXEL 60 mg/m² tous les 21 jours
- ✓ CARBOPLATINE- GEMCITABINE
- ✓ CARBOPLATINE – PEMETREXED pour les tumeurs non épidermoïdes

4.2 Chimiothérapie de seconde ligne.

Chez les patients en bon état général et demandeurs, qu'ils aient répondu ou non à une première ligne métastatique, il est recommandé de réaliser une chimiothérapie de seconde ligne

- ✓ DOCETAXEL 75 mg/m² J1 tous les 21 jours (A)
- ✓ PEMETREXED 500 mg/m² J1 tous les 21 jours sous couvert d'acide folique et de vitamine B12 (A) , uniquement pour les cancers bronchiques non épidermoïdes
- ✓ ERLOTINIB 150 mg/j

4.3 Traitement de troisième ligne

- L'acte chirurgical est suivant les cas une lobectomie ou une résection limitée (*wedge resection*) (A)

CANCER BRONCHIOLO-ALVEOLAIRE

A coté de la forme « pure » sans atteinte ganglionnaire, métastatique ou pleurale, (véritable cancer *in situ* des alvéoles), il existe de nombreuses formes frontalières mixte avec des aspects de cancer broncholo-alvéolaires, au sein d'un adénocarcinome, à traiter comme les adénocarcinomes.

Le traitement sera chirurgical si la lésion est « nodulaire » unique (A) ou intralobaire (sans dépasser une lobectomie). Eventuellement une greffe bi pulmonaire dans certains cas privilégiés peut être discutée. Une chimiothérapie est utilisée en cas d'atteinte pluri focale (B). Les protocoles à utiliser sont des doubles à base de Paclitaxel et de Pemetrexed.

En seconde ligne, l'utilisation de l'erlotinib constitue une option de choix pour les formes non mucineuses.

DEPISTAGE

En dehors d'essai clinique et d'amécédent de cancer, un dépistage systématique chez un patient sans signes fonctionnels respiratoire, même fumeur, par radiographie ou scanner, ou cytologie de crachat n'est pas utile (D)

CHIMIOPREVENTION

Il est recommandé de ne pas prescrire des agents de chimio-prévention tant dans les groupes à risque (fumeur, exposition professionnelle) que chez des patients traités pour cancer du poumon ou autre cancer ORL (D). La seule prévention efficace est l'arrêt du tabac qui diminue le risque de deuxième cancer et diminue la morbidité post opératoire (B).

SOINS PALLIATIFS

A coté des traitements chirurgicaux, radiothérapiques, chimiothérapiques et biologiques, une grande part de la thérapeutique est directement fonction des symptômes ressentis par le patient :

- thérapeutiques médicamenteuses : corticoïdes, antalgiques et notamment morphiniques,
- radiothérapie osseuse, cérébrale,
- chirurgie des métastases
- traitements mécaniques : désobstruction bronchique, laser, cryothérapie,thermo coagulation, photochimiothérapie, mise en place de prothèses, curiethérapie endobronchique, chirurgie de décompression
- prise en charge psychologique et sociale du patient et de sa famille

Facteurs de Croissance Hématopoïétique

Leur utilisation systématique n'est pas recommandée(C).

La chimiothérapie a montré une efficacité comparable à la radiothérapie dans les métastases cérébrales multiples (que la tumeur primitive soit contrôlée ou non) et la même efficacité que dans les autres organes (B). Il est démontré que la chronologie de la radiothérapie cérébrale n'est pas importante par rapport à la chimiothérapie (B). La chronologie des modalités est discutée au cas par cas.

5. DIVERS

5.1. Cancers métachroniques ou synchrones

Ce ne sont pas des contre-indications opératoires formelles (C) .

5.2. Cancer bronchique sur poumon unique

Dans des cas rigoureusement sélectionnés, une exérèse chirurgicale économe peut être réalisée (C) (Massard G, Surgical management for bronchogenic cancer occurring after pneumonectomy, J Thorac Cardiovasc Surg. 1995;109:597-600)

6. CANCER RADIO OCCULTE

- En cas de cancer *in situ* il convient de réaliser une évaluation endoscopique bronchique complète compte tenu de la fréquence de la cancérogénèse multifocale (si possible auto-fluorescence). Un traitement conservateur local endobronchique est préconisé compte tenu de la fréquence des seconds cancers (Speiser BL, Strategies for treatment of occult carcinomas of the endobronchus. Chest 1997;111(5):1158-61) (C, B) ; Photochimiothérapie ou cryothérapie en 1^o intention , curiethérapie endobronchique si échec..... avec une surveillance ultérieure attentive. Option : Thermocoagulation
- Un cancer microinvasif, est traité soit chirurgicalement, soit par un traitement conservateur (curiethérapie) suivant l'état fonctionnel et général du patient

CONDUITE A TENIR DEVANT UN NODULE PULMONAIRE PERIPHERIQUE

Recommandations

- devant un nodule périphérique, des radiographies anciennes doivent être recherchées pour évaluer l'ancienneté du nodule(C)
- Un nodule inchangé depuis au moins 3 ans ne nécessite plus de surveillance particulière (C)
- Un scanner thoracique est nécessaire devant tout nodule périphérique (B)
- Pour les ditzels (nodules de moins de 5 mm) : scanner thoracique à 1 an et arrêt si non évolution
- Pour les nodules entre 5 et 8 mm, scanner à 3,6 ou 12 mois suivant les facteurs du risque du patient
- Pour les nodules de plus de 8 mm de diamètre, une TEP est nécessaire (B)
- En cas de taille > 2 cm, d'évolutivité incertaine, ou de TEP fixant, une intervention chirurgicale est logique (A)
- Une ponction transpariétale n'est réalisée que si contre indication chirurgicale ou refus de la chirurgie par le patient. (C)
- En cas de négativité de fixation de la TEP une surveillance scannographique est nécessaire (3 mois, 6 mois, 12 mois, 18 mois, 24 mois, 36 mois) (C)

Elle est possible en situation préopératoire ou post opératoire dans les stades I à III A, ainsi que chez des patients particulièrement fragiles (plusieurs lignes de chimiothérapie, radiothérapie antérieure) (C)

Erythropoïétine

Son utilisation, chez les patients traités par chimiothérapie, est utile pour améliorer la qualité de vie des patients dès la chute du taux d'hémoglobine à moins de 10 g (B). Il est démontré que l'objectif à atteindre est de conserver un taux d'hémoglobine autour de 11 à 12 g/dl, taux ou la qualité de vie du patient est optimale. Au delà du taux, de 12 g/dl le traitement par Erythropoïétine sera interrompu puis repris éventuellement en cas de nouvelle baisse du chiffre de l'hémoglobine. L'érythropoïétine recombinante ne doit pas être utilisée en dehors de son association à la chimiothérapie.

Traitement anti émétique

MASCC (Multinational Association of Supportive Care in Cancer Perugia 2004) Niveau B

Risque émétique	Chimiothérapie IV	Chimiothérapie per os
Fort	Cisplatine	
Modéré	Carboplatine, dexaméthasone	Ifosfamide, Vinorelbine, VP 16
Faible	Gemcitabine, Docetaxel, Paclitaxel, Topotécan	Pemetrexed, VP 16, Vinorelbine
Minime	Vinorelbine	

Risque Fort

Prévention nausées et vomissements aigus : sétrons (0,15 mg/kg/8 h Ondansetron, 1 à 3 mg Granisetron), aprepitant 125 mg/ po et dexaméthasone 20 mg IV

Nausées retardées : dexaméthasone 8 mg po x 2, 3 à 4 jours et aprepitant 80 mg/j 2 jours

Risque moyen

Aigu : sétron (8 mg Ondansetron, 1 mg Granisetron) et dexaméthasone 8 mg IV
Retardé : dexaméthasone 4 mgx 2, 3 à 4 jours, option : sétron

Risque faible

dexaméthasone 4 mg IV

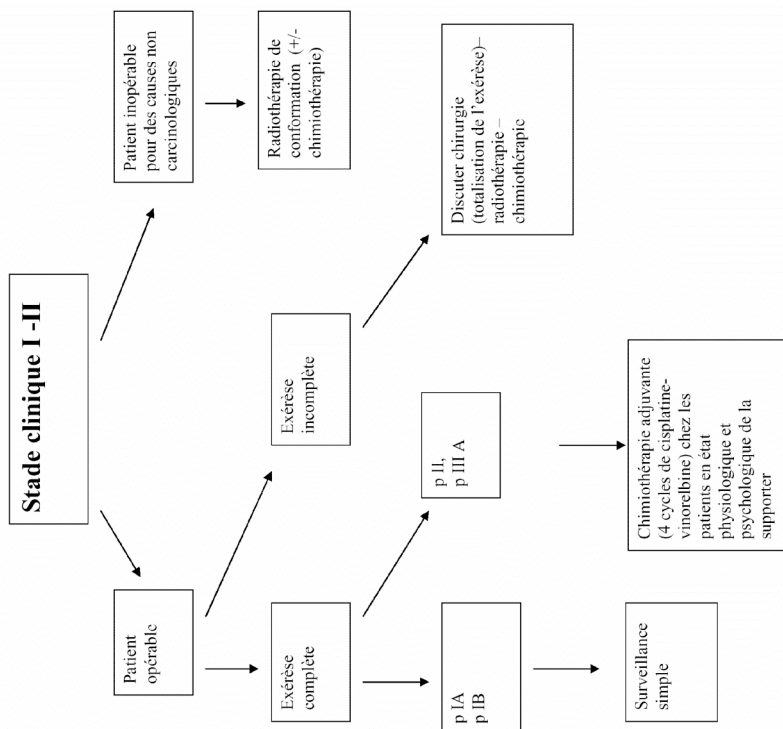
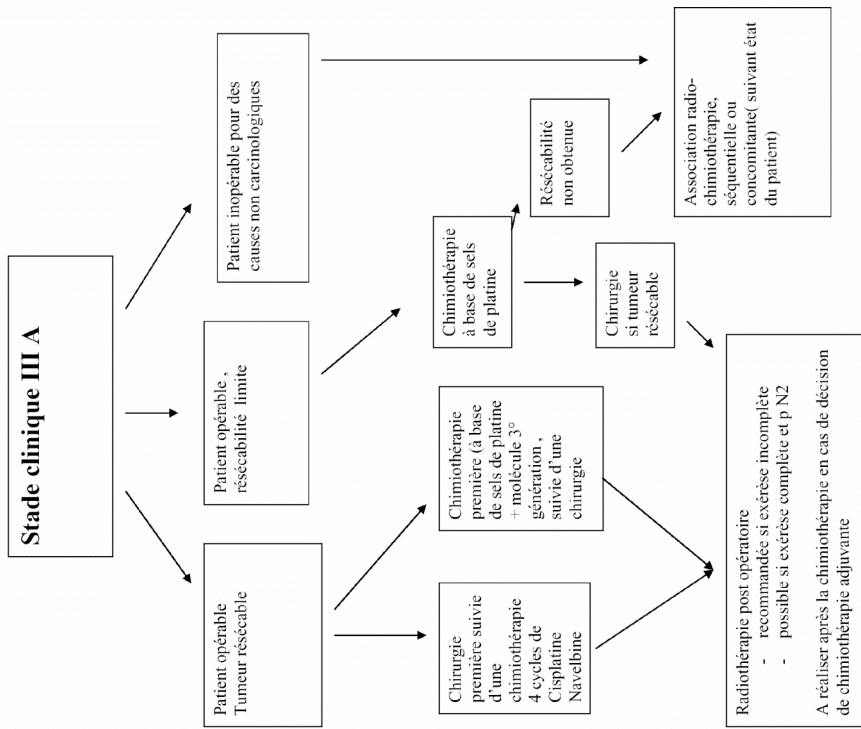
Le meilleur traitement des nausées anticipées et la prévention des troubles digestifs des cures précédentes !!!

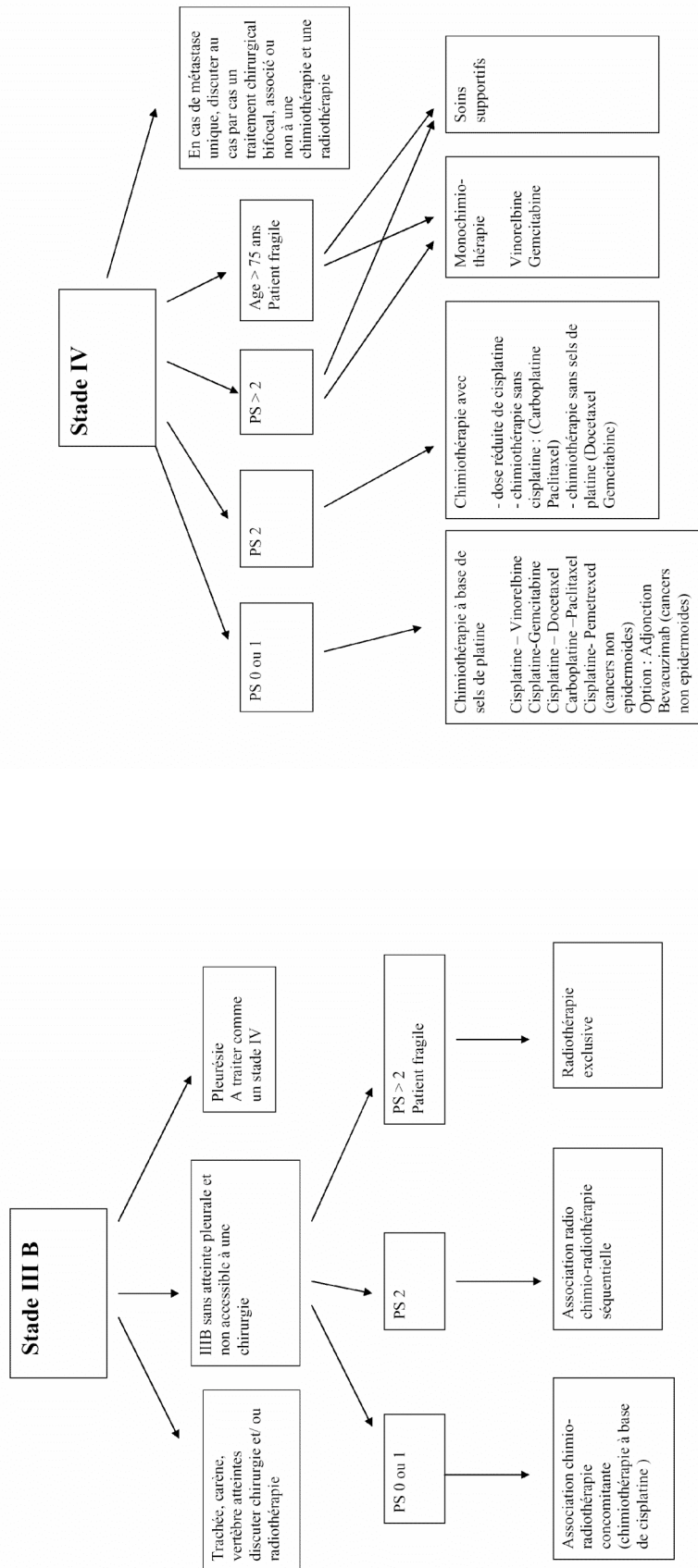
SURVEILLANCE

Le patient doit bénéficier d'une surveillance du fait des risques de réévolution et de second cancer. Dans le but d'augmenter la survie, l'objectif des cs et examens est de diagnostiquer second cancer ou une rechute accessible à un traitement performant

Aucun consensus n'existe concernant les modalités et la fréquence de surveillance, que le patient ait été traité par chirurgie, chimiothérapie, et/ou radiothérapie.
L'arrêt du tabac est impératif pour diminuer le risque de second cancer.

Option: Pour les patients opérés : La rechute métastatique survient surtout dans les 2 premières années, la rechute loco régionale en général entre 1 à 3 ans. L'endoscopie bronchique systématique ne serait utile que chez les patients ayant un cancer épidermoïde. Une TDM thoracique régulière est logique pour dépister un second cancer après 3 ans





















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

EST Profile

Hs.270833 - AREG: Amphiregulin










Breakdown by Body Sites

	TPM	Intensité du spot	
adipose tissue	0		
adrenal gland	0		
ascites	0		
bladder	0		
blood	8		TPM = Transcrits par million
bone	0		
bone marrow	40		
brain	0		
cervix	20		
connective tissue	0		
ear	0		
embryonic tissue	0		
esophagus	148		
eye	0		
heart	0		
intestine	29		
kidney	0		
larynx	0		
liver	52		
lung	20		
lymph	0		
lymph node	21		
mammary gland	12		
mouth	0		
muscle	0		
nerve	0		
ovary	0		
pancreas	0		
parathyroid	0		
pharynx	0		
pituitary gland	0		
placenta	45		
prostate	15		
salivary gland	0		
skin	14		
spleen	0		
stomach	102		
testis	0		
thymus	0		
thyroid	0		
tonsil	0		
trachea	19		
umbilical cord	0		
uterus	4		
vascular	38		

EST Profile

Hs.270833 - AREG: Amphiregulin

Breakdown by Health State

	TPM	Intensité du spot	
adrenal tumor	0		
bladder carcinoma	0		
breast (mammary gland) tumor	21		
cervical tumor	28		
chondrosarcoma	0		
colorectal tumor	26		
esophageal tumor	173		
gastrointestinal tumor	75		
germ cell tumor	0		
glioma	0		
head and neck tumor	0		
kidney tumor	0		
leukemia	0		
liver tumor	51		
lung tumor	9		
lymphoma	0		
non-neoplasia	0		
normal	8		
ovarian tumor	0		
pancreatic tumor	0		
primitive neuroectodermal tumor...	0		
prostate cancer	19		
retinoblastoma	0		
skin tumor	0		
soft tissue/muscle tissue tumor	0		
uterine tumor	0		

TPM = Transcrits par million

Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.270833>



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

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

PATHOLOGIE
BIOLOGIE

Pathologie Biologie xxx (2008) xxx-xxx

Editorial

The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer

Le rôle grandissant de l'amphiréguline dans le cancer du poumon non à petites cellules

Keywords: Amphiregulin; Non-small cell lung cancer; Gefitinib; Growth factor; Apoptosis; Drug resistance; EGFR; Targeted therapy; Tyrosine kinase inhibitors

Mots clés : Amphiréguline ; Cancer bronchique non à petites cellules ; Gefitinib ; Facteur de croissance ; Apoptose ; Résistance aux traitements ; EGFR ; Thérapie ciblée ; Inhibiteurs de tyrosine kinase

Amphiregulin (AREG) is an 84-aminoacid glycoprotein discovered in the late 80s by M. Shoyab et al. AREG was originally isolated from the conditioned medium of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-stimulated MCF-7 human breast carcinoma cell line. The human AREG gene (GeneID 374) is located on the q13-q21 region of chromosome 4, and is composed of six exons encoding the preprotein mRNA transcript. AREG is thus synthesized as a 252-amino acid transmembrane precursor, named pro-AREG. Pro-AREG is subjected to sequential proteolytic cleavage at the plasma membrane within the ectodomain that leads to released N-glycosylated soluble AREG forms. This shedding is essentially mediated by tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE), a member of the disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family also known as ADAM-17.

The AREG gene expression profile indicates that AREG is constitutively expressed in various tissues, mainly in the genitourinary and reproductive systems, as well as in the gastrointestinal tract, but also in bone marrow, liver and in the respiratory tract.

AREG is a member of the epidermal growth factor (EGF) family of proteins, which includes EGF itself, transforming growth factor alpha, heparin-binding EGF-like growth factor, betacellulin, and neuregulin. AREG binds to and activates the EGF receptor (EGFR or ErbB1) through autocrine, paracrine and juxtacrine mechanisms. The EGFR is widely expressed on epithelial cell membranes. The binding of AREG to EGFR induces autophosphorylation of the EGFR intracellular tyrosine kinase domain, which in turn activates two major intracellular pathways, i.e. the MEK/ERK1/2 and the PI3K/AKT pathways. EGFR is for instance involved in cell proliferation and differentiation, cell metabolism, cell migration and survival, as

well as in the control of cell cycle. Furthermore, the EGFR was the first tyrosine kinase receptor to be directly linked to several human tumors. AREG possesses a mitogenic activity for cells and plays a role in several biological processes including nerve generation, bone formation, mammary duct formation, as well as the outgrowth and branching of several tissues such as lung, kidney and prostate. AREG is also expressed in several cancers, inducing cellular responses such as growth, proliferation, migration or invasiveness after the activation of EGFR.

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in the world, both in males and females. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80% of lung cancers. Once diagnosed, NSCLC 5-year survival rate hardly reaches 12% despite different treatments such as chemotherapy, radiotherapy, and surgery. Such a poor prognosis is partially explained by NSCLC's ability to resist apoptosis and treatments. In this editorial, we report the role of AREG in such resistance mechanisms leading to NSCLC progression.

1. Implication of AREG in NSCLC apoptosis resistance

The ability to evade apoptosis is a hallmark of almost all types of cancers. Cancer cells can acquire resistance to apoptosis through a variety of strategies, including the inactivation of the well-known protein p53. Another way to circumvent programmed cell death is to transmit anti-apoptotic survival signals, essentially through autonomous production of growth factors by the tumor. Cancer cells produce growth factors that can be secreted, thus binding to cell surface receptors and stimulating their own growth and apoptosis resistance in an autocrine manner. The autocrine roles of EGF-like growth factors in lung cancer pathogenesis and in

0369-8114/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.patbio.2008.10.002

Please cite this article in press as: Busser B, et al. The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer. Pathol Biol (Paris) (2008), doi:10.1016/j.patbio.2008.10.002

apoptosis resistance have been extensively studied. The involvement of AREG in autocrine loops of activation is well described in several human malignancies and AREG anti-apoptotic activity is already demonstrated in breast, lung and hepatocarcinomas. In NSCLC, AREG presence is correlated with tumor size, illustrating its functional activity as a growth factor enhancing cell proliferation. AREG is also an indicator of reduced overall survival for NSCLC, suggesting an interesting role as a prognostic marker [1]. AREG, in collaboration with insulin-like growth factor type-1 (IGF-1), inhibits serum deprivation-induced apoptosis in NSCLC cell lines [2]. AREG is able to activate the IGF-1-receptor independently of its own EGF receptor. IGF1-receptor activation is in turn inducing the secretion of AREG and IGF-1 in an autocrine loop. The combination of AREG and IGF-1 and the subsequent receptor activation stimulate an original protein kinase C-dependent MAPK and PI3K-independent pathway that leads to NSCLC apoptosis resistance [3].

2. Implication of AREG in NSCLC resistance to treatment

Since autocrine-stimulated mitogenesis and apoptosis resistance contribute significantly to cancer progression, clinical development of anticancer treatments interrupting autocrine loops are under evaluation. In lung cancer, the use of EGFR-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) such as gefitinib and erlotinib can block such autocrine EGFR activation. Gefitinib showed potent anti-tumor effects in clinical trials for NSCLC treatment after previous chemotherapy, but failed to improve overall survival benefit in an unselected population. Predictive markers of EGFR-TKI sensitivity have thus been investigated to identify patients likely to benefit from such a targeted therapy.

As a matter of fact, AREG is involved in NSCLC resistance to EGFR-TKI. Gefitinib responders and non-responders present a differential expression of AREG gene in biopsy samples obtained from gefitinib-treated NSCLC patients. These data are confirmed by RT-PCR, immunohistochemistry, and serologic ELISA assays: AREG is indeed significantly overexpressed in gefitinib non-responders but undetectable in responders. Moreover, NSCLC patients with the worst prognosis and a shorter survival time present high levels of seric AREG, which are correlated with gefitinib resistance [4]. This subset of gefitinib non-responder patients contains principally males, smokers with non-adenocarcinomas NSCLC. Interestingly, independent studies showed that most of gefitinib sensitive patients are principally females, non-smokers with NSCLC adenocarcinomas [5], and with EGFR mutations.

Altogether, these data suggest that seric AREG might be an important predictor of gefitinib resistance among advanced NSCLC patients. In other malignancies, AREG is also responsible for resistance to conventional chemotherapeutic

drug, such as cisplatin, and to hormonal anti-tumor treatments such as exemestane, an oral steroidal aromatase inhibitor.

3. Conclusion

The implication of EGF-related growth factors in cancer progression is indisputable. AREG is already involved in various malignancies, and we reported several oncogenic roles for AREG in NSCLC progression. AREG is secreted by tumor cells in an autocrine/paracrine manner, leading to present AREG as a prognostic marker in NSCLC. Furthermore, AREG allows resistance to apoptosis in NSCLC. Anti-AREG antibodies restored an apoptotic activity in NSCLC cells [2], suggesting that AREG might be an interesting target to overcome apoptosis resistance. In addition, AREG is involved in therapeutic resistance in breast cancer and NSCLC, thus suggesting the interest of AREG as a biological marker of sensitivity to both conventional and EGFR-targeted therapy. The use of AREG as a biomarker should be encouraged since AREG is correlated with a poor prognosis, resistance to treatments and to apoptosis.

References

- [1] Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, et al. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* 1998;4:241-9.
- [2] Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, Favrot MC. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:49127-33.
- [3] Hurbin A, Coll JL, Dubrez-Daloz L, Mari B, Auburger P, Brambilla C, et al. Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280:19757-6.
- [4] Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, Hayama S, et al. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2005;65:9176-84.
- [5] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:169-81.

B. Busser^{a,b}

J.-L. Coll^a

A. Hurbin^{a,*}

^aInserm U823, institut Albert-Bonniot,
université Joseph-Fourier, BP 170, La Tronche,
38042 Grenoble cedex 9, France

^bUF cancérologie biologique et biothérapie,
hôpital Michallon, CHRU de Grenoble,
38000 Grenoble, France

*Corresponding author.

E-mail address: amandine.hurbin@ujf-grenoble.fr
(A. Hurbin).

1 October 2008

17 October 2008

Thèse soutenue par : BUSSEUR Benoît

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN NOUVEAU MÉCANISME DE RÉSISTANCE AU GEFITINIB DANS LE CANCER DU POU MON NON-À PETITES CELLULES : ROLE DE L'AMPHIRÉGULINE

Le cancer bronchique non-à petites cellules (CBNPC) représente 80% des cancers du poumon et possède un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 15%. Le gefitinib, une molécule appartenant à la famille des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) a montré de puissants effets anti-prolifératifs dans les CBNPC, mais la grande variabilité des réponses a incité la recherche de marqueurs capables de prédire une résistance ou une sensibilité à ce traitement. Les patients porteurs de CBNPC résistants au gefitinib ont des taux d'amphiréguline (AREG) sérique élevés, suggérant l'implication de l'AREG dans la résistance au gefitinib. Nous avons d'abord cherché à démontrer le rôle de l'AREG dans la résistance au gefitinib des cellules de CBNPC avant d'en décrire le mécanisme moléculaire.

Notre travail montre que l'AREG permet de résister à l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro* et *in vivo* en inactivant la protéine proapoptotique Bax. L'AREG induit une diminution du niveau d'expression de Bax et augmente son interaction avec la protéine Ku70, par un mécanisme dépendant de l'acétylation de Ku70. Nous décrivons ainsi un mécanisme original de résistance au gefitinib, dépendant de l'acétylation et contrôlé par un facteur de croissance, l'AREG.

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

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ORIGINAL MECHANISM OF RESISTANCE TO GEFITINIB IN NON-SMALL LUNG CANCERS: ROLE OF AMPHIREGULIN

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 80% of lung cancers and is associated with a very poor prognosis, with a 5-year survival rate remaining below 15%. Gefitinib is a molecule that belongs to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase inhibitors (EGFR-TKI) family and has shown potent antiproliferative effects in NSCLC. A high variability in clinical responses to this treatment lead to investigate new predictive markers to discriminate gefitinib-responders from non-responders. Patients that are resistant to gefitinib have high seric amphiregulin (AREG) levels, suggesting a role of this growth factor in gefitinib resistance. We investigated whether AREG was involved in gefitinib resistance and we characterized the molecular pathway initiated by AREG.

This work shows that AREG allows resistance to gefitinib-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*, through the inactivation of Bax proapoptotic protein. AREG induces the decrease of Bax expression level as well as an increased interaction between Bax and Ku70, through an acetylation-dependant mechanism. Therefore we describe an original pathway of gefitinib resistance, dependant of acetylation, and controlled by the growth factor AREG.

Lung cancer is a major health problem and NSCLC resistance to treatments represents a worrying phenomenon for clinicians. This work suggests both diagnostic and therapeutic solutions to improve NSCLC care. Effectively, we demonstrated the major role of AREG in NSCLC resistance to gefitinib, and validated its use as a predictive biomarker of non responsiveness to this treatment. Moreover, we suggest the association of EGFR-TKI with histone deacetylase inhibitors, especially for NSCLC patients that are resistant to EGFR-TKI.

Mots clés : Amphiréguline, Gefitinib, Cancer bronchique non-à petites cellules, Résistance, Tyrosine kinase, EGFR

Keywords : Amphiregulin, Gefitinib, Non-small cell lung cancer, Resistance, Tyrosine kinase, EGFR

Discipline : Biologie cellulaire

Centre de Recherche Inserm U823 - Institut Albert Bonniot – Grenoble I
Équipe 5 : "Identification de cibles thérapeutiques et vectorisation de drogues dans le cancer bronchique non-à petites cellules"

