



HAL
open science

Étude de l'altération de la réponse aux radiations ionisantes par deux inhibiteurs de tyrosine kinase : le STI571 (Glivec®) et le BIBW 2992

Florence Huguet

► **To cite this version:**

Florence Huguet. Étude de l'altération de la réponse aux radiations ionisantes par deux inhibiteurs de tyrosine kinase : le STI571 (Glivec®) et le BIBW 2992. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT: . tel-00574782

HAL Id: tel-00574782

<https://theses.hal.science/tel-00574782>

Submitted on 8 Mar 2011

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.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

2010

Numéro attribué par la bibliothèque



THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Champ disciplinaire : Médecine

École doctorale de rattachement : Cancérologie

présentée et soutenue publiquement par

Florence Huguet

le 8 septembre 2010

Titre

Étude de l'altération de la réponse aux radiations
ionisantes par deux inhibiteurs de tyrosine kinase :
le STI571 (Glivec®) et le BIBW 2992

Directeur de thèse : M. le Dr Favaudon Vincent

Coirectrice de thèse : Mme le Dr Larsen Annette

JURY

Président	M. le Pr	Bourhis	Jean
Rapporteur	M. le Pr	Azria	David
Rapporteur	M. le Pr	Verelle	Pierre
	M. le Dr	Favaudon	Vincent
	Mme le Dr	Larsen	Annette
	M. le Pr	Deutsch	Eric

SOMMAIRE

OBJECTIFS DE LA THESE	10
INTRODUCTION	14
I. Les radiations ionisantes	15
I-1. Les différents types de rayonnements ionisants	15
I-1-1. Les rayonnements particulaires	15
I-1-2. Les rayonnements électromagnétiques	18
I-2. Les effets chimiques et biologiques des RI	20
I-2-1. Les réactions chimiques	20
I-2-2. Les effets des RI sur l'ADN	21
I-2-3. Les effets des RI au niveau cellulaire	24
I-3. Les différents systèmes de réparation de l'ADN	26
I-3-1. La réparation par excision de base (BER)	27
I-3-2. La réparation par excision de nucléotide (NER)	31
I-3-3. la réparation des mésappariements de bases (MMR)	33
I-3-4. La réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB)	35
II. Les associations chimioradiothérapies	39
II-1. Mécanismes d'interactions moléculaires	39
II-1-1. Modifications des lésions radio-induites	39
II-1-2. Inhibition de la réparation des lésions radio-induites	40
II-2. Mécanismes d'interactions cellulaires	41
II-2-1. Coopération cytotocinétique	41
II-2-2. (Pseudo)Synchronisation	42
II-3. Mécanismes d'interactions tissulaires	42
II-3-1. Réoxygénation	42
II-3-2. Inhibition de la prolifération tumorale	44
II-3-2. Recherche d'une spécificité tumorale	45
II-4. Modulation des voies de signalisation	45
II-4-1. Le récepteur à l'EGF (EGFR)	46
II-4-2. Voie RAS/MAPK	56
II-4-4. Voie PI3K/ AKT	60
III. La leucémie myéloïde chronique	65
III-1. Généralités cliniques	65

III-1-1. Épidémiologie	65
III-1-2. Étiologie	65
III-1-3. Diagnostic	65
III-1-4. Principes du traitement	67
III-2. c-Abl	68
III-2-1. Structure	68
III-2-2. Fonctions	69
III-3. Bcr	71
III-3-1. Structure	72
III-3-2. Fonctions	72
III-4. Le gène de fusion Bcr-Abl	72
III-4-1. Structure	72
III-4-2. Fonctions	73
III-5. Influence de Bcr-Abl sur la radiosensibilité	76
III-6. Le STI571	77
III-6-1. Mode d'action	77
III-6-2. Indications et résultats	77
III-6-3. Mécanismes de résistance	78
IV. L'adénocarcinome du pancréas	79
IV-1. Généralités cliniques	79
III-1-1. Épidémiologie	79
III-1-2. Diagnostic	80
III-1-3. Principes du traitement	82
IV-2. Caractéristiques biologiques	89
IV-2-1. KRAS	90
IV-2-2. TP53	90
IV-2-3. CDKN2A/p16	91
IV-2-4. SMAD4/DPC4	91
IV-2-5. Autres anomalies	91
MATÉRIELS ET MÉTHODES	94
I. Culture cellulaire et survie clonogénique	95
I-1. Lignées cellulaires	95
I-2. Culture cellulaire	96
I-3. Survie clonogénique	97
I-4. Inhibition de croissance	98

I-5. Synchronisation cellulaire	98
II. Traitements et irradiation	99
II-1. Composés	99
II-1-1. STI571	99
II-1-2. BIBW 2992	100
II-2. Irradiation gamma	102
III. Western blot	101
III-1. Extraction, dosage des protéines	102
III-2. Electrophorèse	103
III-3. Transfert sur membrane	103
III-4. Immunomarquage	103
IV. Immunodétection de CDK1 et p-Tyr15-CDK1	104
V. Étude du cycle cellulaire en cytométrie en flux	105
VI. Étude de l'apoptose	107
VI-I. AnnexineV-FITC	107
VI-2. Fraction sub-G1	107
VII. Étude de la sénescence : test à la β-galactosidase	108
VIII. Immunofluorescence	108
IX. Étude de la différenciation érythrocytaire	109
IX-1. Marquage à la benzidine	109
IX-2. Marquage à la glycophorine	110
X. Étude du stress oxydatif	110
RÉSULTATS – DISCUSSION	112
<i>1^{ERE} PARTIE : LE STI571</i>	<i>113</i>
I. Introduction	114
II. Résultats	116
II-1. Article n°1	116
II-2. Expériences complémentaires	126
II-2-1. Résultats sur les lignées hTERT-RPE1 et HCC-1937	126
II-2-2. Effets du STI571 sur le métabolisme peroxydatif	129
II-2-3. Effet du STI571 sur la réparation des cassures double-brin de l'ADN	130
II-2-4. Étude de la sénescence induite par le STI571 dans les cellules K562	132
III. Discussion-Conclusions 1^{ère} partie	134

2^{NDE} PARTIE : LE BIBW 2992	139
I. Introduction	140
II. Résultats	142
II-1. Article n°2	142
II-2. Expériences complémentaires	157
II-2-1. Phénotype épithélial ou mésenchymateux des lignées étudiées	157
II-2-2. Inhibition prolongée de la phosphorylation d'HER3	157
II-2-3. Radiosensibilité intrinsèque des 3 lignées	159
II-2-4. Expression nucléaire et cytoplasmique de DNA-PKcs	159
III. Discussion-Conclusions 2^{nde} partie	161
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	164
BIBLIOGRAPHIE	169

REMERCIEMENTS

J'adresse mes premiers remerciements à Monsieur le Docteur Vincent Favaudon, directeur de l'unité INSERM U612, qui m'a accueillie si gentiment en tant que stagiaire et qui m'a ensuite proposé un sujet de thèse aussi complet. Je garderai aussi un excellent souvenir de nos discussions gastronomiques et musicales car, au-delà de notre intérêt commun pour la radiobiologie, nous avons beaucoup d'affinités. Soyez assuré de mon indéfectible admiration.

J'exprime aussi ma reconnaissance à Madame le Docteur Annette Larsen, directrice de l'unité INSERM U938, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et guidée pendant ces quatre années de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jean Bourhis qui me fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Mes remerciements vont à Messieurs les Professeurs David Azria et Pierre Verrelle pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, et pour l'intérêt qu'ils ont témoigné vis-à-vis du travail réalisé.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur Eric Deutsch qui a accepté de faire partie du jury de cette thèse et qui m'a toujours guidée amicalement et soutenue durant ces années de thèse dans les moments de doutes et d'interrogations.

J'exprime ma plus profonde gratitude à toute l'équipe INSERM U612 pour leur aide quotidienne. À commencer par Nicole Giocanti sans qui je ne serai pas là aujourd'hui ! Merci Nicole, c'est toi qui m'a tout appris, qui a guidé avec patience mes premiers pas de chercheuse. Ce travail est le fruit de notre collaboration. Merci aussi à Marie Fernet pour l'aide qu'elle m'a apportée, notamment à un moment critique de ma thèse et pour nos discussions enrichissantes. Un grand merci à Frédérique Mégnin-Chanet, Janet Hall, Laurence Vaslin, Virginie Poindessous, Camille Godon, Hervé Tourbez pour ses conseils en informatique, et à Dany Rouillard pour son aide en cytométrie. Et puis aussi à Valentin, Céleste, Laurent, Mohamed, Nadia, Laurence, Vincent, j'espère n'oublier personne...

Je tiens à remercier tout spécialement le Professeur Emmanuel Touboul pour m'avoir soutenue lors de ce travail. Et je remercie toute l'équipe médicale et paramédicale du service d'Oncologie Radiothérapie de Tenon.

Et puis il y a les miens. Merci aussi dans le désordre le plus complet à Stéphanie et Guillaume Haiat, Vianney Mourman, Hélène Doubre, Thomas Francoual, Claire Choukroun, Sophie Christol, Caroline Ferry, Dimitri Rzepski, David Osman, Benjamin Besse, Stéphane Vignot, Julien Grenier, Josselin Noirel, Martin Kiefer.

Mes remerciements les plus tendres vont à ma famille, mes grands-parents, à mon père et ma mère sans qui je n'en serais pas là, à ma soeur Pauline et mes frères Vincent et Youri, à Linda Amar ma marraine de coeur.

Merci à Eric Périer pour son « accompagnement » pendant la rédaction de cette thèse et sa relecture attentive.

Merci pour tout à François Bidard. Je pense n'avoir pas démerité de la devise que tu m'as attribuée : « Brûlez-les tous, Dieu reconnaîtra les siens » (Simon de Montfort, siège de Béziers, 12 juillet 1209).

Enfin, je dédie cette thèse à mon grand-père le Professeur Amédée Cotte qui a su développé ma curiosité dès mon plus jeune âge, m'a donné le goût de la recherche, m'a enseigné la persévérance et a toujours suivi mes travaux avec le plus grand intérêt jusqu'à son décès le 24 octobre 2008. Il me manque aujourd'hui.

Liste des abréviations

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP	Adénosine mono-phosphate
Arg	Abl-related gene
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BER	Base excision repair
BRCA	Breast cancer associated protein
BSA	Bovin serum albumin
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
CDB	Cassure double-brin
CDK	Cyclin-dependent kinase
CFU	Colony Forming Unit
Chk 1/2	Checkpoint kinase 1/2
COX	Cyclooxygénase
CRT	Chimioradiothérapie
CSB	Cassure simple-brin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phénylindole
DB	Dommmages de base
DBD	DNA-binding domain
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanine diphosphate
GTP	Guanine triphosphate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solutions
HD	Délétion homozygote
HER	Human Eidermal Growth Factor Receptor
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSP90	Heat Shock Protein 90
IGF	Insulin Growth Factor
Jak	Janus tyrosine kinase
JNK	c-jun N-terminal Kinase
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LMDS	Locally Multiply Damaged Sites

LPR	Long patch repair
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAPK / ERK kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NER	Nucleotide excision repair
NK κ B	Nuclear factor κ B
NHEJ	Non Homologous End Joining
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Sequence
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
Pb	Paire de bases
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Ph	Chromosome Philadelphie
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PLC	Phospholipase
PS	Phosphatidyl sérine
PTEN	Phosphatase and tensin homologue gene
Rb	Rétinoblastome
RBD	RAS Binding Domain
RI	Radiations ionisantes
RH	Recombinaison homologue
ROS	Reactive oxygen species
RT	Radiothérapie
SER	Sensitizer Enhancement Ratio
SH	Src-homology domain
SIR2	Silent information repressor protein-2
SPR	Short patch repair
SSA	Single-strand annealing
SSBR	Single-strand break repair
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBI	Total Body Irradiation (irradiation corporelle totale)
TCR	Transcription-coupled repair
TEF1	Transcription enhancer factor-1
TEL	Transfert d'énergie linéaire
TEP1	Telomerase associated protein 1
TGF	Transforming Growth Factor
TK	Tyrosine kinase
TRF1/2	Telomeric repeat binding factor 1/2
TS	Thymidylate synthase
UV	Ultra-violet
XLF	XRCC4-Like factor
XRCC1	X-ray cross complementing protein
XP	Xeroderma pigmentosum
5-FU	5-fluorouracile

OBJECTIFS DE LA THESE

Augmenter la radiosensibilité tumorale sans majorer celle des tissus sains est le défi de la radiothérapie du XXI^{ème} siècle. L'irradiation d'une population de cellules produit une cascade d'évènements physiques, chimiques, biochimiques puis biologiques qui sont de mieux en mieux compris. Dans la phase physique (10^{-18} à 10^{-13} s), les radiations incidentes interagissent avec les atomes en perturbant leurs cortèges électroniques (effet Compton, effet photoélectrique) aboutissant à la formation de micro-dépôts d'énergie. Pendant la phase chimique (10^{-13} à 10^{-9} s), les ions interagissent avec le milieu essentiellement composé d'eau et produisent des radicaux libres (radiolyse de l'eau) qui s'homogénéisent par diffusion (10^{-9} à 10^{-6} s). Ces radicaux sont responsables de la formation d'un grand nombre de lésions dans les différents compartiments cellulaires, dont principalement des lésions de l'ADN : dommages de bases, pontages ADN-protéines et ADN-ADN, cassures simple et double-brin. La formation de ces dommages constitue la phase biochimique (10^{-6} à 10^{-3} s). En réponse aux dommages de l'ADN, la cellule active ses mécanismes de reconnaissance et de réparation qui ont pour but de restaurer l'ADN endommagé. Certains de ces mécanismes sont mis en place en quelques fractions de seconde (1). Si la réparation est fidèle, la cellule survivra, sinon elle peut mourir (par mort mitotique, apoptose ou sénescence) ou se transformer (mutagénèse). Le fait que l'ADN soit la cible principale des radiations ionisantes a depuis longtemps conduit à envisager d'altérer la capacité de réparation des lésions de l'ADN radio-induites pour accroître la radiosensibilité tumorale. C'est ainsi que sont nées les associations chimioradiothérapies concomitantes avec des agents cytotoxiques tels que le cisplatine, majorant les lésions de l'ADN, ou le 5-fluorouracile, inhibant la réparation, ces médicaments jouant alors un rôle de radiosensibilisateurs. Ce type d'approche a permis d'améliorer les résultats de la radiothérapie à la fois en termes de contrôle local et de survie au prix cependant d'une majoration de la toxicité.

Les travaux de l'équipe Inserm U612, avec ceux d'autres auteurs, ont contribué à élucider les mécanismes impliqués dans la synergie rayonnement-drogues et ont montré que l'effet des traitements combinés sur des cellules en phase de prolifération est déterminé, pour l'essentiel, par deux modes d'interaction :

- La **coopération cytotinétique**, qui procède de différences de la radio- ou chimio-sensibilité intrinsèque des divers compartiments du cycle cellulaire, ainsi que de la redistribution dans le cycle consécutive à l'exposition à l'un ou l'autre agent cytotoxique.
- L'altération de la **signalisation** ou de la **réparation** des lésions de l'ADN.

Le développement de thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses permet d'imaginer de nouvelles associations chimioradiothérapies moins toxiques pour les tissus sains car plus spécifiques. Ainsi, en modulant les voies de signalisation impliquées dans la réponse aux radiations ionisantes, notamment les voies RAS et PI3K/Akt, en inhibant spécifiquement le récepteur à l'*Epidermal Growth Factor* (EGFR), ou encore en agissant sur le cycle cellulaire, on espère obtenir une radiosensibilisation tumorale *in vitro* et *in vivo*.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail de thèse. L'équipe du Dr. Vincent Favaudon s'est intéressée dès les années 1990 à l'étude de l'interaction des thérapies ciblées avec les radiations ionisantes, notamment avec le gefitinib, un inhibiteur d'EGFR (2). Le STI571 ou Glivec® représente le prototype des thérapies ciblées. En effet, le STI571 a révolutionné la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique (LMC), syndrome myélo-prolifératif caractérisé par la présence du chromosome Philadelphie. Cette anomalie chromosomique est liée à une translocation des chromosomes 9 et 22 aboutissant à la fusion des gènes BCR et ABL et à la production de la protéine chimérique Bcr-Abl, responsable de la transformation maligne de la cellule. Le STI-571 inhibe spécifiquement l'activité tyrosine kinase de Bcr-Abl permettant d'obtenir des réponses hématologiques et cytogénétiques majeures (3). L'effet de Bcr-Abl sur la radiosensibilité est mal connu. Quelques indices suggèrent que Bcr-Abl modifierait la radiosensibilité par l'induction de mécanismes de résistance aux agents génotoxiques tels qu'une activation de la réparation, une majoration du taux de cellules en phase S ou une inhibition de l'apoptose. La tyrosine kinase c-Abl est elle-même impliquée dans la réponse aux radiations ionisantes *via* la réparation des cassures double-brin de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose. L'interaction entre STI571 et radiothérapie a cependant été très peu étudiée. Le sujet de thèse qui m'a été proposé consistait dans un premier temps à étudier les effets du STI571 sur la réponse aux radiations ionisantes dans des lignées cellulaires Bcr-Abl et non Bcr-Abl. Le but de cette étude était de mettre en évidence une éventuelle modification de la réponse au rayonnement et d'en comprendre les mécanismes, notamment les effets sur la réparation des cassures double brin de l'ADN, sur l'apoptose radio-induite ou sur les voies de signalisation sous-jacentes.

Dans un second temps, suite aux travaux réalisés par l'équipe Inserm U938 dirigée par Annette Larsen et à mon intérêt pour le traitement des cancers du

pancréas, nous avons choisi d'étudier les effets d'un autre inhibiteur de tyrosine kinase, le BIBW 2992, sur des lignées cellulaires de cancers du pancréas.

Le BIBW 2992 est un inhibiteur irréversible spécifique des tyrosines kinases d'EGFR et HER2. L'EGFR joue un rôle important dans la radiorésistance des cellules tumorales. L'activation d'EGFR déclenche une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à une inhibition de l'apoptose et à une activation de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse (4). EGFR agirait aussi sur la réparation des lésions radio-induites via l'activation de DNA-PKcs, enzyme majeure du NHEJ (5). L'inhibition de l'activité d'EGFR devrait par conséquent provoquer une radiosensibilisation. De plus, l'inhibition d'HER2 entraîne une radiosensibilisation dans les cellules surexprimant HER2 (6-8). Récemment, Toulany et al. ont montré l'importance des hétérodimères EGFR-HER2 dans la réponse aux radiations ionisantes (9). Inhiber à la fois EGFR et HER2 pour augmenter la radiosensibilité tumorale paraît donc une combinaison intéressante. Les Docteurs Annette Larsen et Vincent Favaudon m'ont donc proposé de poursuivre mon travail de thèse en étudiant l'efficacité du BIBW 2992 ainsi que son pouvoir radiosensibilisant dans les cancers du pancréas. L'adénocarcinome du pancréas a un pronostic effroyable du fait d'une part d'un diagnostic souvent tardif, et d'autre part d'une chimiorésistance et d'une radiorésistance importante (10). Ceci est dû au fait que la quasi totalité des cancers du pancréas ont une protéine KRAS mutée (11, 12). Le rôle de KRAS dans la radiorésistance est encore discuté (13). La surexpression d'EGFR et d'HER2 étant un évènement fréquent, il nous a semblé intéressant d'étudier l'efficacité du BIBW 2992 dans cette pathologie.

INTRODUCTION

I. Les radiations ionisantes

I-1. Les différents types de rayonnements ionisants

Le noyau d'un certain nombre d'éléments naturels ou artificiels est instable. Il se transforme en émettant des particules ou des photons pour donner un nouveau noyau qui est le plus souvent stable. Ce phénomène constitue la désintégration radioactive. On distingue parmi les radioéléments (radionucléides) naturels ceux dont la période ($t_{1/2}$) est supérieure à l'âge de l'univers (^{232}Th , ^{235}U , ^{238}U), ceux qui dérivent des précédents par filiation (ex. ^{226}Ra) et ceux, à période plus courte, qui sont formés par interaction entre les molécules de la haute atmosphère et les rayonnements cosmiques, les plus importants étant ^3H et ^{14}C .

Les radiations ionisantes (RI) correspondent à des rayonnements qui possèdent une énergie associée supérieure à 30 électrons-volts (eV), seuil au-dessus duquel ils peuvent arracher un électron aux atomes qui constituent le matériau. Les RI comprennent :

- Des particules chargées (α [^4_2He], β^+ [positrons], β^- [électrons], électrons relativistes, ions) ou non chargées (neutrons). Ces particules peuvent être animées d'une vitesse élevée, du même ordre de grandeur que celle de la lumière dans le cas des β^+ ou β^- .
- Les rayonnements électromagnétiques (photons) de haute énergie (rayons X et γ).

Les radiations d'énergie inférieure à 10 eV ne provoquent pas d'ionisation. Elles sont cependant capables de transférer leur énergie au cortège électronique des atomes du milieu pour les amener dans un état excité. Les rayonnements ultraviolets appartiennent à cette catégorie.

L'interaction des rayonnements avec la matière est caractérisée par leur libre parcours moyen et leur transfert d'énergie linéique (TEL). Le TEL représente, en un point de la trajectoire d'une particule ionisante, la densité d'énergie absorbée par le milieu rapportée à l'unité de longueur de la trajectoire : on l'exprime usuellement en $\text{keV}/\mu\text{m}$. Le TEL dépend du type de rayonnement et de son énergie. Par exemple, les rayonnements particuliers ont un TEL plus élevé que les rayonnements électromagnétiques, mais le TEL d'électrons d'énergie $> 2 \text{ MeV}$ ($\approx 0,2 \text{ keV}/\mu\text{m}$) est très voisin celui de photons de même énergie. L'énergie déposée par le rayonnement dans la matière est exprimée en Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$).

Nous allons décrire plus en détail chaque type de RI, ainsi que leurs principales caractéristiques.

I-1-1. Les rayonnements particulaires

I-1-1-a. Les rayonnements α

Les rayonnements α sont des particules d'hélium (${}^4_2\text{He}$) éjectées de noyaux instables ou accélérées dans des cyclotrons. On peut résumer la désintégration α comme une fission nucléaire où le noyau père se scinde en deux noyaux fils dont l'un est un noyau d'hélium. On peut prendre comme exemple la désintégration de l'uranium 238 : ${}^{238}_{92}\text{U} \rightarrow {}^{234}_{90}\text{Th} + \alpha$.

Les particules α issues de la désintégration de noyaux radioactifs possèdent en général une énergie < 10 MeV. Ces particules ont un fort TEL mais une pénétration faible (quelques centimètres dans l'air). Elles sont donc très vite arrêtées par la matière, une simple feuille de papier ou la couche cornée de la peau y suffisent. Ainsi les particules α ne présentent pas de danger lors d'une exposition externe. En revanche, elles sont fortement délétères en cas de contamination interne, c'est-à-dire lorsqu'une particule radioactive émettrice α est intégrée dans l'organisme, car une seule particule α peut créer des lésions majeures dans le noyau d'une cellule. On peut citer comme exemple les contaminations par inhalation de radon, responsables de cancers pulmonaires au terme d'une exposition chronique prolongée.

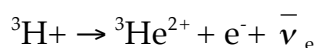
I-1-1-b. Les rayonnements β

La radioactivité β est un type de désintégration dans laquelle une particule β est émise. On parle de désintégration β^- ou β^+ selon que la particule émise est un électron ou un positron (antiparticule de l'électron).

Désintégration β^-

Un neutron est converti en proton par l'intermédiaire de la force nucléaire faible avec émission d'une particule β^- et d'un anti-neutrino : $n \rightarrow p + e^- + \bar{\nu}_e$.

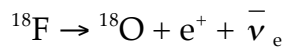
Le spectre d'énergie des β^- est continu (0-3 MeV) en raison du partage de l'énergie entre les trois corps. Il n'y a pas d'énergie minimale. On peut prendre comme exemple la désintégration du Tritium en Hélium-3 :



Désintégration β^+

Un proton est converti en neutron par l'intermédiaire de la force nucléaire faible avec émission d'une particule β^+ (un positron) et d'un neutrino : $p \rightarrow n + e^+ + \nu_e$.

Le spectre d'énergie est continu pour les mêmes raisons que les β^- . Il y a cependant une vitesse minimale des positrons due à la répulsion coulombienne avec le noyau. On peut prendre comme exemple la désintégration du ^{19}F :



Le parcours des β^+ est très limité en raison de leur annihilation par rencontre avec les électrons présents dans le milieu. Cette annihilation produit deux photons colinéaires d'énergie 511 keV. La détection en coïncidence spatio-temporelle de ces deux photons est à la base de la tomographie par émission de positrons (TEP).

I-1-1-c. Les électrons

Un électron qui traverse un milieu matériel perd progressivement son énergie cinétique au cours d'interactions avec les noyaux des atomes qui constituent ce milieu et avec leur cortège électronique. Cette perte d'énergie s'accompagne d'un ralentissement, d'une diffusion et d'un transfert d'énergie aux atomes du milieu. La collision entre un électron en mouvement et un électron périphérique d'un atome se traduit en effet par un partage entre les deux électrons de l'énergie E du premier. Les électrons du milieu sont ainsi mis en mouvement, laissant un atome ionisé, et créent à leur tour des ionisations en cascade.

Les électrons relativistes (5-20 MeV) produits par des accélérateurs linéaires d'électrons sont parfois utilisés en radiothérapie. Lorsque la cible est constituée d'un matériau de numéro atomique élevé, le transfert d'énergie se fait par freinage (Bremsstrahlung) et donne lieu à la génération de photons X. Ce principe est appliqué dans les tubes cathodiques aussi bien que dans les accélérateurs utilisés en radiothérapie externe.

I-1-1-d. Les neutrons

Les neutrons interagissent avec les noyaux des atomes constituant le matériau traversé. Il en résulte deux types d'interactions :

- Capture : le neutron est absorbé par le noyau, lui faisant gagner une unité de masse. Si le noyau résultant est instable, il va émettre un rayonnement particulaire ou électromagnétique pour revenir à un état stable.

- Diffusion : le neutron perd de l'énergie en la transférant à des protons de recul par un processus de collision dite élastique lorsque le noyau n'est pas modifié, ou inélastique lorsque l'état interne du noyau est modifié. Le retour à l'équilibre se fait par émission de plusieurs photons.

I-1-1-e. Les ions accélérés

Hormis l'électron ou le positron, les particules chargées sont des noyaux atomiques. On peut citer comme exemple l'hydrogène (protons H^+), le carbone (C^{6+}), le néon (Ne^{10+}). Ces ions peuvent être accélérés par divers types d'accélérateurs : cyclotrons, synchrotrons, synchro-cyclotrons, accélérateurs linéaires. L'absorption de l'énergie de ces particules dans l'épaisseur du matériau traversé suit une courbe caractérisée par un dépôt d'énergie maximum en fin de parcours (pic de Bragg) (Figure 1). La profondeur à laquelle se forme le pic de Bragg est liée à la masse et à l'énergie de la particule incidente.

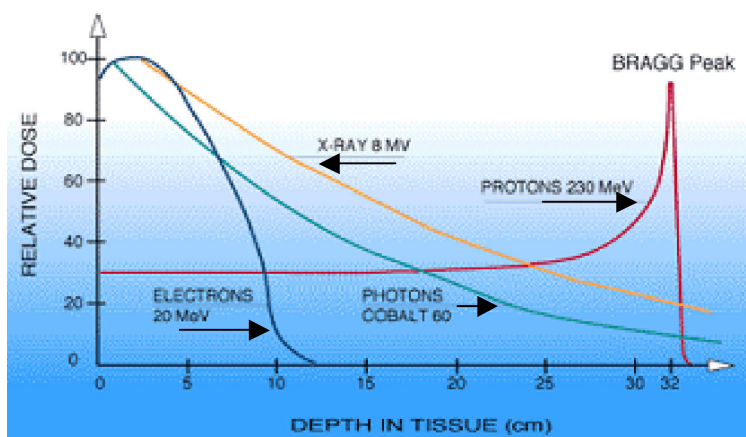


Figure 1

Distribution de dose de différents types de rayonnement dans la profondeur d'un tissu. (source : site internet du centre de protonthérapie d'Orsay – Institut Curie)

Les faisceaux d'ions présentent des caractéristiques intéressantes pour le traitement de certains cancers. Dans le cas des protons, l'absence de dose en arrière du pic de Bragg permet d'éviter l'irradiation d'organes à risque (par exemple le tronc cérébral ou le chiasma optique) situés en arrière de la tumeur par rapport au port d'entrée du faisceau. Ceci permet de mieux cibler des tumeurs difficilement traitables en radiothérapie conventionnelle. C'est ainsi que le *Centre de Protonthérapie d'Orsay-Institut Curie* traite des mélanomes de la choroïde et des tumeurs du cerveau récusées par la chirurgie, notamment des tumeurs de la base du crâne. Par ailleurs, des centres anti-cancéreux d'hadronthérapie (traitement des cancers par faisceaux d'ions légers, essentiellement d'ions carbone) ont vu le jour durant ces dernières décennies en Allemagne ou au Japon et plusieurs centres sont en projet ou en cours de construction, dont le projet *Etoile* à Lyon.

I-1-2. Les rayonnements électromagnétiques

On distingue deux types de rayonnements électromagnétiques : les rayons γ et les rayons X. Les rayons γ sont émis lors de la désintégration de certains noyaux

atomiques, tandis que les rayons X proviennent du cortège électronique des atomes. Les faisceaux de rayons X sont produits par collision d'électrons accélérés avec une cible ou lorsque des faisceaux d'électrons relativistes se voient imposer un changement de direction par l'action d'un champ magnétique (rayonnement synchrotron). Les rayons X de faible énergie (< 450 keV) produits par des tubes de Crookes sont utilisés en radiodiagnostic ou pour l'irradiation de petits animaux. Les rayons X de haute énergie (5-20 MeV) produits par des accélérateurs linéaires d'électrons sont utilisés en radiothérapie. Certains accélérateurs utilisés en physique procurent des énergies de plusieurs GeV.

Les rayonnements électromagnétiques sont dotés d'un TEL faible et à peu près constant entre 30 MV ($0,28$ keV/ μm) et 1 MV ($0,36$ keV/ μm) mais augmentant rapidement aux basses énergies ($2,6$ keV/ μm à 200 kV). Avec les photons, on ne parle pas de parcours dans la matière, mais d'atténuation. En effet, le photon, contrairement à la particule, ne cède pratiquement pas d'énergie le long de sa trajectoire : il interagit avec la matière et y est absorbé quantitativement avec une probabilité qui dépend du numéro atomique et de la densité du matériau. C'est pourquoi chaque matériau possède un pouvoir atténuateur qui lui est propre.

Lors de l'interaction entre un photon et la matière, trois effets peuvent se produire. Leur proportion dépend du matériau traversé et de l'énergie du photon incident.

- **l'effet photoélectrique** : l'énergie du photon est absorbée par un électron de la couche interne d'un atome, qui va être éjecté. Il s'ensuit, par résonance, une réorganisation du cortège électronique de l'atome, avec éventuellement la production d'électrons Auger.
- **l'effet Compton** : l'énergie du photon est transférée en partie à un électron des couches périphériques de l'atome cible, avec émission d'un électron secondaire possédant l'énergie échangée dans l'interaction.
- **l'effet de production de paire** : le photon interagit avec le noyau des atomes, créant ainsi l'émission d'une paire positon/négaton (émission β^+/β^-). Le positon s'annihile ensuite en créant deux photons de 511 keV. L'énergie du photon incident doit être supérieure à 1,022 MeV pour que ce phénomène se produise.

Lors de mon travail de thèse, les cellules ont été irradiées au moyen d'une source ^{137}Cs délivrant des rayons γ monochromatiques à une énergie nominale de 662 keV (TEL $0,91$ keV/ μm) à une profondeur équivalent eau de 3,5 mm assurant l'équilibre électronique.

I-2. Les effets chimiques et biologiques des RI

I-2-1. Les réactions chimiques

Les effets biologiques des RI résultent des réactions chimiques consécutives à l'ionisation des molécules du milieu irradié, et plus précisément à la formation de radicaux libres. On distingue des effets directs et indirects (Figure 2). L'effet direct résulte de l'ionisation d'une molécule d'intérêt (par exemple une molécule d'ADN). L'effet indirect procède de l'interaction des produits de la radiolyse de l'eau avec les molécules contenues dans les cellules. L'effet direct est important pour les rayonnements de type α , mais il a une importance négligeable dans le cas des électrons, des protons et des photons X ou γ . L'effet indirect est largement majoritaire dans les conditions habituelles car les milieux biologiques sont à 70% constitués d'eau; la probabilité que les RI interagissent avec l'eau plutôt qu'avec des macromolécules (comme les molécules d'ADN) est donc beaucoup plus importante.

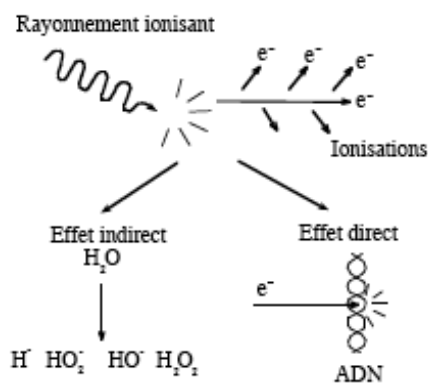


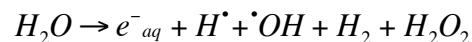
Figure 2

Effets directs et indirects des RI.

(source:

<http://www2.vetlyon.fr/ens/imagerie/D1/09.Radiobiologie/R-notes.html>)

La radiolyse de l'eau génère des radicaux libres et des produits de recombinaison qui diffusent dans la solution :



Les radicaux libres réagissent sur les molécules de soluté, entraînant leur modification chimique. Le radical OH^\bullet est un oxydant extrêmement puissant, qui réagit avec la plupart des molécules rencontrées à des vitesses proches de la limite imposée par la diffusion. Les électrons hydratés (e^-_{aq}) sont pour leur part des réducteurs puissants. Les radicaux H^\bullet peuvent être alternativement oxydants ou réducteurs, selon les conditions. Leur rendement de formation dans l'eau est bien connu : $G(OH^\bullet) = G(e^-_{aq}) = 0.28 \mu\text{mol/J}$, $G(H^\bullet) = 0.062 \mu\text{mol/J}$.

Les principales cibles biologiques des radicaux issus de la radiolyse de l'eau sont les constituants des acides nucléiques (désoxyribose, bases), les lipides insaturés

des membranes cellulaires, et certains acides aminés. Nous ne nous préoccupons dans ce qui suit que des dommages produits sur les molécules d'ADN.

I-2-2. Les effets des RI sur l'ADN

Les radicaux libres, principalement les radicaux OH^\bullet issus de la radiolyse de l'eau, réagissent avec les différents éléments qui composent l'ADN : les groupements phosphates, le cycle désoxyribolactone ou les bases puriques ou pyrimidiques. Les principaux produits finaux de ces réactions sont des cassures de la chaîne polynucléotidique (simples ou doubles), des sites abasiques, éventuellement oxydés, et des dommages de bases. On trouve également des pontages ADN-ADN et ADN-protéines ainsi que des lésions multiples localisées. Ces différentes lésions (Figure 3) se produisent quotidiennement dans l'ADN des cellules non irradiées sous l'effet des radicaux issus du métabolisme de l'oxygène (Tableau 1).

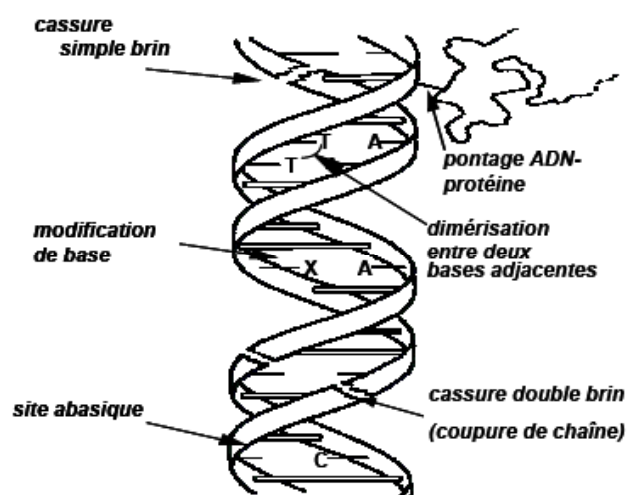


Figure 3

Schéma des lésions radio-induites de l'ADN.

Après exposition à des RI, les principales lésions de l'ADN observées sont des cassures simple-brin, des modifications de bases, des sites abasiques, des pontages ADN-protéine, des dimérisations entre deux bases adjacentes et des cassures double-brin.

(source : Radiobiologie (ISBN 2 7056 6530 7), Tubiana M, ed., Hermann-Médecine, Paris, 2008)

Type de dommage	Nombre moyen de lésions spontanées par cellule par jour	Nombre moyen de lésions radio-induites par cellule et par Gy
Cassures simple-brin	10.000 – 55.000	1.000
Cassures double-brin	8	40
Dommages de bases	3.200	2.000
Pontage ADN-ADN	8	30
Pontage ADN-Protéine	≥ 10	150
Lésions multiples localisées	Non déterminé	Non déterminé

Tableau 1

Dommages endogènes et radio-induits de l'ADN (d'après (14)).

I-2-2-a. Les dommages de bases (DB)

Les réactions chimiques d'oxydation produites par les radicaux libres de la radiolyse de l'eau engendrent une multitude de modifications chimiques des bases puriques et pyrimidiques. Les différents composés qui en résultent ont été identifiés par des techniques de chromatographie. Les deux produits majeurs sont la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydroxythymidine (ThdGly) et la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG). ThdGly est la plus abondante, cependant la 8-oxodG a été la plus étudiée et reste pour cette raison la lésion de référence comme marqueur des lésions oxydatives de l'ADN (15). On notera que le rendement radiolytique est plus faible à haut TEL ($^{12}\text{C}^{6+}$) qu'après irradiation à faible TEL (γ) (16).

I-2-2-b. Les cassures simple-brin (CSB)

Le métabolisme de l'oxygène produit des intermédiaires réactifs qui sont responsables de l'accumulation spontanée d'un grand nombre de CSB (Tableau 1). La rupture simple-chaîne de l'ADN peut survenir au niveau de la liaison phosphodiester 3' ou 5'. Elle peut aussi résulter de l'attaque de la liaison base-désoxyribose. La plupart des CSB radio-induites sont produites par les radicaux OH^\bullet qui attaquent le désoxyribose. Cette attaque est suivie de réarrangements qui aboutissent à la rupture de la liaison phosphodiester en β (17). Les études *in vitro* sur de l'ADN plasmidique ont montré que les CSB radio-induites présentent en grande majorité une extrémité 3'-phosphate ou phosphoglycolate dont la réparation nécessite l'action d'une nucléase (18).

I-2-2-c. Les cassures double-brin (CDB)

Une cassure double-brin est une rupture des deux chaînes d'ADN à des sites distants de quelques nucléotides. Dans la très grande majorité des cas, une CDB est formée par les radicaux produits lors du dépôt d'énergie d'une seule particule. La probabilité de formation d'une CDB dans le noyau d'une cellule par conjonction de CSB produites le long de deux trajectoires d'électrons distinctes est inférieure à 10^{-8} . Une CDB est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases, hétérologue dans le cas contraire. Les CDB hétérologues sont les plus fréquentes.

Le nombre de CDB représente un faible pourcentage des lésions de l'ADN spontanées ou radio-induites (Tableau 1). Cependant, une fraction non négligeable des CDB radio-induites est difficilement réparable. Les CDB étant des lésions particulièrement létales, il existe de ce fait une excellente corrélation entre la

probabilité de mort cellulaire et le taux de CDB non réparées 24 h post-irradiation (19).

I-2-2-d. Les pontages de l'ADN

On connaît trois types de pontages (*cross links*) radio-induits impliquant l'ADN : ADN-ADN intra-chaînes, ADN-ADN inter-chaînes et ADN-protéines. Ces derniers se forment par liaison covalente de protéines à l'ADN. C'est le cas par exemple des histones.

Quelques articles ont décrit la formation de pontages ADN-ADN par les RI (20). Ces dommages restent cependant peu étudiés. Cela tient en grande partie à la difficulté technique de leur mise en évidence et de leur quantification. On pourrait cependant penser qu'ils sont très néfastes pour les cellules car ils sont susceptibles d'interrompre différents mécanismes vitaux comme la réplication et la transcription. De même on reconnaît aujourd'hui que la réparation des pontages ADN-ADN inter-chaînes est complexe et pourrait représenter pour la cellule un challenge difficile à surmonter. En effet, la réparation de ces lésions requiert la formation d'une CDB de part et d'autre du pontage avec perte de l'information de séquence avant que cette rupture double-chaîne ne soit prise en charge par les systèmes de réparation classique des CDB.

I-2-2-e. Les dommages multiples localisés

(Locally Multiply Damaged Sites, LMDS)

Le concept de LMDS est issu de la microdosimétrie. Il est basé sur les modèles microdosimétriques décrivant le dépôt d'énergie des électrons en fin de parcours. Dans le modèle théorique en vigueur, les LMDS sont constituées par l'accumulation (*clusters*) de dommages localisés sur un fragment d'ADN de 10 à 20 paires de bases et pouvant contenir la plupart des lésions de l'ADN décrites précédemment : dommages de bases, CSB, CDB. Les LMDS peuvent être induits à partir d'une seule trace de particule en interaction avec l'ADN. La microdosimétrie prévoit que la fréquence de ce phénomène doit augmenter avec le TEL du rayonnement incident (21, 22). La mise en évidence de ces lésions est très indirecte. La méthode la plus répandue, bien que non exempte d'artefacts et susceptible de conduire à une sur-estimation de l'incidence des lésions, fait appel à la transformation des "clusters" de lésions en CDB sous l'action de nucléases (23). En définitive, les LMDS, si elles existent, seraient caractéristiques des RI car elles ne seraient pas formés

spontanément dans le cours du métabolisme oxydatif ni en réponse à une exposition aux UV (24, 25).

I-2-3. Les effets des RI au niveau cellulaire

Nous avons vu précédemment que les radiations ionisantes engendrent une grande diversité de lésions dans l'ensemble des compartiments subcellulaires, celles qui affectent l'ADN étant les plus importantes. La réponse des cellules à ces dommages se traduit par :

- l'apparition d'un stress oxydatif et une chute du potentiel redox mitochondrial ;
- l'activation de voies de signalisation modifiant l'expression des gènes ou la phosphorylation d'un grand nombre de protéines ;
- une altération du cycle cellulaire ;
- des mutations et des aberrations chromosomiques, souvent une aneuploïdie ;
- une modification du phénotype ;
- la mort cellulaire (mort clonogénique) ou perte de la capacité proliférative, qui constitue l'effet recherché pour la stérilisation des tumeurs en radiothérapie.

L'ampleur de ces diverses manifestations dépend de la dose de rayonnement absorbée par les cellules cibles, et leurs effets sont échelonnés dans le temps (Figure 4). On peut ainsi distinguer :

- la reconnaissance précoce des dommages (quelques secondes) ;
- la signalisation (quelques minutes) et la réparation des lésions (quelques dizaines de minutes) ;
- l'induction, ou la répression de l'expression de certains gènes (quelques heures) ;
- la mort cellulaire (quelques heures à quelques jours) ;
- l'instabilité génomique (quelques jours à plusieurs années).

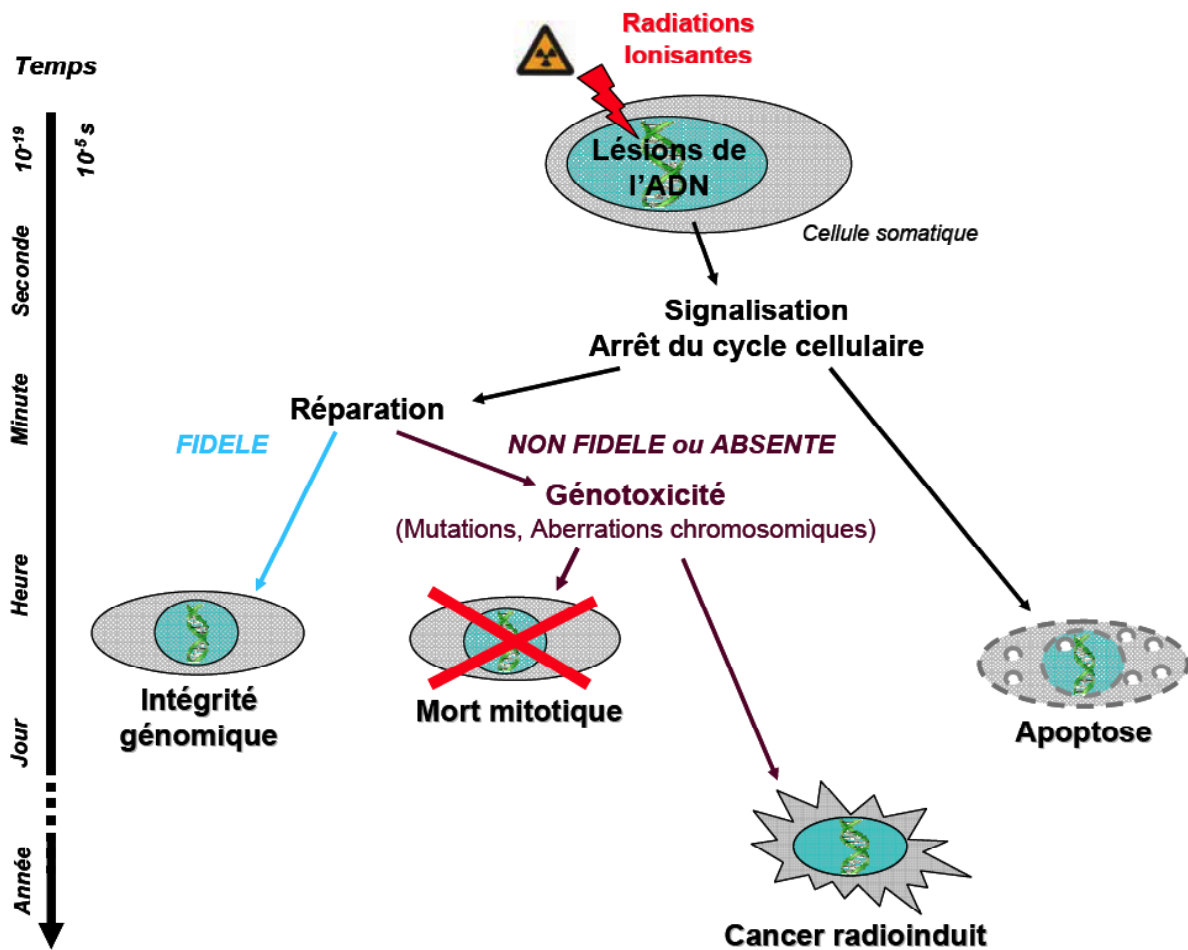


Figure 4

Schéma de l'effet des RI sur les cellules. Si la nature et le taux des dommages sont compatibles avec une réparation fidèle, la cellule peut restaurer l'intégrité de son génome. Lorsque la nature et le taux de dommages radio-induits dépassent les capacités de réparation, la cellule s'oriente vers la mort cellulaire (apoptose, mort mitotique, sénescence). Une réparation infidèle peut permettre la survie mais être à l'origine de mutations ou de remaniements pouvant évoluer à long terme vers des cancers radioinduits.

Les tests clonogéniques *in vitro*, qui mesurent la survie des cellules au rayonnement, ont été établis vers le milieu des années 1950. Ils ont permis de décrire la réponse au rayonnement des cellules saines et tumorales, et de mettre en évidence des différences de radiosensibilité d'une lignée cellulaire à l'autre. Ces observations sont à l'origine de la radiobiologie quantitative et ont donné naissance à la notion de radiosensibilité intrinsèque, définie comme la probabilité de mort cellulaire par unité de dose. Parallèlement, la caractérisation de mutants de radiosensibilité chez les levures et les rongeurs, l'identification chez l'homme de maladies génétiques caractérisées par un syndrome d'hyper-radiosensibilité, et l'analyse du devenir des lésions radio-induites de l'ADN ont fait émerger le concept de réparation et permis

d'en comprendre les mécanismes. La radiosensibilité des cellules dépend de leur équipement génétique et d'un certain nombre de facteurs comme la pression partielle d'oxygène ou la phase du cycle cellulaire, la phase S étant la plus radorésistante en raison des capacités de réparation qui y sont exprimées.

Il existe cinq modes de mort cellulaire. Dans les lignées épithéliales, en particulier dans les lignées tumorales où l'expression de la protéine p53 est perdue, la mort mitotique est le mécanisme prépondérant. Celle-ci peut revêtir des aspects très divers, dont les principaux sont l'oncose (nécrose), la formation et l'éjection (exocytose) de micro-noyaux et la mort cellulaire différée. La mort mitotique s'exprime lors d'une tentative de passage en mitose. L'irradiation des cellules peut également induire l'apoptose, ou mort cellulaire programmée. La sénescence, observée chez les fibroblastes irradiés, doit aussi être considérée comme un mécanisme de mort cellulaire programmée. Il faut mettre à part le phénomène de mort immédiate et l'autophagie. La proportion des différents modes de mort cellulaire est fonction de la dose de rayonnement et de l'expression de certains gènes. Elle dépend au premier chef de l'intégrité de la protéine p53, dont le rôle est décisif dans l'induction de l'apoptose radio-induite. Toutefois, il n'y a pas de corrélation entre l'aptitude à entrer en apoptose et la radiocurabilité des tumeurs (26).

I-3. Les différents systèmes de réparation de l'ADN

La cellule eucaryote a développé au cours de l'évolution des mécanismes de réparation spécifiques de chaque type de lésion de l'ADN (27). Les principaux mécanismes de réparation sont au nombre de cinq :

- réparation par excision de base (*Base Excision Repair*, BER),
- réparation par excision de nucléotide (*Nucleotide Excision Repair*, NER),
- réparation des mésappariements de bases (*Mismatch Repair*),
- réparation des CDB par suture non-homologue (*Non Homologous End-Joining*, NHEJ),
- réparation des CDB par recombinaison homologue (RH).

La réparation permise par ces différents mécanismes peut-être fidèle, c'est-à-dire qu'elle restaure parfaitement la séquence d'ADN originelle, soit infidèle, c'est-à-dire qu'une partie de la séquence nucléotidique aura perdu une partie de son information, ou que la nouvelle séquence synthétisée diffèrera de la séquence avant lésion. Les principales caractéristiques des différentes voies de réparation sont résumées dans le Tableau 2.

Voie de réparation	Lésions induites par	Types de lésions réparées	Fidélité de la réparation
Excision de base (BER)	Radiations ionisantes Espèces activées de l'oxygène Agents alkylants	Dommages de base Sites abasiques CSB	Fidèle
Excision de nucléotide (NER)	CisPlatine Rayons UV Mitomycine C	Pontages Adduits Dimères de pyrimidine	Fidèle
Réparation des mésappariements (MMR)	Erreurs de réplication CisPlatine Agents alkylants	Bases mésappariées Insertion Délétion	Fidèle
Suture non-homologue (NHEJ)	Radiations ionisantes Enes-diynes Bléomycine Poisons de topoisomérase I & II	CDB	Majoritairement infidèle
Recombinaison Homologue (RH)	Radiations ionisantes Enes-diynes Bléomycine Poisons de topoisomérase I & II	CDB	Majoritairement fidèle

Tableau 2

Principales caractéristiques des mécanismes de réparation de l'ADN hors synthèse translésionnelle. La liste des inducteurs de lésions n'est pas exhaustive.

Il faut noter que plusieurs syndromes de prédisposition aux cancers sont liés à la perte de fonction ou à la délétion de gènes de réparation. Ces défauts de réparation sont également responsables de réactions aiguës d'hypersensibilité aux RI. L'inactivation de ces voies au moyen d'inhibiteurs appropriés peut potentialiser la réponse aux agents cytotoxiques, mais il n'est pas certain qu'elle puisse être utilisée chez les patients sans augmentation importante de la toxicité conduisant à l'échec des traitements (28).

I-3-1. La réparation par excision de base (BER)

Le BER prend en charge la réparation des dommages de base comme la 8oxo-dG, les sites abasiques et les CSB.

Trois cas de figures peuvent être envisagés pour le BER :

- Une CSB est formée en réponse à une attaque radicalaire. Dans ce cas la brèche est reliquée directement par le système de réparation des CSB (*Single-Strand Break Repair*, SSB, voir § I-3-1-b).

- La lésion est de type base oxydée ou alkylée. La base doit, dans un premier temps, être excisée par une ADN-glycosylase. La liaison sucre-phosphate sera ensuite clivée sous l'action d'une endonucléase formant ainsi une CSB. Le SSB se chargera alors de réparer la CSB néo-formée.

- La lésion est un site abasique. Ce dommage ne nécessite pas la reconnaissance par une ADN-glycosylase. Le squelette sucre-phosphate est clivé directement par la protéine APE1 (A-Purique/Pyrimidique endonucléase 1) générant une CSB réparée par le SSB.

I-3-1-a. Formation de la brèche simple-brin

Les ADN glycosylases initient le processus de BER en catalysant l'hydrolyse de la liaison N-glycosydique entre la base endommagée et le squelette sucre-phosphate. La formation du site abasique est suivie d'un clivage de la molécule d'ADN pour générer une CSB. Ce clivage est réalisé par les enzymes appelés AP endonucléases.

I-3-1-b. Détection de la CSB

La cassure simple-brin étant réalisée, directement par les RI ou indirectement, la cellule entre dans le processus de SSB. Immédiatement après la génération d'une CSB, la brèche est détectée par la protéine PARP-1 (29). PARP-1 possède deux motifs en doigts de zinc qui lui confèrent une très forte affinité pour les brèches formées dans l'ADN qu'elle est vraisemblablement la première à occuper. Les molécules de PARP-1 au niveau de la cassure provoquent une courbure de l'ADN. PARP-1 s'homodimérise, ce qui permet son automodification grâce à son site catalytique qui synthétise des longues chaînes de polymères d'ADP-ribose (PAR) à partir de molécules de NAD⁺. L'ensemble du processus a trois conséquences majeures sur le SSB (30):

- une modification de la structure de la chromatine autour du site de la cassure grâce à une poly(ADP-ribosyl)ation des résidus d'histones H1 et H2B (31). Cette modification produit une relaxation de la fibre chromatinienne qui est censée faciliter l'accès des autres protéines de réparation au site de la cassure.

- un signalement à la cellule de la présence du dommage ainsi que son étendue. Ces signaux permettent à la cellule d'établir une réponse adaptée à la gravité de la lésion : réparation ou mort cellulaire.
- un recrutement des facteurs du BER/SSBR, soit par affinité de ces derniers pour les chaînes de poly(ADP-ribose) synthétisées par PARP-1, soit par poly(ADP-ribosyl)ation de protéines acceptrices dans une réaction dite d'hétéromodification.

Les chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR) sont chargées négativement. Leur accumulation a donc pour effet de diminuer l'affinité de la protéine envers la molécule d'ADN par répulsion électrostatique, l'ADN étant lui-même chargé négativement. PARP-1 se dissocie alors du complexe de BER. Les PAR sont ensuite dégradés par l'enzyme poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). PARP-1 se trouve alors de nouveau disponible pour intervenir sur un autre site de cassure.

I-3-1-c. Coordination du BER

La protéine XRCC1 (*X-ray cross complementing protein 1*) est recrutée très rapidement au niveau de la CSB par les chaînes de PAR greffées sur la protéine PARP-1 lors de son automodification. Une fois recrutée sur la CSB, XRCC1 interagit et stimule des composants du SSBR impliqués aussi bien dans le traitement des extrémités de la CSB, l'incorporation de nucléotides sur le site de la brèche et la ligation.

I-3-1-d. Traitement des extrémités de la CSB

Dans la plupart des cas, les extrémités 5' et 3' de la brèche doivent subir un remaniement pour permettre la synthèse des nucléotides manquants par les ADN polymérases. Cette synthèse exige des extrémités 3'-OH et 5'-P. L'hétérogénéité des terminaisons générées par les ADN-glycosylases explique l'existence d'une grande variété d'enzymes à ce stade du BER. Cependant, dans la très grande majorité des cas on retrouve deux cas de figures qui font intervenir les enzymes suivantes :

- les CSB possédant des extrémités 5'-OH et 3'-P sont prises en charge par la polynucléotide kinase (PNK).
- les CSB issues du clivage d'un site abasique par l'endonucléase APE1 présentent des extrémités 3'-OH et 5'-déoxyribose phosphate. Elles sont remaniées par l'ADN polymérase β (Pol β) pour former des extrémités 3'-OH et 5'-P.

I-3-1-e. Synthèse et ligation de l'ADN

Deux mécanismes peuvent être mis en œuvre pour l'incorporation dans la séquence d'ADN du nucléotide manquant ou de la séquence éliminée lors du remaniement de la brèche : le *short patch repair* (SPR) et le *long patch repair* (LPR). On pense que c'est la taille de la brèche qui détermine laquelle de ces deux voies est sollicitée. Le SPR prend en charge la réparation lorsque la brèche est limitée à un seul nucléotide à incorporer (voie majoritaire). Le LPR intervient pour des lésions allant de 2 à 15 nucléotides (voie minoritaire). Ces deux voies utilisent des enzymes (polymérases, ligases) et des partenaires différents (Figure 5).

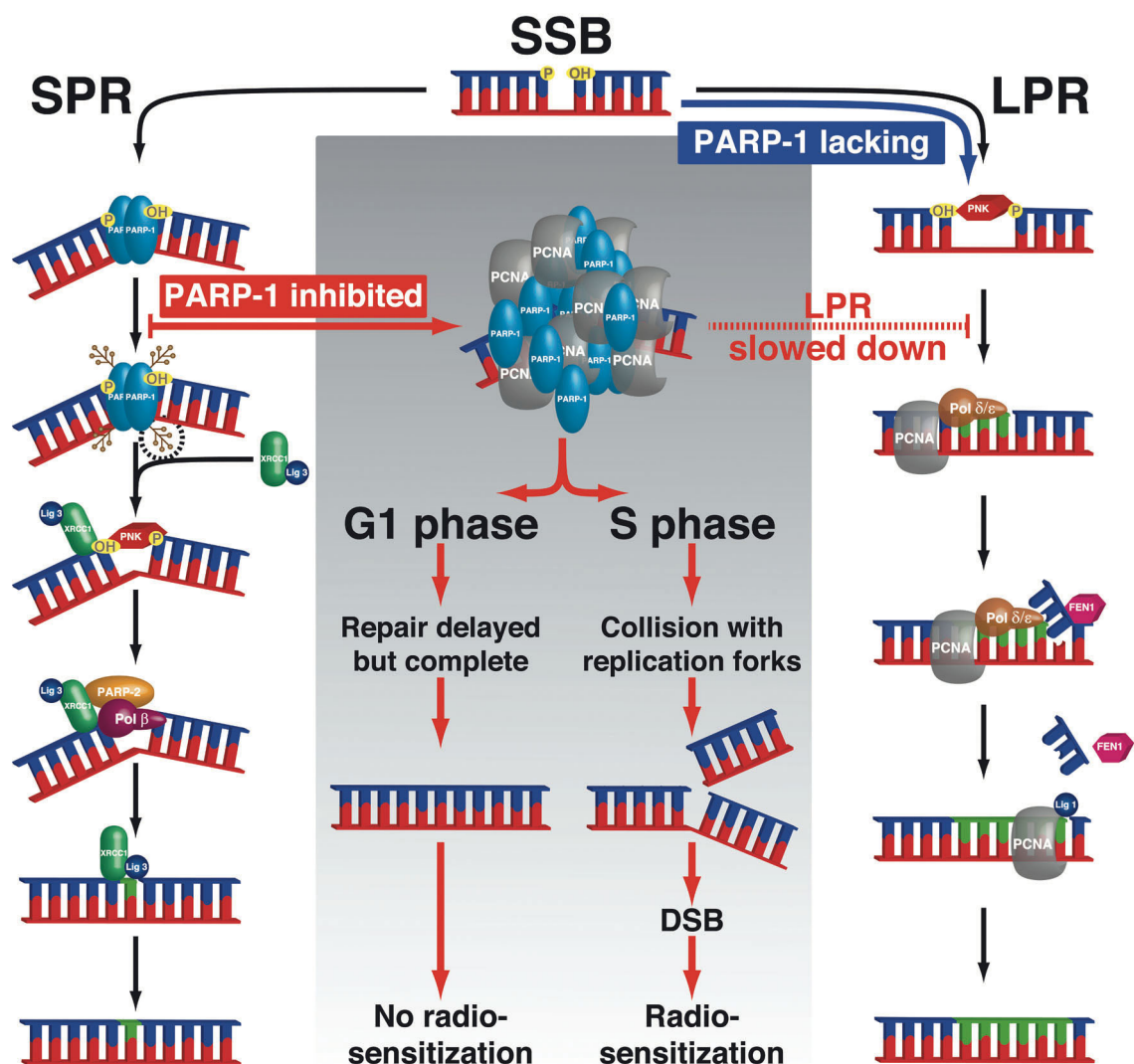


Figure 5
Mécanismes de réparation par excision de base (BER) : voies du short patch (SPR) et du long patch repair (LPR) (d'après Godon et al. (30)).

I-3-2. La réparation par excision de nucléotide (NER)

Le NER prend en charge principalement la réparation des dommages à fort encombrement stérique pouvant être responsables de distorsions de l'ADN, comme les adduits, les pontages et plus particulièrement les photoproduits et les dimères de pyrimidine induits par irradiation UV (15-17).

La réparation par excision de nucléotides se décompose en deux voies, selon le mode de détection du dommage (Figure 6) :

- si la lésion est située dans un domaine non transcrit de l'ADN, le traitement de la lésion emprunte la voie dite de réparation globale du génome (*Global Genomic Repair*, GGR).
- si la lésion est située sur un brin d'ADN transcrit, la réparation sera alors couplée à la transcription (*Transcription-Coupled Repair*, TCR).

Un défaut dans les voies du NER se traduit par un syndrome d'hypersensibilité aux UV. Dans la majorité des cas, ces maladies héréditaires sont autosomales récessives et sont issues de mutations dans des gènes codant des protéines impliquées dans cette voie de réparation. L'exemple le mieux connu est le *Xeroderma pigmentosum* (XP). Exposés à la lumière du jour, les patients atteints de cette maladie développent très précocément (vers l'âge de 8-9 ans) des tumeurs cutanées. Leur espérance de vie est d'environ 40 ans. On peut également citer comme autres exemples le syndrome de Cockayne (CS) ou la trichothiodystrophie (TTD). L'étude de ces pathologies a permis de déterminer les protéines intervenant dans le NER (32).

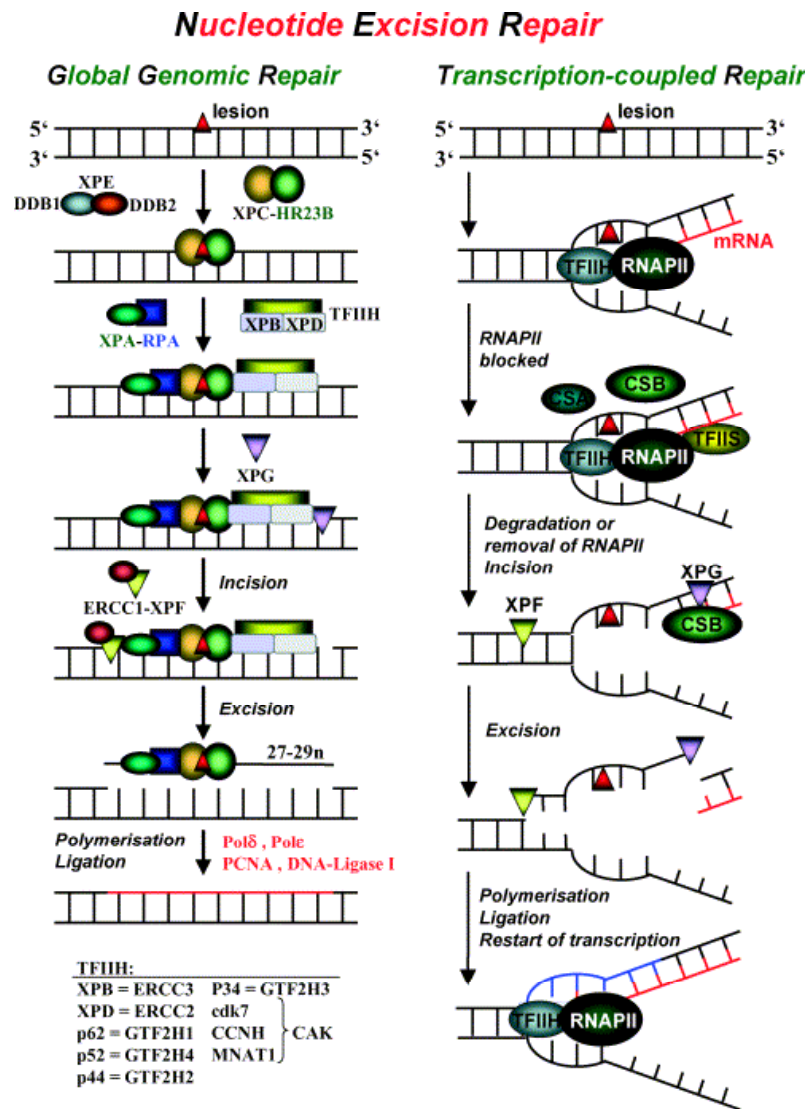


Figure 6
Mécanismes de réparation par excision de nucléotides : réparation globale du génome et réparation couplé à la transcription (d'après Christmann *et al.* (33)).

I-3-2-a. La réparation globale du génome (GGR)

Lors de la réparation par GGR, le dommage est reconnu par trois complexes. Le premier implique XPC, principal initiateur de la réparation par GGR. Le deuxième complexe est composé des protéines XPE-DDB1-DDB2 (*damaged DNA binding protein 1 et 2*). Le troisième est formé par les protéines XPA et RPA (*replication protein A*).

Le facteur TFIIH est ensuite recruté au niveau de la lésion par le complexe XPC-HR23B-centrine 2. Grâce aux activités hélicases 3'→5' et 5'→3' des protéines XPB et XPD, respectivement, TFIIH déroule l'ADN autour de la lésion. Une autre sous-unité de TFIIH, TTD-A, régule le complexe et stimule l'activité ATPase de XPB, aidant ainsi à l'ouverture de l'hélice d'ADN. Le fragment nucléotidique est ainsi rendu accessible aux nucléases XPG (incision en 3') et XPF associé à ERCC1 (incision

en 5'). Il en résulte une incision d'un oligonucléotide d'une taille relativement constante de 27 à 29 nucléotides.

Après excision du fragment, les polymérases δ/ϵ , associées au PCNA, synthétisent la trentaine de nucléotides manquants en prenant comme matrice le brin non endommagé. Les deux extrémités de la cassure sont enfin liguées par l'ADN ligase I, marquant ainsi la fin du mécanisme de GGR.

I-3-2-b. La réparation couplée à la transcription (TCR)

La réparation par TCR intervient lorsque le complexe de transcription de l'ADN en ARN se trouve confronté à un dommage important. L'enzyme ARN-polymérase II se trouve alors bloquée sur le brin transcrit et recule d'une vingtaine de nucléotides afin de permettre le recrutement des protéines CSA, CSB (*Cockayne syndrome protein A, B*) et du complexe TFIIH. Les deux premières protéines permettent à leur tour le recrutement des effecteurs suivants du TCR en modifiant la structure de la chromatine. L'activité hélicase du complexe TFIIH entraîne le déroulement de la double hélice d'ADN autour du dommage photo-induit, permettant ainsi son incision. Le facteur d'élongation de la transcription TFIIIS stimule pour sa part l'activité de clivage du transcrit de l'ARN polymérase II arrêtée par une photolésion. L'ARN-polymérase II quitte alors le site de dommage et est dégradée. Les nucléases XPG puis XPF (associé à ERCC1) interviennent ensuite pour cliver le fragment d'ADN contenant la lésion. Celui-ci est remplacé par un fragment synthétisé par les polymérases δ/ϵ , associées à PCNA. La ligation des deux extrémités est effectuée par la ligase I. La transcription peut alors reprendre par le recrutement d'une ARN-polymérase II se substituant à celle qui avait été dégradée lors de la reconnaissance du dommage.

I-3-3. La réparation des mésappariements de bases (MMR)

Le MMR intervient pour réparer les mésappariements de base qui sont générés lors de la synthèse de l'ADN par les polymérases répliquatives telles que δ ou ϵ (34). Cependant, le MMR peut également intervenir en cas de modification des bases (méthylation, oxydation).

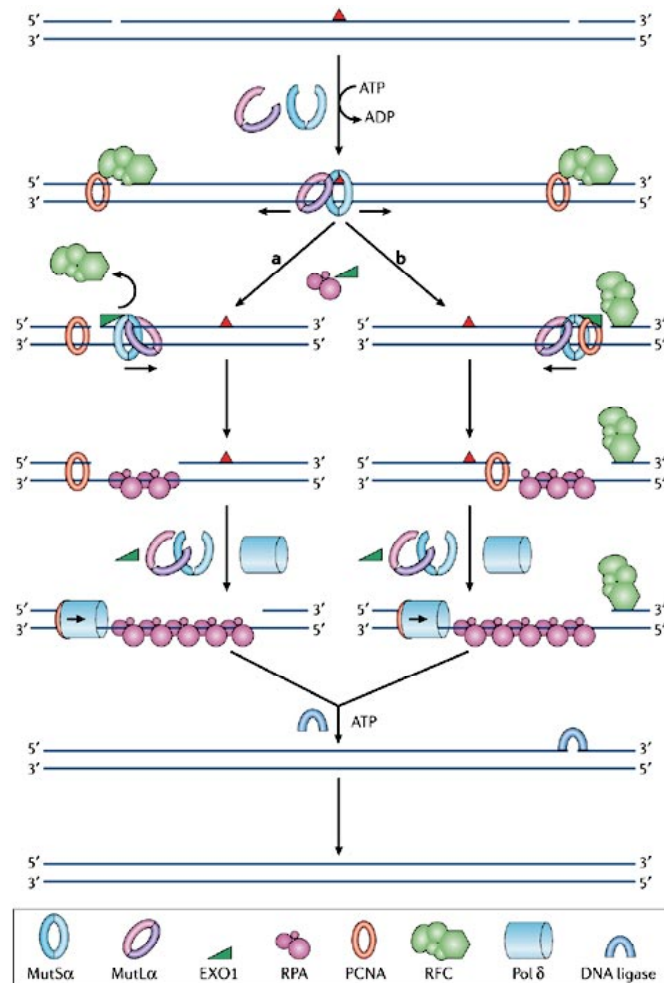


Figure 7
Mécanismes de réparation de mésappariements de bases (d'après Jiricny *et al.* (34)).

Le mésappariement est reconnu par le complexe MutS α , composé des protéines hMSH2 et hMSH6 (*human MutS homologous protein*). MutS α forme une pince autour de l'ADN, ce qui lui permet de venir se fixer au niveau de la distorsion créée par le mésappariement (Figure 7). L'hydrolyse de l'ATP par MutS α provoque un changement de la conformation de l'ADN et permet la fixation de MutL α , un hétérodimère formé des protéines hMLH1 (*human MutL homologous mismatch repair protein 1*) et PMS2.

Si le complexe réplcatif est situé en 5' du mésappariement, MutS α et MutL α peuvent glisser en amont jusqu'au PCNA, et ainsi déloger RFC et recruter l'exonucléase 1 (EXO1). Celle-ci dégrade alors le brin contenant le mésappariement dans le sens 5'→3'. L'ADN simple brin ainsi formé est protégé des nucléases par les protéines RPA. Il sert de matrice à la synthèse des bases manquantes par l'ADN polymérase δ à partir de l'extrémité 3'. L'ADN ligase I viendra enfin effectuer la ligation de l'oligonucléotide néosynthétisé.

Si le complexe répliatif est situé en aval du mésappariement, les complexes MutS α et MutL α coulisent jusqu'au PCNA et recrutent également EXO1, tout en maintenant RFC sur le site de dommage pour éviter une dégradation de l'ADN. Après excision du mésappariement par EXO1, l'ADN polymérase δ synthétise les nucléotides manquants à partir de l'extrémité 3' de la brèche formée, et stabilisée par les protéines RPA, avant ligation par l'ADN ligase I.

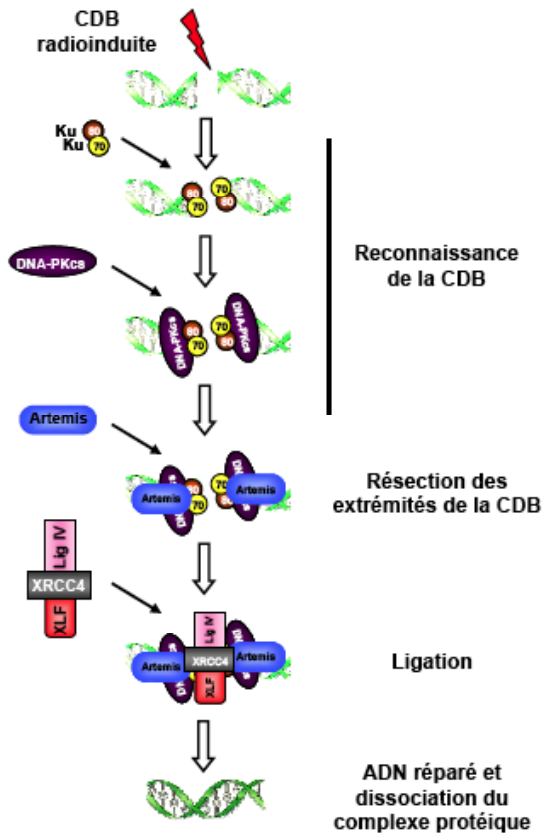
Des mutations dans les gènes codant les protéines hMLH1, hMSH2 et hMSH6 créent des défauts du MMR. Ces défauts sont à l'origine de cancers colorectaux sans polypes.

I-3-4. La réparation des cassures double-brin de l'ADN (CDB)

Chaque jour survient 8 CDB dites spontanées. Ces cassures sont la conséquence d'erreurs qui se produisent au cours de la réplication, par exemple par collision de CSB non réparées avec les fourches de réplication, ou lors d'un dysfonctionnement du mécanisme enzymatique des endonucléases ou des topoisomérases. Elles sont également induites par les RI (environ 40 CDB par Gy dans une cellule diploïde) ou par des drogues antitumorales telles que la bléomycine, les ène-diynes (néocarzinostatine) et les poisons de topoisomérase I (camptothécine et dérivés) ou II (étoposide). Une CDB non réparée se transforme en cassure chromosomique, recombinoène et hautement toxique pour la cellule. Les cellules de mammifères possèdent deux mécanismes principaux pour la réparation des CDB, la suture non-homologue des extrémités clivées (*Non Homologous End Joining, NHEJ*) et la réparation par recombinaison homologue (RH).

I-3-4-a. La réparation des CDB par suture non-homologue (NHEJ)

Le NHEJ est le mécanisme de réparation des CDB majoritaire dans les cellules humaines. Il peut intervenir tout au long du cycle cellulaire, ce qui n'est pas le cas de la recombinaison homologue. Le NHEJ nécessite le complexe DNA-PK.

**Figure 8****Réparation des CDB par suture non-homologue**

Les ruptures double-chaîne sont détectées par les protéines Ku qui s'y fixent et recrutent la sous-unité DNA-PKcs. Après résection des extrémités par la protéine Artemis, la CDB est reliquée par l'ADN ligase IV associée à XRCC4 et XLS.

La reconnaissance de la CDB est assurée par le complexe DNA-PK. Celui-ci se compose de l'hétérodimère Ku70/Ku80 et de la protéine DNA-PKcs (*DNA-PK catalytic subunit*). Le complexe recrute la nucléase Artemis, activée par les kinases ATM et DNA-PK. Artemis provoque la résection des oligonucléotides simple-brin situés aux extrémités de la brèche double-brin. Les extrémités résultantes sont reliquées par l'ADN ligase IV associée aux protéines XRCC4 et XLF (XRCC4-Like Factor). L'étape de résection effectuée par Artemis est nécessaire au remodelage précédant la suture mais implique une perte d'information génétique. C'est pourquoi le mécanisme de réparation NHEJ est généralement infidèle.

Le NHEJ joue un rôle important dans la formation des clones qui constituent le répertoire d'antigènes. Ce répertoire est établi par le système V(D)J de réarrangement des gènes V (*Variable*), D (*Diversity*) et J (*Joining*) codant les immunoglobulines. Le système V(D)J est un mécanisme de formation de coupure et de religation d'ADN double-brin permettant le réarrangement des exons codant les parties variables des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T. Des mutations dans des gènes codant des protéines impliquées dans le NHEJ (notamment Artemis et Ligase IV) sont responsables d'importants déficits immunitaires et prédisposent à l'apparition de lymphomes et de leucémies (35).

I-3-4-b. La réparation des CDB par recombinaison homologue (RH)

Le second mécanisme de réparation des CDB est la recombinaison homologue. Cette voie de réparation est dite fidèle car la séquence d'ADN lésée est resynthétisée à partir de la chromatide sœur ou du chromosome homologue. La RH se produit uniquement dans les phases du cycle cellulaire où la chromatine peut être remaniée pour rapprocher les chromosomes homologues, c'est à dire durant la phase S et en phase G2.

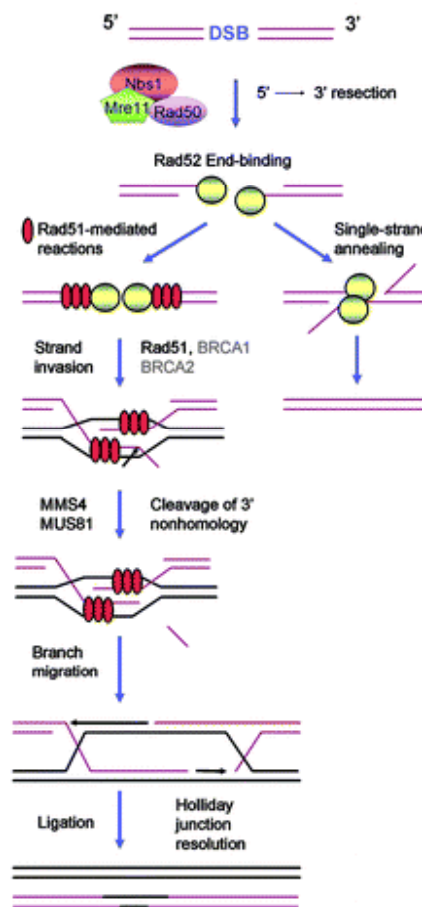


Figure 9
Réparation des CDB par recombinaison homologue et single strand annealing (d'après Sancar *et al.* (36)).

La reconnaissance de la CDB est assurée par le complexe MRN (Mre11-RAD50-NBS1) (Figure 9). L'activité nucléase de Mre11 effectue la résection des extrémités de la CDB de 5' vers 3'. Les protéines RPA et Rad52 viennent alors se fixer sur les extrémités 3' sortantes afin d'éviter leur dégradation par les exonucléases et pour permettre le recrutement de la protéine RAD51, acteur principal de la RH. Rad52 a ainsi une fonction équivalente à celle des protéines Ku70/Ku80 dans le NHEJ, c'est-à-dire la protection des extrémités et le recrutement des différents

partenaires. La protéine RAD51, sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2, va ensuite rechercher les séquences homologues sur la chromatide sœur appariée après une invasion de brins par synthèse de nucléofilaments. Cette invasion des brins endommagés dans les brins de la chromatide sœur appariée forme une structure appelée jonction de Holliday. Ces jonctions sont résolues par des endonucléases qui reconnaissent ces structures spécifiques. La séquence d'ADN lésée est alors synthétisée par les polymérases en prenant comme matrice la séquence homologue intacte sur la chromatide sœur. La polymérase responsable de cette synthèse serait la polymérase η , mais il semble que les polymérases répliquatives puissent également accomplir cette fonction. Une fois cette étape achevée, les extrémités franches formées peuvent être liguées.

La réparation par RH est fidèle et permet de conserver l'intégrité du génome. C'est pourquoi des mutations hétérozygotes affectant les gènes *Brca1* et *Brca2* constituent un facteur de prédisposition aux cancers du sein ou des ovaires. En effet, si des cellules deviennent homozygotes pour la mutation de ces gènes accompagnée de la perte/diminution de fonction des protéines BRCA1/2, il en résulte une RH inefficace qui peut alors devenir infidèle et être à l'origine de processus de cancérogenèse.

II. Les associations chimioradiothérapies

Pour de nombreuses tumeurs, la chimioradiothérapie est devenue le traitement de référence. Cependant, une augmentation des toxicités est très souvent rapportée.

En 1979, Steel a rapporté les justifications théoriques des associations entre radiothérapie et cytotoxiques (37). Elles peuvent se résumer ainsi :

- coopération spatiale : l'effet systémique de la chimiothérapie sur une maladie potentiellement micrométastatique s'allie à l'effet local de la radiothérapie ;
- additivité : si l'on considère les deux agents A et B, chacun ayant une efficacité définie quand administré isolément, on considère que l'association est additive quand $\text{effet A+B} = \text{effet A} + \text{effet B}$;
- supra-additivité : l'association est dite supra-additive quand $\text{effet A+B} > \text{effet A} + \text{effet B}$, du fait d'une interaction entre les deux agents.

De multiples mécanismes d'interactions ont été décrits. Même si le concept de supra-additivité est séduisant, il est probable que la plupart des bénéfices observés en clinique soient dus à la simple additivité des effets ou à la coopération spatiale.

II-1. Mécanismes d'interactions moléculaires

II-1-1. Modifications des lésions radio-induites

De nombreux agents cytotoxiques ont pour cible l'ADN, créant des CSB ou des CDB. Le cisplatine, par exemple, crée des adduits en se fixant sur des résidus guanines avec création de ponts inter ou intrabrans. Deux systèmes de réparation sont impliqués dans la prise en charge de ces adduits : le système de l'*excision repair* (NER) qui va conduire à l'ablation de ces adduits, et la recombinaison homologue qui est nécessaire pour une reconstruction précise de la portion d'ADN enlevée en même temps que l'adduit (38). La présence d'adduits de cisplatine à proximité de CSB provoquées par l'irradiation va modifier les capacités de réparation de ces CSB et transformer ainsi une lésion aisément réparable (la CSB ou l'adduit de cisplatine) en lésion irréparable (le couple CSB + adduit de cisplatine). Ce modèle est supporté par le calcul des probabilités d'interactions stériques entre adduits de cisplatine et CSB radio-induites et par des données expérimentales (39) (40). Cependant, d'autres mécanismes sont probablement en cause dans l'interaction cisplatine-irradiation, en particulier une inhibition de la réparation des lésions radio-induites : les adduits de

cisplatine modifieraient la capacité de fixation des protéines Ku sur l'ADN et diminueraient l'efficacité du système NHEJ (41, 42). Ce phénomène expliquerait pourquoi l'interaction est supra-additive.

L'étoposide est un poison de topo-isomérase II α . Il agit par stabilisation des complexes clivables, intermédiaires du processus enzymatique, ce qui conduit à la création de CDB, particulièrement dans la phase S du cycle cellulaire (43). En association avec l'irradiation, il donne lieu à une interaction supra-additive corrélée à une augmentation de l'incidence des CDB (44, 45).

II-1-2. Inhibition de la réparation des lésions radio-induites

La réparation des lésions radio-induites est actuellement considérée comme le principal déterminant du devenir des tissus sains après irradiation. L'utilisation de puissants inhibiteurs de cette réparation en combinaison avec l'irradiation risque par conséquent d'entraîner une toxicité tardive très importante. Comme plusieurs autres enzymes impliquées dans la réparation, DNA-PKcs possède un domaine catalytique homologue à celui de la PI3K. La DNA-PKcs peut ainsi être inhibée par les inhibiteurs de PI3K, tels la wortmannine (46). *In vitro*, la wortmannine n'est pas cytotoxique en elle-même, cependant elle entraîne une importante radiosensibilisation. L'utilisation de ces inhibiteurs en association à la radiothérapie paraît délicate. En revanche, des inhibiteurs plus spécifiques de la cascade PI3K-PDK1-PKC ζ pourraient être utiles pour potentialiser très spécifiquement la réponse aux poisons de topoisomérase II α sans interférer avec la voie du NHEJ (47).

La synthèse de l'ADN et sa réparation relèvent de processus identiques. En pratique, les médicaments qui affectent le métabolisme des nucléosides ou des nucléotides sont les agents qui sont les plus efficaces et les plus largement utilisés en clinique, en particulier les fluoropyrimidines. La cytotoxicité observée avec le 5-fluorouracile (5-FU) est complexe, faisant intervenir plusieurs processus (48, 49). Il s'incorpore dans l'ARN, l'ADN et inhibe la thymidylate-synthase (TS). Celle-ci catalyse la réduction de la déoxyuridine monophosphate (dUMP) en déoxythymidine monophosphate (dTMP). Cette réaction est la seule source *de novo* de thymidylate qui est nécessaire pour la réplication et la réparation de l'ADN. La déplétion en dTMP induit une déplétion en déoxythymidine triphosphate (dTMT) et une accumulation de dUMP qui se transforme en dUTP. Le dUTP peut s'incorporer dans l'ADN mais la réparation devient inefficace aboutissant à des cycles de réparation futiles et, à terme, à des cassures de l'ADN et à la mort cellulaire. Le 5-FU

est bien connu pour ses propriétés radiosensibilisatrices. Plusieurs mécanismes expliquent son pouvoir radiosensibilisateur :

- l'inhibition de la réparation des lésions radio-induites est impliquée, en diminuant le pool de dTMT. Ainsi l'addition de thymidine dans le milieu de culture atténue la radiosensibilisation (50).

- cette radiosensibilisation dépend de la quantité de 5-FU incorporée dans l'ADN ; la progression inappropriée en phase S en présence de la substance fixée à l'ADN semble être un évènement important (51-53).

- l'irradiation augmente la captation tumorale du 5-FU, probablement en augmentant le débit sanguin (54).

La radiosensibilisation apparaît maximale quand l'exposition à la drogue est prolongée avant et après irradiation, d'où l'administration en perfusion continue.

La gemcitabine est un analogue pyrimidique efficace dans de nombreuses tumeurs solides. Comme le 5-FU, elle déplete le pool de déoxynucléosides triphosphates par inhibition de la ribonucléotide réductase et s'incorpore dans l'ADN. Cette déplétion en déoxyribonucléotides contribue pour une large part à la radiosensibilisation bien qu'aucune augmentation du nombre de cassures de l'ADN n'ait pu être mise en évidence en électrophorèse en champ pulsé (55, 56). C'est essentiellement la diminution du pool de dATP qui est incriminée dans la radiosensibilisation. Une facilitation de l'apoptose radio-induite est également en cause (57). En clinique, des toxicités majeures ont été observées quand la gemcitabine est utilisée à doses usuelles en concomitant avec l'irradiation. Elle ne peut être utilisée en association avec la radiothérapie que dans le cadre d'essais thérapeutiques.

II-2. Mécanismes d'interactions cellulaires

II-2-1. Coopération cytotocinétique

On sait depuis longtemps que la radiosensibilité est variable selon les phases du cycle cellulaire et que la phase S est la plus radiorésistante (58). De ce fait, l'association d'agents cytotoxiques spécifiques de la phase S concomitamment à une irradiation produit une augmentation importante de la pente initiale des courbes de survie au rayonnement. C'est le cas de la camptothécine et de ses dérivés, poisons des topo-isomérases I. L'analyse des modalités de l'interaction montre qu'il s'agit d'une additivité de type II et non d'un effet radiosensibilisateur (59).

II-2-2. (Pseudo) synchronisation

L'opinion a longtemps prévalu que les cellules présentent un pic de radiosensibilité durant la phase G2/M du cycle cellulaire. C'est vrai dans les cellules de rongeurs (58), mais pas dans les cellules humaines où le maximum de radiosensibilité se trouve plus souvent en G1 (V. Favaudon, communication personnelle). Ce fait explique que les drogues provoquant une accumulation en prométaphase, tels les poisons du fuseau ou les taxanes, n'induisent pas d'effet radiosensibilisateur (60). Un effet radioprotecteur des taxanes a même été décrit *in vitro* (61). L'association taxanes-radiothérapie représente pourtant un bénéfice en clinique. Ce bénéfice pourrait être lié à la réoxygénation tumorale sous l'effet de la drogue (§ II-3-1).

La situation est complètement différente dans le cas de cellules qui s'accumulent en phase G2 à la suite d'une irradiation. Dans ce cas, en effet, les cellules présentent une hyper-radiosensibilité marquée que les auteurs ont attribuée à des remaniements de la chromatine liés à la mise en œuvre de la réparation par recombinaison homologe, exposant le génome à un excès de dommages létaux lors d'une ré-irradiation intervenant à ce moment (45).

La (pseudo)synchronisation cellulaire est relativement aisée à obtenir *in vitro*, cependant son utilité en clinique reste controversée. Son intérêt peut être discuté pour plusieurs raisons :

- un grand nombre de cellules au sein des tumeurs sont hors cycle, en G0 ;
- les cellules saines étant tout autant synchronisées que les cellules tumorales, l'index thérapeutique ne sera pas amélioré ;
- les cellules bloquées en G2/M par les drogues sont probablement celles qui sont amenées à mourir.

II-3. Mécanismes d'interactions tissulaires

II-3-1. Réoxygénation

Une réduction du volume tumoral après traitement peut améliorer la vascularisation tumorale, entraînant une réoxygénation et par conséquent une radiosensibilisation. Cela a été montré sur un modèle de tumeur traitée par paclitaxel

avant irradiation (62). La fraction des cellules hypoxiques était mesurée par des micro-électrodes placées dans la tumeur. La pression partielle en O₂ médiane était de 6,2 torrs avant l'administration de paclitaxel et augmentait à 10,5 et 31,2 torrs respectivement à 24 h et 48 h post-traitement. Cette réoxygénation était corrélée avec la radiosensibilisation, que les cellules soient en G₂/M ou non.

Une irradiation fractionnée, *via* une diminution du volume tumoral, peut également accroître le flux sanguin tumoral et faciliter l'accès des substances à la tumeur. Ainsi, il a été montré après irradiation une augmentation de la captation tumorale de certains cytotoxiques, comme le carboplatine et le 5-FU (63, 64).

Une autre méthode pour améliorer l'oxygénation tumorale est l'utilisation d'agents anti-angiogéniques. L'importance de l'angiogenèse dans le développement et la survie des cellules tumorales a été mise en évidence par les travaux princeps de Judah Folkman (65). En particulier, il a été le premier à montrer qu'une tumeur ne peut se développer *in vivo* au-delà d'un diamètre de 3 mm sans solliciter son lit vasculaire, ces 3 mm correspondant à la distance de diffusion passive des nutriments. Ces travaux ont montré l'existence d'une relation étroite entre le développement d'un réseau vasculaire péri- et intra-tumoral et la croissance de la tumeur. Le fait que la cellule endothéliale soit beaucoup plus stable génétiquement que les cellules tumorales -qui présentent par définition de nombreux remaniements génétiques- laisse penser que les agents anti-angiogéniques seraient plus largement applicables que les approches antitumorales ciblées. En effet, les agents anti-angiogéniques n'ont pas besoin d'être adaptés aux spécificités biologiques propres à chaque tumeur.

Les thérapeutiques ciblant la vascularisation tumorale sont actuellement l'objet de nombreuses études cliniques, y compris en association avec l'irradiation. De nombreux travaux ont suggéré que la cible de l'irradiation n'était pas seulement les cellules tumorales mais aussi les cellules de l'environnement péri-tumoral. En particulier, les travaux de Garcia-Barros *et al.* soulignent l'importance de l'apoptose des cellules endothéliales dans la radiocurabilité de tumeurs chez l'animal (66). Différents modèles tumoraux ont permis de montrer que la combinaison des agents antiangiogéniques à l'irradiation potentialise les effets des rayonnements ionisants. Cependant, l'usage concomitant des agents anti-angiogéniques et de l'irradiation semble aller à l'encontre des données classiques sur le rôle de l'hypoxie comme facteur majeur de radorésistance, puisque ces agents entraînent une baisse de la vascularisation tumorale et qu'on pourrait donc s'attendre à une baisse de la concentration tissulaire en oxygène. Cependant, des travaux ont montré que la pression partielle en O₂ peut au contraire augmenter après l'utilisation concomitante

d'anti-angiogéniques et d'irradiation (67). Pour se développer les tumeurs ont besoin de créer de nouveaux vaisseaux, cette transition angiogénique ou "angiogenic switch", est sous la dépendance de facteurs de régulation à la fois positive (VEGF et FGF, TGF α et β) et aussi sous celle de facteurs négatifs (angiostatine, endostatine, thrombospondine et interféron- α) (68). Un des facteurs de croissance majeur pour la cellule endothéliale est le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), facteur antiapoptotique pour les cellules endothéliales, sécrété par la majorité des tumeurs solides (69). L'expression de VEGF est induite par différents facteurs de croissance, notamment IGF1, IGF2, EGF et PDGF. L'hypoxie et les radiations ionisantes peuvent également induire l'expression de VEGF et par là-même, dans certains types de modèles expérimentaux et dans une certaine gamme de dose, l'irradiation peut paradoxalement être pro-angiogénique. Dans un grand nombre de lignées cellulaires, l'irradiation peut ainsi entraîner une augmentation de l'expression de VEGF, cette augmentation faisant partie des processus de réponse cellulaire au stress qui comporte aussi l'induction d'un large éventail de facteurs de croissance et de cytokines (70). De nombreux agents anti-angiogéniques ont été utilisés dans des modèles pré-cliniques en combinaison avec l'irradiation, en particulier l'angiostatine, les inhibiteurs du récepteur au VEGF, ainsi que des anticorps monoclonaux anti-VEGF. Les mécanismes de radiosensibilisation proposés sont nombreux : inhibition de la formation de néo-vaisseaux, radiosensibilisation directe des cellules endothéliales par induction d'apoptose, radiosensibilisation directe des cellules tumorales et diminution de la fraction hypoxique (71).

II-3-2. Inhibition de la prolifération tumorale

La repopulation tumorale est un des facteurs régulièrement impliqués dans l'échec de la radiothérapie en pratique clinique (72). Les mécanismes biologiques responsables d'une repopulation accélérée sont encore mal connus, cependant, il est très probable qu'ils mettent en jeu les facteurs de croissance cellulaires (73) La voie de l'EGFR paraît régulièrement impliquée dans ce phénomène (74) (voir § II-4-1). Des données cliniques sont en faveur de cette hypothèse : dans les essais du groupe DAHANCA réalisés sur des cancers ORL, la surexpression d'EGFR a une valeur pronostique uniquement en cas de traitement incluant un repos, en split-course (75). Les tumeurs surexprimant EGFR pourrait par conséquent bénéficier d'un traitement accéléré.

II-3-3. Recherche d'une spécificité tumorale

La plupart des médicaments utilisés actuellement en association avec l'irradiation n'ont pas ou peu de spécificité pour le tissu tumoral. Même les thérapeutiques ciblées, dont nous allons détailler les mécanismes plus loin, peuvent avoir un effet radiosensibilisateur sur les tissus sains. Cet effet a pour corollaire une augmentation de la toxicité des schémas concomitants par rapport aux schémas séquentiels ou à la radiothérapie exclusive. L'utilisation de techniques de radiothérapie permettant de protéger au mieux les tissus sains, telles que la radiothérapie conformationnelle sans ou avec modulation d'intensité, doit être privilégiée en cas de chimiothérapie concomitante (76).

De nombreuses anomalies moléculaires présentes dans les cellules cancéreuses se situent au niveau des voies de signalisation membranaire, cytoplasmique et nucléaire impliquées dans la prolifération, la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la réparation de l'ADN, l'angiogénèse et l'adhésion cellulaire. L'approche moléculaire de la radiobiologie a clairement mis en évidence que plusieurs de ces voies de signalisation sont en fait, à différents niveaux, directement ou indirectement impliquées dans la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. Ainsi, l'activation permanente dans la cellule cancéreuse d'une voie de signalisation de survie impliquée dans la radioréponse conduit à une radiorésistance accrue et constitue une cible thérapeutique potentielle pour majorer l'efficacité de la radiothérapie.

Les essais employant des molécules dirigées contre les propriétés spécifiques du tissu tumoral doivent être développées. C'est en particulier le cas des molécules agissant préférentiellement sur les cellules hypoxiques, telle la tirapazamine. Les résultats des essais cliniques sont pour l'instant décevants (77). Une meilleure connaissance des caractéristiques tumorales pourrait permettre de choisir une association chimioradiothérapie optimale.

II-4. Modulation des voies de signalisation

La transduction du signal correspond aux différents mécanismes biochimiques consistant en la transmission des signaux extra et intracellulaires vers le génome en vue du contrôle de l'expression des gènes et de la croissance cellulaire. Ces voies de signalisation sont nombreuses et complexes et peuvent interagir entre elles. Elles sont régulées par des modifications post-traductionnelles des protéines, le plus souvent

par phosphorylation-déphosphorylation sous l'action de kinases et de phosphatases. Le rôle central de ces voies de signalisation dans la réponse à l'irradiation a été suggéré par la mise en évidence d'une radiorésistance des cellules possédant une dérégulation des voies de signalisation (dérégulation de protéines kinases et/ou phosphatases) (78).

II-4-1. Le récepteur à l'EGF (EGFR)

La famille des récepteurs EGFR comporte quatre récepteurs apparentés, EGFR ou HER1 (erb-B1), HER2 (erb-B2/neu), HER3 (erb-B3), et HER-4 (erbB4). Les effecteurs d'EGFR incluent RAS et PI3K, ce qui suggère que l'inhibition sélective des voies RAS ou PI3K pourrait être un moyen indirect de radiosensibiliser les tumeurs surexprimant EGFR.

II-4-1-a. Famille des récepteurs de l'EGF ou famille HER (Human EGF Receptor)

L'EGF (Epidermal Growth Factor) a été identifié en 1965 comme facteur stimulant la prolifération des cellules épithéliales (79). Son récepteur a été identifié une dizaine d'années plus tard (80). L'EGFR ou HER1, principal récepteur transmembranaire capable d'activer la voie RAS/MAPK, est une glycoprotéine de 170 kDa appartenant à la famille HER ou ErbB. Cette famille appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine-kinase.

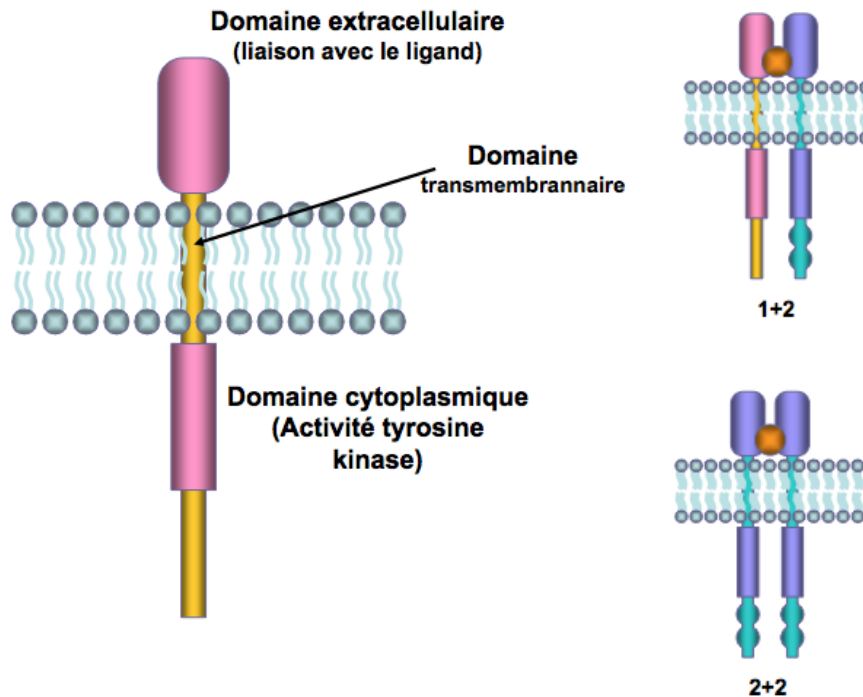


Figure 10

Structure des récepteurs tyrosine kinase de la famille EGFR
(d'après Fumoleau P., communication personnelle)

L'EGFR est composé d'un domaine extracellulaire assurant la fixation avec le ligand, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire effecteur tyrosine-kinase. Il est monomérique à l'état basal (Figure 10). L'EGFR possède plusieurs ligands, principalement l'EGF et le TGF α (Transforming Growth Factor α), mais aussi l'amphiréguline, l'épiréguline, la β -celluline, le facteur de croissance lié à l'héparine ou HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) et les neurégulines (81). La famille HER comporte, en plus de l'EGFR, trois autres récepteurs : HER2, HER3 et HER4. Les herégulines et neurégulines se lient à HER3 et HER4. HER-2 ne possède pas de ligand identifié (Figure 11). La fixation du ligand sur le récepteur entraîne, après homo- ou hétéro-dimérisation de ce récepteur avec d'autres récepteurs de la famille ErbB tels qu'HER2, l'activation de ce dernier par phosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques situés sur son domaine intracellulaire. HER2 forme des hétérodimères avec les 3 autres membres de la famille permettant d'accroître l'affinité de liaison au ligand du récepteur et de diminuer le taux de dissociation ligand/récepteur. Les hétéro-dimères HER2 amplifient également le signal à travers l'activation de son domaine kinase intracellulaire et par autophosphorylation réciproque (82).

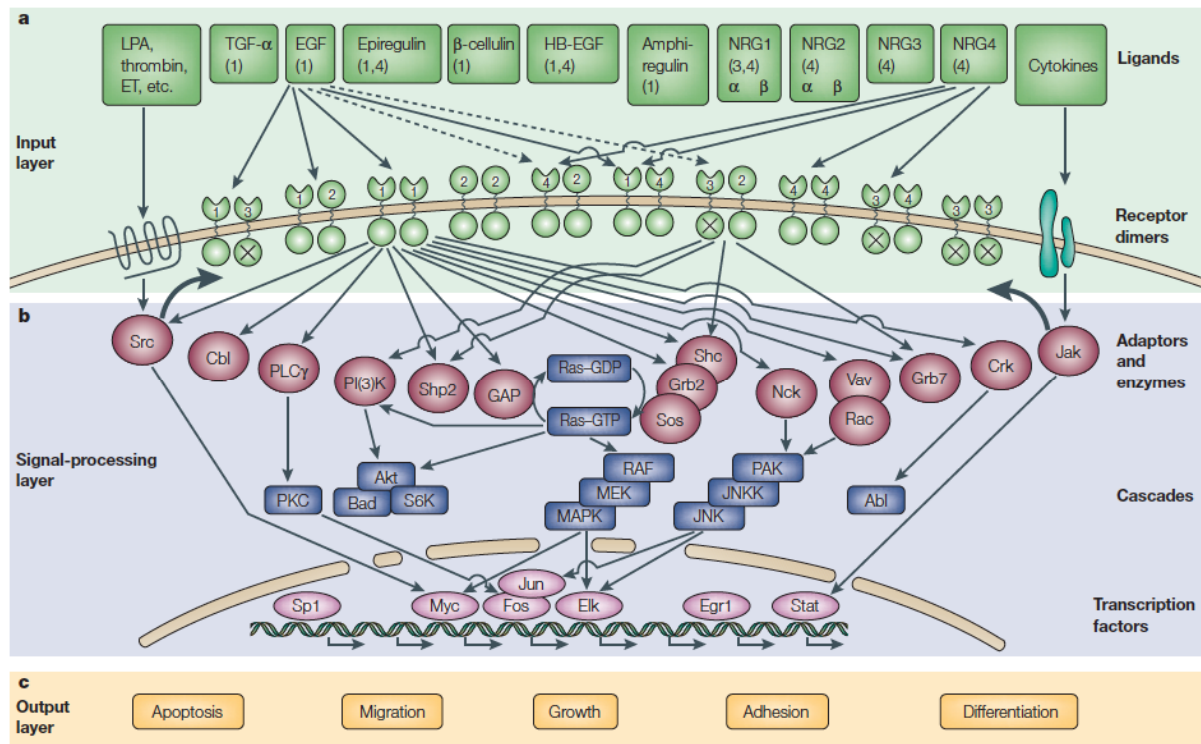


Figure 11

La famille des récepteurs à l'EGF (d'après Yarden *et al.* (81))

Les résidus phosphorylés servent de site d'amarrage pour un certain nombre de protéines intracellulaires contenant un domaine Src homology-2 (SH2) capable de reconnaître ces tyrosines phosphorylées. Ces protéines à domaine SH2 jouent donc un rôle central dans la transmission des signaux intracellulaires, raison pour laquelle on les retrouve dans la plupart des voies de signalisation : il s'agit du complexe Grb2/hSos qui active la protéine RAS dans la voie des RAS/MAPK et de la protéine PI3K (phosphatidylinositol 3 sérine/thréonine kinase) qui phosphoryle certains lipides membranaires ce qui aboutit au recrutement de la kinase AKT-PKB dans la voie PI3K/ AKT.

II-4-1-b. Fonctions d'EGFR

L'activation d'EGFR, suite à la fixation de ses ligands ou après exposition à divers stimuli tels que les radiations ionisantes, les UV, l'hypoxie, l'hyperthermie, le stress oxydatif, est responsable de l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires situées en aval. Quatre voies majeures activées par EGFR ont été mises en évidence (Figure 12) :

- la voie RAS/RAF/MAPK, responsable de la transcription de molécules induisant la prolifération, la survie et une transformation maligne ;
- la voie PI3K/AKT, impliquée dans la croissance cellulaire, la prolifération tumorale, la résistance à l'apoptose et l'angiogénèse;
- la voie Jak/STAT, entraînant une translocation nucléaire des molécules STAT, facteurs de transcription responsables de la division cellulaire, la mobilité tumorale, l'invasion, l'adhésion et la réparation de l'ADN ;
- la voie PLC γ -DAG (phospholipase C γ -diacylglycerol), activant la protéine kinase C (PKC) régulant la progression dans le cycle cellulaire, la différenciation et la mobilité.

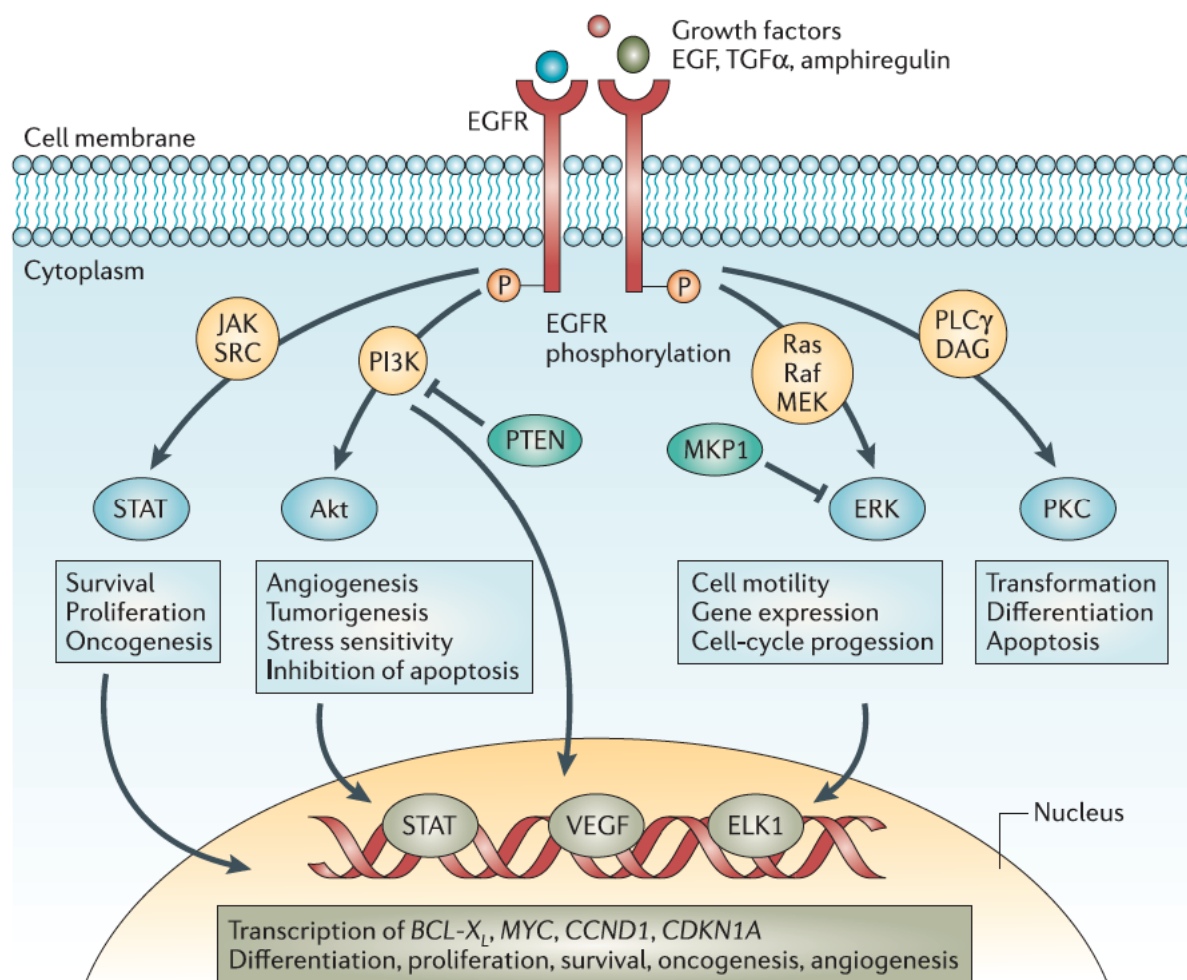


Figure 12

Principales voies de signalisation régulées par EGFR (d'après Nyati *et al.* (83))

Un ligand donné va activer préférentiellement une voie donnée. Par exemple, l'EGF activerait préférentiellement la voie de la PLC γ , alors que le TGF α favoriserait la voie Jak/STAT (84, 85).

Récemment ont été identifiées des voies de signalisation d'EGFR intranucléaire, dépendantes ou non d'un ligand (86-88). L'EGFR possède une séquence de localisation nucléaire dans son domaine juxta-membranaire pour la translocation nucléaire au travers des pores du complexe nucléaire ou par interaction avec des récepteurs de transport nucléaires comme les importines $\alpha/b1$ et les exportines (88). Alors qu'EGFR n'a pas de domaines de liaison à l'ADN, il a un domaine de transactivation sur son extrémité C-terminale régulant la synthèse de protéines pro-mitogéniques dont la cycline D1, iNOS, et B-Myb (86, 89). De plus, l'EGFR interagit avec la DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) nucléaire, agissant ainsi sur la réparation des lésions de l'ADN (87).

L'atténuation de l'activation d'EGFR se fait par déphosphorylation de résidus clés et endocytose. Après endocytose, EGFR est orienté dans des endosomes précoces et dirigé vers les corps multivésiculaires et dans des endosomes tardifs pour dégradation ou recyclage (90). L'ubiquitination d'EGFR médiée par Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) est essentielle pour l'internalisation et la dégradation par le lysosome (90). Un défaut dans ce mécanisme de contrôle peut entraîner une augmentation du recyclage et une amplification du signal.

II-4-1-c. Activation anormale d'EGFR dans les cancers

La surexpression d'EGFR ou HER2 entraîne la transformation des cellules murines NIH 3T3 *in vitro* (91, 92). La transformation de ces cellules par EGFR est dépendante de la présence d'EGF exogène alors que la transformation médiée par HER2 est directement liée au niveau d'expression de l'oncogène. La surexpression d'EGFR induite par le TGF α entraîne aussi une transformation des fibroblastes Rat-1 et NRK (93, 94). Ces données suggèrent que la surexpression d'EGFR pourrait induire une transformation maligne en présence de la quantité appropriée de ligands. De plus, le rôle d'EGFR et HER2 dans la prolifération autonome des cellules tumorales a été démontré par plusieurs approches (95). L'EGFR joue notamment un rôle important dans la genèse de nombreux cancers dont les cancers du pancréas où ce récepteur est surexprimé dans 40 à 90% des cas (12, 96-100). L'activation oncogénique de l'EGFR dans les cancers peut se faire par plusieurs mécanismes :

- amplification du gène de l'EGFR, fréquente dans les cancers broncho-pulmonaires, ORL et colo-rectaux, entraînant une surexpression des récepteurs. La surexpression des récepteurs aboutit à l'activation constitutive de la kinase en augmentant la concentration des dimères. Un autre exemple est celui d'HER2 qui est fréquemment

surexprimé dans les cancers du sein, de l'estomac et du poumon. L'amplification d'HER2 dans les cancers du sein a une valeur de pronostic (101) (81). La surexpression peut également résulter d'une stabilité accrue de la protéine.

- mutations du gène de l'EGFR au niveau du domaine extracellulaire, responsables de la synthèse d'un récepteur anormal ayant perdu ce domaine et activé de manière constitutive (délétions des exons 2 à 7 du variant EGFRvIII, par exemple) ou mutations du domaine tyrosine-kinase intracellulaire (102, 103). Ces mutations sont fréquemment observées dans les cancers bronchiques. Dans le cas d'HER2, la mutation d'une valine en acide glutamique dans le domaine transmembranaire engendre l'activation du récepteur et l'acquisition d'un pouvoir oncogénique en favorisant probablement son oligomérisation (104).

- activation transcriptionnelle secondaire à la production autocrine de TGF α (105). Le TGF α peut être sécrété par les macrophages, les lymphocytes T et les kératinocytes en réponse à une lésion tissulaire. Dans les cellules ayant une mutation activatrice de KRAS, il existe une augmentation de la production autocrine de TGF α activant EGFR (106).

II-4-1-d. EGFR et radiosensibilité

Les premières études ont montré que l'exposition de cellules de carcinome épidermoïde ORL à l'EGF produit un effet radiosensibilisateur (107, 108). Cet effet est probablement dû à une dégradation de l'EGFR induite par l'EGF. D'autres études ont montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR peuvent augmenter le taux d'apoptose radio-induite (109). Milas *et al.* ont montré une corrélation inverse entre le niveau d'expression d'EGFR et la réponse aux radiations (110). La relation entre surexpression d'EGFR et mauvais pronostic a été confirmée sur des échantillons de carcinomes épidermoïdes ORL (111). Outre la corrélation entre expression d'EGFR et radiorésistance, il existe de nombreuses autres raisons d'étudier l'association d'inhibiteurs d'EGFR à l'irradiation. Les inhibiteurs d'EGFR ont le plus souvent un effet cytostatique (caractérisé par un arrêt dans la phase G1 du cycle cellulaire (112)), plus rarement un effet cytotoxique et radiosensibilisant. Cependant, un agent purement cytostatique peut augmenter significativement l'efficacité d'une irradiation fractionnée en diminuant la repopulation tumorale. Un autre intérêt de la combinaison inhibiteurs d'EGFR-radiothérapie vient de la constatation d'une activation d'EGFR radio-induite *in vitro*. Après irradiation, le niveau d'EGFR activé (phosphorylé) dans des cellules confluentes augmente

rapidement (105, 113) (114). Cet effet peut produire une prolifération cellulaire et des phénomènes de réparation contrebalançant les effets de l'irradiation en relation avec une repopulation tumorale accélérée.

La radiosensibilisation obtenue en inhibant EGFR a souvent été rapportée à une augmentation du taux d'apoptose et/ou à un arrêt prolongé dans le cycle cellulaire (115, 116). L'inhibition de la voie PI3K/AKT joue un rôle majeur dans cette radiosensibilisation (117). Plus récemment, il a été montré que l'effet radiosensibilisateur observé est dû à une altération de la réparation des DSB radio-induites (87, 118). En effet, les RI induisent une translocation nucléaire d'EGFR lié à DNA-PK entraînant une augmentation de l'activité de DNA-PK (87, 119) (Figure 13). Le C225 (cetuximab) inhibe cette activation radio-induite de DNA-PK ainsi que la translocation nucléaire d'EGFR, conduisant à une augmentation de la radiosensibilité (120).

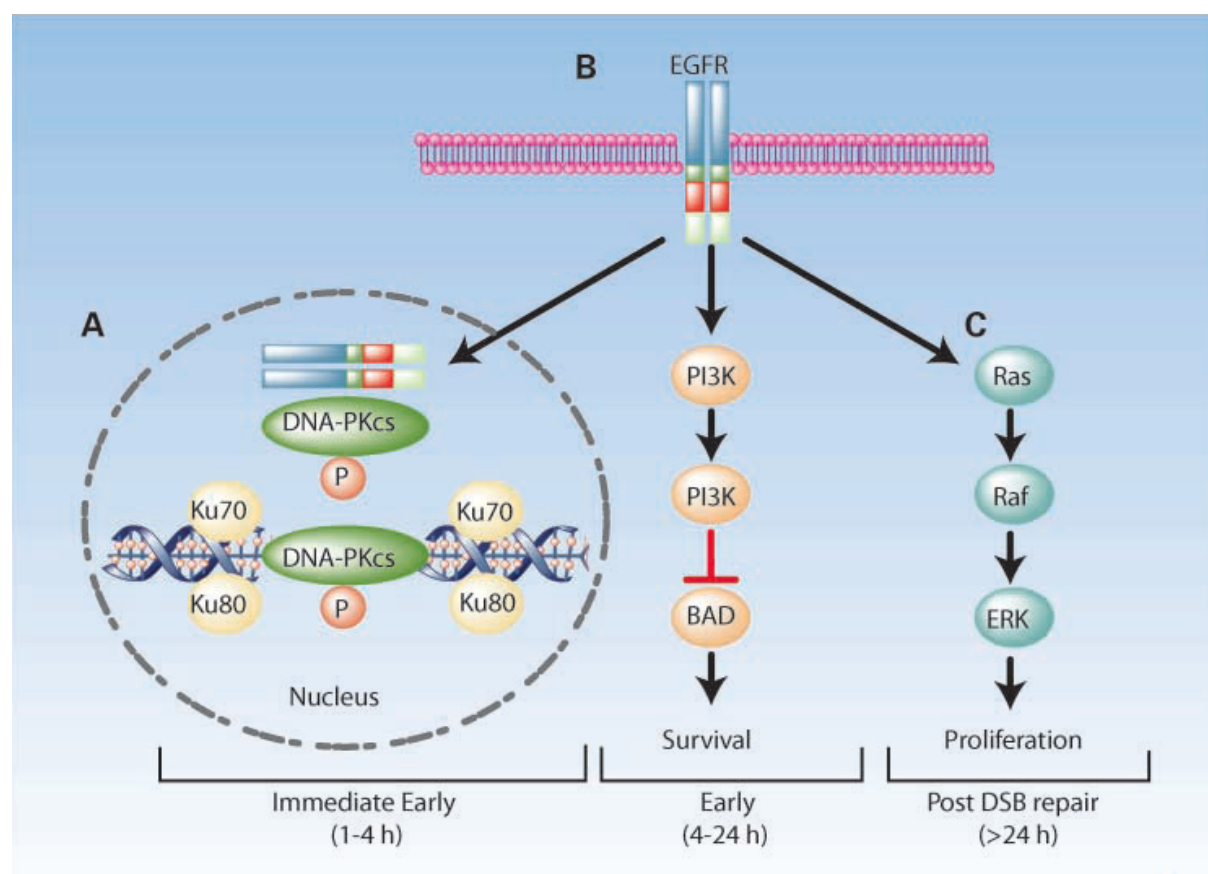


Figure 13

Un modèle de la radiorésistance induite par EGFR (d'après Chen *et al.* (5))

De nombreuses études précliniques ont montré que les inhibiteurs d'EGFR pouvaient augmenter la radiosensibilité, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Alors que la

majorité des études *in vitro* rapportaient un effet additif entre inhibiteurs d'EGFR et irradiation, les études *in vivo* sur modèles de xénogreffe ont montré que cette combinaison pouvait être synergique (115, 121-124). Ceci peut être expliqué par le fait que les inhibiteurs d'EGFR et les radiations ionisantes affectent probablement plusieurs voies de signalisation (116). Ces voies régulent la prolifération cellulaire et l'apoptose, ce qui est visible *in vitro* et *in vivo*, mais aussi l'angiogenèse et l'invasion tumorale, ce qui n'est visible que sur des modèles de xénogreffe (115, 122, 125, 126).

Alors que les études précliniques avaient mis en évidence l'intérêt thérapeutique potentiel d'associer inhibiteur d'EGFR et irradiation, la meilleure validation de cette association est venue des essais cliniques chez les patients ayant un cancer ORL inopérable. Dans un essai de phase I, 16 patients ont reçu une irradiation associée à du cetuximab (127). Treize patients ont eu une réponse complète et deux une réponse partielle. Plus récemment, une étude de phase III randomisée a mis en évidence un doublement de la médiane de survie des patients traités pour un cancer ORL localement avancé par radiothérapie et cetuximab concomitant en comparaison avec la radiothérapie seule (128). Cette étude est la première à avoir montré un bénéfice de l'association inhibiteur d'EGFR et radiothérapie.

Plusieurs questions restent cependant en suspens (83). Premièrement, est-ce que la manière dont est inhibé EGFR a une importance ? Les anticorps monoclonaux semblent donner de meilleurs résultats que les inhibiteurs de tyrosine kinase, cependant, ils n'ont jamais été comparés dans la même étude. Deuxièmement, y a-t-il un intérêt à associer plusieurs inhibiteurs d'EGFR ? Deux études précliniques récentes ont montré que l'association du gefitinib ou de l'erlotinib avec le cetuximab était plus efficace qu'une monothérapie, mais cela reste à vérifier en clinique (129, 130). La troisième et plus importante question consiste en l'identification des patients susceptibles de répondre au traitement. En effet, une partie seulement des patients avec un cancer donné vont répondre au traitement par inhibiteur de l'EGFR. Par exemple, dans l'essai de Bonner *et al.*, le niveau d'expression d'EGFR n'était pas prédictif de la réponse au cetuximab (131). De même, dans l'essai de phase III comparant gemcitabine à gemcitabine et erlotinib dans les cancers du pancréas avancé, la réponse n'était pas corrélée au niveau d'expression d'EGFR (132). Dans ces deux essais ainsi que dans de nombreux autres, la réponse au traitement est corrélée à l'intensité du rash cutané.

II-4-1-e. HER2 et radiosensibilité

L'oncogène HER2 est situé sur le bras court du chromosome 17. Il existe une corrélation significative entre l'amplification du gène HER2 ou la surexpression du récepteur HER2 et un mauvais pronostic dans les cancers du sein (101). HER2 est surexprimé dans environ 20% des cancers du sein mais aussi dans les cancers gastriques, ovariens, pancréatiques, pulmonaires et de la cavité buccale. Il a été montré que les patientes ayant un cancer du col utérin surexprimant HER2 avaient un taux de rechute plus élevée après radiothérapie que les autres, suggérant une radorésistance des tumeurs surexprimant HER2 (133). Le mécanisme de l'activité antitumorale des anticorps monoclonaux ciblant un récepteur de la famille HER n'est pas encore complètement compris. Il semble qu'une grande part de l'effet antitumoral provienne d'un recrutement de cellules NK (*Natural Killer*) par un mécanisme d'ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (134). Cependant, la mise en évidence d'une inhibition de la phosphorylation du récepteur et une internalisation du récepteur induites dans les cellules tumorales par les anticorps monoclonaux anti-HER joue en faveur d'un signal cytostatique ou apoptotique transmis dans la cellule *via* le récepteur (135-139). Pour les anticorps anti-HER2 tels le trastuzumab, leur activité antitumorale n'est pas due à une inhibition de la fixation du ligand puisqu'HER2 n'a pas de ligand connu (135, 136). L'efficacité thérapeutique du trastuzumab dans le cancer du sein a été largement démontrée, cependant, elle est limitée aux patientes ayant une tumeur surexprimant HER2 (140). Trois études ont montré qu'une inhibition d'HER2 par le trastuzumab entraînait une radiosensibilisation dans les cellules surexprimant HER2 (6, 8, 141). Les mécanismes de celle-ci sont encore mal compris : certains évoquent une augmentation de l'apoptose radio-induite via une inhibition de la voie PI3K, associée à une inhibition de l'activation radio-induite de NF- κ B (7).

II-4-1-f. Inhiber EGFR et/ou HER2

Il existe plusieurs méthodes pour inhiber l'activité d'EGFR (Figure 14) :

- des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur peuvent être utilisés pour prévenir les liaisons avec le ligand (cetuximab, trastuzumab, panitumumab...). Cette approche peut ainsi moduler la signalisation, la dimérisation ou l'expression du récepteur au niveau de la surface cellulaire aussi bien que la cytotoxicité anticorps-dépendante (ADCC) ou faisant intervenir le complément.

- des petites molécules se liant au domaine tyrosine kinase peuvent inhiber l'autophosphorylation et l'activation des voies de signalisation d'amont. Ce sont des inhibiteurs de tyrosine kinase (gefitinib, erlotinib...). Ils sont souvent peu spécifiques.
- des antagonistes des récepteurs peuvent être utilisés en bloquant de façon compétitive la liaison avec le ligand.
- des ligands ou des anticorps spécifiques des récepteurs peuvent être couplés à des toxines létales. Après liaison avec le récepteur, la toxine est internalisée et tue la cellule tumorale.
- des oligonucléotides antisens peuvent être utilisés pour inhiber l'expression du récepteur ou des ligands.
- des vaccins peuvent être élaborés pour cibler le système immunitaire afin d'agresser les cellules tumorales exprimant des récepteurs normaux ou mutés.

De nombreux médicaments inhibant plusieurs cibles tumorales sont actuellement en développement, dont le lapatinib et le BIBW 2992, inhibiteurs d'EGFR et HER2.

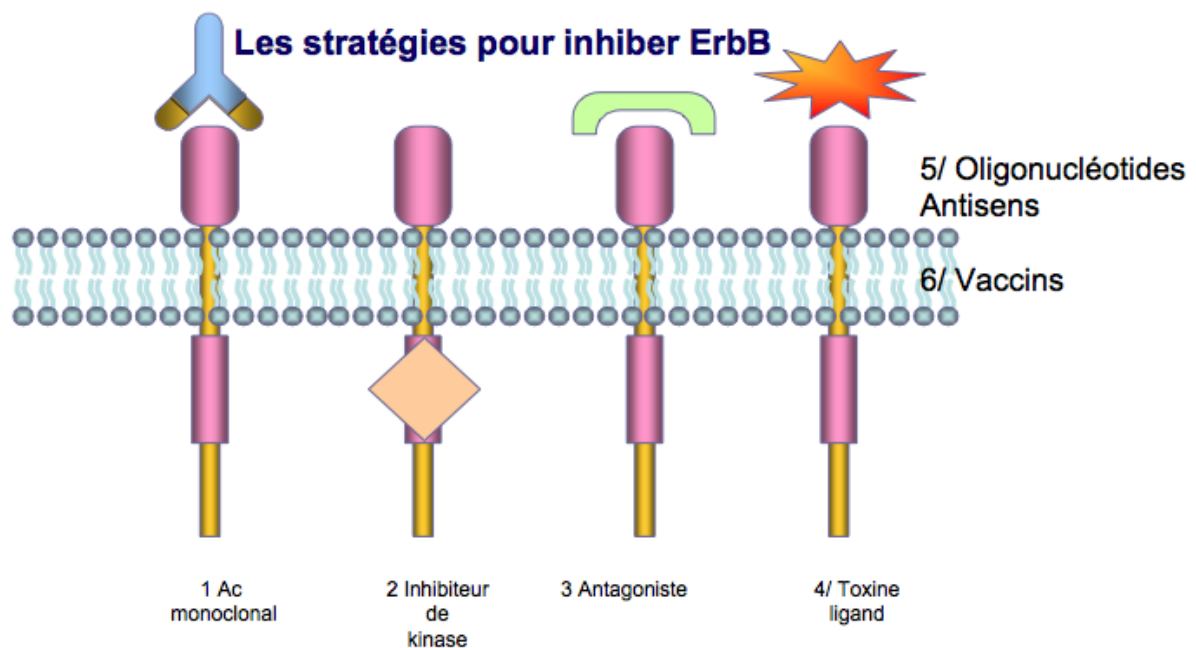


Figure 14

Les différents moyens d'inhiber EGFR (d'après Fumoleau P., communication personnelle)

II-4-2. Voie RAS/MAPK

II-4-2-a. La famille RAS

La famille des oncogènes RAS comprend trois gènes bien caractérisés : HRAS, NRAS et KRAS. Les protéines issues de ces gènes ont un poids moléculaire de 21 kDa. Elles sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique, ancrées dans la couche phospholipidique membranaire par leur extrémité C-terminale. Les protéines Ras font partie de la famille des GTPases et jouent un rôle important dans la transmission des signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation, de la migration cellulaire ainsi que de l'angiogenèse. Leur activation est déclenchée par l'intermédiaire de récepteurs membranaires dont l'EGFR. RAS joue un rôle d'« interrupteur » au sein des voies de signalisation et oscille entre deux états : un état inactif où elle est liée au GDP (guanine diphosphate) et un état actif où elle est liée au GTP (guanine triphosphate), ce qui permet transitoirement l'interaction de RAS avec d'autres molécules intracellulaires effectrices et l'activation de différentes voies de signalisation (RAS/MAPK, PI3K/Akt entre autres) ([Figure 15](#)). L'activation de RAS survient lors du remplacement du GDP par le GTP grâce au complexe Shc/Grb2/SOS, l'inactivation est provoquée par l'hydrolyse du GTP en GDP par des protéines de régulation telles que les GAP (GTPase Activating Proteins) ainsi que par l'activité GTPase intrinsèque de RAS. Tous les effecteurs connus de RAS ont en commun une région homologue appelée RBD (RAS-binding domain) qui interagit avec la boucle effectrice de RAS. Les effecteurs de RAS peuvent être divisés en trois sous-groupes basés sur l'homologie de leur région RBD (142). Le premier sous-groupe comprend les protéines de la famille Raf-1 constituées des sérine-thréonine kinases A-Raf, B-Raf, C-Raf (143). Une fois activée, Raf va phosphoryler MEK qui va elle-même phosphoryler ERK. Le second sous-groupe est représenté par la famille PI3K (phosphatidylinositol-3-OH kinase). Ces deux voies sont détaillées plus bas. KRAS active préférentiellement la voie MAPK alors que H-RAS induit plutôt l'activation de la voie PI3K/Akt (144). Le troisième sous-groupe est un ensemble de protéines diverses dont le RBD est aussi appelé domaine RA (RAS-associating). Ce groupe inclut un membre de la famille des phospholipases C (PLC- ϵ), tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis) qui va activer les GTPases Rac et Rho, Rassf1, et RalGDS qui va activer MAPK (145).

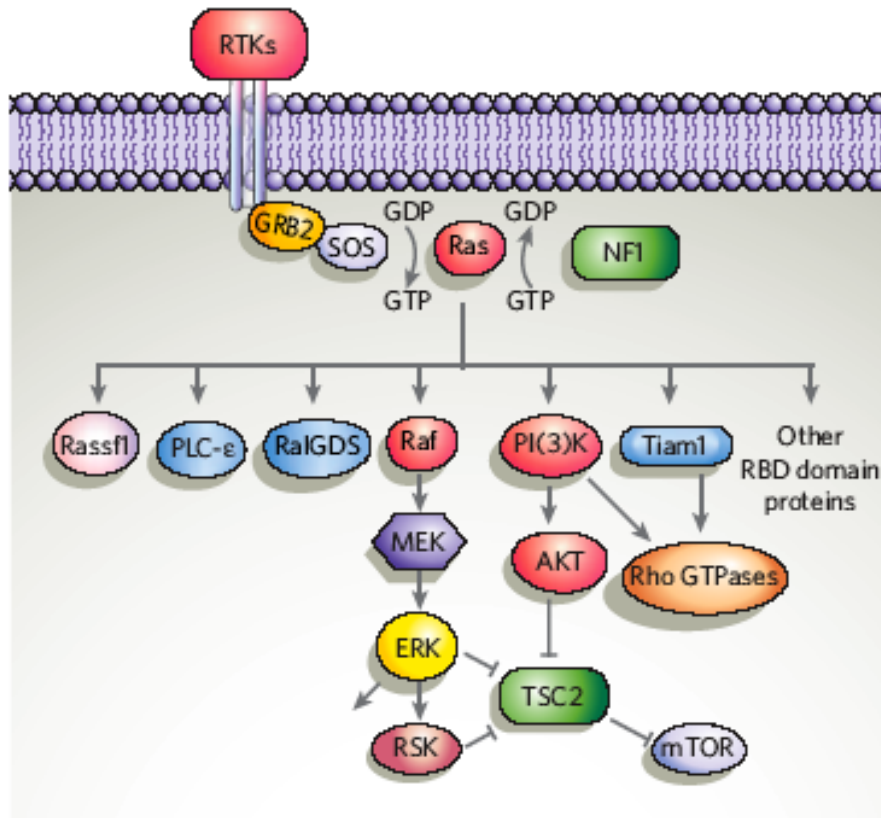


Figure 15

Voies de signalisation intracellulaires activées par Ras (d'après Shaw *et al.* (145))

II-4-2-b. Rôle de RAS dans l'oncogénèse

KRAS est un des oncogènes les plus fréquemment activés dans les cancers puisqu'on estime qu'environ 20% des tumeurs humaines ont une mutation activatrice de ce gène (145). Les tumeurs ayant une prévalence élevée de mutations de KRAS sont les cancers du pancréas (90%), colorectaux (40%), des voies biliaires (33%) et broncho-pulmonaires (18%). L'activation de la protéine RAS est liée à la présence d'une mutation faux-sens de KRAS qui lui confère un pouvoir oncogénique en étant responsable d'une accumulation de la forme active (146). Ces mutations touchent dans plus de 90% des cas l'acide aminé glycine des codons 12 et 13 et, plus rarement, l'acide aminé glutamine du codon 61 (Tableau 3). La présence de telles mutations au niveau tumoral est responsable d'une activation acquise de la voie RAS/MAPK en aval de l'EGFR et totalement indépendante de la fixation du ligand à ce dernier. Ce mécanisme explique la résistance des cellules tumorales coliques aux anticorps anti-EGFR (147). Les gènes NRAS et HRAS sont beaucoup moins souvent mutés.

Codon	Base	Mutation	Substitution d'acide aminé
12	1	<u>G</u> GT → <u>C</u> GT	G12R
12	1	<u>G</u> GT → <u>T</u> GT	G12C
12	1	<u>G</u> GT → <u>A</u> GT	G12S
12	2	GG <u>T</u> → GG <u>C</u>	G12A
12	2	GG <u>T</u> → GG <u>I</u>	G12V
12	2	GG <u>T</u> → GG <u>A</u>	G12D
13	2	GG <u>C</u> → GG <u>A</u>	G13D

Tableau 3

Mutations du gène KRAS les plus fréquentes (A : alanine, C : cystéine, D : aspartate, G : glycine, R : arginine, S : sérine, V : valine)

Une activation prolongée de RAS peut survenir dans les tumeurs en l'absence de mutation. Par exemple, NF1 est un gène suppresseur de tumeur qui code une GAP (148). La perte de NF1 entraîne une accumulation de la forme active de RAS due à une diminution de l'hydrolyse de GTP.

II-4-2-c. Voie MAPK/ERK

L'activation de la voie des MAPK, également appelée ERK (Extracellular signal Regulated Kinase), débute par l'activation et le recrutement à la membrane de la protéine Raf-1. Cette protéine sérine/thréonine kinase est responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK kinase ou MEK (MAPK/ERK kinase). À son tour, MEK va activer de manière hautement spécifique ERK par double phosphorylation, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de nombreux facteurs de transcription (c-FOS, c-MYC, c-JUN...) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6 ayant un rôle majeur dans l'initiation de la phase G1 du cycle cellulaire. ERK active aussi indirectement le facteur de transcription CREB et NF-κB via l'inhibition d'IKK. Cette voie est aussi impliquée dans la régulation de l'apoptose par la phosphorylation post-transcriptionnelle de Bad, Bim, Mdm-1 et capase 9. Une activation anormale de cette voie entraîne une transformation tumorale.

Concernant les protéines de la famille Raf-1, seule B-Raf a été décrite comme mutée (149). Une mutation quasiment unique est observée au niveau de ce gène, conduisant à une substitution d'une valine en un acide glutamique au niveau du codon 600 (V600E). Cette mutation activatrice est responsable d'une augmentation de l'activité kinase de la protéine B-Raf, et il a été montré qu'elle avait des capacités oncogéniques dans des modèles cellulaires (150). Les tumeurs les plus fréquemment mutées sont les cancers de la thyroïde, les mélanomes malins (40%) et les cancers colorectaux (5-10%).

II-4-2-d. RAS et radiosensibilité

Le rôle de RAS dans la radiosensibilité a été étudié dans de nombreux travaux. Les premières études menées sur des cellules de rongeur ont montré que les cellules transfectées avec le gène RAS étaient plus radiorésistantes. Les premiers résultats observés dans des cellules humaines étaient moins concluants. Plusieurs approches ont été utilisées pour inhiber l'activité ou l'expression de RAS dont l'utilisation d'oligonucléotides antisens, d'anticorps simple chaîne dans un adénovirus et d'inhibiteurs de la farnésyltransférase, permettant d'obtenir une radiosensibilisation (151-153).

Des données comparatives provenant de différents modèles cellulaires concluent que la présence de protéines HRAS, KRAS et NRAS mutées protège les cellules de l'effet toxique des radiations ionisantes en activant la voie PI3K (13, 154-157). Dans les cellules de cancer colique HCT116 porteuses de la mutation activatrice KRAS D13, la radiosensibilité était liée à la signalisation par la voie ERK1/2 (158). D'autres études ont aussi montré que les cellules HCT116 utilisaient la voie ERK1/2 en priorité pour se protéger des radiations ionisantes. Dans ces études, des cellules HCT116 isogéniques exprimant la protéine mutée active HRAS V12 avec une délétion de l'expression de KRAS D13 utilisaient préférentiellement la voie PI3K (159-161). Ceci suggère que les différents membres de la famille RAS, HRAS et KRAS, peuvent générer des signaux de radioprotection qualitativement différents en activant différentes voies de signalisation. L'inhibition de l'activité de PI3K par le LY294002 ou la wortmannine radiosensibilise les cellules tumorales exprimant une mutation de RAS sans affecter les cellules RAS wild type (13, 162). L'inhibition de la voie Raf/MEK/MAPK donne des résultats contradictoires.

Récemment, l'hypothèse a été faite que la radiorésistance des cellules KRAS mutées était plutôt le résultat de l'activation constitutive de la boucle de sécrétion

autocrine du TGF α et stimulation d'EGFR (106, 163).

Par conséquent, l'identification des voies de signalisation activées par RAS et induisant une réponse altérée des cellules tumorales à l'irradiation est d'un intérêt majeur, ces voies pouvant être les cibles potentielles de manipulations visant à accroître la radiosensibilité tumorale.

II-4-3. Voie PI3K/AKT

L'autre grande voie de signalisation intracellulaire pouvant être activée par l'EGFR est la voie PI3K/AKT. La Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K) peut interagir directement avec des récepteurs tyrosine kinase (EGFR par exemple), indirectement via des adaptateurs (IGF1 receptor et IRS1 par exemple) ou encore par l'intermédiaire de RAS. Son activation entraîne une activation de la 3-phosphoinositide-dépendant protein kinase 1 (PDK1) qui, elle-même, provoque la phosphorylation d'AKT. Cette activation d'AKT est responsable de l'activation de différentes protéines ayant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (MDM2, GSK3), de l'apoptose (MDM2, mTOR, IKK, FKHR, BAD) et de la traduction (mTOR) (Figure 16). L'activation d'AKT est régulée négativement par la phosphatase PTEN. Il existe un lien étroit entre les voies RAS/MAPK et PI3K/Akt par l'intermédiaire de RAS. Les connexions qui existent entre ces deux voies sont en fait probablement beaucoup plus complexes faisant intervenir la voie de la PLC- γ , la voie STAT et la voie Src/FAK.

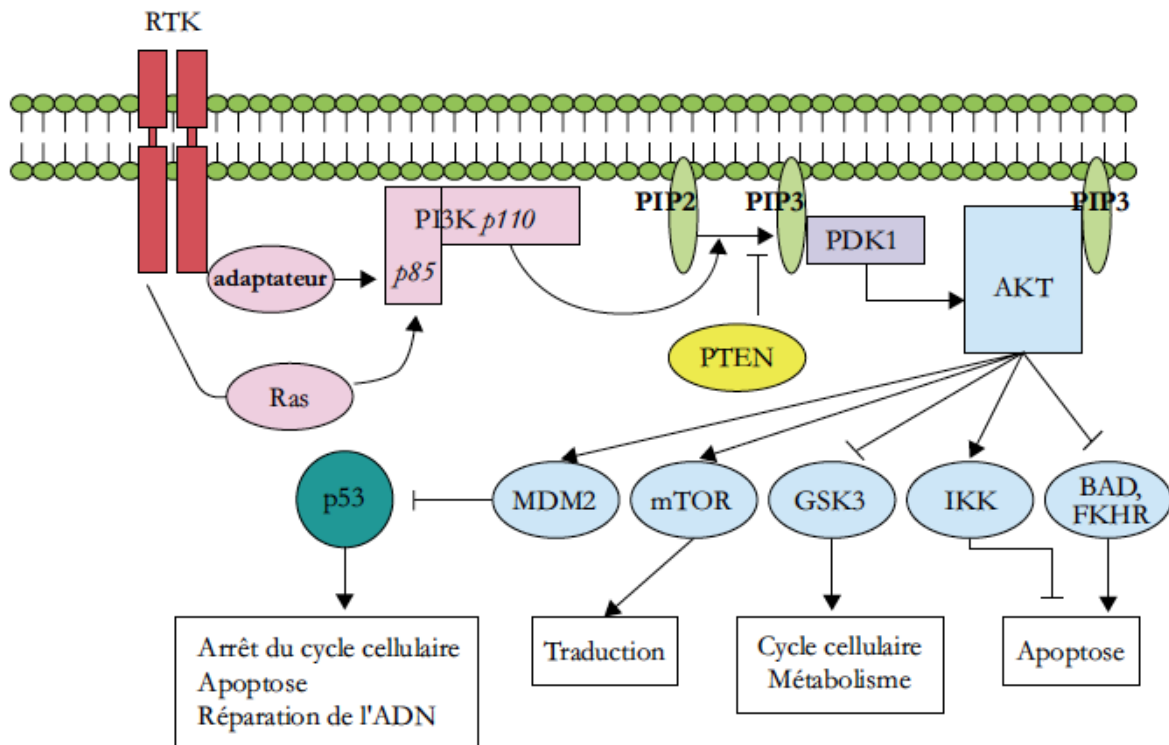


Figure 16

La voie PI3K/AKT (d'après Cortot *et al.* (164))

II-4-3-a. PI3 kinases

La PI3K est une enzyme lipidique hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice/adaptatrice. Il en existe huit formes chez l'homme, réparties en trois grandes classes (I, II et III) selon l'homologie de séquence et la préférence de substrat. Trois enzymes peuvent servir de sous-unité catalytique dans les PI3 kinases de classe I (sous-groupe Ia) : p110a, p110b et p110d. Les deux premières sont des isoformes ubiquitaires, la troisième est particulièrement exprimée dans les leucocytes. La sous-unité régulatrice/adaptatrice est représentée par l'enzyme p85. L'association de ces deux sous-unités forme un complexe hétérodimérique.

Après l'activation induite par un ligand de récepteurs spécifiques, PI3K peut être activée par deux mécanismes. Premièrement, un résidu tyrosine phosphorylé sur le récepteur sert de site d'attache pour la sous-unité régulatrice p85. Ceci entraîne le recrutement de la sous-unité catalytique de PI3K, p110. L'autre possibilité est l'activation par le récepteur du complexe Shc/Grb2/SOS qui va activer RAS. RAS est ensuite capable d'induire la translocation membranaire et l'activation de l'unité catalytique p110 de PI3K (165).

Une des principales fonctions de la PI3K est de phosphoryler le domaine D3 des phospho-inositols membranaires, ce qui aboutit à la formation de lipides tels que le PI3-phosphate (PI3P), le PI3,4-biphosphate (PI(3,4)P2) et le PI3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P3). Ces lipides prennent part à de nombreux processus intracellulaires dont la prolifération cellulaire, la survie, la réorganisation du cytosquelette, le trafic membranaire, l'adhésion cellulaire, la mobilité cellulaire et l'angiogenèse (166). PI(3,4,5)P3 est le principal lipide produit *in vivo*. Deux phosphatases différentes sont capables de le dégrader : les phosphatases à domaine SH2, SHIP1 et SHIP2, et la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue gene). La perte de PTEN est une anomalie retrouvée dans certains syndromes congénitaux bénins (maladies de Cowden, de Bannayan-Zonana...) ainsi que dans de nombreuses tumeurs solides (sein, mélanome, prostate, rein, ovaire, endomètre), soulignant le rôle de la voie PI3K dans la cancérogenèse (167). PTEN est actuellement considéré comme le second gène suppresseur de tumeur le plus souvent muté après p53.

Le gène PI3KCA codant la sous-unité catalytique p110 peut être altéré dans les cancers par mutation ou amplification. Les cancers du sein et de l'endomètre sont ceux dans lesquels on retrouve le plus fréquemment des mutations de PI3KCA (20-26%) suivis par les cancers du colon et ORL (12-15%) . Les protéines p110 mutées ont une activité enzymatique augmentée puisqu'elles sont capables d'activer AKT en l'absence de tout facteur de croissance et ont un pouvoir oncogénique *in vitro* (168). On trouve aussi des mutations dans le gène codant p85 dans certains cancers du colon et de l'ovaire.

II-4-3-b. Kinases AKT

Les kinases AKT (appelées aussi PKB ou Protein Kinase B) sont des sérine/thréonine kinases présentant une homologie avec l'oncogène v-Akt transduit par AKT8, un rétrovirus aigu transformant chez la souris. Il en existe trois types (AKT1, 2 et 3), chacun codé par un gène différent. Leur expression est variable selon les tissus : AKT2 est plus abondante dans les tissus sensibles à l'insuline (169). L'expression d'AKT1 et 3 ne peut compenser la perte d'AKT2. Les domaines kinase des différentes isoformes ont une grande homologie (environ 85%).

Par la phosphorylation de divers substrats, AKT régule quatre processus biologiques : la survie cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire, la croissance et le métabolisme cellulaire (145). La GSK3 (glycogen synthase kinase 3) est inhibée par phosphorylation par AKT entraînant une perte de sa fonction de contrôle de la

transcription de nombreuses protéines régulant le cycle cellulaire (C-Myc, cycline D1, cycline E) ou la différenciation cellulaire (c-Jun, β -caténine, GLI, Notch, Snail). En inhibant GSK3, AKT augmenterait la transcription de ces différentes protéines. AKT contrôle la progression dans le cycle cellulaire par phosphorylation directe de Chk1 ou de MDM2. AKT contrôle également la survie cellulaire en inhibant la protéine pro-apoptotique BAD et en activant la voie IKK/NF- κ B. AKT active la protéine kinase mTOR. Les autres substrats d'AKT sont eNOS (endothelial Nitric Oxyde Synthase), FKHR et les protéines FOXO (170). Par ailleurs, AKT intervient dans la réparation des lésions créées par les agents génotoxiques en activant DNA-PK par l'intermédiaire de la formation d'un complexe entre la forme activée d'AKT et la protéine chaperonne HSP90 (171). L'inhibition de l'activité d'AKT dans les cellules A549 KRAS^m par l'API-59-CJ-OH permet d'observer une radiosensibilisation en rapport avec une diminution de la réparation des CDB (172).

Les effets oncogéniques des différentes formes d'AKT ne peuvent pas être distingués (173). Récemment a été décrite une mutation dans le domaine PH (Pleckstrin Homology) d'AKT1 induisant une activation d'AKT1 (174). La prévalence de cette mutation E17K est basse (1% dans les cancers pulmonaires, 2% dans les cancers colo-rectaux, 7% dans les carcinomes lobulaires du sein). Une amplification ou mutation d'AKT2 a été rarement décrite dans le cancer du colon.

II-4-3-c. PI3K/ AKT et radiosensibilité

Le rôle de PI3K dans la réponse aux radiations ionisantes a été évoqué précédemment. L'inhibition de l'activité de la voie PI3K radiosensibilise les tumeurs porteuses d'une mutation de RAS ou ayant une protéine RAS activée par des récepteurs aux facteurs de croissance (155, 157, 175). Il est possible que les inhibiteurs de PI3K agissent aussi sur la radiosensibilité en inhibant la fonction de protéines ayant des domaines kinases proches comme ATM, ATR et DNA-PK. L'expression d'une protéine PI3K p110 constitutivement active est capable de partiellement compenser l'expression de protéines HRAS mutées pour la radioprotection des cellules (176). Dans les lignées cellulaires où PI3K contrôle la radiosensibilité, l'inhibition d'ERK1/2 ne modifie pas significativement la réponse aux radiations ionisantes.

Dans la lignée de cancer prostatique LNCap, l'inhibiteur de PI3K LY294002 augmente le taux d'apoptose radio-induite et la réponse à l'irradiation (177). Cette radiosensibilisation est médiée par AKT. Pour toutes ces raisons, les médiateurs

d'amont des PI3K, responsables d'une altération de la radiosensibilité médiée par RAS ou par d'autres effecteurs, constituent un domaine de recherche très actif.

III. La leucémie myéloïde chronique

III-1. Généralités cliniques

III-1-1. Épidémiologie

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est peu fréquente ; on dénombre environ 600 nouveaux cas par an en France, et 5 000 à 7 000 cas aux Etats-Unis, soit une incidence annuelle de 1 à 2 cas pour 100 000 individus. La LMC représente 15% de l'ensemble des leucémies, mais moins de 5% des leucémies de l'enfant. L'incidence n'a pas varié depuis les 50 dernières années. La LMC affecte plus les hommes que les femmes, le sexe ratio étant de 1,3-2,2 pour 1. L'âge médian au diagnostic est de 45-55 ans à 67 ans selon les cohortes.

III-1-2. Étiologie

La cause de la LMC est inconnue. La leucémogénèse de la LMC comprend plusieurs étapes qui sont l'initiation, la promotion et la phase de progression de la maladie. La première étape représente l'acquisition par une cellule hématopoïétique pluripotente d'une anomalie génétique, la translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 (chromosome Philadelphie). Cette translocation confère un avantage de prolifération et le clone leucémique remplace alors progressivement les cellules hématopoïétiques normales. Cependant on ne sait pas ce qui déclenche cette première étape, et il n'a été retrouvé jusqu'à présent aucun lien avec une exposition à des agents chimiques ou infectieux.

Il n'existe pas d'argument pour évoquer des facteurs génétiques ou héréditaires : l'incidence de la LMC n'est pas accrue chez les jumeaux monozygotes, ni chez les parents des sujets atteints de la LMC. Toutefois, l'incidence de la LMC est supérieure chez les sujets survivants après la bombe atomique et après exposition nucléaire.

III-1-3. Diagnostic

III-1-3-a. Diagnostic clinique

La LMC évolue en trois phases : la phase chronique initiale, la phase d'accélération qui est inconstante, puis la phase de transformation blastique. Environ 85% des nouveaux cas sont diagnostiqués chez des sujets en phase chronique et 80% des patients évoluent vers la phase d'accélération avant de développer la phase blastique de la maladie.

La présentation clinique de la maladie a changé au cours du temps avec la pratique de bilans physique et biologique systématiques. Ainsi, l'incidence des présentations asymptomatiques de la LMC en phase chronique a augmenté de 15% à plus de 40%, tandis que celle des formes agressives a diminué.

Les symptômes révélateurs sont le plus souvent liés à l'anémie et à la splénomégalie : on retrouve l'asthénie, la dyspnée d'effort, les douleurs abdominales et la sensation de pesanteur au niveau du flanc gauche. L'altération de l'état général avec perte de poids, anorexie et fièvre au long cours est moins fréquente. L'examen clinique révèle la présence d'une splénomégalie dans 40 à 60% des cas et d'une hépatomégalie dans 10 à 20% des cas, constituant le syndrome tumoral classique dans la LMC.

III-1-3-b. Diagnostic cytologique

- *Le frottis sanguin*

La LMC se caractérise par une hyperleucocytose composée de polynucléaires neutrophiles. Environ 50 à 70% des patients se présentent au diagnostic avec un taux de leucocytes supérieur à $100 \cdot 10^9/l$. Il s'y associe toujours une myélémie ainsi qu'une éventuelle augmentation du taux de polynucléaires basophiles et éosinophiles. Une anémie s'observe dans 20% des cas (hémoglobine $<10 \text{ g/dl}$) et une thrombocytose dans 30 à 50% des cas, fréquemment associée à une thrombopathie.

- *Le frottis médullaire*

L'aspiration médullaire est nécessaire pour faire le diagnostic cytologique de la LMC et préciser le stade de la maladie. L'examen du frottis médullaire montre une moelle riche, avec une hyperplasie de la lignée granuleuse, représentant souvent plus de 80% de l'ensemble des cellules. La lignée érythroïde est donc hypoplasique et les mégacaryocytes sont le plus souvent de petite taille et nombreux. La lignée granuleuse présente tous les stades de différenciation et il n'existe pas de signe de dysplasie myéloïde. Le taux de cellules blastiques définit le stade de la maladie : un taux de blastes inférieur à 5% définit le stade chronique, un taux supérieur à 20% le

stade blastique. La présence d'une infiltration blastique extra-médullaire constitue également une phase blastique de la maladie. La transformation aigue est de phénotype myéloïde dans la moitié des cas, lymphoïde B dans 25% des cas et indifférenciée pour le reste. Il est fréquent que des marqueurs myéloïdes soient présents dans une transformation aigue lymphoïde.

III-1-3-c. Les examens cytogénétiques et de biologie moléculaire

La réalisation d'un caryotype médullaire permet de confirmer le diagnostic de LMC en mettant en évidence le chromosome Philadelphie ou un de ses variants. Il peut également retrouver des anomalies chromosomiques additionnelles d'emblée.

La PCR quantitative (RQ-PCR) pour Bcr-Abl est indispensable avant tout traitement car elle a une valeur pronostique forte et permet de suivre l'évolution de la maladie sous traitement. De même, la détection de transcrits rares autres que b2a2 et b3a2 est importante sur le plan pronostique.

L'examen par hybridation in situ fluorescente (FISH) au moyen de sonde spécifique de Bcr-Abl est utile si le caryotype ne met pas en évidence de chromosome Philadelphie alors que le tableau clinique est évocateur de LMC, ou qu'il y a un échec du caryotype médullaire.

III-1-4. Principes du traitement

Le choix du traitement de la LMC repose sur l'âge du patient et le stade de la maladie. Le traitement a pour objectif l'obtention d'une rémission hématologique complète et surtout l'éradication, si possible complète des cellules porteuses du chromosome Philadelphie. La réponse cytogénétique s'évalue grâce au caryotype médullaire à la recherche du chromosome Philadelphie, et la rémission moléculaire grâce à la RQ-PCR qui permet une évaluation quantitative du transcrit de fusion Bcr-Abl. L'obtention d'une rémission cytogénétique durable est associée à un taux de survie supérieur.

Les possibilités thérapeutiques ont beaucoup évolué au cours du temps. L'allogreffe de cellules hématopoïétiques demeure le seul traitement curatif reconnu chez les patients en première phase chronique et pour qui il existe un donneur HLA-compatible. La mise au point de nouvelles techniques de greffe cherche à diminuer la toxicité des procédures afin d'élargir l'indication aux sujets de plus de 50 ans. Les traitements médicamenteux sont représentés par l'interféron- α associé à l'aracytine et

l'imatinib (STI571 ou Glivec®). La grande efficacité et la toxicité limitée de l'imatinib a modifié la décision thérapeutique, même si son pouvoir curatif à long terme est compromis par l'apparition de formes de résistance.

Le traitement des phases accélérée et blastique ne permet pas d'aussi bons résultats que lorsque la maladie est prise en charge à sa phase chronique. Le traitement de la phase blastique vise à obtenir une seconde phase chronique, voire une rémission hématologique afin de réaliser une allogreffe de cellules hématopoïétiques, seul traitement possiblement curateur. Cependant, la réponse à la polychimiothérapie est modérée, variant de 20 à 60% selon le type myéloïde ou lymphoïde de la transformation. L'imatinib représente la seule alternative thérapeutique, avec là aussi des résultats moins bons que dans la phase chronique de la LMC. Des essais cliniques sont en cours afin d'évaluer l'association de l'imatinib aux polychimiothérapies.

D'autres agents thérapeutiques sont en cours d'évaluation, en particulier en association avec l'imatinib dans les phases avancées de la maladie ou dans le cas d'une résistance à l'imatinib. Il s'agit de la forme pégylée de l'interféron- α , de l'homoharringtonine, un alcaloïde semi-synthétique, de la décitabine, un inhibiteur de l'ADN méthyltransférase, des inhibiteurs de la farnésyl transférase.

III-2. c-Abl

III-2-1. Structure

Le gène ABL, homologue de l'oncogène v-Abl présent dans le génome du rétrovirus leucémogène murin (virus d'Abelson), est situé sur le bras long du chromosome 9 (9q34) et s'étend sur 230 kb. Il code c-Abl, une protéine de 145 kDa de distribution ubiquitaire, ayant une activité tyrosine kinase, appartenant à la famille des tyrosines kinases Src. Il existe deux isoformes différentes de c-Abl, Abl1a et Abl1b, en raison d'un épissage alternatif du premier exon. Elles ne diffèrent que par leur extrémité N-terminale, Abl1a étant myristoylée alors qu'Abl1b ne l'est pas (178).

c-Abl est constituée d'une extrémité N-terminale en boucle, nécessaire à son auto-inhibition, suivie d'un domaine SH3 (impliqué dans les interactions protéine-

protéine), d'un domaine SH2 et d'un site à activité tyrosine kinase SH1 (179). L'extrémité C-terminale comporte des séquences riches en proline, susceptibles d'interagir avec d'autres protéines à domaine SH3, trois séquences de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal, NLS), une séquence de localisation cytoplasmique (Nuclear Export Signal, NES), un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison à l'actine (180) (Figure 17). La protéine c-Abl est de localisation ubiquitaire. Elle est localisée majoritairement dans le noyau sauf dans les cellules sanguines et les neurones où elle prédomine dans le cytoplasme. Elle jouerait des rôles différents selon le compartiment, nucléaire ou cytoplasmique, où elle se trouve. La localisation de c-Abl est contrôlée par les séquences NLS et NES. Un passage d'un compartiment à l'autre serait possible sous l'influence de signaux environnementaux (181).

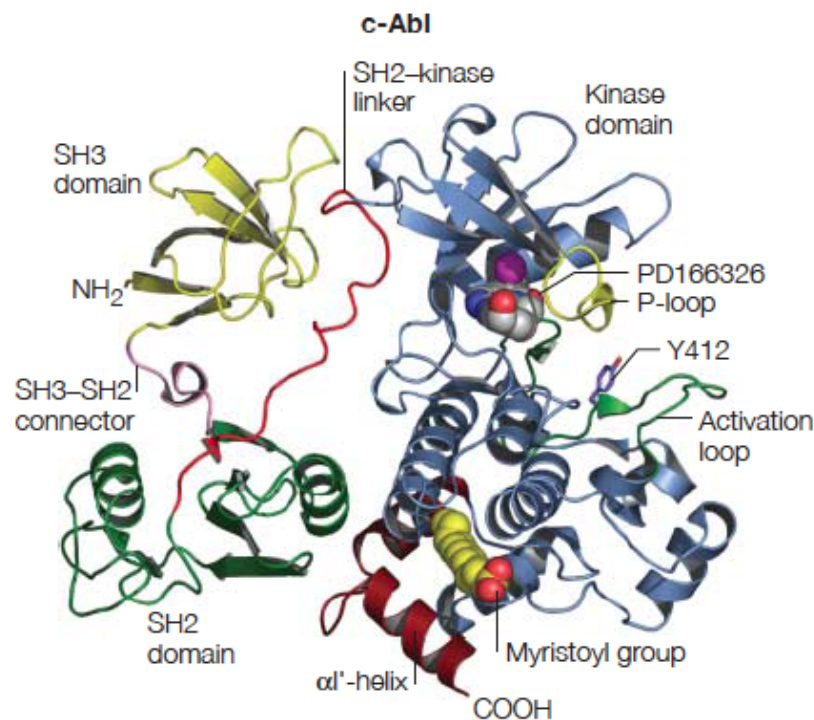


Figure 17
Structure de c-Abl (d'après Hantschel *et al.* (182))

III-2-2. Fonctions

c-Abl est impliquée dans la modulation de nombreuses voies de signalisation, dans la réponse au stress génotoxique, dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose. Dans une cellule normale, c-Abl est inactive grâce à un phénomène d'autoinhibition (179, 182). c-Abl est activée par les agents génotoxiques : RI, cisplatine, mitomycine... Elle est phosphorylée et activée par ATM lors de

l'irradiation au niveau de la Ser 465 ou par l'intermédiaire de DNA-PKcs (183). L'activation de c-Abl se fait préférentiellement au niveau nucléaire.

Les fonctions de c-Abl seraient différentes selon sa localisation, nucléaire ou cytoplasmique (Figure 18). Au niveau nucléaire, c-Abl joue un rôle dans :

- **La recombinaison homologue (RH)**, qui permet une réparation fidèle des cassures double-brin *via* le contrôle de l'activité de RAD51 permettant l'échange inter-brin de matériel génétique (184). RAD51 est une protéine nucléaire et cytoplasmique de 37 kDa jouant un rôle majeur dans la réparation par RH puisqu'elle permet au brin endommagé de se coupler au brin intact d'une chromatide sœur pour former un hétéroduplex (185). L'ADN polymérase peut alors synthétiser les bases manquantes en se servant du brin intact comme matrice (186). RAD51 est activée par phosphorylation par ATM et c-Abl (184, 187).

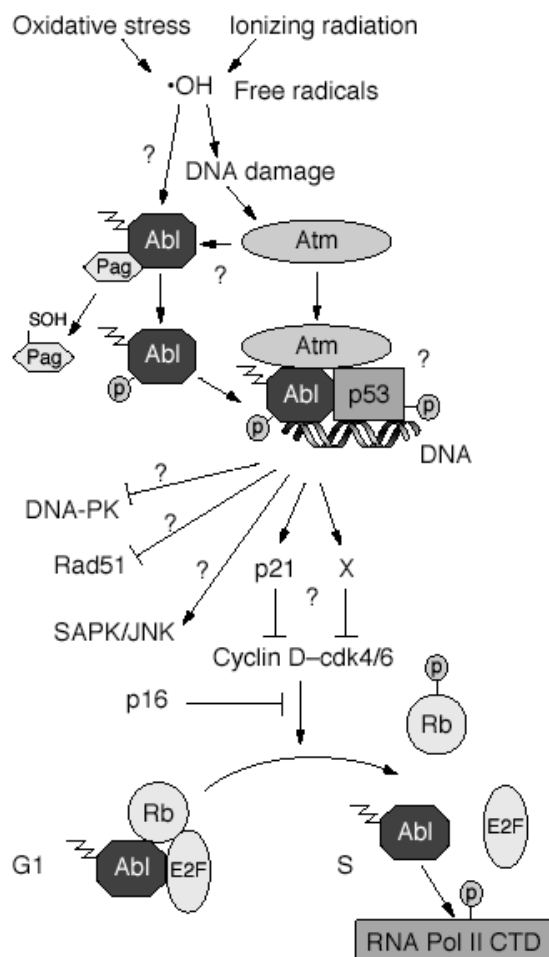


Figure 18
Fonctions nucléaires de c-Abl (d'après Van Etten (178))
jouerait alors un rôle dans la transcription pendant la phase S notamment par l'intermédiaire de deux facteurs de transcription, CREB et E2F-132 (189).

- **La suture non homologue (NHEJ)** : BRCA1 et c-Abl forment un complexe : BRCA1 se lie spécifiquement à la partie N-terminale de c-Abl (SH3) et c-Abl se lie spécifiquement à la région C-terminale de BRCA1 avec une région riche en proline (PXXP). Le complexe BRCA1-c-Abl est dissocié transitoirement après irradiation de manière ATM-dépendante. En effet, ATM phosphoryle BRCA1 ce qui entraîne la dissociation du complexe et l'activation de c-Abl (188).

- **La régulation du cycle cellulaire** : dans les cellules en phase G1, c-Abl forme un complexe avec la protéine du rétinoblastome, Rb. La phosphorylation de Rb par la cycline D-cdk4/6 à la transition G1-S entraîne une dissociation du complexe Rb-c-Abl avec une activation de c-Abl, l'action inhibitrice de Rb ayant été levée. c-Abl

- **La régulation de l'apoptose** : les cellules déficientes en c-Abl ont un défaut d'apoptose radio-induite (190). Les bases moléculaires du rôle pro-apoptotique de c-Abl sont encore mal comprises. Il a été supposé que c-Abl agissait directement sur p53. Cependant, il a été montré que c-Abl induisait l'apoptose indépendamment du statut de p53 (*wild type* ou muté). De plus, p53 n'est pas phosphorylée par c-Abl (191). Par contre, p73, membre de la famille de p53, semble jouer un rôle important. p73 induit l'apoptose dans un grand nombre de lignées cellulaires (192). p73 peut être activée par c-Abl et induire l'apoptose même en l'absence de p53 (193). Après irradiation, p73 est transloquée du cytoplasme à la matrice nucléaire de manière c-Abl-dépendante (191). Une surexpression de p73 associée à la présence de c-Abl est suffisante pour induire l'apoptose dans des fibroblastes. Contrairement à p53, p73 est phosphorylée après irradiation (194). p73 contient un motif PXXP riche en proline qui interagit avec le domaine SH3 de c-Abl. c-Abl phosphoryle p73 (195). De plus, il a été montré que p73 est un substrat direct de c-Abl à la fois *in vitro* et *in vivo* (192).

Au niveau du cytoplasme, c-Abl est associée à l'actine du cytosquelette grâce à sa partie C-terminale et jouerait un rôle dans l'adhésion cellulaire (178).

III-3. Bcr

III-3-1. Structure

Le gène BCR, identifié à partir du chromosome Ph, est situé sur le bras long du chromosome 22 et s'étend sur 135 kb. Il code une protéine de 160 kDa de distribution ubiquitaire. Plusieurs motifs structuraux sont identifiés (Figure 19) :

- le premier exon à l'extrémité N-terminale code pour une sérine/thréonine kinase dont le seul substrat identifié est Bap-1, membre de la famille des protéines 14-3-3 (196),
- un domaine "*coiled-coil*" dans la région N-terminale permet à Bcr de se dimériser (197),
- le centre de la molécule contient une région homologue de Rho-GEF (Rho guanidine nucléotide exchange factors), avec des domaines dbl-like et pleckstrin homologue (PH) capables de stimuler les échanges de GTP en GDP, et d'activer des facteurs de transcription tels que NF- κ B,
- l'extrémité C-terminale possède une activité GTPase pour Rac, une GTPase de la superfamille de RAS.

Il existe également plusieurs sites de phosphorylation, en particulier la tyrosine 177 qui lie GRB2, une molécule adaptatrice intervenant dans la voie de signalisation RAS.

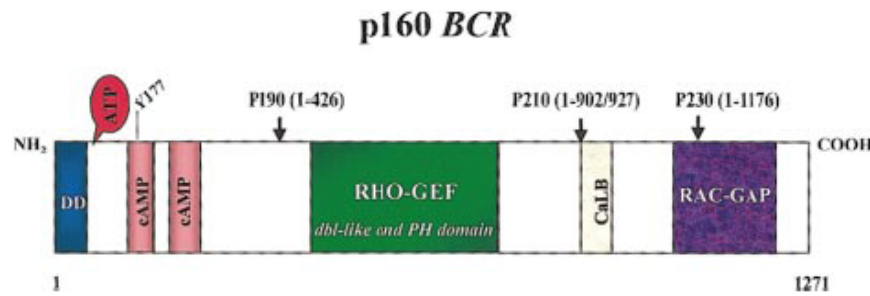


Figure 19
Structure de BCR (d'après Deininger *et al.* (198))

III-3-2. Fonctions

Le rôle de Bcr n'est pas complètement élucidé : elle interviendrait dans la transduction du signal, voire dans le cycle cellulaire.

Les souris BCR^{-/-} sont viables mais développent un choc septique après exposition aux lipopolysaccharides, conséquence de la dérégulation des mécanismes de réponse au stress oxydatif. Les souris BCR^{+/-} sont normales, suggérant que la perte d'un allèle BCR n'influence pas le cours de la LMC (199).

III-4. Le gène de fusion Bcr-Abl

III-4-1. Structure

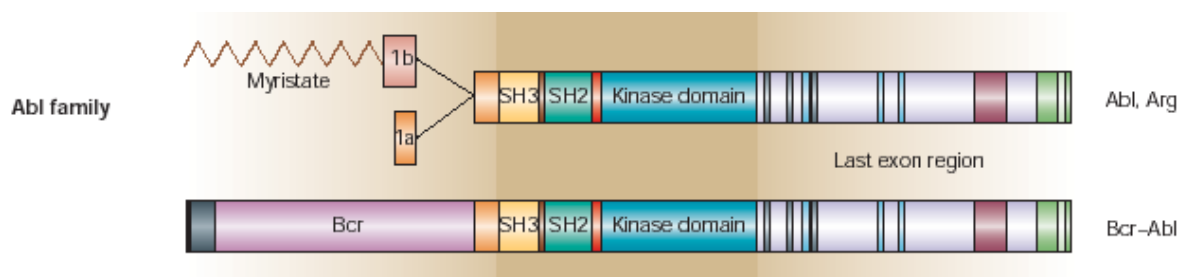


Figure 20

Structure d'Abl et de Bcr-Abl (d'après Hantschel *et al.* (182))

Bcr-Abl est une protéine chimérique résultant de la fusion des gènes BCR et ABL lors de la translocation des chromosomes 9 et 22 donnant naissance au chromosome Philadelphie (Ph) (Figure 20). Découvert en 1960 par Nowell et

Hungerford, le chromosome Ph est présent dans la presque totalité des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et dans 15% des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) (200). Le chromosome Ph constitue le premier marqueur spécifique d'un processus tumoral identifié. Les circonstances de survenue d'un tel accident moléculaire restent incomprises. La cassure peut survenir au niveau du gène ABL n'importe où dans une large région entre sa partie N-terminale et les exons IA et IB (201). Pour BCR, la cassure survient à un des trois points appelés « breakpoint cluster region » (Mbc, mbc et μ bc). Selon le point de cassure, le gène de fusion codera pour une protéine de poids moléculaire différent. Majoritairement, Bcr-Abl est une protéine de 210 kDa, cependant il existe des variants de 190 kDa et 230 kDa fonction du point de cassure (198). Bcr-Abl est uniquement cytoplasmique et constitutivement activée. La présence du domaine "coiled-coil" de Bcr à la partie N-terminale provoque la dimérisation de Bcr-Abl et son activation par autophosphorylation (Figure 21) (178).

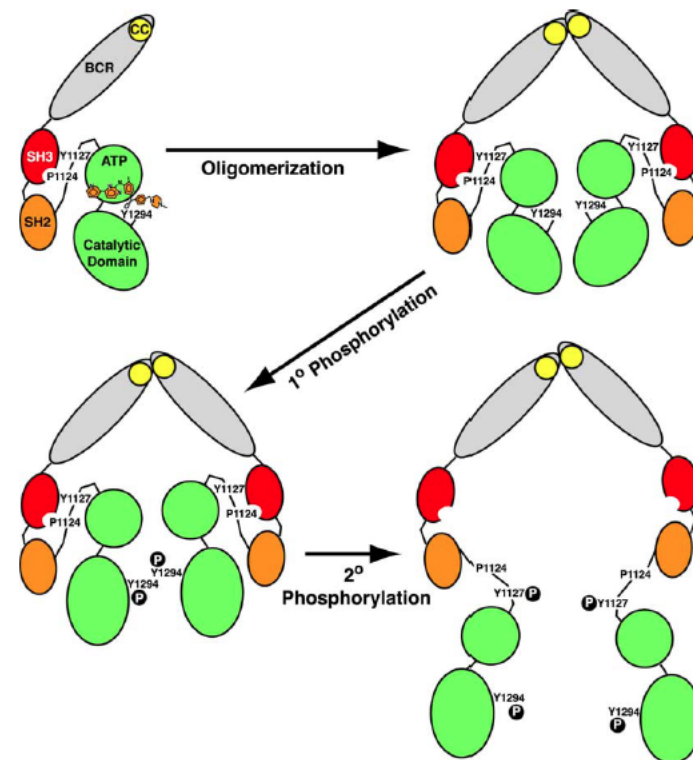


Figure 21
Mécanismes de régulation de Bcr-Abl (d'après Van Etten (202))

III-4-2. Fonctions

II-4-2-a. Dérégulation de l'activité tyrosine kinase de Abl

L'activité tyrosine kinase de Abl est étroitement régulée dans les conditions physiologiques, et le domaine SH3 joue un rôle inhibiteur central par l'interaction avec diverses protéines (Abi-1 et Abi-2 : Abl interactor proteins 1 et 2, Pag/Msp) ou par modification conformationnelle de Abl, inhibant alors la liaison avec son substrat. Ces données sont concordantes avec l'observation de l'activité tyrosine kinase de la protéine Abl hautement purifiée, témoignant que son inhibition constitutive résulte d'un mécanisme « trans ». Il est probable que la fusion de la séquence 5' de Bcr au domaine SH3 de Abl annule l'inhibition physiologique de la kinase. Le mécanisme en cause pourrait être la formation d'homodimère (178). En effet, le domaine de dimérisation N-terminal est une caractéristique essentielle de la protéine Bcr-Abl. L'expression de Bcr-Abl augmente la prolifération en réponse aux facteurs de croissance, augmente la survie indépendamment des facteurs de croissance et réduit l'adhésion cellulaire.

II-4-2-b. Les substrats de Bcr-Abl

Beaucoup de substrats peuvent être phosphorylés par Bcr-Abl. Il existe par ailleurs un taux élevé de la forme phosphorylée de Bcr-Abl par le biais de l'auto-phosphorylation, ce qui a pour conséquence de favoriser la liaison au domaine SH2 des protéines. Les substrats de Bcr-Abl peuvent être classés selon leur rôle physiologique, les protéines adaptatrices telles que Crkl et p62, les protéines intervenant dans l'organisation du cytosquelette et la membrane cytoplasmique, telles que la paxilline et la taline et les protéines ayant une activité catalytique, comme la tyrosine kinase Fes et la phosphatase Syp. Le choix des substrats se fait en fonction du contexte cellulaire. Ainsi, Crkl est la principale protéine phosphorylée dans les polynucléaires neutrophiles et la p62 est phosphorylée dans les précurseurs myéloïdes précoces.

II-4-2-c. Les voies de signalisation activées

Bcr-Abl active de nombreuses voies de signalisation rendant la cellule indépendante de son environnement et induisant une transformation maligne (198) (Figure 22) :

- une prolifération en l'absence de facteur de croissance par l'activation de la voie RAS via GRB2, de la voie JNK et de STAT5 ;

une protection par rapport à l'apoptose par activation d'AKT via PI3K, inhibant Bad, facteur pro-apoptotique ; elle possède par ailleurs une activité régulatrice sur Bcl-2 et Bcl-XL, facteurs anti-apoptotiques ;

- un potentiel invasif et de dissémination métastatique par altération des propriétés d'adhésion de la cellule via Crkl (203).

La protéine Bcr-Abl active également la dégradation par ubiquitination de certaines protéines. Elle induit la dégradation par le protéasome d'inhibiteurs de cdk, comme p27, favorisant la progression dans le cycle cellulaire.

STAT5 est un facteur de transcription de 90 kDa, c'est un substrat très important de Bcr-Abl qui se transloque au niveau nucléaire après phosphorylation et dimérisation (204). Il contribuerait à la transformation maligne des cellules Bcr-Abl notamment en activant la transcription de Bcl-XL (205).

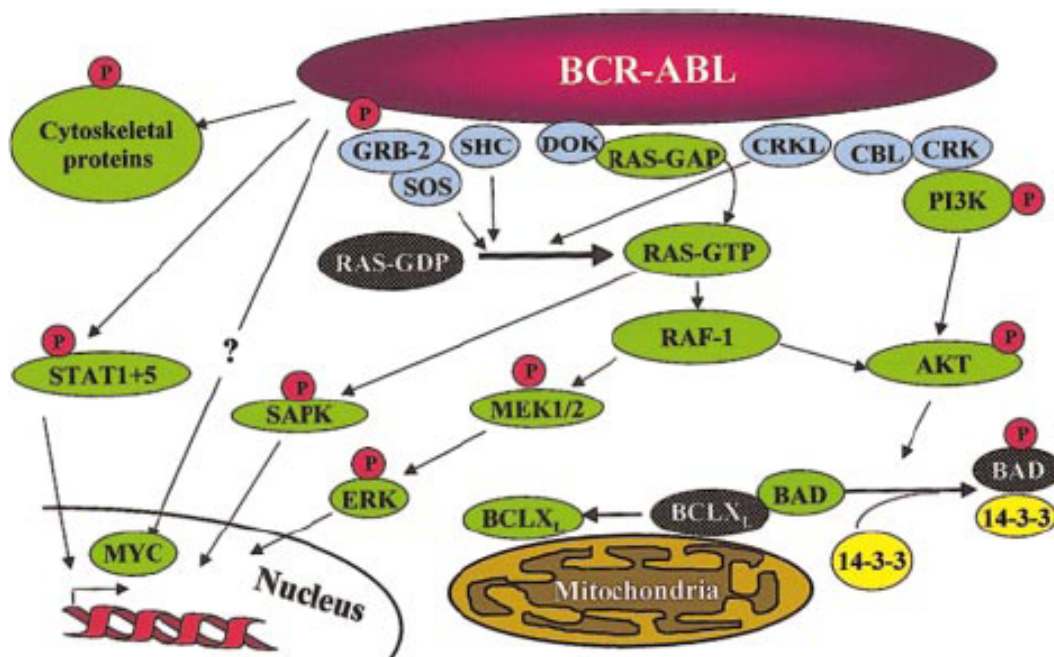


Figure 22

Mécanismes de transformation maligne par Bcr-Abl (d'après Deininger *et al.* (198))

De plus, la présence de Bcr-Abl rend la cellule résistante aux traitements génotoxiques, chimiothérapie et radiothérapie, essentiellement par activation de la réparation par recombinaison homologue (augmentation de l'activité de RAD51), par allongement de l'arrêt du cycle cellulaire en G2-M donnant plus de temps à la cellule pour réparer les lésions, et par activation de Bcl-XL (206) (Figure 23).

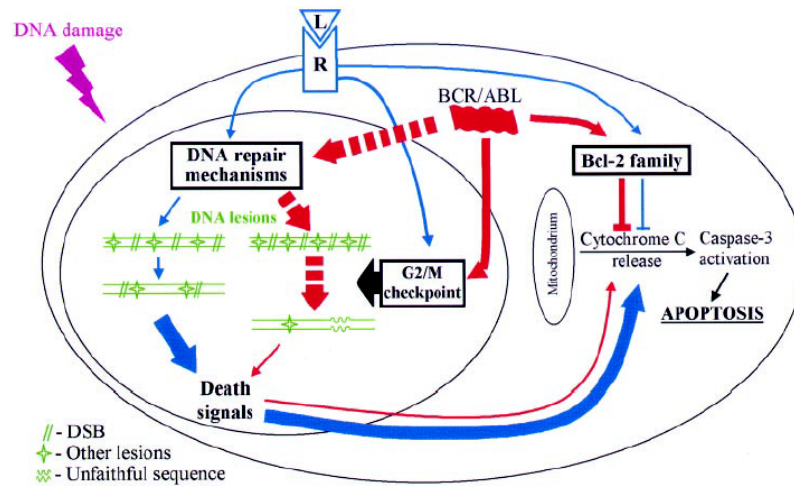


Figure 23

Mécanismes de résistance au stress génotoxique dans les cellules Bcr-Abl (d'après Skorski (206))

Bcr-Abl augmente l'expression de RAD51 par augmentation de sa transcription *via* STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 5*), et diminution de sa dégradation par inhibition de son clivage par la caspase-3 (207). L'activation de RAD51 par Bcr-Abl par phosphorylation du résidu Tyr315 induirait une majoration de la réparation des lésions et par conséquent une résistance aux agents génotoxiques, dont les radiations ionisantes (208, 209).

III-5. Influence de Bcr-Abl sur la radiosensibilité

Plusieurs arguments suggèrent que Bcr-Abl pourrait influencer la radiosensibilité :

- la protéine de fusion p210 Bcr-Abl entraîne une délocalisation de c-abl dans le cytoplasme qui est susceptible de modifier la compétition entre c-abl et Ku pour la fixation sur la protéine DNA- PKcs (protéine nucléaire) et pourrait ainsi modifier profondément la capacité de réparation des CDB et par conséquent la radiosensibilité des cellules exprimant Bcr-Abl.
- Bcr-Abl peut activer la voie PI3K et pourrait ainsi par ce mécanisme influencer la radiosensibilité. En effet, les gènes ATM et DNA-PKcs qui jouent un rôle clé dans la réparation des CDB et la radiosensibilité appartiennent à la famille des PI-3 kinases. Il a été établi que l'expression de la protéine p210 Bcr-Abl entraîne une résistance majeure à l'apoptose induite par certains agents tels que l'étoposide.

- Bcr-Abl agit sur la réparation des lésions de l'ADN en diminuant l'expression de DNA-PKcs via une dégradation par le protéasome, ce qui entraîne une majoration de la radiosensibilité (210).

III-6. Le STI571 (imatinib ou Glivec®)

III-6-1. Mode d'action

L'imatinib agit par compétition au niveau du site de fixation de l'ATP. En bloquant la liaison de l'ATP à son site, il empêche le transfert des phosphates et par conséquent la transduction de signaux énergétiques nécessaires à la prolifération cellulaire (Figure 24). Il est actif sur la forme non phosphorylée de c-Abl, la maintenant en conformation inactive. L'IC₅₀ est égal à 35 nM pour c-Abl, 25 nM pour Bcr-Abl (211, 212).

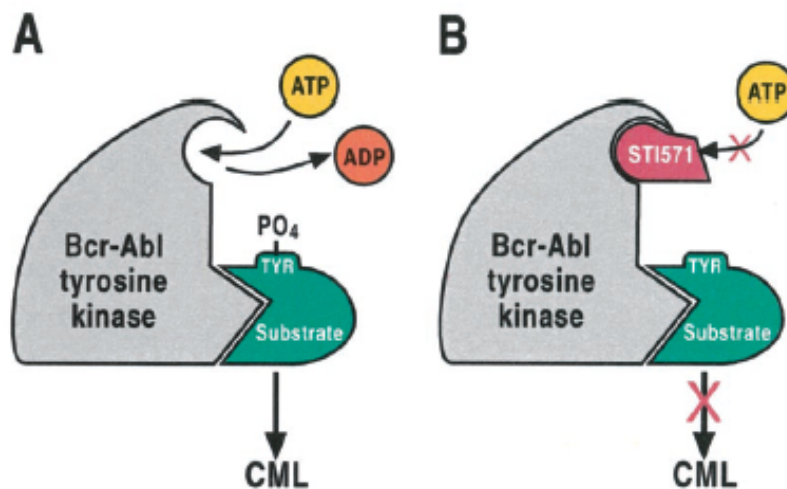


Figure 24

Mode d'action du STI571

(A) La tyrosine kinase Bcr-Abl constitutivement activée fonctionne en transférant des phosphates de l'ATP sur des résidus tyrosine de différents substrats. (B) Le STI571 bloque la liaison de l'ATP au site tyrosine kinase de Bcr-Abl, inhibant ainsi l'activité de la kinase (d'après Mauro *et al.* (3))

III-6-2. Indications et résultats

Jusqu'aux années 80, le seul traitement curatif de la LMC était la greffe de moëlle allogénique. Puis l'interféron- α et la cytarabine ont offert une alternative thérapeutique chez les patients ne pouvant être greffés. Le Glivec® (STI571) est apparu à la fin des années 1990. Dans cette indication, le STI571 a d'abord été testé en phase I chez les patients résistants à l'interféron- α (213). Au vu de sa bonne tolérance et d'un taux de réponse élevé (54%), il a ensuite été étudié lors d'une étude de phase II dans la même population de patients permettant d'obtenir 60% de réponses cytogénétiques majeures et 95% de réponses hématologiques complètes (214). Une étude de phase III a donc très rapidement démarré, comparant le STI571 au traitement de référence, soit l'association interféron- α et cytarabine (215). Dans le groupe de patients traités par STI571, on observait à 18 mois 87,1% de réponses cytogénétiques majeures et 76,2% de réponses cytogénétiques complètes, versus 34,7% et 14,5% respectivement avec l'interféron- α et la cytarabine ($p < 0,001$). Grâce à ces résultats, l'imatinib a obtenu dès décembre 2002 une autorisation de mise sur le marché à la dose de 400 mg/j par voie orale.

Le STI571 s'est également montré efficace dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) surexprimant c-kit (216, 217).

III-6-3. Mécanismes de résistance

Le taux de résistance au STI571 est estimé à 2 ans à 10% dans la phase chronique, 40-50% dans la phase accélérée et 80% dans la phase blastique (218). Les mécanismes de cette résistance sont multiples : surexpression de Bcr-Abl avec amplification de l'oncogène BCR-ABL, mutations au niveau du site de liaison à l'ATP, augmentation de l'efflux de la drogue liée à la surexpression de l' $\alpha 1$ glycoprotéine acide (219).

Une des approches thérapeutiques pour vaincre ces résistances à l'imatinib est d'augmenter la posologie du médicament, en particulier s'il s'agit d'une résistance par hyperexpression de Bcr-Abl ou par amplification de Bcr-Abl. Certaines mutations sont également sensibles à cette stratégie, d'autres non, telles que les mutations de la région dite boucle P (P loop) (acides aminés 248 à 256) et le site de l'acide aminé thréonine 315, qui sont donc importantes à identifier.

IV – L'adénocarcinome du pancréas

IV-1. Généralités cliniques

III-1-1. Épidémiologie

On estime qu'environ 7700 nouveaux cancers du pancréas exocrine ont été diagnostiqués en France en 2009 (220). Ce cancer est plus fréquent chez l'homme avec un sex ratio de 1,6. Les taux d'incidence en 2005 étaient de 7,7 pour 100 000 habitants chez l'homme et 4,7 pour 100 000 chez la femme (221). Ils sont en augmentation depuis deux décennies, de manière plus nette chez la femme (+ 3,8% par an) que chez l'homme (+ 2% par an). Le risque de développer un cancer du pancréas est faible jusqu'à 50 ans (moins de 5 % des cas) puis augmente avec un pic de fréquence entre 65 et 75 ans. C'est la 5^{ème} cause de décès par cancer avec 8623 décès observés en 2007 en France (5,3% des décès par cancer). Le taux de mortalité est stable chez l'homme et en légère augmentation chez la femme.

Les facteurs de risque du cancer du pancréas sont assez mal connus. L'exposition aux amines aromatiques est associée à une augmentation du risque de cancer du pancréas. Le facteur de risque le mieux connu est le tabagisme par le biais des amines aromatiques contenues dans la fumée de cigarette. De nombreuses études prospectives ont montré une association entre le tabagisme et le cancer du pancréas, confirmant ce qui avait été mis en évidence dans des études animales et sur des séries autopsiques. Des études cas-témoins ont observé un risque relatif de cancer du pancréas de 1,3 à 5,5 chez les fumeurs (222). Il existe aussi probablement une augmentation du risque de cancer du pancréas chez certaines catégories de travailleurs exposés aux amines aromatiques, dans l'industrie chimique et pétrochimique. L'association entre alimentation riche en viandes et poissons cuits et cancer du pancréas peut être expliquée par les propriétés mutagènes et carcinogènes des amines aromatiques hétérocycliques formées lors de la cuisson par pyrolyse. Par contre, la consommation de fruits et de légumes a un effet protecteur vis-à-vis du cancer du pancréas probablement grâce aux effets anti-oxydants de la vitamine C qu'ils contiennent. Les rôles du café et de l'alcool ont été longtemps controversés, ils semblent aujourd'hui écartés.

Dans 5 à 10 % des cas, on retrouve chez les patients une histoire familiale de cancer pancréatique (223). Schématiquement, on distingue les cancers s'intégrant

dans un syndrome génétique déterminé et ceux, plus fréquents, survenant dans un contexte d'agrégation familiale non syndromique. Dans le premier groupe, on trouve des affections à expression phénotypique variée : syndromes des cancers du sein et de l'ovaire familiaux (mutation du gène BRCA2), mélanome familial multiple (CDKN2A/p16), syndrome de Peutz-Jeghers (STK11/LKB1), pancréatite chronique héréditaire (PRSS1), syndrome de Lynch (MLH1, MSH2, MSH3) ou encore syndrome de Li-Fraumeni (TP53). Dans le second groupe, les cancers surviennent par agrégation dans certaines familles. Le ratio d'incidence standardisé varie de 5 à 30 selon le nombre d'apparentés atteints. La recherche d'une mutation germinale est actuellement souvent négative, sauf dans les familles comportant de nombreux cas. Ainsi, lorsqu'il existe trois apparentés atteints ou plus, la probabilité de trouver une mutation germinale du gène BRCA2 est de l'ordre de 15 %. En pratique, on considère que la survenue d'un cancer chez au moins deux apparentés au premier degré doit faire évoquer une susceptibilité familiale.

La majorité des cancers du pancréas sont des adénocarcinomes canauxiers.

III-1-2. Diagnostic

III-1-2-a. Diagnostic clinique et biologique

Cliniquement, le cancer du pancréas est longtemps asymptomatique. Le diagnostic est, par conséquent, porté le plus souvent tardivement. De plus, le pancréas est un organe profond, peu accessible à l'examen clinique. Les premiers signes cliniques de la maladie sont aspécifiques : altération de l'état général avec asthénie, anorexie et amaigrissement. Un ictère peut apparaître précocement dans les cancers de la tête du pancréas. Il est secondaire à la compression de la voie biliaire principale par la tumeur. Il peut être associé à un prurit mais de manière inconstante. Dans les cancers du corps et de la queue du pancréas, l'ictère est tardif, le plus souvent en rapport avec des métastases hépatiques ou une compression des voies biliaires par des adénopathies. Dans ces mêmes tumeurs, la douleur est le signe d'appel le plus fréquent, elle est classiquement épigastrique, transfixiante, due à l'envahissement du plexus coeliaque par la tumeur. La tumeur est rarement palpable.

Plus tardivement, des vomissements par compression duodénale, une diarrhée avec stéatorrhée, une ascite en rapport avec une carcinose péritonéale peuvent survenir.

Biologiquement, une cholestase non spécifique peut être observée avec élévation de la bilirubine conjuguée, des phosphatases alcalines et de la gamma-glutamyltranspeptidase (γ GT). Une élévation du dosage sérique du CA19-9 est observée chez plus de 80% des patients. Cependant, sa spécificité est faible et elle n'a pas de valeur diagnostique. Le dosage de l'ACE est peu sensible dans l'adénocarcinome pancréatique.

III-1-2-b. Imagerie

- *L'échographie abdominale* reste l'examen de première intention en cas de suspicion de cancer du pancréas. Elle peut mettre en évidence une tumeur solide, hypoéchogène, déformant plus ou moins les contours du pancréas mais cet organe est difficile à visualiser du fait de fréquentes interpositions gazeuses et chez les sujets corpulents. Elle évalue correctement l'extension tumorale dans seulement 43% des cas. Ce sont le plus souvent des signes indirects qui orientent le diagnostic : dilatation de la voie biliaire principale, des voies biliaires intrahépatiques, grosse vésicule biliaire, dilatation du canal de Wirsung, voire métastases hépatiques ou présence d'ascite. De plus, l'échographie abdominale est un examen peu sensible pour les tumeurs de moins de 2 cm de diamètre.
- *La tomодensitométrie abdominale* avec injection de produit de contraste est l'examen de référence dans le bilan du cancer du pancréas. Elle montre une tumeur hypovascularisée ou du moins une augmentation de volume localisée à une région du pancréas avec une sensibilité de 70 à 80%. Elle permet de rechercher une infiltration péri-pancréatique, un envahissement des organes de voisinage, la présence d'adénopathies en particulier inter-aortico-caves, de métastases hépatiques et d'ascite. Elle permet aussi d'évaluer l'envahissement vasculaire, élément clé pour établir la résecabilité de la tumeur avec une efficacité diagnostique de 70 à 80%, l'efficacité diagnostique étant définie par la somme des vrais positifs (VP) et des vrais négatifs (VN) divisée par la somme des VP, des faux positifs (FP), des VN et des faux négatifs (FN).
- *L'échoendoscopie* est l'examen le plus sensible pour le diagnostic et le bilan d'extension, en particulier pour les tumeurs céphaliques de moins de 3 cm. Son efficacité diagnostique est de 75 à 95% pour l'évaluation de la taille tumorale et de l'extension locale. Elle permet d'apprécier les rapports de la

masse avec les axes vasculaires, notamment les vaisseaux mésentériques supérieurs, avec une sensibilité de 80%. Elle évalue l'extension ganglionnaire avec une sensibilité variant entre 45 et 70% et une spécificité de près de 80%. Il s'agit de l'examen le plus informatif mais il est opérateur-dépendant.

III-1-2-c. Diagnostic histologique

Il doit impérativement être obtenu avant de commencer le traitement. En effet, une tumeur neuro-endocrine pancréatique ne se traite pas de la même façon qu'un adénocarcinome et n'a pas le même pronostic. En cas de tumeur résécable, le diagnostic histologique est obtenu après l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire ou par une biopsie chirurgicale réalisée pendant l'intervention. Dans le cas contraire, une ponction de la tumeur échoguidée (sous échographie ou lors d'une échoendoscopie) ou sous scanner permet de confirmer le diagnostic.

Dans près de 95% des cas, les cancers du pancréas se développent aux dépens du pancréas exocrine. Le cancer du pancréas exocrine est un adénocarcinome ductulaire dans 90% des cas. Les autres formes sont plus rares : adénocarcinome à cellules géantes, carcinome épidermoïde, cystadénocarcinome mucineux, carcinome intra-ductulaire mucineux, adénocarcinome acinaire. La localisation la plus fréquente est la tête du pancréas (60 à 70% des cas) puis plus rarement le corps (10 à 15% des cas) et la queue (5 à 10% des cas) et parfois l'ensemble de la glande (10 à 20% des cas).

III-1-3. Principes du traitement

Le pronostic du cancer du pancréas est très sombre avec des taux de survie à 5 ans de 1 à 4% tous stades confondus (10). Devant une suspicion de tumeur maligne pancréatique, la première question qui se pose est celle de sa résécabilité chirurgicale. En effet, de la réponse à cette question dépend à la fois la stratégie thérapeutique et le pronostic.

Environ 20% des patients ont une tumeur résécable au moment du diagnostic du fait d'un diagnostic souvent tardif. Dans 30% des cas, la maladie est trop étendue avec un envahissement vasculaire la rendant non résécable, sans être pour autant métastatique. De plus, l'adénocarcinome pancréatique est très lymphophile et métastase précocement au niveau des relais ganglionnaires régionaux, du foie et du péritoine. Dans plus de 50% des cas, les patients présentent une maladie métastatique au moment du diagnostic. En pratique clinique, la stratégie

thérapeutique repose plus sur le caractère résecable/localement avancé/métastatique de la tumeur que sur la classification internationale TNM.

III-1-3-a. Cancers du pancréas résecables : traitement adjuvant

Le seul traitement potentiellement curatif d'un cancer du pancréas est l'exérèse chirurgicale, le plus souvent par duodéno pancréatectomie céphalique (DPC) pour les tumeurs de la tête du pancréas ou par spléno pancréatectomie gauche, pour les tumeurs de la queue. Celle-ci est réalisable chez 20% des patients au moment du diagnostic. Parmi les patients opérés, 80% vont rechuter, localement ou à distance, avec un taux de survie de moins de 20% à 5 ans. Les années 1980 ont vu l'apparition des premières associations chimioradiothérapies. Le premier essai randomisé mené à la fin des années 70 aux Etats-Unis par le *Gastrointestinal Tumor Study Group* (GITSG) comparait chez 43 patients une exérèse chirurgicale seule ou suivie d'une CRT avec du 5-fluorouracile (5-FU) en bolus (224). La survie globale et le taux de survie à 2 ans étaient significativement supérieurs dans le bras CRT (20 mois vs 11 mois et 43% vs 18%, respectivement ; $p=0,005$). L'essai de l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) n'est pas venu confirmer le bénéfice de l'association CRT adjuvante (225). Cet essai comparait chez 218 patients ayant eu une DPC le même schéma de CRT adjuvante à une surveillance. Le taux de survie globale à 2 ans était identique dans les deux bras (51% dans le bras CRT contre 41% ; $p=0,2$). Alors que les Etats-Unis ont admis comme traitement standard une CRT post-opératoire, les résultats de l'essai de l'EORTC n'ont pas permis de considérer ce traitement adjuvant comme un standard en Europe. L'essai ESPAC-1 comparait chez 289 patients après chirurgie une surveillance à une CRT ou une chimiothérapie (226). La CRT était une radiothérapie en split-course (irradiation par séries de deux semaines espacées de deux semaines) associée à du 5-FU bolus, identique à celle du bras expérimental de l'essai du GITSG. La chimiothérapie adjuvante était composée de 6 cycles de 5-FU bolus et acide folinique (FUFOL selon le schéma de la Mayo Clinic). L'analyse des résultats concluait à une survie moins bonne chez les patients ayant reçu une CRT en comparaison avec ceux n'en ayant pas reçu (15,9 mois versus 17,9 mois ; $p=0,05$). Par contre, les patients ayant reçu une chimiothérapie avaient une survie significativement plus longue que ceux n'en ayant pas reçu (20,1 mois versus 15,5 mois ; $p=0,009$). Il est possible que l'absence de critère de qualité de la radiothérapie dans cet essai ait entraîné des irradiations de grand volume potentiellement toxiques, d'autant plus que la dose initialement prévue de 40 Gy pouvait être augmentée à 60

Gy à la discrétion des investigateurs. Plus récemment, une méta-analyse sur données publiées a montré qu'il existait un bénéfice de la CRT adjuvante pour le sous-groupe des patients ayant eu une résection incomplète (R1) (227).

Par ailleurs, l'étude allemande de phase III CONKO-1 a montré un allongement de la survie sans récurrence (13,4 mois vs 6,9 mois, $p < 0,001$) chez les malades traités par gemcitabine pendant 6 mois par rapport à ceux n'ayant pas de traitement adjuvant (228). Un effet bénéfique était rapporté quel que soit le statut des marges de résection, R0 ou R1. Un gain significatif en terme de survie globale a été rapporté en 2008 lors de la réactualisation des résultats de cette étude (22,8 mois dans le bras gemcitabine versus 20,2 mois dans le bras contrôle, $p = 0,005$). L'essai ESPAC-3 a comparé chez 1088 patient une chimiothérapie adjuvante par FUFOL pendant 6 mois à six cycles de gemcitabine administrée selon le schéma de Burris (229). La survie globale était identique dans les deux bras (23 mois dans le bras FUFOL versus 23,6 mois dans le bras gemcitabine, $p = 0,39$). La médiane de survie sans progression était aussi identique dans les deux bras. La tolérance était meilleure dans le bras gemcitabine. Très récemment ont été communiqués les résultats d'un essai de phase II randomisé mené par l'EORTC, la FFCD et le GERCOR ayant comparé après exérèse chirurgicale chez des patients R0 une chimiothérapie par 4 cycles de gemcitabine à deux cycles de gemcitabine suivis d'une chimioradiothérapie avec gemcitabine concomitante (230). La survie sans progression et la survie globale étaient identiques dans les deux bras. Un essai de phase III de plus grande envergure serait nécessaire pour conclure sur le rôle de la chimioradiothérapie en situation adjuvante. En l'état actuel des connaissances, en cas de marge positive (résection R1), peut se discuter après 3 à 6 mois de chimiothérapie une association chimioradiothérapie.

III-1-3-b. Cancers du pancréas résécables : traitement néoadjuvant

Plusieurs arguments théoriques viennent plaider en faveur de la réalisation d'un traitement néoadjuvant :

- la possibilité de délivrer la totalité du schéma thérapeutique à une plus grande proportion de patients. En effet, on estime qu'environ 20% à 30% des patients opérés ne peuvent pas avoir un traitement adjuvant, en raison de la survenue de complications post-opératoires et du délai nécessaire pour retrouver un état général compatible avec ce type de traitement ;
- la possibilité d'une réévaluation préopératoire permettant d'épargner une chirurgie lourde aux patients présentant une progression rapide de la maladie ;

- la fréquence de l'envahissement des marges, suggérant que la chirurgie seule n'est pas suffisante pour assurer un contrôle local ;
- une meilleure radiosensibilité tumorale, l'irradiation survenant sur des tissus non disséqués et donc mieux oxygénés.

Ces trois dernières années, les résultats de plusieurs essais de phase II de chimioradiothérapie néoadjuvante ont été publiés. En France, l'essai FFCD-SFRO 97-04 portant sur 41 patients ayant reçu un traitement néoadjuvant (irradiation à la dose de 50 Gy avec 5-FU et cisplatine concomitant) a montré la faisabilité de ce protocole : 90% des patients avaient reçu une dose d'irradiation d'au moins 46 Gy et 73% des patients avaient reçu au moins 75% de la dose totale de chimiothérapie (231). Vingt-six patients (63%) ont eu une exérèse chirurgicale à visée curative avec un taux de réponse histologique majeure de 50% et une réponse complète.

La gemcitabine ayant d'une part montré sa supériorité par rapport au 5-FU pour les tumeurs avancées et d'autre part fait la preuve d'un fort pouvoir radiosensibilisant, il était logique de l'associer à la radiothérapie pré-opératoire. Une équipe du *M. D. Anderson Cancer Center* a inclus 86 patients dans un essai de phase II associant une chimiothérapie par gemcitabine à la dose de 400 mg/m² à une radiothérapie pré-opératoire à la dose de 30 Gy en 10 fractions de 3 Gy (232). Cinquante-trois pourcent des patients ont été hospitalisés en cours de CRT pour toxicité. Parmi les 86 patients inclus, 74 ont été jugés opérables lors du bilan d'évaluation 4 à 6 semaines après la fin de la CRT. Soixante-quatre patients (74%) ont finalement pu avoir une duodéno pancréatectomie. Parmi les patients opérés, 11% avaient des marges envahies (R1) et 38% un envahissement ganglionnaire. Le taux de complications post-opératoires sévères était de 9% avec un décès lié à un lâchage de sutures. La survie médiane des 64 patients réséqués était de 34 mois avec un taux de survie à 5 ans de 36%. Le taux de rechute locale était de 11%.

Étant donné le taux élevé de rechute à distance dans cet essai, la même équipe du *M. D. Anderson Cancer Center* a ajouté au schéma précédemment décrit une chimiothérapie par gemcitabine et cisplatine avant la CRT afin d'essayer d'agir plus efficacement sur une potentielle maladie micro-métastatique (233). Cet essai de phase II a inclus 90 patients. Cinquante-un pourcent des patients ont été hospitalisés en cours de CRT pour toxicité. Soixante-dix-neuf patients ont reçu le traitement complet. Parmi ces 79 patients, 52 (66%) ont eu une duodéno pancréatectomie. Parmi les patients opérés, 4% avaient des marges envahies (R1) et 58% un envahissement ganglionnaire. Le taux de complications post-opératoires sévères était de 9,6%. La survie médiane des 52 patients réséqués était de 31 mois alors qu'elle était de 10,5

mois pour les patients non opérés. Le taux de rechute locale était de 25%. L'ajout d'une chimiothérapie première à la CRT néoadjuvante ne semble pas améliorer la survie des patients. Ces différents résultats sont prometteurs, la CRT néoadjuvante permettant d'obtenir une survie prolongée chez les patients opérés. L'étape suivante consiste peut-être en l'identification précoce des patients présentant une maladie micrométastatique d'emblée pour lesquels chirurgie et CRT sont inutiles. Tant que la CRT néoadjuvante n'a pas été comparée à la chimiothérapie adjuvante dans un essai randomisé, celle-ci doit se faire uniquement dans le cadre d'essai thérapeutique.

III-1-3-c. Cancers du pancréas localement avancés

Pour les cancers du pancréas localement avancés, c'est-à-dire non résécables et non métastatiques (stade III), il n'y a pas de standard thérapeutique (234). Deux options sont utilisées, la chimiothérapie par gemcitabine et la CRT. Deux méta-analyses récentes sur données publiées ont conclu à l'absence de supériorité de la CRT par rapport à la CT (29, 35). Plus récemment, chimiothérapie et CRT ont été comparées dans un essai de phase III mené par la Fédération Française de Cancérologie Digestive (FFCD) et la Société Française d'Oncologie Radiothérapique (SFRO) (235). Cet essai a comparé la survie de 119 patients traités soit par chimiothérapie seule (gemcitabine telle que dans le schéma de Burris), soit par CRT de 60 Gy avec 5-FU et cisplatine. Dans les 2 bras, la chimiothérapie de maintien était de la gemcitabine jusqu'à progression ou toxicité inacceptable. La survie médiane était plus courte dans le bras CRT (8,6 mois versus 13 mois, $p=0,03$). Le taux de toxicité de grade 3-4 était plus élevé dans le bras CRT, que ce soit pendant la phase initiale de traitement (36% versus 22%) ou pendant la chimiothérapie d'entretien (32% versus 18%). Ce taux de toxicité élevée est probablement dû au schéma de CRT utilisé avec une dose élevée (60 Gy alors que la dose recommandée est de 50 à 54 Gy) et une chimiothérapie concomitante par 5-FU et cisplatine, moins bien tolérée que le 5-FU en monothérapie. Dans le même temps, l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) menait un essai de phase III presque similaire (236). Une chimiothérapie par 7 cycles de gemcitabine seule (1000 mg/m² J1, J8, J15) était comparée à une CRT de 50,4 Gy avec gemcitabine concomitante (600 mg/m²/sem) suivie de 5 cycles de gemcitabine seule. Plus de 300 patients devaient être inclus or l'essai a été clos après 74 inclusions en raison de la lenteur des inclusions. Le taux de réponse objective était de 2,7% dans le bras chimio versus 8,8% dans le bras CRT. La survie médiane était plus longue dans le bras CRT (11 mois versus 9,2 mois, $p=0,022$). Le taux de toxicité de grade 4 était beaucoup plus élevé dans le bras CRT (41,2% versus 5,7%, $p<0,001$).

Même si le nombre de patients inclus dans cet essai est peu important, ses résultats viennent contredire ceux de l'essai de Chauffert *et al.*

Plutôt que de continuer à opposer chimiothérapie et CRT, plusieurs équipes ont développé une stratégie thérapeutique consistant à associer chimiothérapie et CRT avec une médiane de survie de 12 à 17 mois (237, 238). En effet, quel que soit le mode de traitement utilisé, environ 30% des patients présentent une progression tumorale durant les trois premiers mois de traitement. Une chimiothérapie première pourrait donc permettre de sélectionner les patients pouvant potentiellement bénéficier ensuite d'une CRT. L'essai de phase III LAP07 mené par le GERCOR, la FFCD et la FNCLCC vient de débiter pour confirmer cette hypothèse. Dans cet essai international sont inclus des patients avec un cancer du pancréas localement avancé. Pendant les quatre premiers mois de traitement, ils reçoivent une chimiothérapie d'induction par gemcitabine associée ou non avec de l'erlotinib. Les patients ayant une tumeur contrôlée après cette première phase de traitement sont ensuite randomisés entre poursuite de la chimiothérapie pour deux cycles ou CRT (radiothérapie conformationnelle à la dose de 54 Gy avec chimiothérapie concomitante par capécitabine). Les patients ayant été randomisés initialement dans le bras gemcitabine-erlotinib reçoivent ensuite un traitement d'entretien par erlotinib jusqu'à progression.

III-1-3-d. Cancers du pancréas métastatiques

L'adénocarcinome pancréatique est relativement peu chimiosensible. Jusqu'au milieu des années 1990, la chimiothérapie de référence était le 5FU avec pourtant un taux de réponse très faible. Puis Burris *et al.* ont comparé, dans une étude de phase III, un traitement par 5FU à la dose de 600 mg/m² en perfusion courte une fois par semaine à un traitement par gemcitabine à la dose de 1 000 mg/m² en perfusion de 30 minutes, selon un schéma hebdomadaire (7 semaines sur 8, puis 3 semaines sur 4) (239). Cent vingt-six patients ont été inclus dans cette étude, 75 % étaient métastatiques. Il a été observé un bénéfice clinique dans 4,8 % des cas après 5FU versus 23,8 % des cas après gemcitabine ($p = 0,0022$), avec une survie globale de 4,41 versus 5,65 mois ($p = 0,0025$). La tolérance du traitement par gemcitabine était bonne. Suite à cette étude, la gemcitabine est devenue la chimiothérapie de référence dans le cancer du pancréas grâce au bénéfice clinique apporté aux patients, et ce malgré des taux de réponse assez faibles.

Auteur	Traitement	N	LA/M	RO	SSP	SG	<i>p</i>
--------	------------	---	------	----	-----	----	----------

			(%)	(%)	(mois)	(mois)	
Gemcitabine et 5-FU / capécitabine							
Berlin	Gem	163	10/90	5,6	2,2	5,4	0,09
	Gem / 5-FU bolus	164		6,9	3,4	6,7	
Riess	Gem	238	23/77			6,2	0,7
	Gem / 5-FU p.c. / AF	235				5,8	
Herrmann	Gem	319	21/79	7,9	4	7,3	0,3
	Gem / capécitabine			10,1	4,8	8,4	
Cunningham	Gem	266	30/70	12,4	3,8	6,2	0,08
	Gem / capécitabine	267		19,1	5,3	7,1	
Gemcitabine et sels de platine							
Colucci	Gem	54	20/80	9,2	2	4,6	0,4
	Gem / cisplatine	53		26,4	4,6	6,9	
Heinemann	Gem	95	20/80	8,2	3,1	6	0,15
	Gem / cisplatine	95		10,2	5,3	7,5	
Louvet	Gem	156	30/70	17,3	3,7	7,1	0,1
	Gem FDR / Oxali	157	32/68	26,8	5,8	9	
Poplin	Gem	279	88/12	5	-	4,9	
	Gem FDR	277		10	-	6	0,05
	Gem FDR / Oxali	276		9	-	5,9	0,16
Gemcitabine et autres cytotoxiques							
Rocha Lima	Gem	169	13/81	4,4	3	6,6	0,8
	Gem / irinotecan	173	15/82	16,1	3,5	6,3	
Stathopoulos	Gem	74	14/86	10	2,9	6,5	0,97
	Gem / irinotecan	71	22/78	15	2,8	6,4	
O'Reilly	Gem	174	-	6,3	3,8	6,2	0,5
	Gem / exatecan	175		8,2	3,7	6,7	
Richards	Gem	282	9/91	9,1	3,3	6,3	0,85
	Gem / pemetrexed	283	10/90	18,3	3,9	6,2	
Gemcitabine et thérapies ciblées							
Bramhall	Gem	239	-	16	-	5,5	0,9
	Gem / marimastat			11	-	5,5	
Van Cutsem	Gem	347	24/76	8	3,6	5,9	0,75
	Gem / tipifarnib	341	23/77	6	3,7	6,3	
Moore	Gem	284	25/75	8	3,55	5,9	0,025
	Gem / erlotinib	285	24/76	8,6	3,75	6,4	
Philip	Gem	369	21/79	7	3	6	0,14
	Gem / cetuximab	366		7	3,5	6,5	
Kindler	Gem	300	16/84	11,3	4,3	6	0,8
	Gem / bevacizumab	302	15/85	13,1	4,8	5,7	
Vervenne	Gem / erlotinib	301	-	8,6	3,6	6	0,2
	Gem / erlotinib / beva	306		13,5	4,6	7,1	

Tableau 4**Résumé des essais de phase III de polychimiothérapie contenant de la gemcitabine dans le cancer du pancréas avancé**

(abréviations : N, nombre de patients ; LA, maladie localement avancée ; M, maladie métastatique ; RO, taux de réponse objective ; SSP, médiane de survie sans progression ; SG, médiane de survie globale ; Gem, gemcitabine ; 5-FU, 5-fluorouracile ; pc : perfusion continue ; FDR, fixed-dose rate)

Afin d'améliorer ceux-ci, la gemcitabine a ensuite été testée en association avec de nombreuses autres molécules cytotoxiques. Les résultats des principaux essais de phase III sont résumés dans le tableau 4. Parmi l'ensemble des essais randomisés réalisés ces quinze dernières années, un seul est positif. Cet essai en double aveugle a

randomisé 569 patients entre gemcitabine selon le schéma de Burris et erlotinib versus placebo (132). L'erlotinib est un inhibiteur réversible du domaine tyrosine-kinase de l'EGFR. Dans cet essai, il existait une différence significative en termes de survie globale en faveur du bras avec erlotinib (8,6 versus 8 mois, $p = 0,025$). La durée médiane de survie sans progression était aussi allongée dans le bras gemcitabine-erlotinib (3,75 versus 3,55 mois, $p = 0,003$). Cependant, ces résultats sont très discutés du fait du faible gain en survie (moins de 1 mois) amené par l'adjonction de l'erlotinib. Dans cet essai, il n'a pas été mis en évidence de lien entre la surexpression d'EGFR ou le statut KRAS et la survie.

L'amélioration de l'efficacité de la chimiothérapie dans les cancers du pancréas est indissociable d'une meilleure compréhension des mécanismes de chimiorésistance tumorale.

IV-2. Caractéristiques biologiques

Le développement, la croissance et le potentiel métastatique des cancers du pancréas sont sous l'influence de multiples altérations génétiques incluant l'inactivation de gènes suppresseurs du tumeur et l'activation d'oncogènes. Les adénocarcinomes pancréatiques présentent des mutations fréquentes des gènes KRAS, TP53, CDKN2A (appelé aussi p16 ou p16INK4A) et SMAD4 (appelé aussi DPC4) (240). La relation entre phénotype et génotype est encore mal comprise car il y a peu d'études ayant porté sur l'effet direct de ces mutations sur le comportement cellulaire. Par exemple, il n'y aurait pas de corrélation entre le statut de KRAS, TP53, CDKN2A/p16 et SMAD4/DPC4 avec le grade de différenciation ou le comportement biologique des lignées cellulaires pancréatiques. Cependant, il semblerait que le potentiel métastatique soit associé *in vivo* au statut de TP53, suggérant que génotype et phénotype seraient reliés (241).

L'ensemble des mutations décrites dans le cancer du pancréas est présentée dans le [Tableau 5](#).

	Fréquence de mutation ou expression anormale (%)
KRAS	98
CDKN2A/p16	98

Téломérase	95
Mésothéline	90-100
VEGF	93
MUC1	90
COX-2	67-90
EGFR	42-95
Sonic hedgehog	70
Notch3	69-74
RelA (NF-κB p65)	67
IGF1R	64
TP53	50
mTOR	50-55
SMAD4/DPC4	48-55
HER2	10-42
AKT2	10-20

Tableau 5
Fréquence des mutations dans les cancers du
pancréas (d'après Danovi *et al.* (242))

IV-2-1. KRAS

Les mutations de KRAS sont très fréquentes dans les cancers du pancréas, présentes dans presque toutes les tumeurs primitives et survenant précocément dans la progression de la maladie (243). La survenue de mutations au niveau des codons 12, 13 ou 61 inhibe l'activité GTPase de RAS, conduisant à une protéine RAS oncogénique constitutivement activée. Loukopolos *et al.* ont étudié directement les quatre mutations les plus fréquentes sur dix lignées cellulaires de cancer du pancréas (241). Les mutations étaient retrouvées au niveau de la seconde base du codon 12 dans huit des lignées. Pour les deux autres lignées, l'une contenait une mutation au niveau du codon 61 et l'autre était *wild type* (BxPC3).

IV-2-2. TP53

Les mutations du gène suppresseur de tumeur TP53 sont très fréquentes dans les cancers dont les cancers du pancréas où elles sont retrouvées dans environ 50% des cas. Elles surviennent tardivement dans la progression de la maladie (11). Elles

sont plus fréquentes dans les lignées cellulaires (95%) qu'en clinique. La lignée Capan-2 est la seule lignée pancréatique p53 *wild type*.

IV-2-3. CDKN2A/p16

L'inactivation du gène suppresseur de tumeur CDKN2A/p16 surviendrait précocément dans l'oncogenèse pancréatique car elle est observée dans environ 40% des néoplasies pancréatiques intra-épithéliales (244, 245). La voie p16 est interrompue dans près de 98% des cancers du pancréas par mutation, délétion homozygote ou méthylation anormale. Lors d'une étude de 25 tumeurs primitives du pancréas, 80% d'entre elles présentaient une mutation ou une inactivation de p16 (246). La cause la plus fréquente d'inactivation de p16 serait une aberration dans la méthylation du promoteur, dans environ 50% des cas.

TP53 et p16 jouent tous les deux un rôle important dans le contrôle du passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et du maintien de l'intégrité du génôme lors d'un dommage de l'ADN. La fréquence élevée de perte de fonction de p53 et p16 souligne l'importance de l'abrogation du checkpoint entre G1 et S dans la progression des cancers du pancréas.

IV-2-4. SMAD4/DPC4

SMAD4/DPC4 est membre de la famille du TGF β . C'est aussi un gène suppresseur de tumeur qui est inactivé dans 48 à 55% des cancers du pancréas (247). La perte de fonction de SMAD4 survient tardivement dans l'oncogenèse pancréatique.

IV-2-5. Autres anomalies

IV-2-5-a. EGFR

Une surexpression d'EGFR est rapportée dans 42 à 95% des cancers pancréatiques (12, 96-98, 248). Contrairement aux cancers pulmonaires, aucune mutation d'EGFR n'a été mise en évidence dans le cancer du pancréas (99, 248). La surexpression d'EGFR paraît être un facteur de mauvais pronostic (97, 98, 249). L'inhibition d'EGFR augmente la sensibilité des cellules pancréatiques à la gemcitabine (250-253). En clinique, un essai de phase III a montré la supériorité de l'association gemcitabine-erlotinib par rapport à la gemcitabine en monothérapie,

même si le bénéfice observé était modeste (132). Dans cette étude, l'analyse des échantillons tumoraux disponibles a permis de retrouver 53% de surexpression d'EGFR. Le taux de réponse et la survie des patients n'étaient pas corrélés au niveau d'expression d'EGFR ni au statut KRAS (254). Le principal problème consiste en l'identification des patients potentiellement répondeurs aux inhibiteurs d'EGFR. Pour certains auteurs, la sensibilité aux inhibiteurs d'EGFR est liée à la surexpression d'EGFR (255-257). D'autres réfutent cette hypothèse et relient l'efficacité de l'inhibition d'EGFR à la quantité de son ligand TGF α (258). Pour d'autres encore, il existerait une relation directe entre la sensibilité à l'erlotinib et le niveau d'expression d'HER3 (259, 260). Cette hypothèse est sous-tendue par le fait que les hétérodimères EGFR-HER3 activeraient préférentiellement la voie PI3K/AKT. Enfin, la sensibilité à l'erlotinib a été rapportée au phénotype tumoral, les lignées cellulaires épithéliales étant pour certains plus sensibles à l'erlotinib que les lignées mésenchymateuses (261). La question n'est donc pas résolue à ce jour.

IV-2-5-b. HER2

Une surexpression d'HER2 est retrouvée dans 10 à 42% des adénocarcinomes pancréatiques (96, 98, 262-268). Elle n'a pas de valeur pronostique (263, 264, 268). L'inhibition d'HER2 par le trastuzumab n'a pas d'effet sur la croissance cellulaire quel que soit le niveau d'expression d'HER2 (267). Safran *et al.* ont évalué l'efficacité d'un traitement par gemcitabine associée à du trastuzumab chez 34 patients avec un adénocarcinome pancréatique métastatique surexprimant HER2. Le taux de réponse et la survie étaient identiques à ceux observés avec la gemcitabine seule (269).

IV-2-5-c. PTEN

Le gène suppresseur de tumeur PTEN joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire, la migration cellulaire et l'apoptose. PTEN est une phosphatase lipidique qui régule des voies de signalisation importantes, notamment la voie PI3K. Les mutations de PTEN entraînent une activation constitutive de la voie PI3K/Akt engendrant des tumeurs résistantes à l'apoptose. Dans le cancer du pancréas, PTEN n'est pas muté, cependant sa fonction est inhibée par une perte d'expression. Environ 60% des cancers du pancréas ont une expression diminuée ou abolie de PTEN (12).

IV-2-5-d. NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription. C'est un hétérodimère comprenant une sous-unité p65 (RelA) et une sous-unité p50. Dans la majorité des cellules, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme sous forme inactive liée à son inhibiteur I κ B. Cette association masque le signal de localisation nucléaire de NF- κ B. RelA est constitutivement activée dans 67% des cancers pancréatiques (270). NF- κ B joue un rôle important dans la résistance tumorale à l'apoptose induite par les agents génotoxiques. Les cellules pancréatiques résistantes à la gemcitabine ont un haut niveau basal de NF- κ B (271). Récemment, Pan et al. ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la sensibilité à la gemcitabine et le niveau d'activité basal de NF- κ B. Par contre, l'inhibition de NF- κ B par un siRNA augmentait le taux d'apoptose dans les cellules sensibles à la gemcitabine (272).

IV-2-5-e. COX2

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes qui catalysent la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines et thromboxane. Elles ont un rôle-clé dans l'inflammation et la régulation de fonctions physiologiques. Il existe deux isoformes : COX-1 et COX-2. COX-1 est présente dans les tissus avec les prostaglandines pour assurer le maintien de fonctions organiques. COX-2 se comporte plutôt comme un gène précoce avec des variations transcriptionnelles rapides en réponse à l'inflammation, aux facteurs de croissance, aux cytokines et à la croissance tumorale. COX-2 mais pas COX-1 est induite pas de nombreux types de cancers dont les cancers pancréatiques. Il a été rapporté une expression de COX-2 dans environ 75% des cancers du pancréas (273). Plusieurs études ont montré que les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les inhibiteurs de COX-2 inhibaient la croissance de cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo* avec un effet plus marqué sur les cellules exprimant COX-2 (274-276). L'effet antiprolifératif des inhibiteurs de COX-2 provient de leur effet sur le cycle cellulaire avec un arrêt en G1 (276). Il est peut-être aussi dû à leur pouvoir anti-angiogénique. En effet, le celecoxib induirait l'apoptose des cellules endothéliales (277). Une étude *in vitro* a associé erlotinib et celecoxib dans des lignées pancréatiques. La cytotoxicité et l'apoptose induite par l'erlotinib étaient majorées en présence de celecoxib dans les cellules surexprimant EGFR probablement en rapport avec une inhibition de l'activité de NF- κ B (255).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Culture cellulaire et survie clonogénique

I-1. Lignées cellulaires

Trois lignées cellulaires humaines ont été utilisées pour l'étude de l'interaction du STI571 avec les radiations ionisantes : la lignée K562 (leucémie myéloïde chronique) et les lignées HCC1937 (carcinome canalaire infiltrant mammaire) et hTERT-RPE1 (epithélium pigmentaire rétinien).

Pour l'étude de l'interaction du BIBW 2992 avec les radiations ionisantes, nous avons choisi de nous intéresser au cancer du pancréas. Trois lignées ont été choisies : la lignée BxPC3, KRAS *wild type*, et les lignées Capan2 et Panc1, KRAS mutées.

Lignée cellulaire	Origine	Caractéristiques génétiques
K562	Leucémie myéloïde chronique (P. Rousselot, Hôpital St Louis, Paris)	Bcr-Abl ^{+/+} p53 ^{-/-}
HCC1937	Cancer du sein canalaire infiltrant (CRL-2336, American Type Culture Collection, Manassas, USA)	BRCA1 ^{mut} p53 ^{-/-} PTEN ^{-/-} Her2/neu ^{-/-}
hTERT-RPE1	Epithélium pigmentaire rétinien (lignée immortalisée par récativation de hTERT) (C4000-1, CLONTECH, Palo Alto, USA)	
BxPC3	Adénocarcinome du pancréas (CRL-1687, American Type Culture Collection, Manassas, USA)	p53 ^{mut} (220 Cys) p16 HD DPC4 HD
Capan2	Adénocarcinome du pancréas (V. Fauquette, INSERM U837, Lille)	KRAS ^{mut} (12 Val)
Panc1	Adénocarcinome du pancréas (CRL-1469, American Type Culture Collection, Manassas, USA)	KRAS ^{mut} (12 Asp) p53 ^{mut} (273 His, 273 Cys) p16 HD

HD : délétion homozygote

Tableau 6

Caractéristiques génétiques et origine des lignées cellulaires utilisées.

I-2. Culture cellulaire

Les lignées ont été conservées par congélation dans l'azote liquide dans du milieu de culture additionné de 10% de DMSO. Elles ont été cultivées soit en monocouche (cellules adhérentes), soit en suspension (K562) et incubées à 37°C. Les cellules ont été régulièrement repiquées. Le nombre de passages depuis la primoculture a été limité à 10 pour éviter une dérive des caractéristiques génétiques des différentes lignées.

La lignée hTERT-RPE1 a été cultivée (37°C, 5% CO₂) en monocouche dans des flacons ventilés en milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM/NUT-MIX F12) (4,5 g/l glucose, 0,86 g/l Glutamax I, 0,1 g/l pyruvate, 10⁵ UI/l pénicilline, 0,1 g/l streptomycine, 7,5% Na₂HCO₃, 10% sérum de veau fœtal (SVF)). Les autres lignées ont été cultivées (37°C, 5% CO₂) dans du RPMI-1640+SVF 10%+PS.

Pour les trois lignées pancréatiques, nous avons comparé leur croissance en culture avec différents pourcentages de SVF variant de 1 à 10% (Figure 25). L'effet de la concentration de SVF sur la réponse au BIBW 2992 a été soigneusement analysée. L'effet de la drogue était un peu plus important à 1% de SVF, probablement du fait de la présence d'EGF dans le SVF. Nous avons finalement décidé de réaliser les expérimentations en présence de SVF 5%.

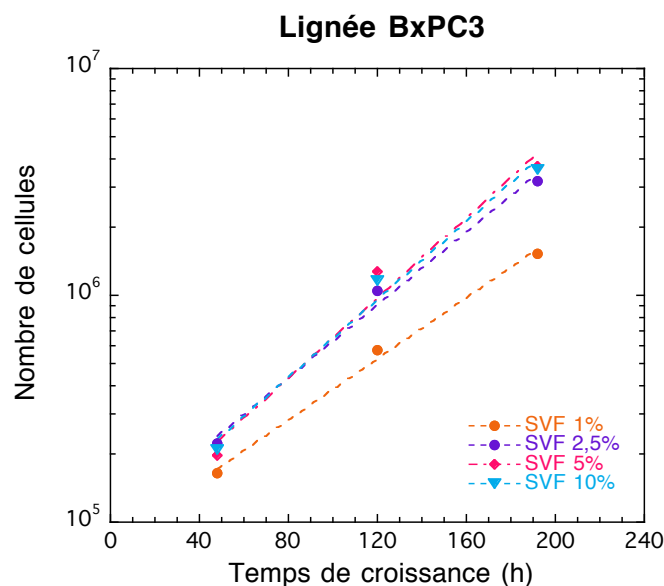


Figure 25
Croissance des cellules BxPC3 en fonction du pourcentage de SVF contenu dans le milieu de culture

I-3. Survie clonogénique

La survie cellulaire a été déterminée par la capacité à former des colonies (50 cellules minimum). Pour réaliser une mesure de survie cellulaire, les cellules sontensemencées en nombre constant et suffisant pour donner environ 200 colonies après 7 à 12 jours d'incubation post-traitement.

Les tests basés sur la détermination du nombre de cellules clonogènes survivantes à différents traitements doivent être établis à partir de cellules isolées. Lorsque cette condition n'est pas remplie, par exemple lorsque les cellules ont été incubées longtemps (plusieurs heures à quelques jours) après ensemencement et forment des multiplets au lieu de cellules isolées - ce qui est systématiquement le cas dans les expériences mettant en œuvre des cellules synchronisées - il faut apporter aux mesures une correction qui tient compte de la multiplicité au moment de l'irradiation, faute de quoi les résultats sont entachés d'une erreur systématique importante. Pour un multiplet contenant n cellules, la probabilité de survie S_n s'exprime par l'équation :

$$S_n = (1 - p)^n$$

où p est la probabilité de mort cellulaire d'une cellule isolée. La survie réduite à la cellule isolée (SCSF, *Single-Cell Surviving Fraction*) peut être calculée à partir du nombre de colonies mesuré par comptage (S_{exp}) en résolvant par récurrence l'équation (278) :

$$S_{\text{exp}} = \sum_1^n a_n [1 - (1 - \text{SCSF})^n]$$

où a_n est le taux de multiplets contenant n cellules, mesuré au moment de l'irradiation.

Les cellules en phase de croissance exponentielle sont isolées par trypsinisation, ensemencées à la densité requise (600 à 2000 cellules par flacon de 25 cm²) puis incubées pendant 3 à 4 h. Ce temps d'incubation, trop court pour permettre un cycle de division et modifier la multiplicité cellulaire, est suffisant pour obtenir l'adhésion des cellules viables au support. Après les divers traitements, les flacons sont replacés en incubateur durant le temps nécessaire pour permettre une dizaine de générations. Les colonies formées sont fixées à l'éthanol après rinçage au PBS, colorées au bleu de Coomassie et comptées manuellement sous loupe. Chaque point

expérimental représente la moyenne d'un minimum de 3 flacons. Pour chaque point expérimental, une moyenne et un écart-type ont été calculés sur l'ensemble des comptages. Les résultats des flacons traités ont été rapportés à ceux des flacons témoins (non traités).

Pour les cellules K562 en suspension, une étude de la clonogénicité en milieu semi-solide a été réalisée avec du Methocel 2% (Stem Cell Technologies)(279). On mélange à froid du Methocel à 4% avec un équivalent de milieu RPMI-1640 2X (dilution de 20 ml de RPMI 10X avec 75 ml d'eau désionisée distillée, 5,38 ml de solution de bicarbonate de sodium à 7,5%, 2 ml de glutamine-L puis ajuster le pH) sur un agitateur magnétique, le tout en conditions stériles. Le mélange contenant le Methocel est complété par 10% de SVF, 10% de GM-CSF, 0,5% de Glutamine 100X, 0,5% de Pyruvate 100X et les cellules. Un ml du mélange dans lequel les cellules ont été mises en suspension a ensuite été réparti avec une seringue de 5 ml par boîte de 3 cm de diamètre. Les boîtes sont placées à l'étuve pendant 4 jours. Les colonies sont alors comptées et mesurées sur microscope inversé 3 jours d'affilée.

I-4. Inhibition de croissance

Les cellulesensemencées dans plusieurs flacons à la même densité (10^5 cellules/flacon, 10 ml de milieu) ont été mises en contact avec différentes concentrations de drogue pendant un à cinq jours puis ont été comptées en chambre de Malassez. Toutes les expériences ont été réalisées en lumière atténuée pour éviter la photodégradation de la drogue.

Chaque point expérimental représente la moyenne de 3 flacons. Pour chaque point expérimental, une moyenne et un écart-type ont été calculés sur l'ensemble des comptages. Les résultats des flacons traités ont été rapportés à ceux des flacons témoins (non traités).

I-5. Synchronisation cellulaire

Les cellules K562 ont été synchronisées par la méthode de double bloc à la thymidine décrite par Tsao *et al.* (280). La thymidine à forte concentration a pour effet d'inhiber la synthèse de l'ADN au cours de la phase S par déplétion du pool de dCTP. Quatre heures après ensemencement à la densité requise, des cellules en phase

de croissance exponentielle ont été exposées à 2mM de thymidine (37°C, milieu complet) pendant 16 h, temps nécessaire pour parcourir la phase G2-M et une partie de la phase G1. Au terme de ce premier bloc, environ 25% de la population cellulaire est restée bloquée en phase S, tandis que la quasi-totalité de l'autre fraction est bloquée à la jonction G1-S. Les flacons sont alors rincés 2 fois et incubés 10 h dans du milieu neuf pour permettre la progression des cellules bloquées en phase S et à la jonction G1-S. Les cellules sont alors exposées à un second bloc de thymidine. La durée de ce bloc (16 h) est calculée pour permettre le parcours de l'intégralité de la phase G1 de toute la population cellulaire, et l'accumulation de la quasi-totalité des cellules à la jonction G1-S. On obtient ainsi une synchronisation de $\geq 95\%$ de la population cellulaire à la jonction G1/S. Après retrait de la thymidine, les cellules entrent immédiatement en phase S et progressent de manière synchrone dans le cycle cellulaire. Les différents traitements (drogues, irradiations) ont été effectués 2, 8 ou 14 h après la levée du deuxième bloc selon que l'on souhaite travailler avec des cellules respectivement en phase S, G2 ou G1.

II. Traitements et irradiation

II-1. Composés

II-1-1. STI571

Le 4-(4-méthylpiperazin-1-ylmethyl)-N-[4-méthyl-3-[4-(3-pyridyl)pyrimidin-2-ylamino]phe-nyl] benzamide (STI571, aussi appelé imatinib ou Glivec®) a été synthétisé par le Dr Martine Croisy (UMR 176 CNRS, Institut Curie) selon Zimmermann *et al.* avec de légères modifications (281, 282). Brièvement, de l'acide *p*-toluic méthyl ester commercial a été brominé avec du N-bromosuccinimide. Le composé bromométhylé a été couplé à la N-méthyl pipérazine et l'ester résultant a été directement condensé avec du 4-méthyl-N-3(4-pyridine-3-yl-pyrimidine-2-yl)-benzène-1,3-diamine en utilisant du triméthylaluminium dans du dichlorométhane. Une purification par chromatographie flash a permis d'obtenir un composé pur avec un rendement de 85%. La pureté du STI571 a été vérifiée par chromatographie et analyse par résonance magnétique nucléaire.

La drogue a été dissoute dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) pur à la concentration de 10 mM, aliquotée et stockée à -20°C puis diluée extemporanément.

La concentration finale de DMSO était suffisamment ($\leq 0.5\%$) pour ne pas altérer la croissance cellulaire ou la réponse à l'irradiation. Toutes les expériences ont été réalisées en lumière atténuée pour éviter la photodégradation de la drogue.

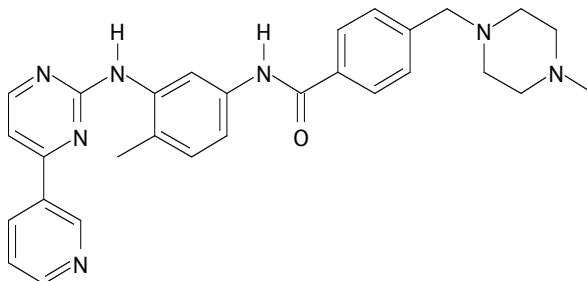


Figure 26
Structure chimique du STI571 (d'après Noble *et al.* (283))

II-1-2. BIBW 2992

Le BIBW 2992 (Tovok®) est un inhibiteur irréversible spécifique des tyrosine kinases EGFR et HER2, dérivé des séries chimiques anilino-quinazolines conçues pour se lier de façon covalente au résidu Cys773 d'EGFR ou Cys805 d'HER2 (284). Le BIBW 2992 a été synthétisé par Boehringer Ingelheim Pharma GmbH and Co. KG comme décrit dans WO 02/50043.

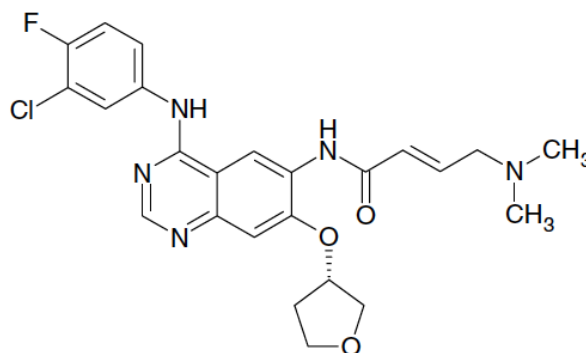


Figure 27
Structure chimique du BIBW 2992 (d'après Eskens *et al.* (285))

II-2. Irradiation gamma

Les irradiations ont été effectuées dans un irradiateur γ équipé de sources de Césium¹³⁷ (IBL-637 de CIS-Biointernational). La dosimétrie a été réalisée par la méthode à l'alanine, ainsi que par la dosimétrie de Fricke et par des électromètres. Toutes les méthodes se sont montrées concordantes. Des dispositifs d'atténuation et d'homogénéisation du faisceau permettent d'obtenir un débit de dose variant de 4 Gy/min à 0,5 Gy/h. Douze flacons peuvent être irradiés en même temps. Le débit de dose le plus fréquemment utilisé était de 1 Gy/min. Dans ces conditions, la durée d'irradiation est toujours inférieure à 10 min et effectuée à température ambiante (21-24°C). Les flacons ont été remplacés en incubateur immédiatement après l'irradiation.

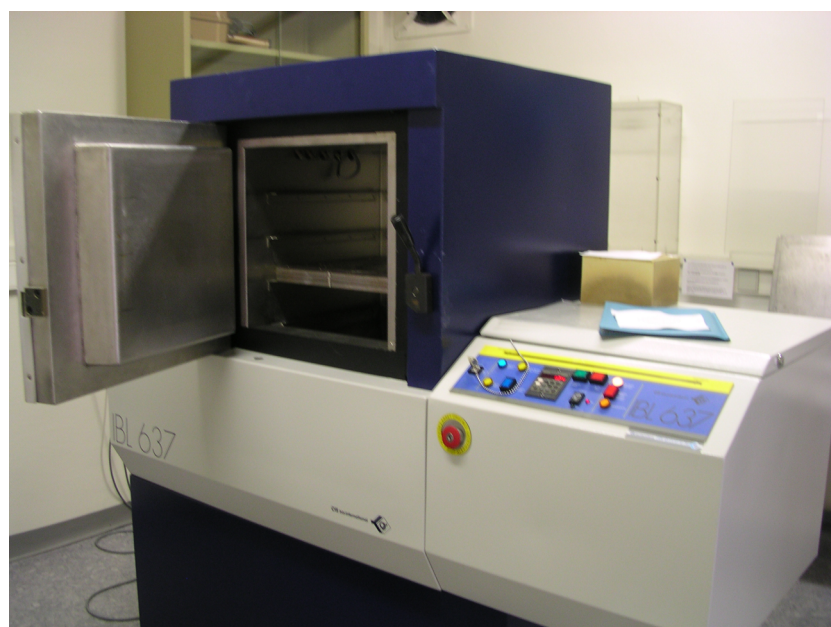


Figure 28
Irradiateur IBL-637
(¹³⁷Cs, rayonnement δ
660 keV)

III. Western blot

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (SDS-PAGE) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. En effet, le sulfate de lauryle (sodium dodécyl-sulfate, SDS) est un détergent anionique qui, en se liant aux polypeptides, leur confère une charge négative proportionnelle à leur masse. La position de chaque protéine donne donc une bonne approximation de sa masse moléculaire et après coloration, l'intensité de la bande est proportionnelle à la quantité de protéine présente. Nous avons utilisé le système discontinu classique, qui permet une meilleure résolution, les protéines se concentrant sous forme d'une bande

fine dans la première partie du gel (*stacking gel*, pH 6,8) avant de migrer dans le gel de séparation (*separating gel*, pH 8,0). Les gels de séparation utilisées avaient une épaisseur de 1 à 1,5 mm. La concentration d'acrylamide variait, selon les protéines étudiées, entre 5 et 12,5%.

III-1. Extraction, dosage des protéines

III-1-1. Extraits totaux

Un nombre suffisant de cellules estensemencé pour obtenir un minimum de 10^6 (jusqu'à 10^8) cellules par extrait. Pour la préparation d'extraits totaux, le milieu des cellules est retiré, les cellules sont rincées avec du PBS froid (4°C), puis incubées avec une préparation commerciale (M-PER, Pierce) pendant 10 min en chambre froide. Les cellules sont ensuite récoltées par grattage et transférées dans un tube conique. Les cellules sont centrifugées à froid (14.000 rpm, 15 min, 4°C) pour sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant, constituant l'extrait protéique total, est récupéré et stocké à -80°C.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford (BioRad protein assay).

III-1-2. Extraits cytoplasmiques et nucléaires (286)

Après traitement cytotoxique, les cellules en suspension ($25 \cdot 10^6$ cellules/flacon) sont lavées à deux reprises dans du PBS froid, puis centrifugées en chambre froide (4°C). Les culots sont ensuite repris avec 400 µl de tampon de lyse 1 (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.3% NP40, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma)) et incubées 15 min à 4°C (choc hypotonique) puis centrifugées (15000 g, 30s à 4°C). Le surnageant constitue l'extrait cytoplasmique, il est repris, aliquoté et conservé à -80°C.

Pour les cellules adhérentes, on procède d'abord à un double rinçage au PBS froid. Les cellules sont ensuite récoltées en chambre froide par grattage dans 10 ml de PBS. La suite du protocole est identique à celui pour les cellules en suspension.

Les culots précédemment obtenus sont repris dans 100 μ l de tampon de lyse 2 (50 mM Hepes pH 7,9, 50 mM KCl, 400 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10% Glycérol, 0,6% NP40, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma)) et incubés sur roue pendant 30 min à 4°C en chambre froide (choc hypertonique) puis centrifugés (15 000 g, 15 min à 4°C). Le surnageant constitue l'extrait nucléaire. Il est récupéré, aliquoté et congelé à -80°C.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford (BioRad protein assay).

III-2. Électrophorèse

La quantité de protéine déposée dans chaque puits a été ajustée entre 15 et 50 μ g selon les cas. Les électrophorèses ont été effectuées à l'aide des systèmes Mini-Protean II et III (Bio-rad). Le tampon de migration était un tampon glycine classique (192 mM glycine, 25 mM Tris base, 1% SDS, pH 8,3). La migration a été réalisée à voltage constant (96 V) pour une durée de 1 à 2 h.

III-3. Transfert sur membrane

À la fin de la migration, le gel est extrait de la cassette d'électrophorèse et équilibré pendant 15 min dans le tampon de transfert (230 mM glycine, 30 mM Tris base, 20% éthanol, 0,012% SDS). Le transfert sur membrane a été réalisé en transfert semi-sec sur membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) avec une intensité constante de 1 mA/cm² et un voltage de 26 V maximum. Le temps de transfert varie de 1 à 4 h selon la masse moléculaire de la protéine, le transfert étant d'autant plus lent que la protéine est plus grosse.

III-4. Immunomarquage

Après le transfert, la membrane est équilibrée en tampon TBST (15 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0,25% Tween-20) avec 5% de BSA pendant 1 h. La membrane est alors incubée dans le même tampon avec l'anticorps primaire ([Tableau 7](#)) pendant une nuit à 4°C sous agitation (agitateur orbital). Après de multiples rinçages au TBST, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (1 h à température ambiante). La réaction se termine par 3 lavages en tampon TBST. Les complexes antigènes-anticorps sont détectés par une méthode de chimiluminescence (*Enhanced ChemiLuminescence* – Amersham Pharmacia Biotech) mettant en œuvre des anticorps

secondaires conjugués à la peroxydase. L'anticorps secondaire est révélé au moyen d'un film BioMaxMR1 (Kodak).

Anticorps	Isotype	Fournisseur	Dilution
PARP-1	Monoclonal souris	BD PharMingen 556362	1/2000
c-Abl	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2862	1/1000
P-c-Abl (Tyr245)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2861	1/1000
RAD51	Monoclonal souris	Abcam Ab213	1/2000
STAT5	Monoclonal souris	BD Biosciences 610191	1/250
P-STAT5 (Tyr694)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 9351	1/1000
BAD	Polyclonal lapin	Cell Signaling 9292	1/1000
P-BAD (Ser112)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 9291	1/1000
p73	Polyclonal lapin	Cell Signaling 4662	1/1000
Chk1	Polyclonal lapin	Santa Cruz Sc7898	1/500
P-Chk1 (Ser345)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2341	1/1000
Chk2	Polyclonal lapin	Abcam Ab477	1/500
P-Chk2 (Thr68)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2661	1/1000
DNA-PKcs	Monoclonal souris	NeoMarkers MS-370-P1	1/100
Caspase-3 clivée	Polyclonal lapin	Cell Signaling 9664	1/1000
EGFR	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2232	1/1000
P-EGFR (Tyr1068)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2234	1/1000
HER2	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2242	1/1000
P-HER2 (Tyr1221/1222)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2249	1/1000
HER3	Polyclonal lapin	Santa Cruz Sc-285	1/500
P-HER3 (Tyr1289)	Monoclonal lapin	Cell Signaling 4791	1/1000
Akt	Polyclonal lapin	Cell Signaling 9272	1/1000
P-Akt (Ser473)	Polyclonal lapin	Cell Signaling 9271	1/1000
E-cadhérine	Monoclonal souris	Santa Cruz sc-21791	1/500
Vimentine	Monoclonal souris	Santa Cruz sc-32322	1/500
Lamine B	Monoclonal souris	Calbiochem NA12	1/100
P-DNA-PK (Thr2609)	Polyclonal lapin	Donné par David Chen (Dallas)	1/1000
P-DNA-PK (Ser2056)	Polyclonal lapin	Donné par David Chen (Dallas)	1/1000
ERK1/2	Polyclonal lapin	Cell Signaling 9102	1/1000
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Monoclonal lapin	Cell Signaling 4376	1/1000
Ku80	Polyclonal lapin	Cell Signaling 2753	1/2000
α Tubuline	Monoclonal souris	SIGMA	1/2000

Tableau 7
Caractéristiques des anticorps primaires utilisés.

IV. Immunodétection de CDK1 et p-Tyr15-CDK1

Du fait que les anticorps dirigés contre CDK1 (Cdc2) interagissent avec d'autres CDKs en Western blots, l'analyse de l'expression de CDK1 et de la

phosphorylation de Tyr-15-CDK1 a été réalisée par immunoprécipitation de CDK1. Des extraits nucléaires ont été préparés dans un tampon de lyse contenant 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA et 0,5% NP40, pH 7, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma). 300 μ l d'extraits (250 μ g de protéines) ont été incubés avec 3 μ l d'anticorps monoclonal de souris anti-Cdc2 (POH1, Cell Signaling Technology) à 4°C pendant la nuit en agitation douce. Des billes de G-sépharose (20 μ l de 50% de billes en suspension) ont été ajoutées au lysat et incubées pendant 4h à 4°C sur un rotateur. Les immunoprécipités ont été lavés quatre fois avec le tampon de lyse. Les culots ont été resuspendus dans 20 μ l de tampon de chargement SDS 2X. Les immunoprécipités ont été séparés dans un gel SDS-PAGE 12% et détectés par autoradiographie en utilisant des anticorps monoclonal ou polyclonal dirigés contre Cdc2 et P-Tyr15-Cdc2 (Cell Signaling Technology, dilution 1/100). La protéine de fusion GST-Cdc2 fusion et des extraits totaux de SK-N-MC traités avec de l'hydroxyurée (3 mM, 24 h) ont été utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement.

V. Étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

La répartition des populations cellulaires dans les différentes phases du cycle a été analysée par cytométrie en flux selon la méthode décrite par Demarcq *et al.* (287).

Les cellules sont exposées pendant 15 min à 10 μ M de 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdUrd) après les divers traitements. Au terme de cette incubation, les cellules sont trypsinées, collectées par centrifugation (4 min, 1500 rpm, 4°C), suspendues en tampon PBS, resédimentées, reprises dans 300 μ l de tampon PBS et mises sur glace 5 min. Les cellules sont alors fixées par addition de 700 μ l d'éthanol froid sous agitation continue et entreposées à 4°C en attente d'analyse. Elles peuvent alors être conservées à -20°C dans du DMEM + 10% DMSO.

Les étapes suivantes comportent la préparation des noyaux, la lyse de la chromatine, la digestion de l'ARN, un marquage par l'iodure de propidium, la reconnaissance de la bromodésoxyuridine par un anticorps monoclonal et la reconnaissance de celui-ci par un anticorps secondaire marqué à la fluorescéine.

Après une éventuelle décongélation, les cellules sont remises en suspension dans du tampon PBS froid et centrifugées 4 min. Le culot est repris dans 600 μ l de PBS. Les cellules sont alors fixées par transfert goutte à goutte dans 1,4 ml d'éthanol

froid sous agitation continue (concentration finale d'éthanol : 70%) et stockées à 4°C pendant 3 h. Les cellules fixées sont ensuite centrifugées (2800 rpm, 5 min à 4°C). Les culots sont réhydratés (PBS pendant 10 min), centrifugés puis digérés avec 3 ml de solution de pepsine (0,5 mg/ml). On incube la suspension au bain marie à 37 °C, 20 min. On centrifuge et on reprend le culot avec 0,5 ml d'HCl 2 N. La suspension est incubée 20 min à température ambiante. On ajoute 5 ml de PBS et on centrifuge (2800 rpm, 10 min). Le surnageant est aspiré et le culot repris dans 4 ml de tampon Bu (Tween-20 0,5%, 20 mM HEPES, sérum de chèvre 0,5%). La solution est vortexée puis centrifugée. Le culot est une nouvelle fois repris dans 500 µl de tampon Bu. On ajoute 20 µl d'anticorps monoclonal de rat anti-BrdUrd (CeraLab) que l'on laisse incuber 1 h à température ambiante, puis on ajoute 5 ml de PBS et on centrifuge. Le culot est resuspendu dans 200 µl d'anticorps fluorescent (chèvre anti-rat FITC au 1/50^{ème}) puis incubé 30 min dans l'obscurité. On rajoute ensuite 5 ml de PBS et on centrifuge. Le culot est repris avec 300 µl d'Iodure de Propidium au 1/40^{ème} dans du PBS. Les cellules sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à la lecture par un cytomètre FACStarPlus (Becton-Dickinson) dans le service de cytométrie de l'Institut Curie. Les données ont été analysées par le logiciel CellQuest Pro.

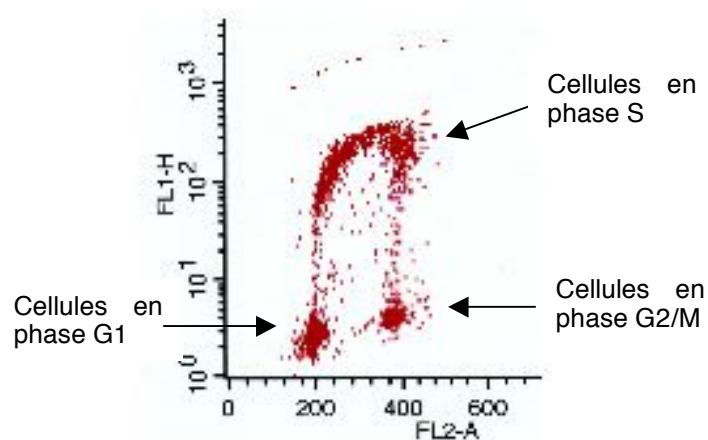


Figure 29

Exemple de cytogramme en "fer à cheval". Les cellules ont été incubées en présence de BrdUrd (15 µM, 10 min) avant collecte et fixation, puis préparées pour analyse par cytométrie en flux. L'axe des ordonnées (FL1-H) représente en échelle logarithmique l'intensité de fluorescence de l'anticorps monoclonal conjugué FITC qui reconnaît spécifiquement le BrdUrd. Cette fluorescence est propre aux cellules qui étaient en cours de synthèse d'ADN au moment du contact avec le BrdUrd. L'axe des abscisses (FL-2A) correspond à la quantité d'iodure de propidium (PI) fixée à l'ADN. Cette valeur est proportionnelle au contenu en ADN. On voit que les cellules en phase G1 (2N) ont incorporé deux fois moins de PI que les cellules en phase G2/M (4N). La représentation choisie permet de sélectionner très précisément les différents compartiments du cycle cellulaire.

VI. Étude de l'apoptose

VI-1. Annexine V-FITC

Dans les cellules normales viables, la phosphatidyl sérine (PS) est localisée à la face interne de la membrane plasmique. L'apoptose s'accompagne d'une externalisation de la PS. La PS est ensuite reconnue par les macrophages qui vont phagocyter la cellule (288).

In vitro, la PS externalisée peut être détectée grâce à son interaction avec un anticoagulant, l'Annexine V. En présence de calcium, l'Annexine V et la PS se couplent. La translocation de la PS à la surface cellulaire survient avant la lyse du noyau et la fragmentation de l'ADN faisant de l'Annexine V un marqueur précoce de l'apoptose.

Nous avons utilisé un kit de détection de l'apoptose Annexine V-FITC (Oncogene) dans lequel un résidu fluorescéine isothiocyanate (FITC) est couplé à l'Annexine V permettant la quantification par cytométrie de flux. L'iodure de propidium (PI) est utilisé pour distinguer les cellules apoptotiques (PI-) des cellules nécrotiques (PI+). Après avoir ajusté la concentration de la suspension cellulaire à 10^6 cellules/ml, on transfère 0,5 ml de suspension dans un microtube puis on ajoute 10 μ l de Media Binding Reagent. On ajoute ensuite 1,25 μ l d'Annexine-V FITC et on incube 15 min à température ambiante dans l'obscurité puis on centrifuge à 1000 g pendant 5 min à température ambiante. Après avoir ôté le surnageant, on resuspend doucement dans 0,5 ml de Binding Buffer 1X (10mM Hepes pH 7,4, 150mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 4% BSA) froid. Puis on ajoute 10 μ l de PI, on place les échantillons dans la glace et à l'obscurité et on les analyse par cytométrie en flux.

VI-2. Fraction sub-G1

La fragmentation de l'ADN est un bon indicateur de l'apoptose. La fraction hypodiploïde, ou sub-G1, a été estimée en analysant par FACS les cellules marquées à l'iodure de propidium après fixation à l'éthanol à 70%.

Après avoir ajusté la concentration de la suspension cellulaire à 1×10^6 cellules/ml, on transfère 0,5 ml de suspension dans un microtube puis on ajoute 10

μM de bromodésoxyuridine (BrdU) pendant 20 min. Après centrifugation, les cellules sont reprises dans du milieu avec 10% de DMSO puis congelées à -20°C avant d'être analysées par cytométrie en flux. La région sub-G1 est déterminée par une fenêtre sur l'histogramme du contenu en ADN excluant les débris à l'origine de l'abscisse mais s'étendant ensuite jusqu'au début du pic G1.

VII. Étude de la sénescence : test à la galactosidase

L'étude de la sénescence a été réalisée dans les cellules K562 par marquage à la β -galactosidase comme décrit par Dimri *et al.* (289). Brièvement, des cellules K562 en suspension ont été déposées sur des lamelles enduites de polylysine placées dans des boîtes de Pétri puis ont été remises dans l'incubateur pendant 24 h. Les cellules non adhérentes ont ensuite été retirées par lavage doux et les cellules adhérentes ont été exposées au STI571 (48 h), aux radiations ionisantes ou à la combinaison des deux. Après traitement, les cellules ont été laissées en croissance pendant 5 jours dans du milieu sans drogue, puis le milieu a été retiré par aspiration. Les lamelles ont été lavées avec du PBS puis fixées séquentiellement avec 20% de formaldéhyde suivi de 2% de glutaraldéhyde dans du PBS. Après trois lavages au PBS, les lamelles ont été incubées (37°C pendant la nuit) avec 1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Cell Signaling Technology). Les lamelles ont été recolorées avec du Giemsa, rincées à l'eau distillée puis examinées au microscope. Les cellules sénescents ont une morphologie typique et sont colorées en bleu par la β -galactosidase.

VIII. Immunofluorescence

La quantification du nombre de centrosomes a été réalisée après marquage à la γ -tubuline et détection par immunofluorescence. Brièvement, les cellules ont été traitées le lendemain de l'ensemencement par une irradiation à la dose de 6 Gy ou avec du BIBW 2992 à $2\ \mu\text{M}$ (BxPC3 et Panc1) ou $1\ \mu\text{M}$ (Capan2). Pour le traitement combiné, les cellules ont été irradiées après 24h d'exposition à la drogue. Du DMSO était ajouté dans les flacons non traités. Deux jours après traitement, les cellules ont été trypsinées et ensemencées sur des lamelles de verre rondes de 12 mm. Après 24 h

d'incubation, le milieu de culture a été retiré, les cellules ont été lavées avec du PBS tiède, fixées pendant 3 min avec du paraformaldéhyde (1% dans PBS) à 37°C, puis incubées pendant 5 min avec du méthanol à -20°C, et réhydratées avec du PBS pendant 10 min. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps (anti- γ -tubuline T4026, Sigma-Aldrich, dilution 1/500 dans du PBS avec 3% de BSA et 0,05% de Tween-20) pendant 1 h à 37°C. Après plusieurs lavages avec du PBS, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire couplé à un fluorophore Alexa (Alexa Fluor 546, Invitrogen, dilution 1/400 dans du PBS avec 3% de BSA et 0,05% de Tween-20) pendant 1 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées et les lamelles montées sur des lames avec une goutte d'agent de montage Vectashield en présence de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), un intercalant de l'ADN qui permet de visualiser les noyaux des cellules par fluorescence dans le bleu. Le bord des lamelles est verni pour éviter leur dessiccation.

Les images des cellules fixées ont été prises en utilisant un système de déconvolution d'images en 3D, constitué d'un microscope Leica DM RXA équipé avec un convertisseur piezoélectrique (PIFOC ;PI) placé à la base d'un objectif PlanApo N.A.1.4, et un appareil photo CCD Micromax 1300Y (Roper Instruments). Le logiciel Image J a été utilisé pour l'analyse des images.

IX. Étude de la différenciation érythrocytaire

Plusieurs auteurs ont montré que la présence de STI571 induit une différenciation érythrocytaire de la lignée K562 (290, 291). Nous avons évalué ce phénomène par deux techniques différentes.

IX-1. Marquage à la benzidine

Le marquage à la benzidine permet de mettre en évidence la production d'hémoglobine et donc la différenciation érythrocytaire des cellules (292) (290).

La benzidine (Sigma) est diluée dans de l'acide acétique à 3% pour obtenir une concentration de 2 mg/ml. Au dernier moment, on ajoute 1% d'H₂O₂. Après traitement, on prépare pour chaque condition un culot de 100 μ l de cellules après centrifugation et comptage et resuspension pour avoir environ 200 000 cellules /100

µl. Les culots sont incubés avec 100 µl de benzidine pendant 5 min à température ambiante, puis comptées manuellement.

IX-2. Marquage à la glycophorine

Les cellules de la lignée érythrocytaire expriment à leur surface la glycophorine A. L'expression de la glycophorine A peut être détectée par immunofluorescence directe (291, 293).

10^6 cellules sont lavées avec du PBS, resuspendues dans 200 µl de milieu, incubées avec 2 µl d'anticorps anti-Glycophorine A (Pharmlingen) pendant 30 min à 4°C dans l'obscurité puis lavées deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 g/ml d'IgG goat antimouse FITC et incubées 30 min à 4°C dans l'obscurité. Après deux lavages avec du PBS froid, les cellules sont resuspendues dans 300 µl de PBS avec 1% de formaldéhyde (pH 7,4). Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (cytomètre FACStarPlus - Becton-Dickinson). Les données ont été analysées par le logiciel CellQuest Pro.

X. Étude du stress oxydatif

Pour étudier l'influence du STI571 sur le métabolisme peroxydatif des cellules irradiées, nous avons mesuré l'incorporation de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (H2DCFDA, Invitrogen) et la production *in situ* de ses métabolites fluorescents par analyse par cytométrie de flux telles que décrites par Sattler *et al.* (294).

5×10^5 K562 cellules ont été incubées pendant 30 min avec 20 µM de H2DCFDA. Les cellules ont été collectées par centrifugation, et transférées dans du milieu frais. Le niveau de fluorescence a été évalué immédiatement par cytométrie en flux.

RÉSULTATS - DISCUSSION

1^{ère} PARTIE

Le STI571

I- Introduction

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'équipe de Vincent Favaudon avait commencé à étudier l'interaction des thérapies ciblées avec les radiations ionisantes, notamment avec le gefitinib, un inhibiteur d'EGFR (2). En effet, le laboratoire s'intéressait depuis longtemps aux associations chimioradiothérapies en vue de potentialiser la létalité des RI par des agents chimiques (44, 59, 61).

Les thérapies ciblées cherchent à réprimer l'une des fonctions cellulaires caractéristiques du cancer telles que la croissance tumorale, l'angiogenèse ou le pouvoir métastatique. Les inhibiteurs de tyrosine kinase ont été très étudiés dans cette optique et donnent actuellement, tant au laboratoire qu'en clinique, des résultats très prometteurs. Ils agissent principalement en perturbant les voies de transduction des signaux. Or, on sait maintenant que la réponse aux radiations ionisantes dépend de certaines de ces voies de signalisation, en particulier pour l'induction de la réparation de l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose. L'altération des voies de signalisation qui déterminent ces mécanismes est donc susceptible d'altérer la réponse aux rayonnements ionisants.

Le STI571 (imatinib ou Glivec®) est un inhibiteur sélectif des tyrosine kinases Bcr-Abl, c-kit et PDGFR (3). Il agit par compétition au niveau du site de fixation de l'ATP. Il a été d'abord utilisé pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique, caractérisée par une translocation chromosomique (chromosome de Philadelphie) produisant le gène de fusion BCR-ABL. La protéine Bcr-Abl présente une affinité élevée pour le STI571. Le complexe formé est inactif, ce qui permet d'obtenir en clinique un taux élevé de régression tumorale.

Par ailleurs, la protéine c-Abl est impliquée dans la modulation de nombreuses voies de signalisation, en particulier dans la détection et la réparation des lésions de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'apoptose (206). Plus précisément, c-Abl est impliquée :

- Dans la recombinaison homologue, qui permet une réparation fidèle des cassures double-brin, principale lésion radio-induite de l'ADN, *via* le contrôle de l'activité de RAD51 permettant l'échange inter-brin de matériel génétique.

- Dans la suture non homologue (NHEJ), en relation avec la formation d'un complexe c-Abl-BRCA1 (188).
- Dans l'arrêt en G2/M après chimiothérapie génotoxique (cisplatine, étoposide, daunorubicine). Le rôle de c-Abl dans l'arrêt du cycle post-irradiation est moins bien établi.
- Dans la régulation de l'apoptose. c-Abl exerce une action anti-apoptotique, notamment par augmentation de l'expression de Bcl-2. Par ailleurs, c-Abl active Akt, ce qui a pour effet d'inactiver Bad, protéine pro-apoptotique, et de promouvoir l'expression de p27^{KIP1}.
- Dans la régulation de l'activation de NF- κ B, dans la voie de réponse au stress oxydatif.

Ces données suggèrent que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de c-Abl devrait permettre une altération contrôlée de la réponse aux radiations ionisantes, et peut-être aboutir à une radiosensibilisation. Au moment du début de ce travail, l'interaction entre imatinib et radiothérapie n'avait été que très peu étudiée (295).

Le but de cette première partie de thèse était de rechercher un effet radiosensibilisateur du STI571 en évaluant à la fois le potentiel cytotoxique (test de clonogénicité) et cytostatique (inhibition de la prolifération) de l'association rayonnement-drogue. En fonction des résultats obtenus, nous avons prévu d'étudier les modifications du taux d'apoptose sous rayonnement, l'altération de la progression du cycle cellulaire induite par la combinaison des deux traitements et l'altération par le STI571 des voies de signalisation dépendantes de c-Abl. Ce travail devait être réalisé à la fois sur des lignées de leucémie myéloïde chronique, connues pour être sensibles au STI571, et sur des lignées épithéliales, peu sensibles à un effet cytotoxique de la drogue, mais qui pourraient en revanche produire un effet radiosensibilisateur et donner d'emblée des informations sur les mécanismes sous-jacents. Les lignées utilisées étaient les suivantes :

- cellules de LMC (K562) ;
- cellules d'adénocarcinome mammaire (HCC1937), mutées pour BRCA1 ;
- cellules humaines normales : épithélium pigmentaire rétinien (hTERT-RPE1).

Un effet radiosensibilisateur ayant été observé uniquement dans la lignée K562, l'étude des mécanismes responsables de cet effet n'a été réalisée que dans cette lignée.

II. Résultats

II-1. Article n°1

Growth inhibition by STI571 in combination with radiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells

Florence Huguet, Nicole Giocanti, Christophe Hennequin, Martine Croisy,
Emmanuel Touboul, and Vincent Favaudon

Molecular Cancer Therapeutics 2008; 7(2):398-406

Growth inhibition by STI571 in combination with radiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells

Florence Huguet,^{1,2,4} Nicole Giocanti,^{1,2}
 Christophe Hennequin,^{1,2,5} Martine Croisy,^{1,3}
 Emmanuel Touboul,⁴ and Vincent Favaudon^{1,2}

¹Institut Curie, Centre de Recherche; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U612; ³Centre National de la Recherche Scientifique, UMR1 76, Orsay, France; and ⁴AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'Oncologie-Radiothérapie; and ⁵AP-HP, Hôpital Saint Louis, Service de Cancérologie-Radiothérapie, Paris, France

Abstract

Altered radiation responses by STI571 (Imatinib, Glivec), a specific inhibitor of the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl, was assessed in K562 chronic myelogenous leukemia cells using growth inhibition and colony formation assays. Flow cytometry, Western blotting, and microscope observation were used to determine cell cycle redistribution, erythroid differentiation, apoptosis, necrosis, senescence, and expression and phosphorylation of effectors downstream from Bcr-Abl as endpoints. STI571 (≥ 24 -h contact) retarded the growth of K562 cells and elicited reduction in the G₂-phase content due to an efficient arrest in early S phase rather than to the disruption of the G₂ checkpoint as confirmed by analysis of Lyn and CDK1 phosphorylation. STI571 brought about the inhibitory dephosphorylation of Bcr-Abl and STAT5, but the expression of DNA-PKcs and Rad51 was unaffected and the interaction between radiation and STI571 was strictly additive with regard to induction of apoptosis. Overall STI571 interacted cooperatively with radiation to retard the growth of K562 cells but did not affect intrinsic radiosensitivity. However, STI571 and radiation acted antagonistically with each other with regard to induction of senescence and erythroid differentiation. [Mol Cancer Ther 2008;7(2):398–406]

Received 8/30/07; accepted 12/19/07.

Grant support: Fondation pour la Recherche Médicale (F. Huguet), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Institut Curie.

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

Note: F. Huguet and N. Giocanti equally contributed to this study.

Requests for reprints: Vincent Favaudon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U612, Institut Curie-Recherche, Bât., 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France. Phone: 33-169863188; Fax: 33-169863187. E-mail: vincent.favaudon@curie.fr

Copyright © 2008 American Association for Cancer Research. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2023

Introduction

c-Abl is a 145-kDa nonreceptor tyrosine kinase involved in a variety of cellular processes, including regulation of the cell cycle, actin organization, transduction of mitogenic signals, differentiation, and response to genotoxic stress (1, 2). Loss of c-Abl regulation may be oncogenic. Indeed, in pluripotent hematopoietic stem cells, the reciprocal t(9; 22)(q34; 11) chromosomal translocation generates the Philadelphia chromosome (3) and results in the fusion of the *BCR* and *ABL* genes. This translocation is the hallmark of chronic myelogenous leukemia (CML) and provided the first example of a specific genetic change associated with human cancer. *BCR-ABL* encodes a p210^{Bcr-Abl} chimeric protein in which the Abl tyrosine kinase activity is constitutively turned on by dimerization-induced, intermolecular autophosphorylation (2, 4).

Multiple signaling proteins have been shown to interact with Bcr-Abl through various functional domains and/or to become phosphorylated in Bcr-Abl-expressing cells (5). These include Ras, mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase, Akt, Jnk, Src family kinases, and their respective downstream targets as well as transcription factors, such as the signal transducers and activators of transcription (STAT), nuclear factor- κ B, and Myc (6–12). In addition, the activation of STAT5 and the phosphatidylinositol-3-kinase pathway by Bcr-Abl may mediate inhibition of apoptosis via up-regulation of Bcl-2 expression and phosphorylation of the proapoptotic protein Bad (13).

Whether Bcr-Abl affects on the DNA damage and repair capacity of cells is a matter of controversy. It has been proposed that Bcr-Abl induces resistance to DNA-nicking agents via protection from apoptosis, prolongation of the G₂ checkpoint, and stimulation of DNA repair (14, 15). Bcr-Abl has also been reported to promote the expression of the homologous recombination effector Rad51 (16). Other authors, however, did not reach the same conclusions (17). Alternative mechanisms, including the Bcr-Abl-dependent down-regulation of the expression of the nonhomologous end-joining kinase DNA-PKcs (18) and the homologous recombination effector BRCA1 (19), have been proposed. All these pathways are liable to be altered by STI571 (Imatinib, Glivec), a 2-phenylaminopyrimidine derivative that acts as a specific inhibitor of Bcr-Abl. STI571 actually competes with ATP for the binding site at the SH1 catalytic domain of Bcr-Abl (20, 21) and inhibits Bcr-Abl autophosphorylation, thus maintaining the kinase in an inactive conformation. STI571 has proven its efficiency in CML (22) and is nowadays the standard treatment in this disease.

Combination of STI571 and radiation has been attempted in non-Bcr-Abl cells. The results are controversial. Uemura et al. (23) found no evidence of a radiosensitizing effect in U937 leukemia cells. In contrast, Russell et al. (24) and

Podtcheko et al. (25) reported that STI571 potentiates radiation-induced cell kill at high drug concentration in glioma and anaplastic thyroid cancer cells, respectively. The purpose of the present study was to assess the effect of STI571 on the radiation response in K562 CML cells expressing Bcr-Abl using growth inhibition, colony-forming ability, peroxidative metabolism, erythroid differentiation, apoptosis, senescence, and cell cycle progression as endpoints. The results show that in K562 cells STI571 cooperates with radiation to repress cell growth in a strictly additive way.

Materials and Methods

Reagents

4-(4-Methylpiperazin-1-ylmethyl)-N-[4-methyl-3-[4-(3-pyridinyl)pyrimidin-2-ylamino]phenyl] benzamide (STI571) was synthesized according to Zimmermann et al. (26, 27) with slight modifications. Briefly, commercial *p*-toluic acid methyl ester was brominated with *N*-bromosuccinimide. The bromomethylated compound was coupled with *N*-methylpiperazine and the resulting ester was directly condensed with 4-methyl-*N*-3(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-yl)-benzene-1,3-diamine using trimethylaluminum in dichloromethane. Purification by flash chromatography yielded the pure compound in 85% yield. Purity of STI571 was confirmed by TLC and nuclear magnetic resonance analysis.

Aliquots of STI571 were dissolved in pure DMSO and stored as a 10 mmol/L stock solution at -20°C . Dilutions were made daily in growth medium. The final concentration of DMSO was $\leq 0.5\%$ so as not to alter cell growth or radiation responses. All experiments were done in dim light to avoid the photodegradation of the drug.

Cell Line and Cell Culture

The human CML, Bcr-Abl-expressing cell line K562 (ATCC CCL-243) was kindly provided by Dr. Philippe Rousselot (Service d'Immunologie Clinique, Hôpital Saint-Louis) and maintained in RPMI 1640 supplemented with Glutamax I, penicillin, streptomycin, and 10% FCS at 37°C with 5% CO_2 . K562 cells express high levels of Bcr-Abl and are mutated for p53 (28).

Irradiation of Cells

Irradiation without or with concomitant exposure to STI571 was done at room temperature using a ^{137}Cs γ -ray, IBL-637 irradiator (CIS-Biointernational) at a dose rate of 1.15 Gy/min. Each measurement was done in duplicate or triplicate. The relative cell growth or colony count was fitted to the classic linear-quadratic equation,

$$\ln S = -\alpha D - \beta D^2 \quad (1)$$

where S is the growth or surviving fraction, D is the radiation dose, and α and β are adjustable variables characterizing radiosensitivity in the low (α) and high (β) dose ranges of radiation, respectively. Calculations were made through nonlinear least-squares regression, taking all data points into account, using Kaleidagraph software (Synergy Software).

Western Immunoblotting

Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared each from 2×10^7 cells with protease and phosphatase inhibitors as described (29). Total extracts were made using M-PER reagent (Pierce) with protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Proteins were titrated by the Bradford method using the Bio-Rad protein assay. Cell extracts were boiled in Laemmli loading buffer and separated on 5% (DNA-PKcs), 7.5% (Bcr-Abl, STAT5, and Lyn), or 10% (Rad51 and CDK1) SDS-PAGE gel. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) and blocked for 1 h in 5% bovine serum albumin in TBST at 37°C . Membranes were subsequently incubated with primary monoclonal antibodies overnight at 4°C in TBST buffer, washed for 1 h, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories) in TBST buffer and revealed with an enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare-Amersham Biosciences). Nitrocellulose membranes were rehybridized with anti- α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich). For immunoprecipitates, calibration of protein loading was made by scanning SDS-PAGE gels after Coomassie blue staining. Densitometric analysis was done using QuantityOne software (Bio-Rad).

Immunodetection of CDK1 and p-Tyr¹⁵-CDK1

Because antibodies directed against CDK1 (Cdc2) cross-react with other CDKs in Western blots, the analysis of CDK1 expression and Tyr¹⁵ phosphorylation was carried out using CDK1 immunoprecipitates. Nuclear extracts were prepared in lysis buffer containing 50 mmol/L HEPES, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, and 0.5% NP40 (pH 7.0) plus protease and phosphatase inhibitors. Three hundred microliters of the extract (250 μg protein) were incubated with 3 μL monoclonal mouse anti-Cdc2 (POH1, Cell Signaling Technology) at 4°C overnight with gentle rocking. Protein G-Sepharose beads (20 μL of 50% bead slurry) were added to the lysate and incubated for 4 h at 4°C on a rotator. The immunoprecipitates were washed four times with lysis buffer. The pellets were resuspended in 20 μL of 2 \times SDS loading buffer. Immunoprecipitates were separated by 12% SDS-PAGE and detected by chemiluminescence using monoclonal or polyclonal antibodies to Cdc2 and p-Tyr¹⁵-Cdc2 (1:100 dilution; Cell Signaling Technology). GST-Cdc2 fusion protein and SK-N-MC total cell extracts treated with hydroxyurea (3 mmol/L, 24 h) were used as negative and positive controls, respectively.

Annexin V Assay

Determination of apoptosis and necrosis was done using an Annexin V-FITC kit (Calbiochem). Briefly, 10^6 cells were suspended in 1 mL ice-cold binding buffer [10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MgCl_2 , 4% BSA (pH 7.4)]. Ten microliters of media binding buffer and 1.25 μL Annexin V-FITC antibody (Calbiochem) were added to 500 μL of the cell suspension for 15 min at room temperature in the dark. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 0.5 mL ice-cold binding buffer. Annexin V-FITC-labeled cells were analyzed

400 Growth Inhibition by STI571 and Radiation

immediately using a FACStar PLUS cytofluorometer (Becton-Dickinson Biosciences). Propidium iodide (10 μ L; 30 μ g/mL in PBS) was subsequently added to allow discrimination between apoptotic (propidium iodide-negative) and necrotic (propidium iodide-positive) cells among the Annexin V-positive cells, and both propidium iodide and FITC fluorescence was determined by fluorescence-activated cell sorting. Signal analysis was carried out using CellQuest Pro software (Becton-Dickinson Biosciences).

Analysis of DNA Fragmentation by Flow Cytometry (sub-G₁)

The hypodiploid (sub-G₁) fraction was measured using fluorescence-activated cell sorting analysis of propidium iodide-stained cells after overnight fixation with cold 70% ethanol. The sub-G₁ region was determined by a gate on the DNA content histogram excluding cell debris.

Glycophorin A Assay

The expression of glycophorin A, a sialoglycoprotein present at the surface of human RBCs and erythroid precursors, was detected by direct immunofluorescence according to Kawano et al. (30). Briefly, 10⁶ K562 cells that had been exposed or not to STI571, radiation, or a combination of both were harvested, washed once with PBS supplemented with 2% FCS, and incubated in the dark (45 min, 4°C) with a monoclonal antibody directed against human glycophorin A following the manufacturer's instructions (PharMingen). After three washes with PBS containing 2% FCS, the cells were analyzed by flow cytometry. Mouse IgG antibody was used as isotype negative control.

β -Galactosidase Staining and Determination of Senescent Cells

See Supplementary Material.⁶

Cell Cycle Analysis

The effect of STI571 and/or radiation on the cell cycle distribution and progression of cells through S phase was monitored by dual-variable flow cytometry using a FACStar PLUS cytofluorometer as above. Pulse-chase labeling of K562 cells by bromodeoxyuridine (10-30 μ mol/L, 10-20 min, 37°C) was done ahead of or following exposure to radiation and/or STI571 (see text and figure legends for details). Cells were finally harvested by centrifugation, washed once with ice-cold PBS, and fixed in 70% ice-cold ethanol. Treatment of fixed cells and data acquisition were carried out as described previously (31). Data analysis was done with CellQuest Pro software (Becton-Dickinson Biosciences).

Results

Effect of STI571 and Radiation on K562 Cell Growth and Survival

STI571 induced a time- and concentration-dependent inhibition of cell proliferation (Fig. 1). After 72-h contact,

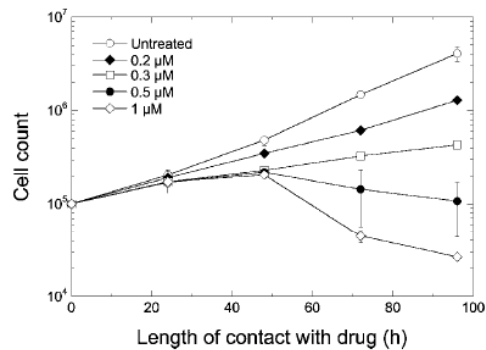


Figure 1. Time and dose dependence of growth inhibition by STI571. K562 cells were seeded at a constant density (10⁵ cells in 8 mL medium, 25-cm² flasks) and incubated with STI571 for the time and concentration indicated. Every 24 h, cells were resuspended by mild agitation, an aliquot was withdrawn, and cells were counted in a hemocytometer. Bars, SD determined over three independent measurements.

the amount of drug that reduced cell growth to 50% of that in controls (IC₅₀) was 0.14 \pm 0.01 μ mol/L. This value is in close agreement with those determined by other authors using a similar assay (32, 33). Past 48-h incubation, a drop in the cell count was observed at the highest drug concentrations used, suggesting a cytotoxic effect. This effect correlated with erythroid differentiation, a phenomenon described previously by Jacquelin et al. (34). Indeed, STI571 generated tiny, hemoglobin-positive cells that expressed the same level of glycophorin A as undifferentiated cells but incorporated 10-fold as much propidium iodide (Fig. 2) and have proven unable to resume growth after drug removal.

For determination of the effect of combined treatment on cell growth, K562 cells were first incubated with STI571 for 24 h before irradiation. The results are shown in Fig. 3A. The growth curves obtained in the absence of STI571 fitted the linear-quadratic model [Eq. (1); see Materials and Methods]. In combination with radiation, STI571 brought about suppression of the β variable together with a 2.1-fold increase of the α variable, suggesting radiosensitization in the low-dose range of radiation. Interestingly, radiation antagonized STI571-induced erythroid differentiation under similar conditions (Fig. 2).

For clonogenic assays, K562 cells were harvested at the end of treatment, freed from drug, and grown in semisolid medium. Reduction of the radiation susceptibility by a factor of 1.6 among drug survivors, specifically in the low-dose range of radiation was experienced in this assay (Fig. 3B).

In a third experiment, STI571 was introduced shortly after irradiation and was left in the medium for a maximum of 48 h. Under these conditions, we observed the same effect as in the first growth assay, that is, suppression of the quadratic component characteristic of radiation response together with a substantial increase of the α variable that was already apparent after 24 h contact with drug (Fig. 3C).

⁶Supplementary material for this article is available at Molecular Cancer Therapeutics Online (<http://mct.aacrjournals.org/>).

In summary, the comparison of growth and clonogenic experiments shows that STI571 is able to induce a cytotoxic effect likely to parallel erythroid differentiation but does not interfere substantially with the lethal effect of radiation, although a moderate radioprotecting effect was observed at low radiation dose in the clonogenic assay. At particular times past radiation exposure, however, the growth inhibitory effect of the drug resulted in suppression of the quadratic component (β) together with a substantial increase of the α variable characterizing response in the low-dose range of radiation.

Radio-Induced Apoptosis and Necrosis without and with STI571

Apoptosis and necrosis of K562 cells were assessed by flow cytometric analysis of the sub-G₁ DNA fragments and Annexin V binding in cells exposed to 4 Gy alone, 0.3 μ mol/L STI571 alone, and a combination of both. The susceptibility to STI571-induced apoptosis was in good agreement with Jacquelin et al. (34). From both methods, the interaction between radiation and drug appeared to be purely additive with respect to the level of apoptosis (Fig. 4). Based on the DNA content, the necrosis index was below 1% under these conditions. However, necrosis was more pronounced than apoptosis at high concentrations of STI (14% for 1 μ mol/L STI571, 20% for 10 μ mol/L STI571, 72-h contact) in agreement with Okada et al. (35).

To extend these observations, Bcr-Abl and STAT5 expression and phosphorylation were analyzed by Western blot. Indeed, the phosphorylated form of STAT5 reportedly imparts sustained resistance to DNA damage-induced

apoptosis (7) via up-regulation of the transcription of the antiapoptotic Bcl-X_L protein (36). No significant change of Bcr-Abl and STAT5 expression was observed following radiation, STI571, or a combination of both. In contrast, STI571 abolished Bcr-Abl and STAT5 phosphorylation independently of whether cells were irradiated or not (Fig. 5).

Radio-Induced Senescence without and with STI571

Ionizing radiation induced senescence-like changes in K562 cells exposed to radiation. Indeed, after 5-day incubation, a substantial part of irradiated cells underwent phenotypic changes characteristic of senescence, associated with β -galactosidase staining. At the concentration used, STI571 alone did not induce such changes. In combination with radiation, STI571 overcame the effect of radiation and abolished radiation-induced formation of β -galactosidase-positive cells to near completion (see Supplementary Material).

Cell Cycle Studies

The time dependence of cell cycle disruption by radiation (6 Gy), STI571 (0.3 or 1 μ mol/L), and a combination of both was investigated by flow cytometry for up to 72 h following initial treatment. The results are shown in Fig. 6.

Radiation alone induced a depletion of the G₁- and S-phase compartments together with prolonged accumulation in the G₂ phase. The effect reached a maximum at ~12 h (G₁, G₂) to 24 h (S) after irradiation. STI571 (0.3 μ mol/L) alone brought about a transient G₁-phase accumulation and S-phase depletion peaking at 12 h of contact with drug followed by a progressive decrease of the G₁- and G₂-phase content and accumulation in S phase. These effects were

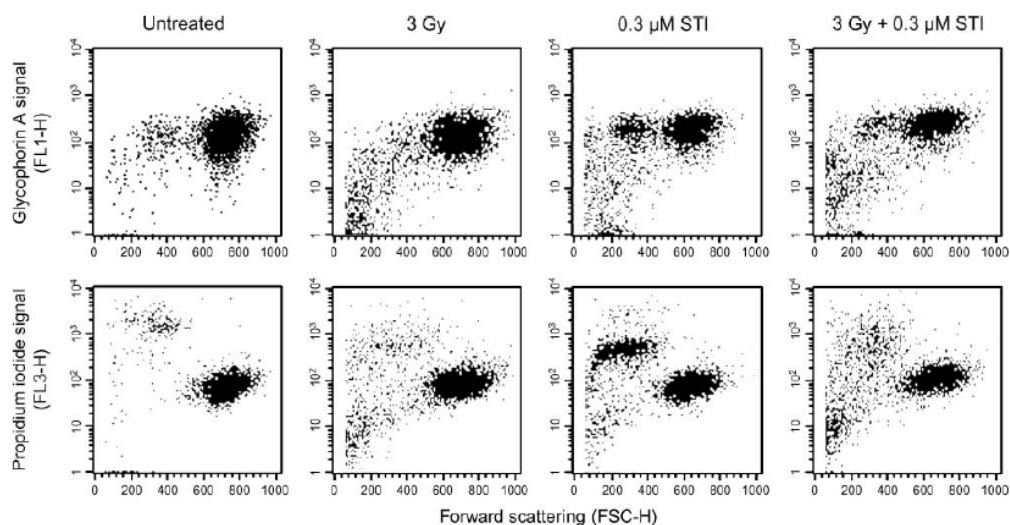


Figure 2. Flow cytometric analysis of erythroid differentiation in K562 cells by STI571 and radiation. Exponentially growing K562 cells were exposed or not to STI571 and/or γ -rays. In combined treatment, STI571 (48-h contact) was introduced 24 h before radiation and was present for an additional 24 h. At the end of incubation, cells were washed, fixed, exposed to anti-glycophorin A antibody then to a FITC-labeled secondary antibody, and analyzed by flow cytometry. The same samples were subsequently counterstained with propidium iodide to determine the DNA content.

402 Growth Inhibition by STI571 and Radiation

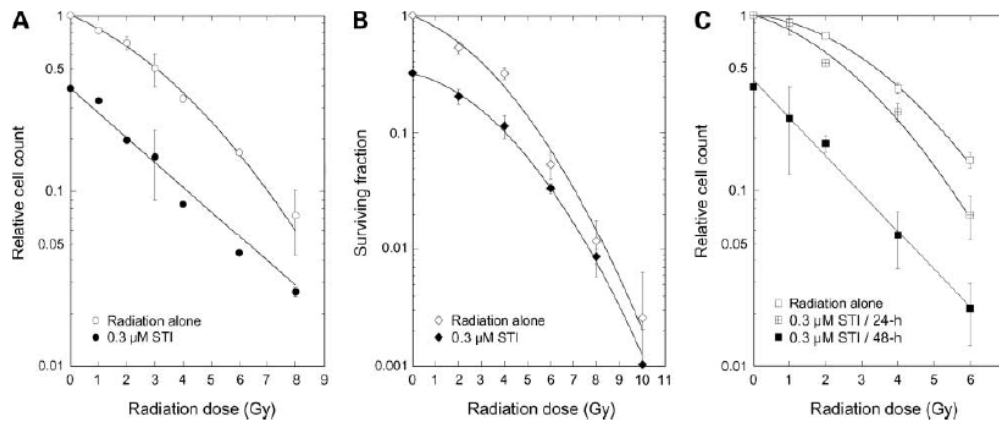


Figure 3. Effect of combined treatment with ionizing radiation and STI571 on cell growth and survival. **A**, growth assay, sequence drug → radiation → drug. Cells were irradiated without or with STI571. When present, the drug was introduced 24 h before irradiation and was left in the medium for a further 48 h. Cells were subsequently harvested by centrifugation, transferred to drug-free medium for 72 h, and counted. Radiation response in the absence of drug followed the linear-quadratic equation [Eq. (1); see Materials and Methods] with $\alpha = 0.152 \pm 0.017 \text{ Gy}^{-1}$ and $\beta = 0.025 \pm 0.008 \text{ Gy}^{-2}$. Radiation response in the presence of drug followed a single-exponential dose dependence with slope $\alpha = 0.323 \pm 0.031 \text{ Gy}^{-1}$. The relative cell count at null radiation dose in the presence of STI571 was 0.385. **B**, clonogenic assay. Cells were incubated for 24 h in the absence or presence of STI571, irradiated or not, returned to the incubator for 48 h with or without STI571, then collected by centrifugation, washed twice with HBSS, counted, and plated (4,000 cells per 10-cm² dish) in semisolid medium using the methylcellulose technique (48). Colonies were scored under microscope examination after 12 days of growth. Found: $\alpha = 0.166 \pm 0.034 \text{ Gy}^{-1}$ and $\beta = 0.045 \pm 0.009 \text{ Gy}^{-2}$ in the absence of drug and $\alpha = 0.104 \pm 0.016 \text{ Gy}^{-1}$ and $\beta = 0.045 \pm 0.005 \text{ Gy}^{-2}$ in the presence of STI571. The drug surviving fraction at null radiation dose was 0.319. **C**, growth assay, sequence radiation → drug. STI571 was introduced shortly after irradiation and was present for 24 or 48 h. Cells were subsequently incubated in drug-free medium for 5 days and counted. For radiation alone, $\alpha = 0.0265 \pm 0.0038 \text{ Gy}^{-1}$ and $\beta = 0.0484 \pm 0.0111 \text{ Gy}^{-2}$. For 24-h incubation with STI, $\alpha = 0.144 \pm 0.077 \text{ Gy}^{-1}$ and $\beta = 0.0498 \pm 0.0264 \text{ Gy}^{-2}$. After 48-h incubation in the presence of STI, radiation response fitted a single exponential with slope $\alpha = 0.489 \pm 0.014 \text{ Gy}^{-1}$; the growth fraction at null radiation dose was 0.429.

more pronounced in the presence of 1 μmol/L drug. In particular, 1 μmol/L drug abrogated the radio-induced G₂ block and elicited prolonged accumulation in S phase paralleling G₁-phase depletion.

Abolition of the G₂-phase arrest by caffeine has long been known to slow the progress of DNA repair and result in a radiosensitizing effect. We used two methods to determine whether a similar event could be induced by STI571 in

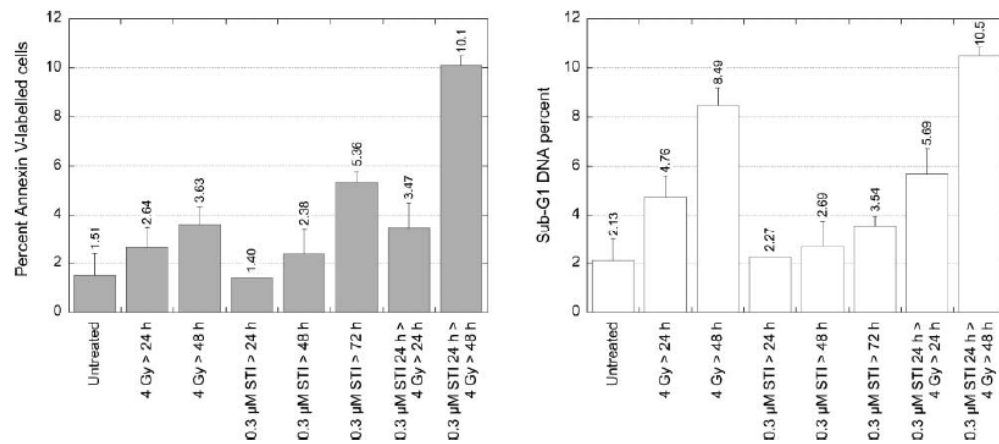


Figure 4. Determination of STI571-induced apoptosis and effect of drug on radio-induced apoptosis in K562 cells. Cells were exposed to radiation or drug, collected, and processed for Annexin V-FITC or sub-G₁ fragments determination by flow cytometry as indicated in the text. In combined treatment, STI571 was introduced 24 h before irradiation and was present for up to cell harvest.

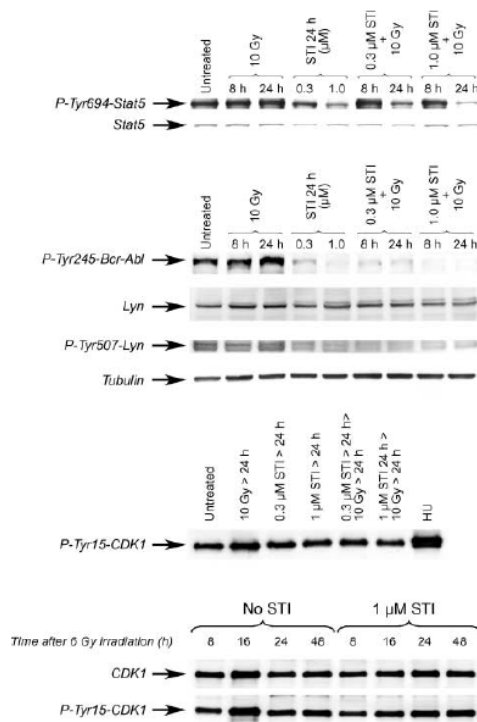


Figure 5. Western blot determination of the expression and phosphorylation of STAT5, CDK1, Bcr-Abl, and Lyn following radiation with or without STI571. Bcr-Abl, Lyn, and STAT5 were probed from total extracts (30 μg/lane). CDK1 was probed from immunoprecipitates prepared from nuclear extracts of K562 cells (see Materials and Methods). HU, treatment with hydroxyurea (3 mmol/L, 24 h). The antibodies used were mouse monoclonal antibody against STAT5 (Becton-Dickinson Biosciences) and rabbit polyclonal antibodies against p-Tyr⁶⁹⁴-STAT5, Lyn, p-Tyr⁵⁰⁷-Lyn, c-Abl (cross-reacting with Bcr-Abl), and p-Tyr²⁷⁵-c-Abl (cross-reacting with p-Bcr-Abl; Cell Signaling Technology).

K562 cells. For this purpose, we analyzed (a) the pathway involved in the control of the G₂ transition through Tyr¹⁵ phosphorylation of CDK1 (Cdc2) and (b) the cell cycle progress in cells that had been labeled with bromodeoxyuridine in S phase before exposure to drug or radiation.

Control of the G₂-Phase Progression. Loss of Bcr-Abl phosphorylation is expected to reduce the activity of the tyrosine kinase Lyn through Tyr⁵⁰⁷ dephosphorylation (37). The phosphorylated form of Lyn has been involved in the control of Tyr¹⁵ phosphorylation of CDK1, thus controlling the transit through late G₂ and mitosis (38). Exposure to STI571 was found to induce a loss of Lyn phosphorylation (Fig. 5), consistent with the lack of a radio-induced G₂ block in the presence of STI571 (Fig. 6). This study was completed by analysis of CDK1 expression and phosphorylation using immunoprecipitates. As expected, radiation alone elicited a

transient increase of the nuclear content and phosphorylation of CDK1, peaking at ~ 16 h following radiation (Fig. 5). Preincubation (24 h) with 1 μmol/L STI571 prevented CDK1 phosphorylation, consistent with the flow cytometric analysis that showed a lack of accumulation of cells in G₂ under these conditions.

Control of the S-Phase Progression. From the data presented above, it may be inferred either that STI571 abrogates the radio-induced G₂ block through down-regulation of Lyn phosphorylation or that cells are blocked at an earlier stage.

To resolve this issue, the effect of STI571 and/or radiation on the relative movement of cells through S phase was analyzed in asynchronous K562 cells that had been pulse labeled with bromodeoxyuridine in S phase. Both STI571 and radiation slowed down the transit of cells through the S phase of the cell cycle. The combination of radiation and STI571 produced an additive effect (see Supplementary Material).

Discussion

STI571 at high concentration has been reported to increase radiation susceptibility in glioblastoma cells both *in vitro* (24) and in mouse models (39, 40). This effect was assigned to disruption of an autocrine loop involved in phosphorylation (activation) of the platelet-derived growth factor receptor (39, 40) and was not observed in breast and colon cancer cells (40). At high enough concentrations to inhibit the activity of c-Abl, STI571 was able to potentiate radiation response in cells from anaplastic thyroid cancer (25). However, at concentrations achieving complete inhibition of Bcr-Abl but insufficient to depress c-Abl activity, STI571 did not alter the radiation response in normal bone marrow cells from BALB/c mice and in U937 human leukemia cells in a clonogenic assay *in vitro* (23). Here, we show that STI571 at cytostatic concentrations represses cell growth cooperatively with radiation in K562 CML cells but does not induce any significant change in radiation susceptibility, consistent with the fact that the expression of DNA-PKcs was not altered (see Supplementary Material).

STI571 at submicromolar concentration did not alter the expression of Bcr-Abl and STAT5 expression in K562 cells but abrogated the phosphorylation of Bcr-Abl-Tyr²⁴⁵ and STAT5-Tyr⁶⁹⁴, as also observed by others (34, 41) and independently of whether cells were irradiated or not. As the phosphorylated form of STAT5 imparts sustained resistance to DNA damage-induced apoptosis (7, 36), down-regulation of STAT5 phosphorylation would be expected to result in an enhanced susceptibility of K562 cells to apoptosis. However, although K562 cells showed time- and dose-dependent apoptosis in response to STI571 and radiation, as shown in Fig. 4, the drug did not potentiate radiation-induced apoptosis and the interaction between both modalities was strictly additive. The same result was obtained by Podtcheko et al. (25) using non-Bcr-Abl anaplastic thyroid cancer cells.

404 Growth Inhibition by STI571 and Radiation

A substantial part of K562 cells exposed to radiation alone displayed phenotypic changes associated with the formation of β -galactosidase-positive cells (see Supplementary Material) typical of senescence-like, terminal growth arrest in nearly the same way as described for hydroxyurea treatment also in K562 cells (42). Surprisingly enough, STI571 acted antagonistically with radiation in this pathway. Symmetrically, in our hands, radiation antagonized drug-induced erythroid differentiation of K562 cells (Fig. 2). These results are at variance with those obtained at high drug concentration in the non-Bcr-Abl anaplastic thyroid cancer cells (25). One would tentatively propose to explain these differences that pathways of DNA damage response under control of the c-Abl tyrosine kinase are not operating in CML cells. Alternatively, inhibition of the catalytic activity of other tyrosine kinases, such as c-Kit or platelet-derived growth factor receptor, at concentrations 1 order of magnitude above those used in this study should also be taken into consideration.

Riordan et al. (43) and Jeong et al. (44) earlier reported that herbimycin A, an inhibitor of c-Abl and Bcr-Abl, increased the level of radiation-induced apoptosis in K562 cells. This effect was associated with the abrogation of the G₂ checkpoint (44). Actually, bypassing the G₂ checkpoint reduces the amount of DNA repair that can take place and leads to an increase of radiation susceptibility. To determine whether this effect occurred in K562 cells, we

analyzed the effect of STI571 on the phosphorylation of Lyn, a member of the Src tyrosine kinase family. As a matter of fact, constitutive activation of Lyn through Tyr⁵⁰⁷ phosphorylation is driven by Bcr-Abl (45). Lyn can also be activated by radiation and other DNA-damaging agents. p-Tyr⁵⁰⁷-Lyn binds to and phosphorylates CDK1 on the Tyr¹⁵ residue, and p-Tyr¹⁵-CDK1 is necessary to block G₂-M progression (38). Although Lyn expression did not vary after radiation or prolonged exposure to STI571, Lyn phosphorylation slightly increased after radiation exposure and was abolished by STI571. Such inhibition of Lyn phosphorylation is sufficient to induce suppression of the radio-induced G₂ block. However, this explanation does not hold in the present case. Indeed, studies with pulse-chased bromodeoxyuridine-labeled cells showed that a short contact with STI571 lengthened S-phase progression (see Supplementary Material) but did not affect the duration of the G₂ block induced by radiation. On the other hand, prolonged exposure to 1 μ mol/L STI571 resulted in the accumulation of cells in G₁ and in early S phase. This block was efficient enough to starve the G₂ compartment.

The ability of STI571 to induce transient accumulation in early S phase suggests that STI571 might be able to potentiate the cytotoxic effect of topoisomerase I and II poisons in c-Kit and platelet-derived growth factor receptor-expressing solid tumors, which are both targets

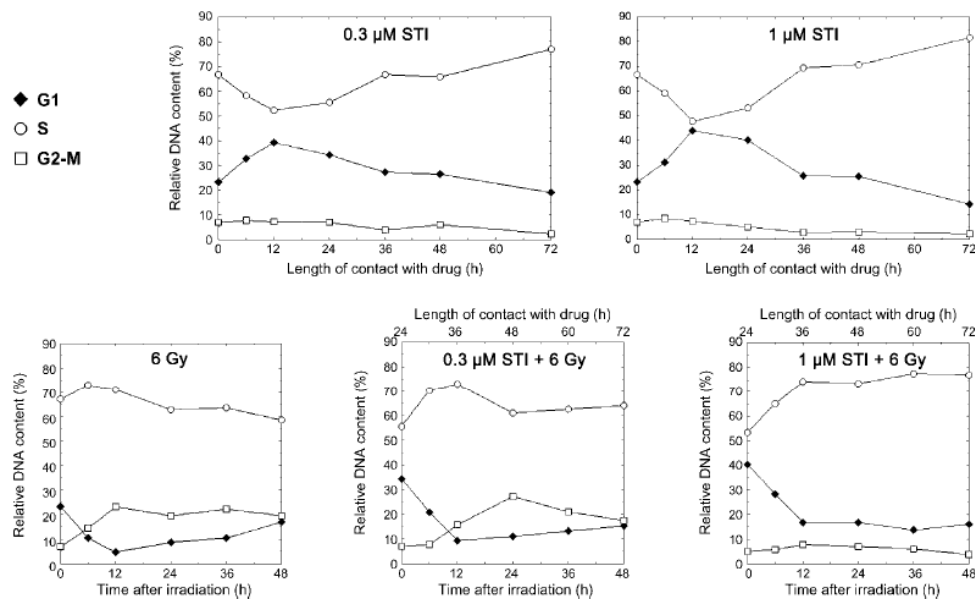


Figure 6. Altered cell cycle progression of growing K562 cells by STI571 and radiation. In combined treatment, cells were incubated with STI571 for 24 h before radiation. Cells were harvested at the times indicated, incubated with bromodeoxyuridine (10 μ mol/L, 15 min) for S-phase DNA labeling, and processed (31) for flow cytometric analysis. For sake of clarity, the sub-G₁ fraction has not been shown on the diagram.

for STI571. Indeed, STI571 has been reported to act synergistically with etoposide and topotecan in small cell lung cancer xenografts (46). Moreover, in c-Kit-positive small cell lung cancer cells, STI571 was found to up-regulate topoisomerase I activity and potentiate induced cell kill by camptothecin derivatives (47). Clearly, the possibility of selective sensitization to S-phase targeting drugs by STI571 in Bcr-Abl, platelet-derived growth factor receptor, or c-Kit-expressing tumors warrants further investigation.

Acknowledgments

We thank Dr. Philippe Rousselot for the generous gift of K562 cells, Drs. Eric Deutsch (Institut Gustave-Roussy), Janet Hall and Frédérique Mégnin-Chanet (Institut Curie) for helpful discussion, and Danièle Rouillard for the flow cytometric analysis of the cell cycle.

References

1. Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 1999;9:179–86.
2. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:33–44.
3. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:85–109.
4. Van Etten RA. Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-Imatinib era. *Leuk Res* 2004;28 Suppl 1:21–8.
5. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343–56.
6. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000;95:2118–25.
7. Hoover RR, Gerlach MJ, Koh EY, Daley GQ. Cooperative and redundant effects of STAT5 and Ras signaling in BCR/ABL transformed hematopoietic cells. *Oncogene* 2001;20:5826–35.
8. Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene* 2002;21:7137–46.
9. Kawachi K, Ogasawara T, Yasuyama M, Ohkawa S. Involvement of Akt kinase in the action of STI571 on chronic myelogenous leukemia cells. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31:11–7.
10. Chu S, Holtz M, Gupta M, Bhatia R. BCR/ABL kinase inhibition by Imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukemia CD34⁺ cells. *Blood* 2004;103:3167–74.
11. Parmar S, Katsoulidis E, Verma A, et al. Role of the p38 map kinase pathway in the generation of the effects of Imatinib mesylate (STI571) in BCR-ABL expressing cells. *J Biol Chem* 2004;279:25345–52.
12. Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 2005;65:2047–53.
13. Keeshan K, Cotter TG, McKenna SL. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. *Leukemia* 2002;16:1725–34.
14. Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, et al. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G2/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:4189–201.
15. Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* 2002;21:8591–604.
16. Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, et al. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 2001;8:795–806.
17. Dierov J, Dierova R, Carroll M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* 2004;5:275–85.
18. Deutsch E, Dugray A, Abdul-Karim B, et al. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 2001;97:2084–90.
19. Deutsch E, Jarrousse S, Buet D, et al. Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 2003;101:4583–8.
20. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996;56:100–4.
21. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. *Science* 2000;289:1938–42.
22. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994–1004.
23. Uemura N, Griffin JD. The ABL kinase inhibitor STI571 does not affect survival of hematopoietic cells after ionizing radiation. *Blood* 2000;96:3294–5.
24. Russell JS, Brady K, Burgan WE, et al. Gleevec-mediated inhibition of Rad51 expression and enhancement of tumor cell radiosensitivity. *Cancer Res* 2003;63:7377–83.
25. Podtcheko A, Ohtsuru A, Namba H, et al. Inhibition of ABL tyrosine kinase potentiates radiation-induced terminal growth arrest in anaplastic thyroid cancer cells. *Radiat Res* 2006;165:35–42.
26. Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T, Lydon NB, Traxler P. Phenylamino-pyrimidine (PAP)-derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6:1221–6.
27. Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T, Lydon NB. Potent and selective inhibitors of the Abl-kinases: phenylamino-pyrimidine (PAP)-derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 1997;7:187–92.
28. Drexler HG, MacLeod RA, Uphoff CC. Leukemia cell lines: *in vitro* models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leuk Res* 1999;23:207–15.
29. Piret B, Schoonbroodt S, Piette J. The ATM protein is required for sustained activation of NF- κ B following DNA damage. *Oncogene* 1999;18:2261–71.
30. Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Saito S, et al. Ectopic cyclin D1 expression blocks STI571-induced erythroid differentiation of K562 cells. *Leuk Res* 2004;28:623–9.
31. Demarcq C, Bastian G, Remvikos Y. BrdUrd/DNA flow cytometry analysis demonstrates *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-induced multiple cell-cycle modifications on human lung carcinoma cells. *Cytometry* 1992;13:416–22.
32. Yu C, Krystal G, Dent P, Grant S. Flavopiridol potentiates STI571-induced mitochondrial damage and apoptosis in BCR-ABL-positive human leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:2976–84.
33. Park J, Kim S, Oh C, Yoon SS, Lee D, Kim Y. Differential tyrosine phosphorylation of leukemic cells during apoptosis as a result of treatment with Imatinib mesylate. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336:942–51.
34. Jacquet A, Herrant M, Legros L, et al. Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J* 2003;17:2160–2.
35. Okada M, Adachi S, Imai T, et al. A novel mechanism for Imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL-positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity. *Blood* 2004;103:2299–307.
36. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 2000;96:2269–76.
37. Ptasznik A, Urbanowska E, Chinta S, et al. Crosstalk between BCR/ABL oncoprotein and CXCR4 signaling through a Src family kinase in human leukemia cells. *J Exp Med* 2002;196:667–78.
38. Kharbada S, Saleem A, Yuan ZM, et al. Nuclear signaling induced by ionizing radiation involves colocalization of the activated p56/p53lyn tyrosine kinase with p34cdc2. *Cancer Res* 1996;56:3617–21.
39. Geng L, Shinohara ET, Kim D, et al. STI571 (Gleevec) improves tumor growth delay and survival in irradiated mouse models of glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:263–71.
40. Holdhoff M, Kreuzer KA, Appelt C, et al. Imatinib mesylate radiosensitizes human glioblastoma cells through inhibition of platelet-derived growth factor receptor. *Blood Cells Mol Dis* 2005;34:181–5.
41. Jacobberger JW, Sramkoski RM, Frisa PS, et al. Immunoreactivity of

406 *Growth Inhibition by ST1571 and Radiation*

- Stat5 phosphorylated on tyrosine as a cell-based measure of Bcr/Abl kinase activity. *Cytometry* 2003;54:75–88.
42. Park JI, Jeong JS, Han JY, et al. Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:455–60.
43. Riordan FA, Bravery CA, Mengubas K, et al. Herbimycin A accelerates the induction of apoptosis following etoposide treatment or γ -irradiation of bcr/abl-positive leukaemia cells. *Oncogene* 1998;16:1533–42.
44. Jeong SJ, Jin YH, Moon CW, et al. Protein tyrosine kinase inhibitors modulate radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in K562 cells. *Radiat Res* 2001;156:751–60.
45. Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker BJ, Emmerich B, Hallek M. Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer Res* 1996;56:3589–96.
46. Decaudin D, de Crémoux P, Sastre X, et al. *In vivo* efficacy of ST1571 in xenografted human small cell lung cancer alone or combined with chemotherapy. *Int J Cancer* 2005;113:849–56.
47. Maulik G, Bharti A, Khan E, Broderick RJ, Kijima T, Salgia R. Modulation of c-Kit/SCF pathway leads to alterations in topoisomerase-I activity in small cell lung cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2004;23:237–51.
48. Aye MT, Seguin JA, McBurney JP. Erythroid and granulocytic colony growth in cultures supplemented with human serum lipoproteins. *J Cell Physiol* 1979;99:233–8.

II-2. Expériences complémentaires

II-2-1. Résultats sur les lignées hTERT-RPE1 et HCC-1937

II-2-1-a. Effet cytostatique du STI571

Le pouvoir cytostatique du STI571 a été étudié par l'inhibition de croissance cellulaire induite par la présence de la drogue sur les lignées hTERT-RPE1 et HCC-1937 non porteuses de la mutation Bcr-Abl.

- *hTERT-RPE1*

Pour les cellules de la lignée épithéliale hTERT-RPE1, l'inhibition de croissance induite par le STI571 est relativement peu sensible au temps de contact avec la drogue au-delà de 48 h (Figure 30A) avec une réponse presque identique après 72 h d'exposition au STI571. Les cellules sont résistantes à la drogue jusqu'à 10 μM , puis la survie décroît abruptement aux plus fortes concentrations. Elle décroît abruptement au-delà de 12 μM STI571. L' IC_{50} est estimée à 16-18 μM .

La figure 30B montre l'effet du temps d'exposition à la drogue à différentes concentrations. On observe un effet cytostatique complet et létal seulement à la plus forte concentration utilisée (20 μM).

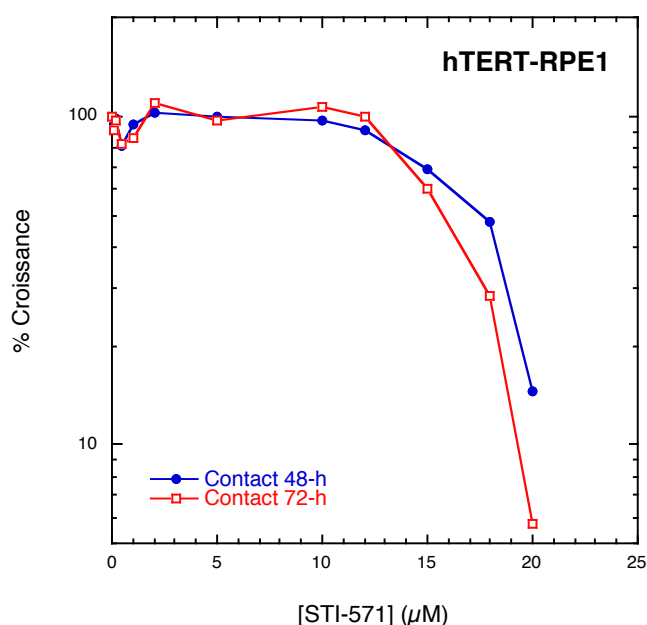


Figure 30A
Inhibition de croissance de la lignée hTERT-RPE1 par le STI571 avec des temps de contact de 48 et 72 h.

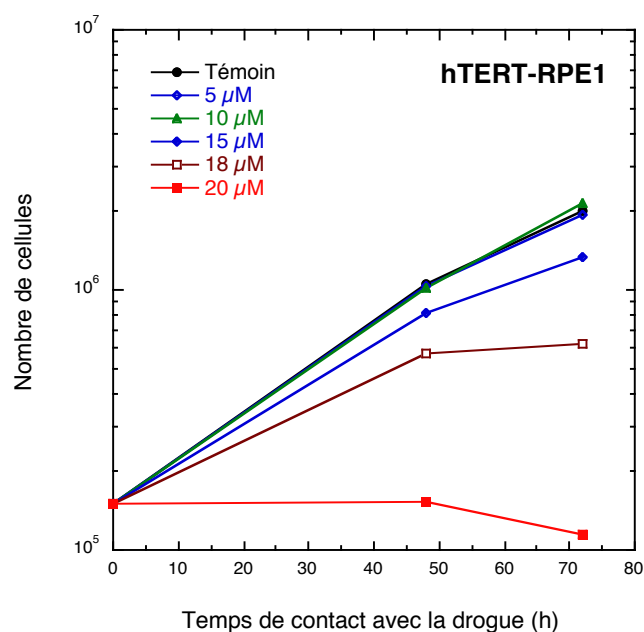


Figure 30B
Croissance de la lignée hTERT-RPE1 en présence de différentes concentrations de STI571.

- *HCC-1937*

Les cellules de la lignée HCC-1937, mutées pour BRCA1, ont un comportement sensiblement différent de celui des cellules hTERT-RPE1. Après une durée d'exposition de 120 h au STI571, on observe une décroissance à peu près exponentielle du potentiel de croissance en fonction de la concentration de STI571 (Figure 31A). L' IC_{50} est plus élevée que pour les cellules hTERT-RPE1, et a été estimée à $65 \mu\text{M}$ par extrapolation.

L'étude de la croissance cellulaire en fonction du temps d'exposition à la drogue (Figure 31B) confirme que les cellules HCC-1937 sont plus résistantes à la drogue que les cellules hTERT-RPE1, même pour des temps d'incubation plus longs.

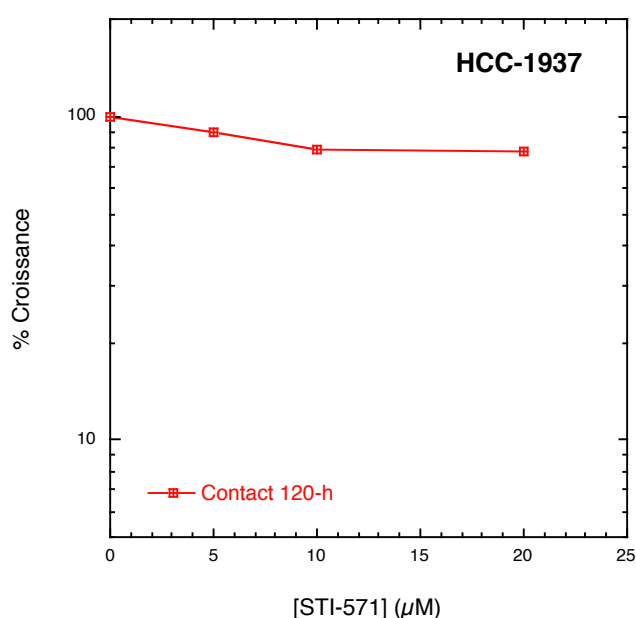


Figure 31A
Inhibition de croissance de la lignée HCC-1937 par le STI571 avec un temps de contact de 120 h.

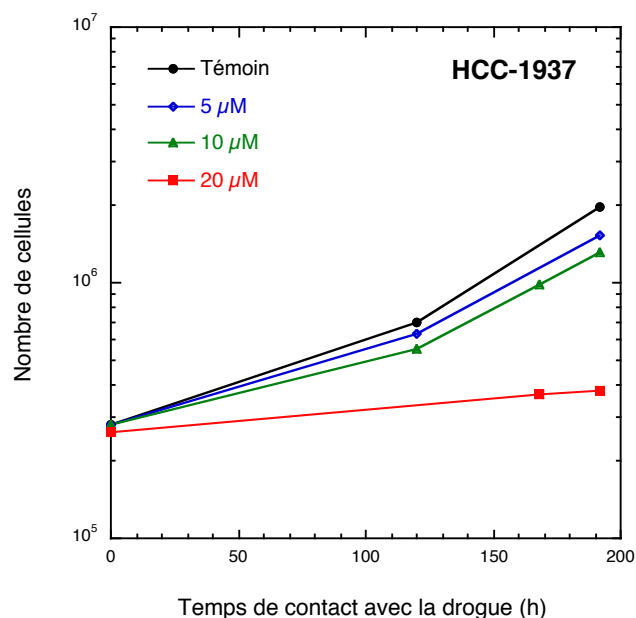


Figure 31B
Croissance de la lignée HCC-1937 en présence de différentes concentrations de STI571.

II-2-1-b. Effet cytotoxique du STI571

La possibilité d'un effet cytotoxique du STI571 a été étudiée sur les cellules hTERT-RPE1 et HCC-1937 par un test de survie clonogénique. Il n'a pas été possible de mettre en évidence un effet cytotoxique sur les cellules HCC-1937. À la plus forte concentration de drogue utilisée, les cellules hTERT-RPE1 montrent un effet cytotoxique modéré mais significatif en fonction du temps d'exposition à la drogue (Figure 32).

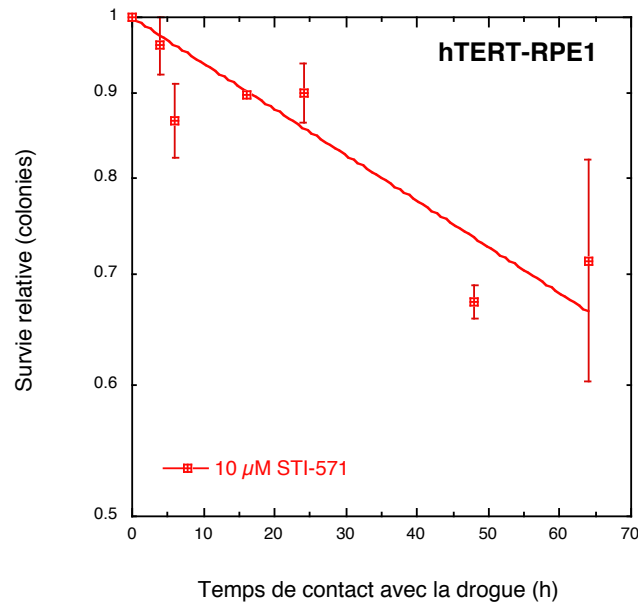


Figure 32
Cytotoxicité du STI571 sur la lignée hTERT-RPE1 (test clonogénique).

II-2-1-c. Étude de l'effet du STI571 sur la réponse aux radiations ionisantes

- *HTERT-RPE1*

Dans la lignée hTERT-RPE1, l'exposition au STI571 ne modifie pas la réponse aux RI pour les temps courts d'exposition à la drogue (données non montrées). Après 16 h de contact avec 10 μM de STI571, on observe une modification de la courbe de survie au rayonnement (Figure 33) avec une diminution de la valeur du paramètre α qui passe de $0,35 \text{ Gy}^{-1}$ en l'absence de STI571 à $0,25 \text{ Gy}^{-1}$ en présence de la drogue. Dans le même temps, la valeur du paramètre β passe de $0,048$ à $0,130 \text{ Gy}^{-2}$. Dans cette lignée, le STI571 induit un effet radioprotecteur à faible dose et radiosensibilisateur à forte dose.

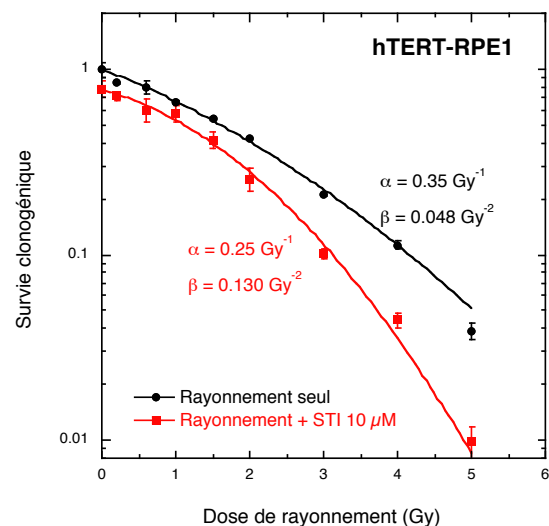


Figure 33
Survie clonogénique de la lignée hTERT-RPE1 irradiée avec ou sans STI571 à la concentration de 10 μM.

- HCC-1937

Dans la lignée HCC-1937 mutée pour BRCA1, en présence de 10 et 20 μM de STI571, on observe un phénomène de radioprotection (Figure 34) avec une diminution de la valeur du paramètre α qui passe de 0,39 Gy^{-1} en l'absence de STI571 à 0,24 et 0,23 Gy^{-1} en présence de concentrations élevées de drogue (10 et 20 μM). La réponse étant exponentielle par rapport à la dose de rayonnement, le paramètre β est égal à 0. Dans cette lignée, le STI571 induit donc un effet radioprotecteur.

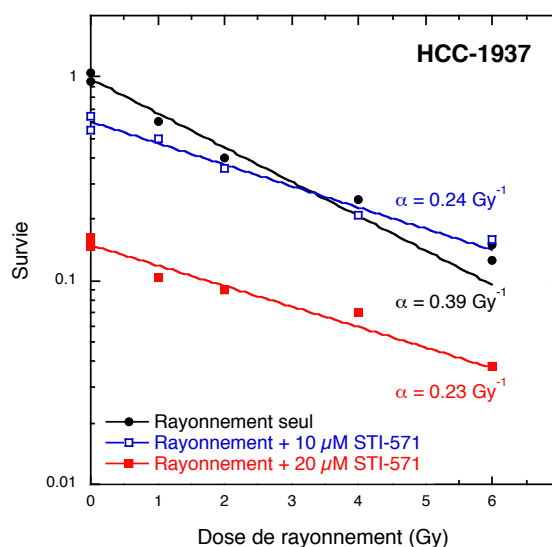


Figure 34
Survie de la lignée HCC-1937 irradiée avec ou sans STI571 à la concentration de 10 et 20 μM .

En définitive, le STI 571 produit un effet radioprotecteur dans les lignées hTERT-RPE1 et HCC-1937.

II-2-2. Effets du STI571 sur le métabolisme peroxydatif

La stimulation du métabolisme peroxydatif et l'accumulation de ROS (*reactive oxygen species*) survient dans les cellules porteuses de la mutation Bcr-Abl (294, 296). Le STI571 inhibe le stress oxydatif dans les cellules Bcr-Abl et protège les cellules contre la mort induite par H_2O_2 (294, 297). L'exposition aux radiations ionisantes génère un stress oxydatif intense dans les cellules et pourrait alors antagoniser l'effet du STI571.

Pour étudier l'influence du STI571 sur le métabolisme peroxydatif des cellules K562 irradiées, nous avons mesuré l'incorporation de 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H2DCFDA, Invitrogen) et la production *in situ* de ses métabolites fluorescents par analyse par cytométrie de flux telles que décrites par Sattler *et al.* (294).

L'irradiation entraîne une augmentation importante du métabolisme peroxydatif (Figure 35). Le STI571 diminue de manière importante le niveau de stress oxydatif basal ainsi qu'après irradiation, indiquant l'absence de corrélation entre le potentiel de peroxydation des cellules et la radiosensibilisation induite par le STI571.

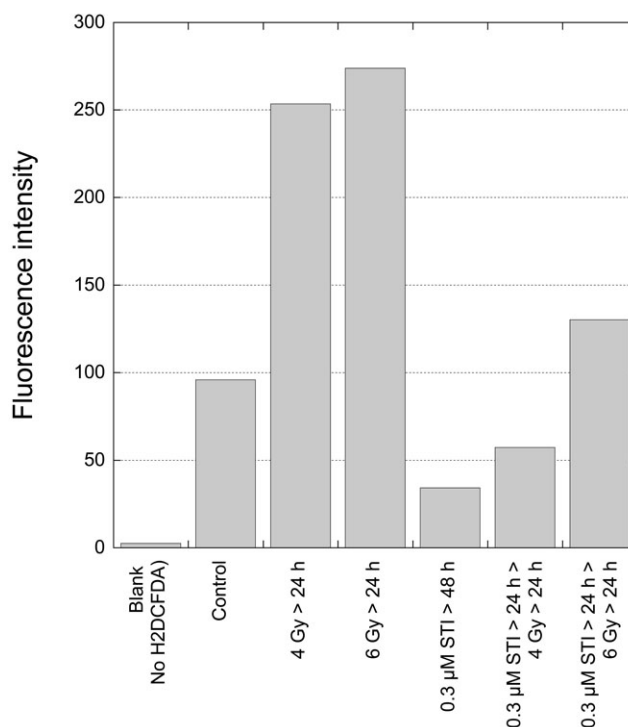


Figure 35

Analyse par cytométrie de flux de l'effet du STI571 sur le métabolisme peroxydatif d'H2DCFDA dans les cellules K562. Le STI571 était introduit 24 h avant l'irradiation. L'émission fluorescente a été mesurée par FACS.

II-2-3. Effet du STI571 sur la réparation des cassures double-brin de l'ADN

Les CDB induites par les RI sont réparées par 2 mécanismes différents : la recombinaison homologe (RH) et la religation non homologe (NHEJ) (cf. paragraphe I-3-4) . Dans les cellules de leucémie myéloïde chronique, la réparation est majorée, induisant une résistance aux agents génotoxiques (206). Nous avons donc cherché à savoir si la radiosensibilisation induite par le STI571 dans la lignée K562 était ou non liée à une altération de la réparation. Une première approche de

cette question consistait à déterminer l'expression et l'activité des enzymes majeures des voies RH (RAD51) et NHEJ (DNA-PK).

II-2-3-a. RAD51

RAD51 est une protéine nucléaire et cytoplasmique de 37 kDa jouant un rôle majeur dans la réparation par RH puisqu'elle permet au brin endommagé de se coupler au brin intact d'une chromatide sœur pour former un hétéroduplex. L'ADN polymérase peut alors synthétiser les bases manquantes en se servant du brin intact comme matrice (186). RAD51 est activée par phosphorylation par ATM et c-Abl (184). Dans les cellules Bcr-Abl, son activité est augmentée par augmentation de son expression, diminution de sa dégradation et activation des modifications post-transcriptionnelles (207). Dans la lignée K562, l'expression de RAD51 n'est pas modifiée en présence de STI571 1 μ M et augmentée après irradiation, y compris en présence de STI571 (Figure 36). Cette observation suggère que le STI571 n'influe pas sur la réparation par RH.

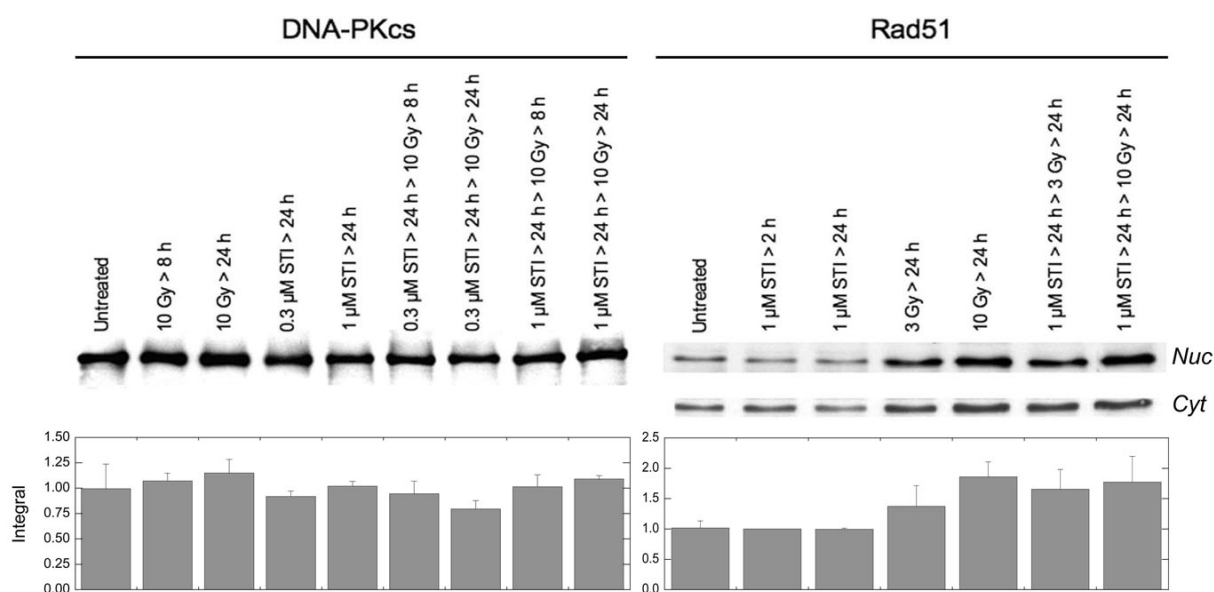


Figure 36

Analyse par Western blot de l'expression de DNA-PKcs (extraits totaux, 100 μ g de protéine par bande) **et de Rad51** nucléaire (Nuc, 15 μ g par bande) et cytoplasmique (Cyt, 25 μ g par bande) dans les cellules K562 exposées aux radiations ionisantes, au STI571 ou à la combinaison des deux. Les cellules exposées aux RI seules étaient collectées 8h ou 24h après irradiation. Le STI571 était laissé 24h. Lors de la combinaison des deux, le STI571 était introduit 24h avant l'irradiation puis était laissé 8h ou 24h après, puis les cellules étaient récupérées et lysées.

II-2-3-b. DNA-PK

La sous-unité catalytique du complexe DNA-PK, DNA-PKcs, forme avec les protéines Ku70 et Ku80 un hétérotrimère jouant un rôle majeur dans la reconnaissance des CDB et le recrutement des différentes protéines nécessaires à la réparation par religation non homologue (NHEJ) (298, 299). Elle est sous-exprimée dans les cellules Bcr-Abl UT-7, suggérant l'existence d'un défaut de réparation des CDB dans cette lignée (210).

L'analyse de l'expression de DNA-PKcs dans la lignée K562 par Western blot n'a pas montré de variation en présence de STI-571 1 μ M ou après RI (Figure 36), montrant que les K562 se comportent différemment des cellules UT-7 et qu'une modification de l'expression de DNA-PKcs ne peut rendre compte de l'effet observé.

II-2-4. Étude de la sénescence induite par le STI571 dans les cellules K562

La sénescence cellulaire est définie comme la capacité limitée des cellules à se répliquer (300). Par conséquent, les cellules ont une durée de vie limitée au-delà de laquelle elles ne peuvent plus se multiplier. Cette durée de vie limitée des cellules est en corrélation avec l'âge de l'organisme et l'espérance de vie de l'espèce à laquelle les cellules appartiennent. Ainsi, la sénescence cellulaire est considérée comme génétiquement programmée et induite par l'expression de suppresseurs de croissance (301). Il a également été montré que lors de l'oncogénèse, certains mécanismes permettaient d'échapper à la sénescence, au moins en partie. En théorie, rétablir la sénescence dans des cellules cancéreuses devrait induire un effet anti-tumoral. Par exemple, le traitement par hydroxyurée induit la sénescence des cellules K562 (302).

Nous avons étudié l'effet du STI571 sur la sénescence des cellules K562 par marquage à la β -galactosidase. L'exposition aux RI induit des modifications morphologiques des cellules associées à un marquage à la β -galactosidase, indiquant que ces cellules sont sénescents (Figure 37). Le STI571 seul n'induit pas de sénescence. En revanche, et de manière assez paradoxale, nous montrons que le STI571 inhibe la sénescence radio-induite.

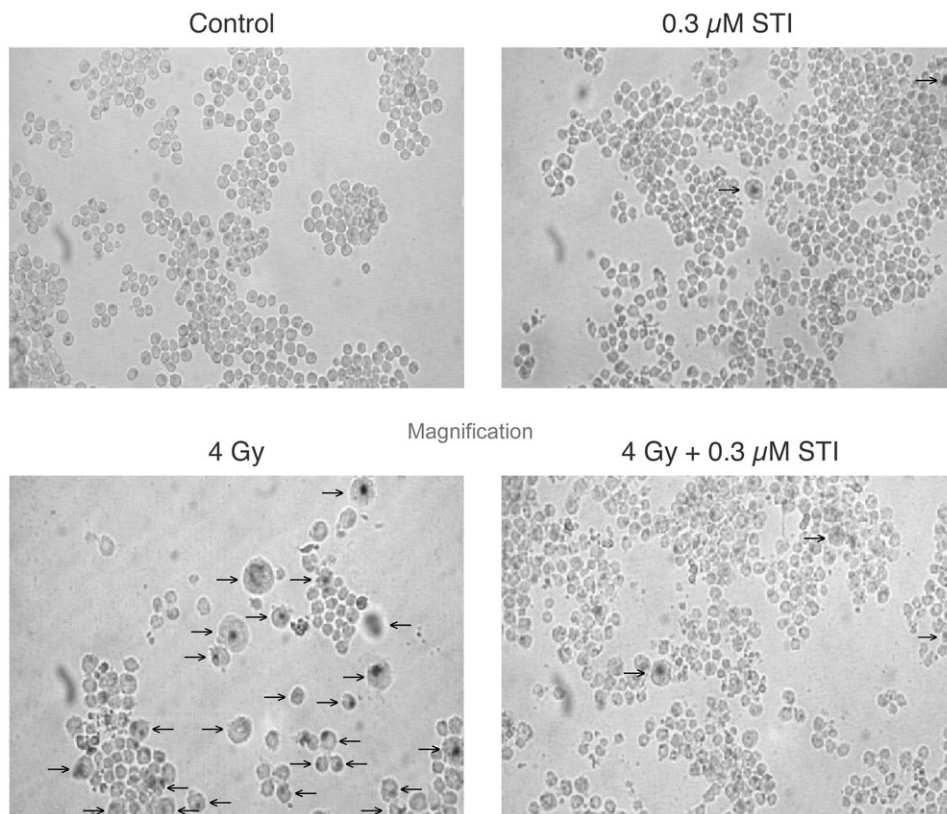


Figure 37

Étude de la sénescence dans la lignée K562 par marquage à la β -galactosidase (les flèches indiquent les cellules marquées par la β -galactosidase).

III – Discussion - Conclusions 1^{ère} partie

La présence de la mutation Bcr-Abl entraîne une résistance de la cellule au stress génotoxique (206). Il paraît par conséquent logique de postuler que l'inhibition de l'activité de Bcr-Abl puisse entraîner une radiosensibilisation. Le STI571 (imatinib ou Glivec[®]) est un inhibiteur spécifique de Bcr-Abl agissant par inhibition compétitive au niveau du site de fixation de l'ATP (3). Au moment où nous avons débuté ce travail, une seule équipe avait publié des résultats concernant l'association du STI571 aux radiations ionisantes dans des cellules hématopoïétiques (295). Les auteurs avaient exposé des cellules de moelle osseuse de souris BALB/c à différentes concentrations de STI571 pendant 24 h avant irradiation. Alors qu'une concentration d'1 μ M de STI571 suffisait à inhiber l'activité de Bcr-Abl et c-Abl, la survie cellulaire après irradiation n'était pas modifiée. Les résultats étaient identiques dans la lignée U937 porteuse d'une mutation de p53.

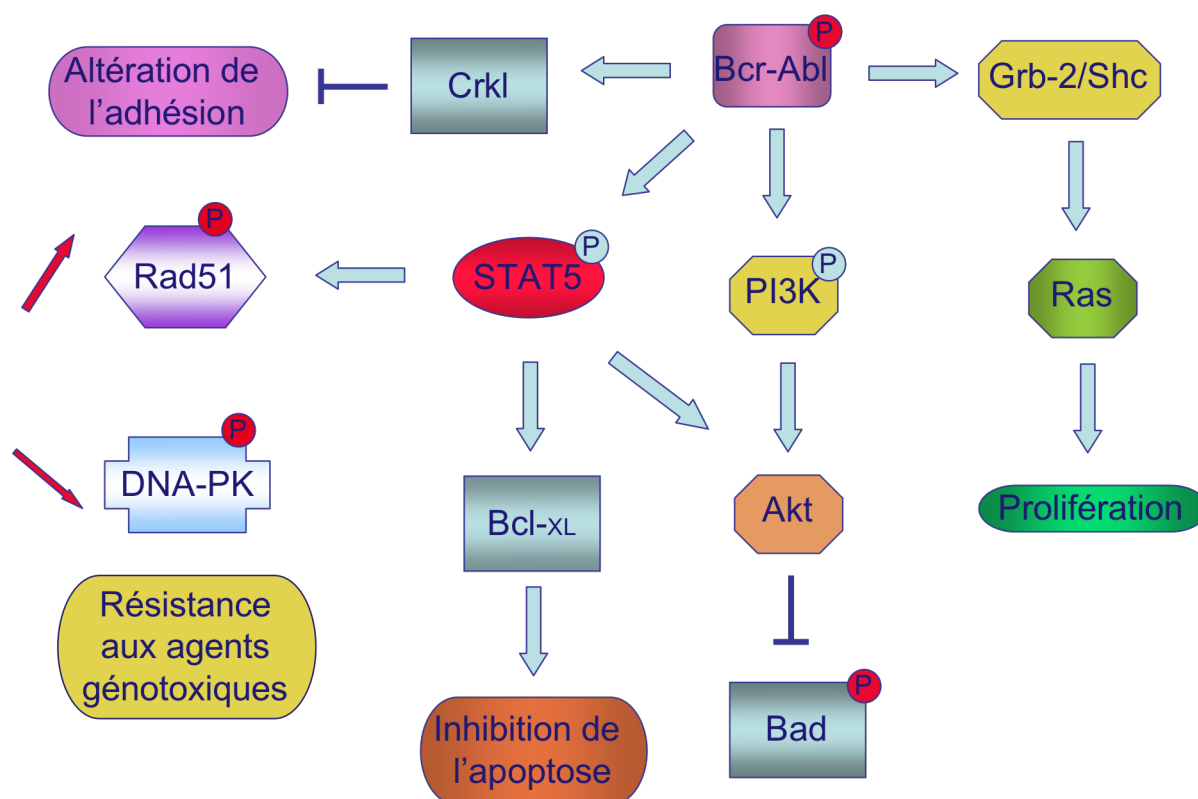


Figure 41
Schéma simplifié des fonctions de Bcr-Abl

L'étude de la réponse aux radiations ionisantes dans la lignée de LMC K562 a montré que l'inhibition de l'activité de Bcr-Abl par le STI571 produit un effet

radiosensibilisateur, confirmant notre hypothèse. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude des mécanismes sous-tendant cette radiosensibilisation. Trois mécanismes principaux pouvaient être évoqués :

- une majoration de l'apoptose radio-induite,
- un défaut de réparation des lésions de l'ADN,
- un effet sur le cycle cellulaire.

Selon Mancini *et al.*, Bcr-Abl est à l'origine d'une résistance à l'apoptose radio-induite via l'inhibition de l'expression de Bad et Bax, facteurs pro-apoptotiques, et l'induction de Bcl-2 et Bcl-XL, facteurs anti-apoptotiques (303). Jacquet *et al.* ont montré que l'exposition de la lignée K562 au STI571 induit une majoration de l'apoptose *via* d'une part, la diminution de l'expression de Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 liée à l'inhibition de l'activité de STAT5 et ERK1/2, et d'autre part, une induction des caspases 3, 9 et 8 aboutissant à un clivage de Bcr-Abl (290). Cet effet se produit parallèlement à une différenciation érythroïde de la lignée. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation modeste du taux d'apoptose après exposition prolongée des cellules K562 au STI571. L'interaction entre RI et STI571 est additive, il n'y a pas de synergie. Toutefois, comme Jacquet *et al.*, (290) nous avons observé une différenciation érythroïde des cellules K562 en présence de STI571. Il aurait été intéressant de pouvoir comparer directement la radiosensibilité des cellules différenciées aux cellules initiales après tri cellulaire.

Deutsch *et al.* ont montré que l'expression de Bcr-Abl induisait une diminution de l'expression de DNA-PKcs associée à un défaut de réparation de l'ADN (210). Les cellules UT-7 et Ba/F3 exprimant un haut niveau de Bcr-Abl étaient les plus radiosensibles tout en ayant un taux d'apoptose radio-induit relativement bas. On pourrait alors penser que l'inhibition de Bcr-Abl en rétablissant une réparation efficace induirait plutôt en effet radioprotecteur. A l'inverse, l'activité de RAD51, enzyme majeure de la recombinaison homologue, est augmentée dans les cellules porteuses de Bcr-Abl par augmentation de son expression, diminution de sa dégradation par la caspase 3 et activation post-transcriptionnelle par STAT5 (207). Cette activation de RAD51 serait responsable de la résistance des cellules de LMC aux agents génotoxiques, dont les RI, par augmentation de la réparation par RH (208). Dans notre étude, le niveau d'expression de DNA-PKcs ne variait pas en présence de STI571 et/ou de RI. Il aurait été intéressant d'étudier l'activité de DNA-PKcs, l'étude du niveau d'expression étant insuffisante pour conclure sur

l'implication de DNA-PK. D'autre part, nous avons observé une diminution de l'expression de RAD51 en présence de STI571. Cependant, l'irradiation ne modifie pas l'expression de RAD51 dans cette lignée, y compris en présence de STI571. En définitive, nos résultats s'accordent à montrer que le STI571 a peu d'influence sur la réparation des lésions de l'ADN.

Les cellules réagissent aux dommages de l'ADN en activant des voies de signalisation aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire, une réparation de l'ADN et/ou une apoptose. Les cellules peuvent s'arrêter dans la phase G1 du cycle cellulaire ou avant la mitose (checkpoint G2), pour permettre la réparation de l'ADN, minimiser la réplication d'ADN endommagé et prévenir les mitoses aberrantes. Le checkpoint G1 est régulé principalement par p21/WAF1, qui est sous la dépendance de p53. Les cellules p53 négatives ont un checkpoint G1 non fonctionnel, mais peuvent s'arrêter en G2 en réponse à une lésion de l'ADN. Plusieurs études ont montré que les cellules porteuses de la mutation Bcr-Abl présentaient un arrêt prolongé en G2/M en réponse aux agents génotoxiques tels que le cisplatine, l'étoposide et la mitomycine C (304, 305). Cet arrêt en G2/M contribuerait à la résistance aux agents génotoxiques, permettant aux cellules de réparer les lésions. La phase G2/M est contrôlée par deux checkpoints : le premier à la transition entre les phases G2 et M (checkpoint G2) et le deuxième entre la métaphase et l'anaphase (checkpoint M). Le checkpoint G2 dépend de la régulation du complexe cdc2-cycline B1. Celui-ci est inactif quand cdc2 (CDK1) est phosphorylée en Tyr15 et Thr14, il est activé par déphosphorylation de cdc2 par la phosphatase cdc25c. Après irradiation, ATM va activer les kinases Chk1 et Chk2 qui vont phosphoryler la phosphatase cdc25c l'empêchant ainsi de pénétrer dans le noyau et d'activer le complexe cdc2-cycline B1. Le checkpoint M est contrôlé par les mécanismes d'assemblage du fuseau mitotique. Il semblerait que Bcr-Abl agisse sur le checkpoint G2 par augmentation de la phosphorylation de cdc2 (305). Après irradiation, nous avons observé dans la lignée K562 p53 négative un arrêt prolongé en G2/M. Le STI571 seul induisait une accumulation transitoire en G1 associée à une déplétion de la phase S atteignant un maximum après 12 h d'exposition à la drogue, suivie d'une accumulation des cellules en phase S. En présence de STI571, l'arrêt en G2/M était aboli et les cellules s'accumulaient en S. Lyn est une tyrosine kinase membre de la famille Src. Elle est activée par les RI et contribue à l'arrêt en G2/M en phosphorylant cdc2 au niveau de la Tyr15 (306-308). Le STI571 inhibe l'activation de Lyn radio-induite et la phosphorylation de cdc2, ce qui concorde avec l'abolition du bloc G2/M observé en

cytométrie. Cette abolition de l'arrêt en G2/M radio-induit peut expliquer la radiosensibilisation observée en présence de STI571.

Topaly *et al.* ont aussi rapporté un effet synergique de l'association STI571 et irradiation dans les lignées cellulaires Bcr-Abl positives BV173 et EM-3 (309). Cet effet était dû à une majoration importante du taux d'apoptose radio-induite, ce qui n'était pas le cas dans notre étude. Par contre, il n'y avait pas de radiosensibilisation par le STI571 dans les lignées Bcr-Abl négatives.

Nous avons décidé de ne pas poursuivre plus loin ce travail du fait que la radiothérapie n'est pas utilisée dans le traitement des LMC, hormis lors des irradiations corporelles totales de conditionnement avant greffe, situations dans lesquelles une association à un traitement par STI571 semble avoir un intérêt mineur. Les données obtenues sur les lignées non porteuses de la mutation Bcr-Abl ne nous ont pas incité à étudier le pouvoir radiosensibilisant du STI571 sur d'autres types de tumeurs, notamment des tumeurs solides. Depuis la publication de ce travail, d'autres équipes se sont intéressées à l'effet du STI571 sur la réponse aux radiations ionisantes de tumeurs solides. Les résultats publiés sont très divers.

Russell *et al.* ont montré les premiers que le STI571 à forte dose (7,5 μ M) majorait *in vitro* la radiosensibilité de cellules de glioblastomes par inhibition de l'activité de RAD51 radio-induite (310). Par contre, il n'avait aucun effet sur des fibroblastes normaux. Holdhoff *et al.* ont confirmé ces données en observant un effet radiosensibilisateur du STI571 dans la lignée de glioblastome RuSi RS1 *in vitro* (311). Cet effet était dû non pas à une inhibition de l'activité de c-Abl ou à une diminution de l'expression de RAD51, mais à une inhibition de la phosphorylation de PDGFR- β . En effet, le STI571 est un inhibiteur de PDGFR (312). Les voies de signalisation activées par PDGFR sont mal connues. Les auteurs font l'hypothèse que PDGFR active STAT5 et que c'est l'inhibition de STAT5 par le STI571 qui serait responsable de la radiosensibilisation, ce qui est en accord avec nos résultats. D'autres auteurs encore ont montré *in vitro* une radiosensibilisation de lignées cellulaires de glioblastome par le STI571 (313, 314). *In vivo*, le STI571 entraîne également une radiosensibilisation de glioblastomes sur des modèles murins (315). Cette radiosensibilisation est expliquée par l'inhibition par le STI571 de l'activité de PDGFR- β et d'Akt associée à un clivage par la caspase 3 résultant en une augmentation de l'apoptose radio-induite. Les mécanismes évoqués pour expliquer cette radiosensibilisation sont donc multiples.

Utilisé à forte dose (7 μ M), le STI571 majore l'effet anti-prolifératif des RI sur des lignées cellulaires de carcinome anaplasique de la thyroïde par inhibition de l'activation radio-induite de c-Abl et accumulation de p21 (316). Dans cette étude, le STI571 ne majore pas le niveau d'apoptose radio-induite mais induit une mort cellulaire par sénescence. Ces résultats sont en désaccord avec notre étude, qui montre que le STI571 inhibe la sénescence radio-induite.

Dans les cellules de carcinome épidermoïde de cancer ORL PECA, le STI571 produit un effet radioprotecteur (317).

Très récemment, Xu *et al.* ont montré que le STI571 pouvait majorer la radiosensibilité de cellules d'adénocarcinome prostatique résistantes aux androgènes (318). Dans ces cellules, le STI571 inhibe la translocation nucléaire radio-induite de RelB ainsi que l'activation de la voie PI3K/Akt.

Je souhaitais poursuivre ce travail sur le cancer du pancréas, en lien avec mon activité de recherche clinique. Le STI571 ne paraissait pas un médicament intéressant dans cette pathologie tumorale où la surexpression de PDGFR est un évènement rare et qui n'est pas porteuse de mutation de c-kit ni de Bcr-Abl. Par conséquent, nous avons décidé de nous intéresser à un autre inhibiteur de tyrosine kinase, le BIBW 2992.

2nde PARTIE

Le BIBW 2992

I. Introduction

L'utilisation de médicaments ciblant spécifiquement les mécanismes de radiorésistance tumorale en association avec la radiothérapie constitue une voie de recherche prometteuse. L'étude des multiples voies de signalisation entrant en jeu dans la réponse aux radiations ionisantes a conduit au développement de nombreuses molécules permettant d'inhiber spécifiquement les mécanismes de radiorésistance de la cellule tumorale sans majorer, à priori, la réponse à l'irradiation des tissus sains. L'inhibition de l'EGFR dans le traitement des carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures constitue un exemple récent du développement réussi des thérapeutiques ciblées combinées à la radiothérapie (128). En effet, l'EGFR joue un rôle important dans la radiorésistance des cellules tumorales. L'irradiation active précocément l'EGFR par sécrétion autocrine radio-induite de TGF α (113). Cette activation déclenche une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à une inhibition de l'apoptose et à une activation de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse (4). L'EGFR agirait aussi sur la réparation des lésions radio-induites via l'activation de DNA-PKcs, enzyme majeure du NHEJ (5). L'inhibition de l'activité de l'EGFR par un inhibiteur spécifique de tyrosine kinase (erlotinib, gefitinib) ou par un anticorps monoclonal (cetuximab) devrait par conséquent provoquer une radiosensibilisation. C'est le cas avec le cetuximab alors que les résultats obtenus *in vitro* avec les inhibiteurs de tyrosine kinase sont moins concluants (2, 4). Cette différence d'efficacité est peut-être due à la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) qui n'existe pas avec les inhibiteurs de tyrosine kinase (134). Par ailleurs, l'inhibition d'HER2 par le trastuzumab entraîne une radiosensibilisation dans les cellules surexprimant HER2, probablement par augmentation de l'apoptose radio-induite via une inhibition de la voie PI3K (6-8). Récemment, Toulany et al. ont montré l'importance des hétérodimères EGFR-HER2 dans la réponse aux radiations ionisantes (9). Inhiber à la fois EGFR et HER2 pour augmenter la radiosensibilité tumorale paraît donc une combinaison intéressante.

Le BIBW 2992 est un inhibiteur irréversible spécifique des tyrosine kinases EGFR et HER2, dérivé des séries chimiques anilino-quinazolines conçues pour se lier de façon covalente aux résidus Cys773 d'EGFR et Cys805 d'HER2 (284). Des études précliniques réalisées par l'équipe INSERM U893 dirigée par Annette Larsen ont mis

en évidence une bonne efficacité du BIBW 2992 dans le cancer du colon. Annette Larsen et Vincent Favaudon m'ont proposé de poursuivre mon travail de thèse en étudiant l'efficacité du BIBW 2992 ainsi que son pouvoir radiosensibilisateur dans les cancers du pancréas.

L'adénocarcinome du pancréas a un très mauvais pronostic du fait d'une part d'un diagnostic souvent tardif, et d'autre part d'une chimiorésistance et d'une radiorésistance importantes (10). Ceci est dû au fait que la quasi totalité des cancers du pancréas ont une protéine KRAS mutée (11, 12). Le rôle de KRAS dans la radiorésistance a été évoqué plus haut (cf. § II-4-2-d). Le traitement de référence des cancers du pancréas avancés est la gemcitabine (239). L'association à la gemcitabine d'un inhibiteur d'EGFR, l'erlotinib, améliore la survie d'un sous-groupe de patients que l'on ne sait pour l'instant pas identifier *a priori* (132, 254). Certains travaux relient l'efficacité de l'erlotinib à la surexpression d'HER3 (259, 260). La surexpression d'EGFR et d'HER2 étant un évènement fréquent dans les cancers du pancréas (319), il nous a semblé intéressant d'étudier l'efficacité du BIBW 2992 dans cette pathologie. Pour ce faire, nous avons choisi trois lignées cellulaires exprimant EGFR, HER2 et HER3 à des niveaux différents pour pouvoir observer un éventuel effet différentiel de la drogue en fonction du niveau d'expression de ces récepteurs. De même, nous avons choisi une lignée cellulaire KRAS *wild type* (BxPC3) et deux lignées KRAS mutées (Panc-1 et Capan-2) pour étudier l'influence de KRAS sur l'efficacité de la drogue et son interaction avec la réponse aux radiations ionisantes.

Le but de cette deuxième partie de thèse était d'étudier l'efficacité du BIBW 2992 dans trois lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique et de rechercher un effet radiosensibilisateur en évaluant à la fois le potentiel cytotoxique (test de clonogénicité) et cytostatique (inhibition de la prolifération). En fonction des résultats obtenus, nous avons prévu d'étudier les modifications du taux d'apoptose, l'altération de la progression du cycle cellulaire induite par la combinaison des deux traitements, et l'altération par le BIBW 2992 des voies de signalisation dépendantes d'EGFR. L'étude est allée au-delà de ces premières intentions et ouvre une piste intéressante sur la régulation de la mitose et de la cytokinèse en tant que cible spécifique des cellules tumorales.

II. Résultats

II-1. Article n°2

Antiproliferative and radiosensitizing effects of BIBW 2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor, in pancreatic carcinoma

Florence Huguet, Marie Fernet, Nicole Giocanti, Annette K. Larsen
and Vincent Favaudon

Cancer Research, soumis.

ANTIPROLIFERATIVE AND RADIOSENSITIZING EFFECTS OF BIBW 2992, AN IRREVERSIBLE EGFR/HER2 INHIBITOR, IN PANCREATIC CARCINOMA CELLS

Florence Huguet^{1,2,3,4,5,6}, Marie Fernet^{1,2}, Nicole Giocanti^{1,2}, Annette K. Larsen^{3,5,6}, Vincent Favaudon^{1,2}.

¹Institut Curie, Centre de Recherche, 91405 Orsay, France. ²Inserm, U612, 91405 Orsay, France. ³Université Paris-VI Pierre et Marie Curie (UPMC06), 75005 Paris, France. ⁴AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'Oncologie Radiothérapie, 75020 Paris, France. ⁵Centre de Recherche Saint-Antoine, 75012 Paris, France. ⁶Inserm, U938, 75012 Paris, France

Running title: Activity of BIBW 2992 in pancreatic carcinoma

Keywords: BIBW 2992 / EGFR / HER2 / HER3 / pancreatic carcinoma / ionizing radiation

Financial Support: This work was supported by financial aid from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* and *Institut Curie*.

Corresponding author: Florence Huguet, Inserm U612, Institut Curie-Recherche, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France. florence.huguet@tnn.aphp.fr

ABSTRACT

Purpose: Pancreatic carcinoma is characterized by a poor prognosis, a high frequency of KRAS gene mutations and frequent dysregulation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and HER2. This prompted us to investigate the effect of the dual EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor BIBW 2992 alone or in association with ionizing radiation on pancreatic carcinoma cell lines.

Methods: Proliferation, cell-cycle distribution and clonogenic survival after irradiation were assayed *in vitro* without and with BIBW 2992 in BxPC3, Panc-1 and Capan-2 human pancreatic carcinoma cell lines. Altered expression and phosphorylation of the HER receptors, Akt, DNA-PKcs, and ERK1/2 by BIBW 2992 was also determined by Western blot analysis. The quantification of centrosomes was carried out by immunofluorescence.

Results: BIBW 2992 significantly slowed down the growth rate of the three cell lines. A marked cytotoxic effect was found in BxPC3 (KRAS^{wt}) and Capan-2 (KRAS^{mut}) cells, which expressed the highest level of

EGFR, HER2 and HER3. However, the effect of BIBW 2992 on cell cycle progression was weak with a minor block in G1 phase and delay of G2/M radio-induced accumulation. BIBW 2992 potentiated the radiation susceptibility and inhibited radio-induced activation of Akt in BxPC3 and Capan-2 cells. BIBW 2992 induced apoptosis in the p53^{wt} Capan-2 cells only and did not enhance radio-induced apoptosis. BIBW 2992 reduced the level of excess centrosomes in BxPC3 and Capan-2 cells.

Conclusions: BIBW 2992 demonstrated a clear cytotoxic effect against BxPC3 and Capan-2 cells and potentiated radiation-induced cell kill in these cell lines. Radiosensitization was marginal in Panc-1 cells. No correlation was found between these effects and KRAS mutation or DNA-PKcs phosphorylation. However, the antiproliferative effect of BIBW 2992 correlated the level of expression of EGFR, HER2 and HER3, with circumstantial evidence in favor of altered mitotic transition by the drug.

INTRODUCTION

Pancreatic adenocarcinoma is one of the leading causes of cancer-related mortality in the Western world. The prognosis is very poor, with a 5-year survival rate < 20% after surgical resection (1). The standard treatment of advanced pancreatic

adenocarcinoma is chemotherapy with gemcitabine, which increases quality of life and survival when compared with best supportive care (2). The combination of erlotinib, an EGFR inhibitor, with gemcitabine marginally improves overall

survival (3). In adjuvant setting and for locally advanced non metastatic tumors, the role of chemoradiotherapy has been highly debated over the past 30 years.

Mutation or overexpression of transmembrane tyrosine kinases of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family occurs in the majority of human epithelial cancers and results in constitutive activation of mitogenic cascades ending in repression of apoptosis and stimulation of tumor growth, metastasis and tumor-induced neovascularization (4). The two major intracellular pathways activated by EGFR are, firstly, the RAS-RAF-MEK-MAPK pathway, which controls gene transcription, cell-cycle progression from the G1 phase to the S phase and cell proliferation and, secondly, the PI3K-Akt pathway, which activates a cascade of anti-apoptotic and prosurvival signals. The EGFR family of receptors consists of four receptor tyrosine kinases, namely, ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) and ErbB4 (HER4) (5) complementing each other *via* heterodimerization as shown in the HER2-HER3 complex.

EGFR overexpression has been reported in 42% to 90% of all pancreatic cancers and is associated with disease progression and poor prognosis (6-9). Blockade of EGFR tyrosine kinase signaling consistently decreases the growth and metastatic potential of human pancreatic tumor xenografts and improves the antitumor efficiency of gemcitabine (10). Overexpression of EGFR is also putatively associated with radioresistance, and in particular instances blockade of EGFR has been reported to enhance radiosensitivity *in vitro*, *in vivo* and in the clinical setting in head and neck cancers (11, 12) whilst inhibition of the kinase activity of the receptor has only marginal effects on the radiation susceptibility of tumor cells (13). Moreover, no activating mutations of EGFR have been identified in pancreatic cancer (9).

Contrasting with EGFR, HER2 overexpression has been reported in 10 to 42% of pancreatic cancers only and is not a prognosis factor (6, 8). Nevertheless, the combination of anti-EGFR and anti-HER2 antibodies in pancreatic xenografts

reportedly showed a synergistic antitumor effect (14).

Oncogenic, mutationally activated KRAS isoforms are found in approximately 30% of human malignancies and play a critical role in tumorigenesis and resistance of malignant neoplasms to chemotherapy and radiation (15). In particular, KRAS mutation is associated with resistance to cetuximab, an anti-EGFR antibody, in metastatic colorectal cancer patients treated with this therapy (16). In pancreatic cancer, KRAS mutations have been reported in around 95% of the cases and are regarded as a negative prognostic factor after surgery and adjuvant chemoradiation (17). In addition to oncogenic mutations in KRAS, signaling through Ras proteins can be stimulated by EGFR overexpression, EGFR activation, and HER2 overexpression. Though this is still a matter of discussion, the mechanisms of radioresistance mediated by oncogenic KRAS could be mediated by PI3K and Akt (18, 19).

BIBW 2992 is a novel, irreversible dual specificity EGFR/HER2 inhibitor derived from the anilino-quinazoline series which is being developed by Boehringer Ingelheim Corp. for the potential treatment of solid tumors and has been studied in phase I/II clinical trials (20). BIBW 2992 was designed to covalently bind Cys773 in EGFR and Cys805 in HER2. The IC₅₀, i. e., the concentration providing 50% inhibition of the kinase activity, evaluated by *in vitro* kinase assay is 0.5 nM for EGFR kinase and 14 nM for HER2 kinase (21). In this study, we report the effect of BIBW 2992 alone and in combination with radiation on cell proliferation and clonogenic survival of BxPC3, Capan-2 and Panc-1 human pancreatic adenocarcinoma cells *in vitro*. These cell lines express EGFR and HER2 at different levels. BxPC3 cells are KRAS wild type whereas Capan-2 and Panc-1 cells are KRAS mutated. We initiated this study to determine whether the response to BIBW 2992 differs according to KRAS status and EGFR/HER2 levels of expression, and whether the inhibition of EGFR/HER2 could sensitize pancreatic cancer to ionizing radiation to provide data in support of a future clinical trial.

MATERIALS AND METHODS**Drug and reagents**

BIBW 2992 was synthesized at Boehringer Ingelheim Pharma GmbH and Co. KG as described in WO 02/50043, and provided as a solution in DMSO. The other suppliers were as follows: products for cell culture, Invitrogen (Cergy-Pontoise, France); M-PER reagent for protein extraction, Pierce (Perbio, Brebières, France); protease inhibitors, phosphatase inhibitors and mouse anti- α -tubulin monoclonal antibody, Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France); nitrocellulose membranes (0.45 μ m pore size), Schleicher & Schuell (Dassel, Germany); enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit and films, GE Healthcare-Amersham Biosciences (Orsay, France); rabbit monoclonal antibodies raised against phospho-(Tyr1289)-HER3 and phospho-(Thr202/Tyr204)-ERK1/2, and rabbit polyclonal antibodies raised against EGFR, phospho-(Tyr1068)-EGFR, HER2, AKT, phospho-(Ser473)-AKT, ERK1/2, and phospho-(Tyr1221/1222)-HER2, Cell

Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France); rabbit polyclonal antibody against HER3 (clone C-17) and mouse monoclonal antibodies against E-cadherin and vimentin, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California); mouse monoclonal antibody against lamin-B, Calbiochem (VWR International, Illkirch, France); mouse monoclonal antibody against α -tubulin, Sigma-Aldrich; mouse monoclonal antibody against DNA-PKcs ab-2 (clone 25-4), Neomarkers (Interchim, Montluçon, France); goat HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies, Jackson ImmunoResearch Laboratories (Soham, UK). Mouse monoclonal antibodies against phospho-(Thr2609)-DNA-PKcs and phospho-(Ser2056)-DNA-PK were kindly provided by Pr David Chen (Division of Molecular Radiation Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas).

Cell lines and cell culture

Human chronic pancreatic carcinoma cell lines BxPC3 and Panc-1 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The human pancreatic carcinoma cell Capan-2 was kindly provided by Valérie Fauquette (INSERM U837, Lille). BxPC3,

Panc-1 and Capan-2 cells were cultured in RPMI 1640 medium with supplements as recommended by ATCC and 5% fetal calf serum at 37°C with 5% CO₂. Some cell characteristics are presented in Table 1.

TABLE 1

Characteristics of the human pancreatic carcinoma cell lines: main mutations (44).

Cell line	KRAS	TP53	CDKN2A/ p16	SMAD4/ DPC4
BxPC3	-	220 Cys	HD	HD
Capan-2	12 Val	-	-	-
Panc-1	12 Asp	273 His	HD	-

"-" refers to absence of a genetic alteration. In tumors with homozygous deletions ("HD"), the gene is not present, and mutations cannot be assayed. For KRAS, and TP53, the codon and amino acid change are shown.

Cytotoxicity and growth inhibition

The response of the three cell lines to BIBW 2992, radiation, or a combination of both, was determined using growth inhibition and colony-forming assays. DMSO was present at constant concentration in all experiments (0.2%). Briefly, 1000 to 1500 cells from exponentially growing subcultures were isolated by trypsinisation, plated in triplicate in 25-cm² flasks and incubated at 37°C for 4 h prior to treatment. Following treatment, flasks were rinsed twice with Hank's balanced salt solution, and cells returned to

Irradiation and radiation response

Cells seeded at a density of 1000 cells (25 cm² flasks) were incubated for 4 h and exposed to BIBW 2992 for 24 h prior to single dose (0-8 Gy) irradiation. BIBW 2992 was left in the medium for a further 24 h. At that time the drug was removed and cells were trypsinised, counted and plated at a density of 1000 cells (25 cm² flasks). Irradiation of cells without or with concomitant exposure to BIBW 2992 was performed at room temperature using a ¹³⁷Cs γ -ray, IBL-637 irradiator (CIS-Biointernational, Saclay, France) at a dose rate of 1 Gy/min. The relative colony count was fitted to the classical linear-quadratic

Western immunoblotting

Total extracts were made using M-PER reagent (Pierce). Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared each from 2x10⁷ cells with protease and phosphatase inhibitors as described (22). Proteins were titrated by the Bradford method using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Cell extracts were boiled in Laemmli loading buffer and separated on 5% (DNA-PKcs), 7.5% (EGFR, HER2, HER3, E-cadherin, vimentin, Akt), or 10% (ERK1/2) SDS-PAGE gel. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes using a semi-dry technique and blocked for 1 h in 5% bovine serum albumin (BSA) in TBST at 37°C. Membranes were

Cell cycle analysis by flow cytometry

The effect of BIBW 2992, alone and associated with radiation on the cell cycle distribution and hypodiploid cell fraction, was monitored by dual-parameter flow cytometry using a FACScalibur cytofluorometer. Before

normal growth medium for 10-14 days. Colonies were fixed with methanol, stained and scored visually. The surviving fraction was calculated as the percentage of colonies relative to control.

For growth inhibition assays, 25 cm² flasks were seeded with 10⁵ cells and incubated for 24 h prior to introduction of BIBW 2992. Cells were harvested and counted after five days of contact with different concentrations of the drug.

equation,

$$(1) \quad \ln S = -\alpha \cdot D - \beta \cdot D^2$$

where S is the surviving fraction, D the radiation dose and α and β adjustable parameters characterizing radiosensitivity. Calculations were made through non-linear least-squares regression taking all data points into account, using Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, Pennsylvania). D₃₇ is the dose required to reduce survival to 1/e = 37% relative to controls. Statistical analysis was performed using StatEL (AD Science, Paris, France).

subsequently incubated with primary monoclonal antibody overnight at 4°C in TBST buffer. After washing for 1 h, membranes were incubated with goat HRP-conjugated secondary antibody in TBST buffer and revealed with an enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (GE Healthcare-Amersham Biosciences). Nitrocellulose membranes were re-hybridised with anti- α -tubulin antibody. Calibration of protein loading was also made by scanning SDS-PAGE gels after Coomassie blue staining. Densitometric analysis was performed using QuantityOne® software (Bio-Rad).

collection, cells were pulse-labelled with BrdUrd (10 μ M, 20 min at 37°C). At various time points after treatment, cells were collected by trypsinisation and frozen in medium with 10% of DMSO. Two days

before analysis cells were thawed, fixed with 70% ice-cold ethanol and kept at 4°C overnight until further processing. Treatment of fixed cells and data acquisition were carried out as described (23). Data analysis

was performed with CellQuest Pro software (Becton-Dickinson Biosciences). The sub-G1 region was determined by a gate on the DNA content histogram excluding cell debris.

Immunofluorescence

The quantification of centrosomes was carried out after γ -tubulin detection by immunofluorescence. Cells were exposed to 6 Gy γ -rays the day after plating (see Materials and Methods) or BIBW 2992 at 2 μ M (BxPC3 and Panc1) or 1 μ M (Capan2). For combined treatment, irradiation was done 24 h after treatment with BIBW 2992. DMSO was added in non treated flasks. Two days after treatment, cells were trypsinized and plated onto 12 mm round coverslips. After additional 24 h, the culture medium was removed, cells were washed with warm PBS, fixed 3 min with paraformaldehyde (1% in PBS) at 37°C, incubated 5 min with methanol at -20°C and rehydrated with PBS (10 min). Cells were then incubated with primary antibody (anti γ -tubulin T4026, Sigma-Aldrich, 1/500 dilution in PBS with

3% BSA and 0.05% Tween-20) for 1 h at 37°C. After several washes with PBS, cells were incubated with Alexa-coupled secondary antibody (Alexa Fluor 546, Invitrogen, 1/400 dilution in PBS with 3% BSA and 0.05% Tween-20) for 1 hour at 37°C. Cells were then washed and coverslips mounted in mounting medium (Vectashield with DAPI (1.5 μ g/ml), Vector Laboratories, Burlingame, California). Pictures of fixed cells were collected using a 3D deconvolution imaging system, consisting of Leica DM RXA microscope, equipped with a piezoelectric translator (PIFOC ;PI) placed at the base of a PlanApo N.A.1.4 objective, and a 5 MHz Micromax 1300Y interline CCD camera (Roper Instruments). Image J software was used for analysis.

RESULTS

BxPC3, Capan-2 and Panc-1 express different levels of EGFR, HER2 and HER3 receptors

Expression of the EGFR and HER2 receptors, E-cadherin and vimentin in the three cell lines was determined by Western immunoblotting. The results are shown in Figure 1. Consistent with Larbouret *et al.* (14), BxPC3 cells were characterized by high EGFR and moderate HER2 expression. Capan-2 cells expressed a high level of EGFR and HER2 in agreement with Komoto *et al.* (24). In contrast, the expression of EGFR was low in Panc-1 cells; HER2 was below the limit of detection. Because expression of HER3 in pancreatic cell lines has recently been identified as a factor of

sensitivity to erlotinib (25), we also measured the expression of the HER3 receptor. The level of HER3 was high in BxPC3 and Capan-2 cells but was below detection in Panc-1 cells.

Correlating with the KRAS status, BxPC3 cells presented an epithelial phenotype with E-cadherin expression and absence of vimentin whereas Capan-2 and Panc-1 presented a mesenchymal phenotype with loss of E-cadherin expression and presence of vimentin (data not shown). These results were in agreement with Pino *et al.* (26).

BIBW 2992 inhibits EGFR, HER2 and HER3 phosphorylation

48 h contact with BIBW 2992 resulted in a substantial increase of EGFR expression in the three cell lines used, and affected differentially HER2 and HER3 expression in BxPC3 and Capan-2 cells. At the same time point the phosphorylation of the three receptors was abolished in all cell lines (Figure 1). In BxPC3 cells, the inhibition of

HER3 phosphorylation was prolonged until 120 h of contact with BIBW 2992 whereas Capan-2 cells evaded inhibition after 48 h of drug exposure (data not shown) as previously described (27).

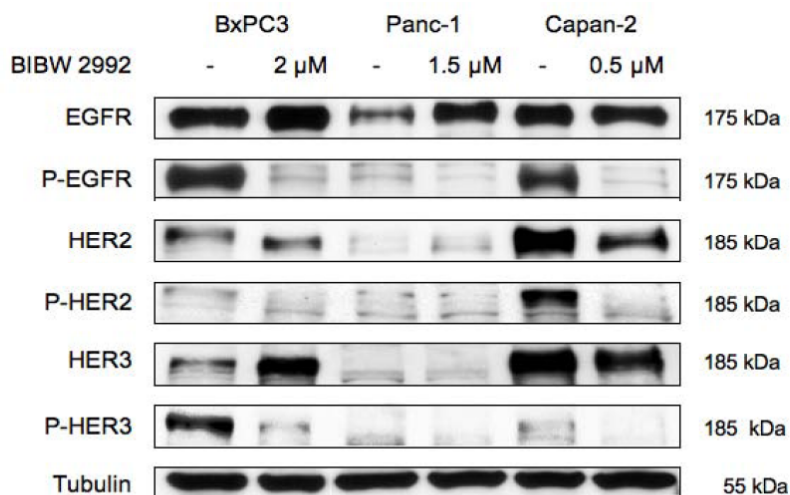


Figure 1

Immunoblot determination of the expression and phosphorylation of EGFR, HER2, and HER3 in pancreatic carcinoma cells without (-) or with (+) BIBW 2992. EGFR, P-Tyr1068-EGFR, HER2, P-Tyr1221/1222-HER2, HER3 and P-Tyr1289-HER3 were probed with suitable antibodies (see Materials and Methods) in total extracts (30 μ g in each lane) from untreated controls or cells exposed (48 h contact) to BIBW 2992. Tubulin was used as a loading control.

Altered cell cycle progression by BIBW 2992

Altered cell cycle progression by radiation (6 Gy), BIBW 2992 (1 or 2 μ M) and a combination of both, was investigated by flow cytometry for up to 120 h following initial treatment. The results are shown in Figure 2.

Compared to controls, BIBW 2992 brought about G1-phase accumulation associated with a S-phase depletion in the 3 cell lines after 24 h of contact. This effect decreased for longer exposures, indicating partial evasion from the G1 block. As expected, radiation alone induced accumulation of

cells in the G2/M phase with concomitant depletion of the G1 and S phase compartments in the three cell lines. However the magnitude of the checkpoint varies with the cell line, Capan2 cells exhibiting the most important accumulation, followed by BxPC3 cells and by Panc1 cells that showed a very weak G2 accumulation. The effect reached a maximum at 24 h after radiation. In combined treatment, BIBW 2992 delayed and reduced but did not abrogate the radio-induced G2 accumulation in BxPC3 and Capan-2 cells.

BIBW 2992 develops a weak cytostatic effect

The inhibition of cell growth was evaluated for the three cell lines following 120 h contact with 0.25-2 μ M BIBW 2992. The drug reduced the proliferation of BxPC3

(IC_{50} = 0.4 μ M) and Capan-2 cells (IC_{50} = 0.7 μ M). Panc-1 cells were considerably more resistant (IC_{50} = 2.5 μ M) (Figure 3A).

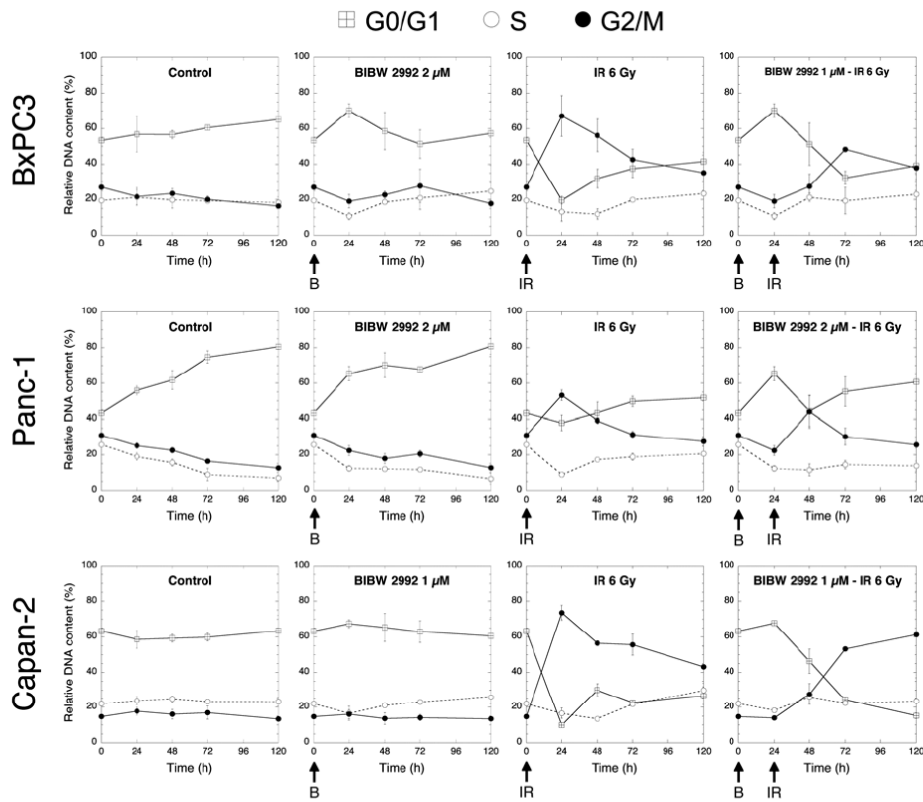


Figure 2
Altered cell cycle progression by BIBW 2992 (B) and ionizing radiation (IR).
 BxPC3 (A), Panc-1 (B), and Capan-2 (C) cells were treated with BIBW 2992 alone (1 to 2 μM), with radiation (6 Gy) alone or with both combined. In association with radiation, BIBW 2992 was added 24 h prior to treatment. Cells were harvested at the times indicated, incubated with BrdUrd (10 μM , 15 min) for S phase DNA labeling, and processed for flow cytometric analysis. Bars, SD (mean over three experiments).

BIBW 2992 exerts a strong cytotoxic effect

The cytotoxic effect of BIBW 2992 (0.25–2 μM) was determined in the three cell lines of interest using a colony forming assay. The results (Figure 3B) revealed a differential effect of BIBW 2992 on the clonogenic potential of the three cell lines. After 5-days incubation the clonogenic potential of Capan-2 and BxPC3 cells was reduced

down to 20% and 60% of controls, respectively. Panc-1 cells proved to be resistant to drug-induced lethality. Thus, the sensitivity to induced cell kill by BIBW 2992 seems to depend more on the level of HER receptors expression than on the KRAS status.

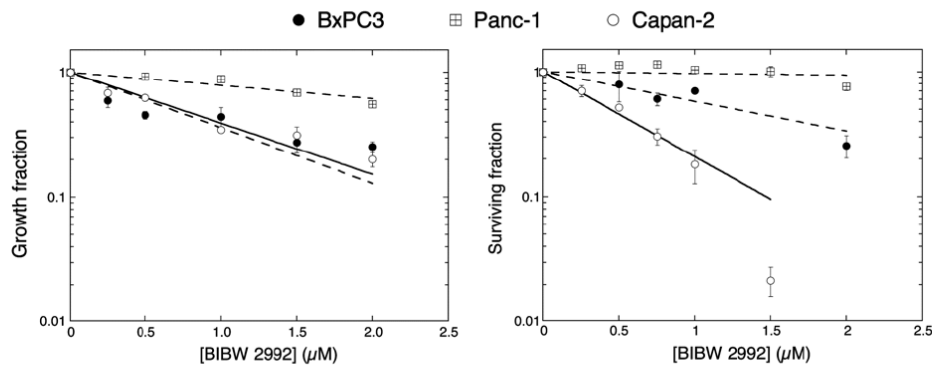


Figure 3

3A. Growth inhibition by BIBW 2992.

BxPC3, Capan-2 and Panc-1 cells were seeded in 25 cm² flasks in RPMI 1640 containing 5% FCS. After 24h, BIBW 2992 was added to the culture medium. Cells were harvested and counted after 5 days of contact with the drug. The data points represent the mean over three experiments. Bars, SD.

3B. Cytotoxic effect of BIBW 2992.

Log phase cells were plated for colony formation. 4 h after plating, cells were exposed to different concentrations of BIBW 2992. After 5 days of contact with drug, the flasks were rinsed twice and cells returned to normal growth medium for 10 days. Colonies were fixed, stained and scored visually. The symbols shown represent the mean over three experiments. Bars, SD.

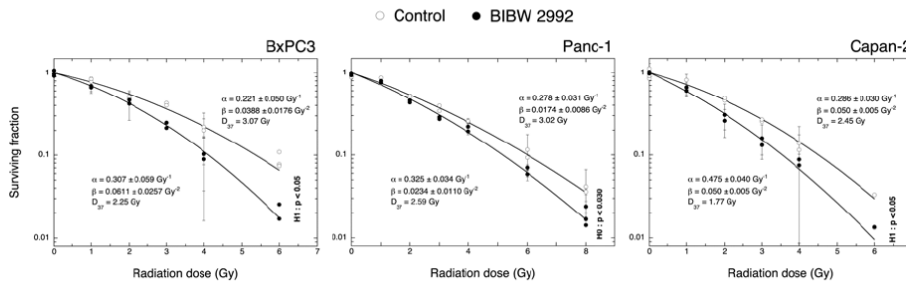


Figure 4

Effect of BIBW 2992 on clonogenic radiation response.

Triplicate culture flasks were incubated for 24 h in the absence or presence of 1 (Capan-2) or 2 µM (BxPC3, Panc-1) BIBW 2992, irradiated or not, returned to the incubator for 24 h and processed for clonogenic assays as described in Materials and Methods. The survival curves were drawn for best fit to the linear-quadratic model (eq. 1, see Materials and Methods). D_{37} values are calculated from these curves. The data points come from a mean over two independent experiments. Bars, SD. To determine whether the drug-induced modification of radiation response was significant or not, a non-parametric Mann-Whitney U-test was performed on paired sets of data (controls vs. drug) taking into consideration the survival values at the highest radiation dose applied in each cell line. H0 states that there is no significant difference between median values; H1 infers that the medians are statistically distinct. p is the calculated error risk estimate relative to the model (H0 or H1) considered.

Radiosensitization by BIBW 2992 in BxPC3 and Capan-2 cells

Asynchronously growing cells were incubated for 24 h with 1 µM (Capan-2) or 2 µM BIBW 2992 (BxPC3 and Panc-1), and exposed to increasing doses of γ-rays. BIBW 2992 was left in the medium for a further 24

h then cells were freed of drug, trypsinised and plated at a known density to allow the formation of colonies. The results are shown in Figure 4.

Radiation survival in the absence of BIBW

2992 fitted the linear-quadratic model (eq. 1, see Materials and Methods). The intrinsic radiosensitivity of BxPC3 was close to that of Capan-2 cells whereas Panc-1 cells were significantly more radioresistant. BIBW 2992 elicited a significant increase of the radiation sensitivity in BxPC3 and Capan-2 cells. The

susceptibility of Panc-1 cells to BIBW 2992 was weaker. Based on the D_{37} values, the sensitizer enhancement ratio (SER) of BIBW 2992 was 1.38 and 1.36 for Capan-2 and BxPC3 cells, respectively, whereas it was only 1.16 in Panc-1 cells.

BIBW 2992 inhibits radiation-induced Akt phosphorylation

Downstream signaling from EGFR/HER2 and Ras is known to activate several key pathways in common, including the PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK pathways (28). Phosphorylation of Akt on Ser473 in response to radiation has been reported to be EGFR-dependent and Ras-independent (29, 30). As shown in Figure 5, radio-

induced phosphorylation of Akt was inhibited by BIBW 2992 in BxPC3 and Capan-2 cells whilst it remained unchanged in Panc-1 cells. In all cell lines the phosphorylation of ERK1/2 was not affected by down-regulation of EGFR/HER2 phosphorylation, in agreement with Kimple *et al.* (31) working on pancreatic cells.

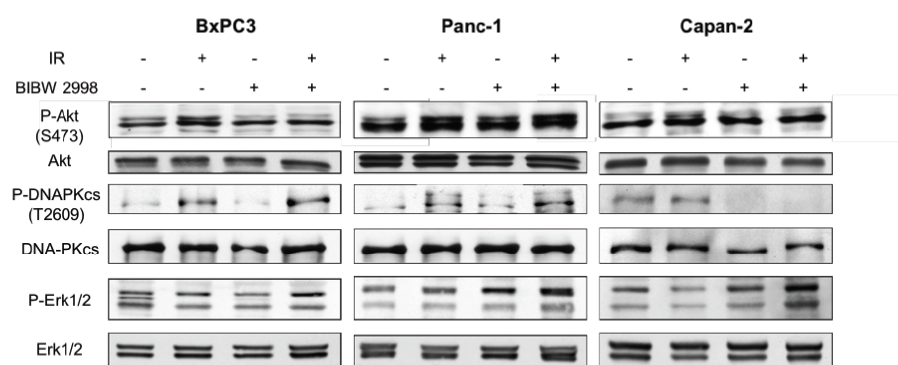


Figure 5

Immunoblot determination of the expression and phosphorylation of Akt, ERK1/2, and DNA-PKcs following radiation (IR 6 Gy) with (+) or without (-) BIBW 2992.

BxPC3, Panc-1, and Capan-2 cells were exposed for 1 h to 2 μ M BIBW 2992 prior to radiation and harvested for immunoblotting at 30 min after irradiation. Akt, P-Ser431-Akt, DNA-PKcs, P-Thr2609-DNA-PKcs, ERK1/2 and P-Thr202/Tyr204-ERK1/2 were probed with suitable antibodies (see Materials and Methods) in total extracts (30 μ g in each lane).

Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) phosphorylation on Thr2609 has been shown to be relevant for both DNA double-strand break (DSB) repair and cellular radiosensitivity (32). Toulany *et al.* hypothesized that DNA-PKcs was activated by ionizing radiation in an Akt-dependent manner in the KRAS mutant cell line A-549 (30). We consistently investigated the effect of BIBW 2992 on DNA-PKcs phosphorylation on Thr2609. An inhibition of radio-induced phosphorylation of DNA-PKcs by BIBW 2992 was observed in Capan-2 cells only whereas the drug did not affect

DNA-PKcs phosphorylation in BxPC3 and Panc-1 cells (Figure 5). Dittmann *et al.* reported that inhibition of radio-induced EGFR nuclear import could reduce DNA-PK activity by immobilization of the complex of EGFR with DNA-PK in the cytoplasm (33). We explored the variations of level of nuclear and cytoplasmic DNA-PKcs in presence of BIBW 2992 and/or ionizing radiation. Contrary to what was expected, expression of cytoplasmic DNA-PKcs increased after irradiation and was not modified by BIBW 2992 in BxPC3 and Capan-2 cells, whereas expression of

cytoplasmic DNA-PKcs decreased after irradiation in Panc-1 cells with an inhibition

of radio-induced decrease in presence of BIBW 2992 (data not shown).

BIBW 2992 does not affect radio-induced apoptosis

Apoptosis of BxPC3, Capan-2, and Panc-1 cells was assessed by flow cytometric analysis of the sub-G1 DNA fragments in cells exposed to 6 Gy alone, BIBW 2992 1 or 2 μM alone and a combination of both. BIBW 2992 alone induced a large increase of sub-G1 DNA fragments in the p53^{wt} Capan-2 cells and a slight increase in the p53^{mut} BxPC3 cells. No significant increase of the sub-G1 content was observed in the p53^{mut} Panc-1 cells (Figure 6). Irradiation alone induces an increase of the sub-G1

fraction in the three cell lines, with the highest percentages observed in the Capan2 cells. No additional sub-G1 fragments were observed when BIBW 2992 treatment was associated with radiation. Based on the DNA content, the necrosis index was below 1% under these conditions. Interestingly, in both BxPC3 and Panc-1 cells, part of the sub-G1 fragments was found to incorporate 5-bromo-2'-deoxyuridine and should thus be regarded as micronuclei.

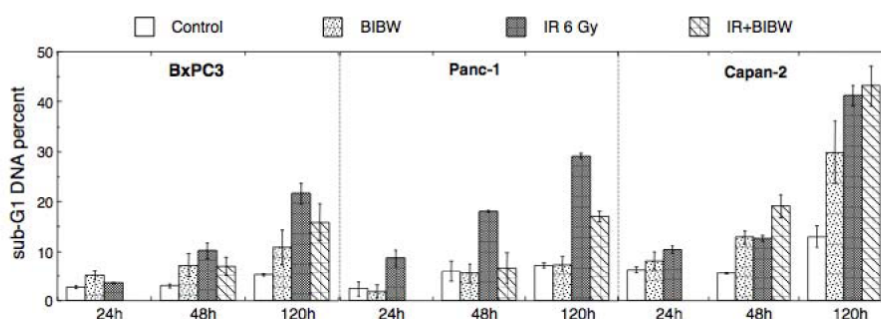


Figure 6
Determination of BIBW 2992-induced cell death, and effect of drug on radio-induced cell death.

Cells were exposed to radiation or drug as indicated, collected and processed for sub-G1 fragments determination by flow cytometry. In combined treatment, BIBW 2992 (1 to 2 μM) was introduced 24 h prior to irradiation (IR, 6 Gy) and was present for up to cell harvest.

BIBW 2992 inhibits excess centrosomes formation in response to radiation

A role for Aurora A kinase in the progression of pancreatic cancer has been proposed recently (34). Aurora A is an oncogenic serine/threonine kinase that plays a role in centrosome separation and in the formation of the mitotic bipolar spindle (35). According to Hung *et al.* (36) the nuclear EGFR associates to STAT5 to bind and promote Aurora A gene expression, which may lead to chromosome instability and tumorigenesis. As a first approach to evaluating the effect of BIBW 2992 on these pathways, the number of centrosomes after

radiation without or with drug was measured in the three cell lines by an immunofluorescence assay. Excess centrosomes were actually found in irradiated cells (Figure 7). BIBW 2992 reduced the level of excess centrosomes down to the basal level in BxPC3 and Capan-2 cells, thus suggesting a major link between EGFR and Aurora A in these cell lines. Panc-1 cells were more resistant to repression of excess centrosome by BIBW 2992.

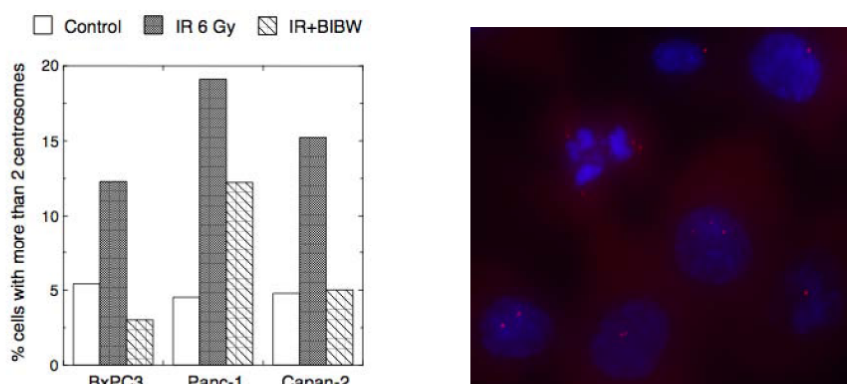


Figure 7
Effect of BIBW 2992 on excess centrosome formation.
 BxPC3, Capan-2, and Panc-1 cells were irradiated (IR, 6 Gy) in presence or not of BIBW 2992 (2 μ M). The immunofluorescence detection of cells was then performed using γ -tubulin antibody (red) and DAPI (blue, a DNA-specific dye) for monitoring the centrosome number. A, percentage of cells with excess centrosome number; B, picture of BxPC3 cells exposed to IR 6 Gy.

DISCUSSION

BIBW 2992 was found to induce a pronounced cytotoxic and a weak cytostatic effect only in BxPC3 and Capan-2 cells. The cytostatic effect is likely to mirror cytotoxic response since no major G1 block occurred in response to prolonged contact with drug. Panc-1 cells were resistant to the drug in all assays. Interestingly, Panc-1 cells are also resistant to lapatinib, a dual EGFR and HER2 inhibitor (31). KRAS^{mut} Capan-2 cells were the most sensitive to EGFR/HER2 inhibition. The widely held relationship between KRAS mutations and resistance to EGFR inhibitors does not fit this observation (16). We would rather propose that the sensitivity to BIBW 2992 is linked to the expression of EGFR, HER2, and HER3. This assumption is supported by Buck *et al.* (37) and Frolov *et al.* (25) who established a direct relationship between HER3 overexpression and the sensitivity to erlotinib, an EGFR inhibitor, in pancreatic cancer cells. Whether EGFR/HER3 heterodimerization plays a role in this pathway in the same way as for EGFR/HER2 heterodimerization (38), is open to discussion. On the other hand, authors reported that the sensitivity to EGFR inhibition by erlotinib is more pronounced in

epithelial than in mesenchymal cell phenotypes (39). This may not account for the differential sensitivity to BIBW 2992 since Capan-2 (mesenchymal) are as sensitive as BxPC3 cells (epithelial) to the cytotoxic effect of the drug.

Owing to the growing evidence in support of the ability of EGFR and HER2 inhibitors to potentiate the radiation susceptibility in multiple types of cancers, we started with the hypothesis that dual inhibition of EGFR and HER2 by BIBW 2992 would sensitize pancreatic cancer cells to radiation-induced cell kill. We actually observed a large radiosensitizing effect of BIBW 2992 in two out of the three cell lines, BxPC3 and Capan-2 cells used in this study. The strength of the effect was significantly smaller in Panc-1 cells and appeared to correlate the susceptibility to the drug, independently of the KRAS status. This result is at variance with other authors who proposed that radiosensitization in relation to EGFR inhibition requires a wild-type (31) or a mutated (29) K-RAS phenotype. Were it to occur, radioresistance in cells expressing oncogenic KRAS was proposed to be mediated by the PI3K/Akt pathway (18, 19, 40). Again this model does not fit our results.

A role for ERK1/2 signaling was also proposed (41). However, in agreement with Kimple *et al.* (31) we did not observe any direct relationship between ERK1/2 phosphorylation and radiation response.

Three alternative mechanisms were taken into consideration to explain the potentialization by BIBW 2992 of radiation-induced cell kill, namely, a defect in the DNA-PK pathway, a synergy between drug- and radiation-induced apoptosis, and an accumulation of cells at a radiosensitive stage of the cell cycle.

Firstly, we observed that BIBW 2992 inhibited radio-induced DNA-PKcs phosphorylation in Capan-2 cells only, yet the drug enhanced radiation response also in BxPC3 and, though to a minor extent, in Panc-1 cells. Therefore, the hypothesis that EGFR-mediated inhibition of Akt activation in KRAS mutant cells enhances radiosensitivity by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair (30) does not hold in our model. Nuclear to cytoplasmic translocation of DNA-PKcs in the form of a complex with EGFR (33, 42) is not consistent either with the observations made in the three pancreatic cell lines used in this study.

BIBW 2992 elicited a transient G1 block and S phase depletion in our cells, with a maximum after 24 h of contact with the drug. However, this G1 block was relatively minor compared to FaDu cells (43) and did not abrogate the radio-induced G2/M accumulation which was only reduced and

delayed. This rules out the possibility of interphase progression as a major mechanism of enhanced radiation susceptibility in the cell lines of interest. Potentiation of radio-induced apoptosis is not a likely mechanism either in consideration of our results.

We observed a dramatic reduction of excess centrosomes by BIBW 2992 in BxPC3 and Capan-2 cells exposed to radiation. The strength of this effect was in relation to both the susceptibility to drug and the BIBW 2992-induced radiosensitization. This is consistent with Hung *et al.* who demonstrated a major link between EGFR and Aurora A expression (36). Some of our results are not in agreement with this mechanism: first, BIBW 2992 did not levelled up radio-induced apoptosis, secondly, circumstantial evidence in favor of a substantial excess of radio-induced micronuclei was observed in the presence of BIBW 2992 in p53 defective cells. Therefore, we hypothesize that the BIBW 2992 acts on the mitosis by two antagonistic mechanisms, (i) reinforced control on centrosome overduplication, likely to depend on Aurora A (spindle poles) (35), (ii) facilitation of micronucleation, in relation to faulty cytokinesis, likely to depend on Aurora B (kinetochores and midbody). This may represent a new mode of action to target pancreatic carcinoma. The use of specific Aurora A and B kinase inhibitors is planned to establish this pathway.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Valérie Fauquette (INSERM U837, Lille) for the generous gift of Capan-2 cells, and Dr Janet Hall (Institut

Curie, Orsay) and Virginie Poindessous (INSERM U893, Paris) for helpful discussion.

REFERENCES

- DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer principles and practice of oncology, 7th edition. Philadelphia: Lippincott Company; 2005.
- Burriss HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15(6):2403-13.
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, *et al.* Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007;25(15):1960-6.
- Ciardello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358(11):1160-74.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(2):127-37.
- Zhang L, Yuan SZ. Expression of c-erbB-2 oncogene protein, epidermal growth factor receptor, and TGF-beta1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1(4):620-3.
- Tobita K, Kijima H, Dowaki S, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *Int J Mol Med* 2003;11(3):305-9.

8. Xiong HQ. Molecular targeting therapy for pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54 Suppl 1:S69-77.
9. Immervoll H, Hoem D, Kugarajh K, Steine SJ, Molven A. Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes. *Virchows Arch* 2006;448(6):788-96.
10. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, *et al.* Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1936-48.
11. Harari PM, Huang SM. Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49(2):427-33.
12. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354(6):567-78.
13. Giocanti N, Hennequin C, Rouillard D, Defrance R, Favaudon V. Additive interaction of gefitinib ('Iressa', ZD1839) and ionising radiation in human tumour cells in vitro. *Br J Cancer* 2004;91(12):2026-33.
14. Larbouret C, Robert B, Navarro-Teulon I, *et al.* In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007;13(11):3356-62.
15. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;441(7092):424-30.
16. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66(8):3992-5.
17. Lee J, Jang KT, Ki CS, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2007;109(8):1561-9.
18. Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, *et al.* The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res* 2001;61(10):4278-82.
19. Grana TM, Rusyn EV, Zhou H, Sartor CI, Cox AD. Ras mediates radioresistance through both phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-independent signaling pathways. *Cancer Res* 2002;62(14):4142-50.
20. Eskens FA, Mom CH, Planting AS, *et al.* A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2008;98(1):80-5.
21. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, *et al.* BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008;27(34):4702-11.
22. Piret B, Schoonbroodt S, Piette J. The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage. *Oncogene* 1999;18:2261-71.
23. Demarcq C, Bastian G, Remvikos Y. BrdUrd/DNA flow cytometry analysis demonstrates cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced multiple cell-cycle modifications on human lung carcinoma cells. *Cytometry* 1992;13:416-22.
24. Komoto M, Nakata B, Nishii T, *et al.* In vitro and in vivo evidence that a combination of lapatinib plus S-1 is a promising treatment for pancreatic cancer. *Cancer science* 2010;101(2):468-73.
25. Frolov A, Schuller K, Tzeng CW, *et al.* ErbB3 expression and dimerization with EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib. *Cancer Biol Ther* 2007;6(4):548-54.
26. Pino MS, Balsamo M, Di Modugno F, *et al.* Human Mena+11a isoform serves as a marker of epithelial phenotype and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human pancreatic cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4943-50.
27. Sergina NV, Rausch M, Wang D, *et al.* Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445(7126):437-41.
28. Normanno N, De Luca A, Bianco C, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006;366(1):2-16.
29. Toulany M, Dittmann K, Baumann M, Rodemann HP. Radiosensitization of Ras-mutated human tumor cells in vitro by the specific EGF receptor antagonist BIBX1382BS. *Radiother Oncol* 2005;74(2):117-29.
30. Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, *et al.* Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):4119-26.
31. Kimple RJ, Vaseva AV, Cox AD, *et al.* Radiosensitization of epidermal growth factor receptor/HER2-positive pancreatic cancer is mediated by inhibition of Akt independent of ras mutational status. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):912-23.
32. Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, *et al.* Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes & development* 2002;16(18):2333-8.
33. Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol* 2005;76(2):157-61.
34. Warner SL, Munoz RM, Stafford P, *et al.* Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5(10):2450-8.
35. Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 2005;5(1):42-50.
36. Hung LY, Tseng JT, Lee YC, *et al.* Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic acids research* 2008;36(13):4337-51.
37. Buck E, Eyzaguirre A, Haley JD, Gibson NW, Cagnoni P, Iwata KK. Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2006;5(8):2051-9.

38. Toulany M, Minjee M, Kehlbach R, Chen J, Baumann M, Rodemann HP. ErbB2 expression through heterodimerization with erbB1 is necessary for ionizing radiation- but not EGF-induced activation of Akt survival pathway. *Radiother Oncol* 2010.
39. Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, *et al.* Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. *Mol Cancer Ther* 2007;6(2):532-41.
40. Kim IA, Bae SS, Fernandes A, *et al.* Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2005;65(17):7902-10.
41. Caron RW, Yacoub A, Mitchell C, *et al.* Radiation-stimulated ERK1/2 and JNK1/2 signaling can promote cell cycle progression in human colon cancer cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2005;4(3):456-64.
42. Friedmann BJ, Caplin M, Savic B, *et al.* Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol Cancer Ther* 2006;5(2):209-18.
43. Schutze C, Dorfner A, Eicheler W, *et al.* Combination of EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibition by BIBW 2992 and BIBW 2669 with irradiation in FaDu human squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol* 2007;183(5):256-64.
44. Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, *et al.* Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2010;39(4):425-35.

II-2. Expériences complémentaires

II-2-1. Phénotype épithélial ou mésenchymateux des lignées étudiées

Plusieurs auteurs ont montré que la sensibilité à l'erlotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR, varie selon le statut épithélial ou mésenchymateux des cellules d'adénocarcinome pancréatique (258, 261). Par ailleurs, il est possible que les cellules mésenchymateuses soient plus résistantes à l'irradiation que les cellules épithéliales (320). Les lignées épithéliales sont définies par la présence d'E-cadhérine et l'absence de vimentine et de N-cadhérine ; à l'inverse, les lignées mésenchymateuses expriment la vimentine et la N-cadhérine mais pas l'E-cadhérine (321). Nous avons étudié l'expression de ces trois protéines par Western blot (Figure 38). En accord avec les auteurs, nous avons trouvé que la lignée BxPC3 présente un phénotype épithélial tandis que la lignée Panc-1 exprime un phénotype mésenchymateux (258, 261, 322). La lignée Capan-2 a un phénotype intermédiaire : elle n'exprime pas la E-cadhérine ni la N-cadhérine alors qu'elle exprime la vimentine. D'après Najakima *et al.*, la lignée Capan-2 exprime la E-cadhérine, la N-cadhérine et la vimentine, alors que pour Buck *et al.*, elle exprime la E-cadhérine uniquement. Ces données, discordantes, suggèrent que la lignée Capan-2 a un phénotype instable.

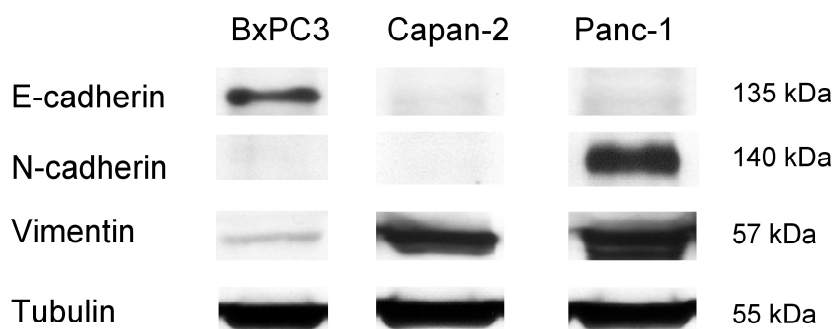


Figure 38
Analyse par Western blot de l'expression d'E-cadhérine, N-cadhérine et vimentine dans les 3 lignées pancréatiques utilisées.

II-2-2. Inhibition prolongée de la phosphorylation d'HER3

HER3 est un récepteur tyrosine kinase de 160 kDa. Son activité est très faible (81). Ses principaux ligands sont les neurégulines 1 et 2. Il est surexprimé dans 28 à 47% des

adénocarcinomes pancréatiques (323). HER3 ne forme pas d'homodimère mais uniquement des hétérodimères avec EGFR ou HER2 activant préférentiellement la voie PI3K/Akt (324). En effet, HER3 possède de multiples sites de fixation pour la sous-unité p85 de PI3K. Les travaux de Sergina *et al.* ont mis en évidence le rôle crucial d'HER3 dans la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans les cancers du sein HER2+ (325). Les auteurs observent une inhibition transitoire de l'activité d'HER3 suivie d'un échappement après 48 h d'exposition à un inhibiteur d'EGFR. Ce phénomène serait dû à un mécanisme compensatoire médié par Akt et produisant une augmentation de l'expression membranaire d'HER3. Le BIBW 2992 inhibant la phosphorylation d'HER3, nous avons voulu rechercher un échappement dans les cellules BxPC3 et Capan-2 (les cellules Panc-1 n'exprimant pas HER3). Dans les cellules BxPC3 KRAS^{wt}, l'inhibition de la phosphorylation d'HER3 persiste jusqu'à 120 h alors qu'elle disparaît après 48 h dans les cellules Capan-2 KRAS^{mut}. Ceci peut s'expliquer par le fait que la production de TGF α médiée par KRAS est plus importante dans les lignées mutées où KRAS est activée constitutivement, entraînant une surexpression des récepteurs malgré l'inhibition d'EGFR, HER2 et HER3 (117).

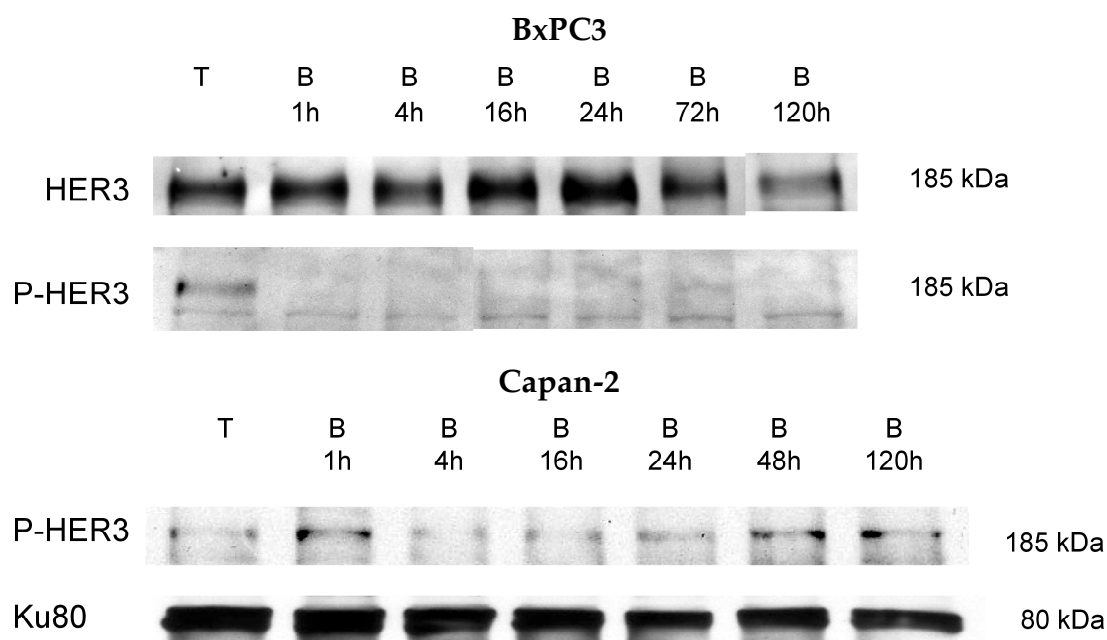


Figure 39

Analyse en Western blot de l'effet d'une exposition prolongée au BIBW 2992 sur la phosphorylation d'HER3 dans les lignées BxPC3 et Capan-2.

II-2-3. Radiosensibilité intrinsèque des trois lignées

Les cellules porteuses d'une mutation de KRAS sont supposées être plus radiorésistantes que les cellules KRAS *wild type* (13). Pour vérifier ce point, nous avons effectué un test clonogénique des lignées BxPC3 (KRAS^{wt}), Capan-2 (KRAS^{mut}) et Panc-1 (KRAS^{mut}) (Figure 40) exposées à des doses croissantes de rayonnement. On montre que les lignées BxPC3 et Capan-2 expriment la même radiosensibilité, alors que la lignée Panc-1 est significativement plus radiorésistante. Il n'y a donc pas de lien causal entre le statut de KRAS et la réponse au rayonnement dans ces lignées.

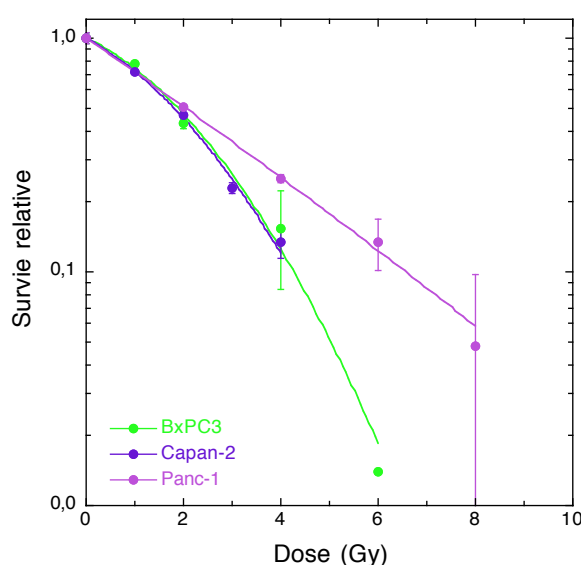


Figure 40
Survie des lignées BxPC3, Capan-2 et Panc-1 après irradiation.

II-2-4. Expression nucléaire et cytoplasmique de DNA-PKcs

Selon Dittmann *et al.*, les RI sont capables d'induire une translocation nucléaire de la forme activée d'EGFR responsable d'une augmentation de l'activité DNA-PK (87) contribuant à la radiorésistance des cellules surexprimant EGFR. De fait, l'inhibition de l'activation radio-induite d'EGFR par le cetuximab entraîne une augmentation de la radiosensibilité parallèlement à la séquestration cytoplasmique d'une forme de DNA-PKcs liée à l'EGFR (120). Nous avons donc étudié les variations du niveau d'expression nucléaire et cytoplasmique de DNA-PKcs dans les trois lignées cellulaires utilisées exposées au BIBW 2992 et/ou aux RI. Nous n'avons pas

constaté de variation significative du taux de la forme nucléaire de DNA-PKcs. Au niveau cytoplasmique, nous nous attendions à trouver une diminution radio-induite de l'expression de DNA-PKcs et qui serait inhibée en présence de BIBW 2992. C'est le cas dans les Panc-1 ([Figure 41](#)). En revanche, nous avons observé le contraire dans les BxPC3 et les Capan-2, c'est-à-dire que l'expression de DNA-PKcs n'est pas modifiée ou qu'elle est légèrement diminuée en présence du BIBW 2992.

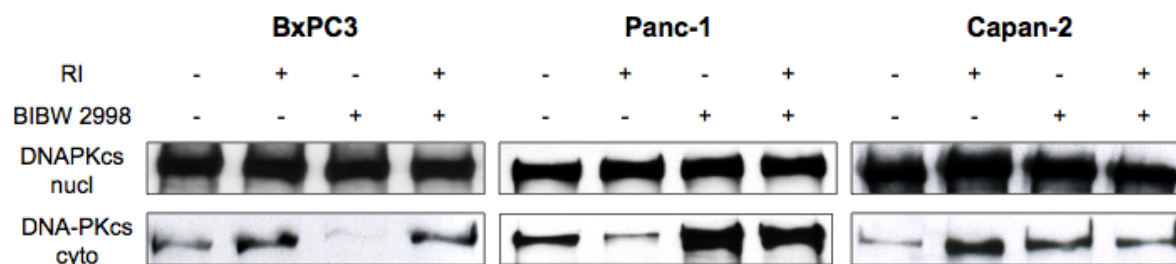


Figure 41

Analyse en Western blot de l'expression nucléaire et cytoplasmique de DNA-PKcs dans les lignées BxPC3, Panc-1 et Capan-2.

III – Discussion - Conclusions 2^{ème} partie

Dans notre étude, le BIBW 2992 produit un effet cytotoxique et radiosensibilisateur dans les cellules d'adénocarcinome pancréatique BxPC3 et Capan-2. Les cellules Panc-1 ne sont pas sensibles à cet inhibiteur. Elles ne sont pas sensibles non plus au lapatinib, un autre inhibiteur d'EGFR et HER2 (319, 326). L'effet cytotoxique du BIBW 2992 est indépendant du statut KRAS puisque les cellules BxPC3 sont KRAS *wild type* alors que les Capan-2 ont un gène KRAS muté. Il semble plutôt corrélé au niveau d'expression des récepteurs EGFR, HER2 et HER3. Komoto *et al.* rapportent que l'efficacité du lapatinib dans des lignées pancréatiques est corrélé au niveau d'expression de HER2 et non d'EGFR (319). Dans l'étude de Kimple *et al.*, le pouvoir cytoxique du lapatinib dans des lignées pancréatiques semblent aussi corrélé au niveau d'expression d'HER2 et, dans une moindre mesure, d'HER3 (326). Selon d'autres auteurs, la réponse à l'erlotinib, un inhibiteur d'EGFR, est corrélé au niveau d'expression d'HER3 dans des lignées cellulaires de cancer du pancréas (259, 260). Ces résultats sont à considérer avec précaution car, selon la technique choisie pour étudier le niveau d'expression des récepteurs, celui-ci peut être très différent. Par exemple, les cellules Panc-1 ont un bas niveau d'expression d'HER2 déterminé par cytométrie en flux (267, 319) ou par Western blot (255, 259), alors que l'analyse par RT-PCR quantitative indique qu'elles détiennent un nombre de copies d'ARN messager d'HER2 élevé (326). Selon d'autres auteurs, la sensibilité à l'erlotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase d'EGFR, dépendrait du statut épithélial ou mésenchymateux des cellules d'adénocarcinome pancréatique (258, 261). Ce n'est pas ce qui ressort de notre étude.

L'effet cytotoxique obtenu avec le BIBW 2992 est en accord avec les résultats observés *in vitro* par Larbouret *et al.* avec une association d'un inhibiteur d'EGFR, le cetuximab, et d'un inhibiteur d'HER2, le trastuzumab sur deux lignées cellulaires de cancer du pancréas (327), ainsi qu'avec ceux de Kimple *et al.* utilisant lapatinib (326). Les résultats de Larbouret *et al.* ont été confirmés *in vivo* sur des xénogreffes de souris, ainsi que ceux de Komoto *et al.* (319, 328). De même, nos résultats devront être transposés *in vivo* avant d'envisager un essai clinique chez des patients. Ce d'autant plus que les expériences réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires ne permettent pas d'évaluer l'impact de l'inhibition d'EGFR sur l'angiogenèse, qui ne serait pas négligeable (4, 329, 330).

Le mécanisme responsable de l'effet radiosensibilisateur observé dans notre étude avec le BIBW 2992 n'est probablement pas univoque. Classiquement, une molécule peut produire un effet radiosensibilisateur par l'un des trois mécanismes suivants : majoration de l'apoptose radio-induite, altération de la réparation des lésions radio-induites ou effet sur le cycle cellulaire avec abrogation de l'arrêt en G2/M. La majorité des auteurs rapportent que l'inhibition d'EGFR entraîne une augmentation du niveau d'apoptose radio-induite. Ce n'est pas le cas dans notre étude. Utilisé seul, le BIBW 2992 augmente de manière significative le taux d'apoptose uniquement dans la lignée Capan-2 qui n'a pas de mutation de TP53. En combinaison avec l'irradiation, la drogue ne majore pas le niveau d'apoptose radio-induite, voire même le diminue dans les cellules BxPC3. Notre hypothèse est que le BIBW 2992 entraîne préférentiellement dans ces cellules une mort mitotique, comme le suggère la présence de micro-noyaux. Ceci reste à confirmer.

Concernant le cycle cellulaire, la présence du BIBW 2992 induit une accumulation transitoire des cellules en phase G1 associée à une déplétion de la phase S après 24 h d'exposition à la drogue. Ce bloc est toutefois de faible importance et réversible. Cet effet de la drogue sur le cycle cellulaire n'est pas assez puissant pour inhiber l'arrêt des cellules en G2/M radio-induit. Dans les cellules Panc-1, il est seulement un peu moins important. Dans les cellules BxPC3 et Capan-2, il est également réduit mais surtout décalé de 24 h. Une inhibition de l'arrêt en G2/M radio-induit aurait pu entraîner une radiosensibilisation en laissant moins de temps aux cellules pour réparer les lésions de l'ADN radio-induites (331) mais ici, le fait que ce bloc soit seulement réduit et retardé ne suffit pas à expliquer la radiosensibilisation observée dans notre étude.

L'inhibition de l'EGFR peut produire une altération de la réparation des CDB *via* son interaction avec DNA-PK, enzyme majeure du NHEJ. En effet, l'activation radio-induite d'EGFR entraîne une translocation nucléaire d'une forme activée d'EGFR liée à DNA-PK (87, 119). L'inhibition d'EGFR provoque alors une séquestration cytoplasmique de DNA-PK empêchant son action dans la réparation (120). En présence de BIBW 2992, nous avons observé ce phénomène uniquement dans la lignée cellulaire Panc-1, la moins radiosensible, alors que le phénomène inverse était observé dans les lignées BxPC3 et Capan-2. Selon Toulany *et al.*, l'effet radiosensibilisateur d'un inhibiteur de l'EGFR, le BIBX1382BS, observé dans la lignée de carcinome bronchique A549 KRAS^{mut} serait dû à une diminution de la capacité des cellules à réparer les CDB radio-induites (118). Dans leur modèle, EGFR activerait

directement la voie PI3K/Akt indépendamment de KRAS, et ce serait Akt qui activerait DNA-PKcs en la phosphorylant sur le résidu Thr2609. Nous avons donc étudié l'effet du BIBW 2992 sur l'activation radio-induite d'Akt et de DNA-PKcs. Le BIBW 2992 inhibe la phosphorylation radio-induite d'Akt sur le résidu Ser473 dans les lignées BxPC3 et Capan-2 mais pas dans la lignée Panc-1 qui est, rappelons le, résistante à la drogue. Cette inhibition d'Akt est suivie d'une inhibition de la phosphorylation radio-induite de DNA-PKcs sur le résidu Thr2609 par le BIBW 2992 dans les cellules Capan-2 KRAS^{mut} mais pas dans les cellules BxPC3 KRAS^{wt}.

Nos résultats suggèrent que l'effet radiosensibilisateur observé en présence du BIBW 2992 dans les cellules BxPC3 KRAS^{wt} et les cellules Capan-2 KRAS^{mut} pourrait être expliqué par des mécanismes différents selon le type cellulaire. En effet, l'effet observé dans la lignée Capan-2 peut s'expliquer par une majoration du taux d'apoptose radio-induite et une diminution de la réparation des CDB alors que ces mécanismes n'entrent pas en jeu dans la radiosensibilisation observée dans les cellules BxPC3. Le BIBW 2992 entraînerait préférentiellement dans ces cellules une mort mitotique, comme le suggère la présence de micro-noyaux.

Partant de ce fait, nous nous sommes intéressés à l'influence du BIBW 2992 sur la mitose. On sait que les kinases Aurora A et B sont fréquemment surexprimées dans les cancers du pancréas (332, 333) et jouent un rôle majeur dans la mitose. Schématiquement, Aurora A contrôle la formation des centrosomes et du fuseau mitotique tandis qu'Aurora B joue un rôle majeur dans la cytokinèse (334). Hung *et al.* ont montré qu'EGFR forme au niveau du noyau un complexe avec STAT5 induisant la surexpression d'Aurora A (335). La surexpression d'Aurora A entraîne une instabilité chromosomique. Nous avons observé une augmentation du pourcentage de cellules porteuses d'un nombre anormal de centrosomes après irradiation dans les trois lignées pancréatiques étudiées. En présence de BIBW 2992, ce pourcentage diminue significativement dans les lignées BxPC3 et Capan-2. Le lien entre EGFR et les kinases Aurora A et B doit être étudié de manière plus approfondie, notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des kinases Aurora A et B. Des données suggèrent que l'inhibition de l'activité de ces kinases produirait un effet radiosensibilisateur (336, 337).

CONCLUSION GENERALE PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

Les thérapies dites “ciblées” cherchent à réprimer l'une des fonctions cellulaires caractéristiques du cancer telles que la croissance tumorale, la néo-angiogenèse ou le pouvoir métastatique par ciblage de gènes ou produits de gènes qui déterminent ces fonctions et diffèrent sensiblement entre cellules normales et tumorales. Les inhibiteurs de tyrosine kinase ont été très étudiés dans cette optique et donnent actuellement, tant au laboratoire qu'en clinique, des résultats prometteurs. Ils agissent principalement en perturbant les voies de transduction des signaux. Or, on sait maintenant que la réponse aux radiations ionisantes dépend de certaines de ces voies de signalisation, en particulier pour l'induction de la réparation de l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire, et du contrôle de la mitose et de l'apoptose. L'altération des voies de signalisation qui déterminent ces mécanismes est donc susceptible d'influencer la réponse aux rayonnements ionisants. Nous avons choisi deux inhibiteurs de tyrosine kinase pour tenter de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette modulation. Le premier étudié, le STI571 (imatinib ou Glivec®), représente l'archétype des agents de thérapie ciblée. En effet, le STI571 inhibe spécifiquement la tyrosine kinase Bcr-Abl résultant de la fusion des gènes BCR et ABL, en relation avec une anomalie chromosomique caractéristique de la leucémie myéloïde chronique. Nous avons montré que le STI571 induit un effet radiosensibilisateur dans la lignée cellulaire de LMC K562. Le mécanisme responsable de cet effet pourrait être une abolition de l'arrêt en G2/M radio-induit. Le second inhibiteur que nous avons étudié est le BIBW 2992. Cet agent inhibe spécifiquement et de manière irréversible le site catalytique à activité tyrosine kinase des récepteurs EGFR et HER2. Nous montrons qu'il produit un effet radiosensibilisateur dans les lignées de cancer du pancréas BxPC3 et Capan-2 indépendamment de leur statut KRAS. Le mécanisme responsable de cet effet semble varier avec la lignée cellulaire. En effet, l'effet observé dans la lignée Capan-2 peut s'expliquer par une majoration du taux d'apoptose radio-induite et une diminution de la réparation des cassures double-brin de l'ADN alors que le BIBW 2992 paraît orienter préférentiellement les cellules BxPC3 vers la mort mitotique par dérégulation de la transition mitotique.

De manière plus générale, nos travaux s'intègrent dans un corpus de recherche en plein développement et qui s'intéresse aux mécanismes et aux applications de la modulation de la réponse aux radiations ionisantes par les agents de thérapie ciblée. Notons d'emblée que l'efficacité de ce type d'approche est limitée par la biologie tumorale, l'inhibition d'une cible pouvant avoir un effet différent selon les cas. Par exemple, l'inhibition sélective de c-Abl par le STI571 entraîne un effet radiosensibilisateur uniquement dans certains types cellulaires. Le concept d'inhibition sélective dépend donc non seulement de l'expression de la cible mais également du rôle qu'elle occupe dans les cascades de signalisation qui contrôlent la survie cellulaire après irradiation, cette implication pouvant être extrêmement variable d'un type cellulaire à l'autre, et pouvant même varier entre les différentes cellules d'une même tumeur en fonction de leur statut métabolique ou de leur dérive génétique.

Une stratégie alternative au ciblage spécifique consiste à cibler simultanément plusieurs mécanismes impliqués dans la survie de la cellule cancéreuse après irradiation, comme l'arrêt en phase G2 du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose ou l'inhibition de la réparation de l'ADN afin d'accroître la radiosensibilité tumorale. Les thérapeutiques dirigées spécifiquement contre une fonction biochimique spécifique telle l'activité d'une tyrosine kinase spécifique d'un substrat particulier, sont en général efficaces mais la survenue d'une seule mutation de leur cible peut les rendre inefficaces. Leur bonne utilisation nécessite *a priori* la recherche de mutations de la cible et des voies de signalisation sous-jacentes. Ainsi, la présence d'une mutation de KRAS confère une résistance aux anticorps inhibant l'EGFR dans les cancers coliques. Par ailleurs, nos résultats ajoutent à la controverse sur le rôle de KRAS dans la réponse aux radiations ionisantes, au motif que nous observons un effet radiosensibilisateur du BIBW 2992 à la fois sur une lignée KRAS^{wt} et une lignée KRAS^{mut}. D'autres voies de signalisation sont donc impliquées dans la réponse aux radiations ionisantes de ces cellules. Ces voies devront être caractérisées dès lors qu'un essai clinique sera envisagé. Enfin, il faut rappeler que les approches *in vitro* ne permettent pas d'évaluer l'impact des drogues sur l'environnement tumoral, en particulier l'environnement vasculaire. Une évaluation *in vivo* de l'effet de ces traitements est donc indispensable. Nous devons malheureusement constater l'absence de modèles pré-cliniques fiables permettant d'évaluer les effets de ce type d'approche sur les tissus sains et tout particulièrement les effets tardifs.

L'effet radiosensibilisateur du STI571 sur les cellules de LMC a été confirmé sur d'autres types cellulaires que la lignée K562. Cependant, les débouchés thérapeutiques de l'association du STI571 à l'irradiation paraissent assez limités. En effet, lors du traitement de la LMC, la seule situation où les patients ont recours à la radiothérapie est l'irradiation corporelle totale de conditionnement avant greffe, situation dans laquelle une association à un traitement par STI571 n'a qu'un intérêt mineur, sauf à permettre de réduire significativement la dose délivrée aux tissus sains. En revanche, l'utilisation du STI571 comme radiosensibilisateur dans le traitement des glioblastomes surexprimant PDGFR se place dans une perspective thérapeutique intéressante. Le STI 571 est d'ailleurs à l'étude dans plusieurs essais cliniques chez des patients présentant un glioblastome en rechute. Le BIBW 2992 (Tovok®), quant à lui, est en cours de développement dans de nombreuses localisations tumorales, en particulier dans les cancers broncho-pulmonaires, les cancers coliques et les cancers des voies aéro-digestives supérieures. Les résultats de ces essais de phase II sont très prometteurs, une étude de phase III ayant même débuté dans le traitement des cancers bronchiques métastatiques présentant une mutation d'EGFR (essai LUX-Lung 3). L'efficacité du BIBW 2992 dans le traitement des adénocarcinomes du pancréas reste à évaluer *in vivo*.

D'autres inhibiteurs dirigés contre des récepteurs ou des voies de signalisation ubiquitaires sont en cours de développement. Les inhibiteurs d'IGF1R en sont un exemple. L'activité IGF1R semble indispensable à la croissance d'un grand nombre de modèles tumoraux alors que son inhibition n'affecte pas les tissus sains, ce qui devrait permettre d'obtenir un effet différentiel. L'avantage de ce type d'approche est de ne pas dépendre trop étroitement de la biologie tumorale. Ainsi, le fait que le récepteur-cible, IGF1R, possède une activité pléiotrope sur les voies de signalisation, peut nous faire penser qu'une seule mutation des voies de signalisation aval n'entraînera pas l'inefficacité de cette approche.

Dans le cadre des essais cliniques précoces évaluant l'intérêt d'une nouvelle drogue combinée à l'irradiation, il est important de rappeler que la toxicité de telles combinaisons n'est pas nécessairement la somme de la toxicité habituelle de la radiothérapie plus celle de la nouvelle drogue. Par ailleurs, les doses et schémas d'administration de la drogue sont susceptibles d'induire des variations majeures des profils de toxicité. Une évaluation incorrecte peut conduire à deux types d'erreurs distinctes, soit un abandon injustifié, soit l'adoption d'une combinaison drogue/radiothérapie aboutissant à un niveau de toxicité inacceptable. Au nombre

des aspects majeurs devant être définis avant d'envisager l'association à la radiothérapie de nouvelles molécules, nous mettrions l'accent sur quatre points :

- Quel type de tumeur, quel profil biologique tumoral est-il susceptible de bénéficier du traitement combiné ?
- Quel doit être le schéma optimal d'administration de la drogue au décours de la radiothérapie ?
- Quel est le profil de toxicité, est-il tolérable ?
- Le bénéfice obtenu justifie-t-il le coût financier – souvent considérable – de la drogue ?

En définitive, la définition des objectifs et de la méthodologie des essais cliniques associant thérapies ciblées et radiothérapie ne fait pas encore l'objet d'un consensus universel. Ce facteur sera une des clefs pour le succès du développement des traitements combinés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Ponette V, Le Pechoux C, Deniaud-Alexandre E, *et al.* Hyperfast, early cell response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 2000;76(9):1233-43.
2. Giocanti N, Hennequin C, Rouillard D, Defrance R, Favaudon V. Additive interaction of gefitinib ('Iressa', ZD1839) and ionising radiation in human tumour cells in vitro. *Br J Cancer* 2004;91(12):2026-33.
3. Mauro MJ, O'Dwyer M, Heinrich MC, Druker BJ. STI571: a paradigm of new agents for cancer therapeutics. *J Clin Oncol* 2002;20(1):325-34.
4. Harari PM, Huang SM. Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49(2):427-33.
5. Chen DJ, Nirodi CS. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin Cancer Res* 2007;13(22 Pt 1):6555-60.
6. Liang K, Lu Y, Jin W, Ang KK, Milas L, Fan Z. Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Mol Cancer Ther* 2003;2(11):1113-20.
7. Guo G, Wang T, Gao Q, *et al.* Expression of ErbB2 enhances radiation-induced NF-kappaB activation. *Oncogene* 2004;23(2):535-45.
8. Sato S, Kajiyama Y, Sugano M, *et al.* Monoclonal antibody to HER-2/neu receptor enhances radiosensitivity of esophageal cancer cell lines expressing HER-2/neu oncoprotein. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61(1):203-11.
9. Toulany M, Minjee M, Kehlbach R, Chen J, Baumann M, Rodemann HP. ErbB2 expression through heterodimerization with erbB1 is necessary for ionizing radiation- but not EGF-induced activation of Akt survival pathway. *Radiother Oncol* 2010.
10. Gudjonsson B. Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer* 1987;60(9):2284-303.
11. Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Molecular cancer* 2003;2:7.
12. Xiong HQ. Molecular targeting therapy for pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54 Suppl 1:S69-77.
13. Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, *et al.* The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res* 2001;61(10):4278-82.
14. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988;35:95-125.
15. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003;531(1-2):5-23.
16. Pouget JP, Frelon S, Ravanat JL, Testard I, Odin F, Cadet J. Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiat Res* 2002;157(5):589-95.
17. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567(1):1-61.
18. Bertocini CR, Meneghini R. DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleic Acids Res* 1995;23(15):2995-3002.
19. Badie C, Iliakis G, Foray N, *et al.* Induction and rejoining of DNA double-strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiat Res* 1995;144(1):26-35.
20. Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997;131:1-87.
21. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 1994;65(1):7-17.
22. Nikjoo H, O'Neill P, Wilson WE, Goodhead DT. Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation. *Radiat Res* 2001;156(5 Pt 2):577-83.

-
23. Hada M, Georgakilas AG. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. *J Radiat Res (Tokyo)* 2008;49(3):203-10.
 24. Song JM, Milligan JR, Sutherland BM. Bistranded oxidized purine damage clusters: induced in DNA by long-wavelength ultraviolet (290-400 nm) radiation? *Biochemistry* 2002;41(27):8683-8.
 25. Sutherland BM, Bennett PV, Cintron NS, Guida P, Laval J. Low levels of endogenous oxidative damage cluster levels in unirradiated viral and human DNAs. *Free Radic Biol Med* 2003;35(5):495-503.
 26. Favaudon V. Effets cellulaires des rayonnements ionisants. Radiosensibilité, cycle cellulaire et mort cellulaire. In: Tubiana M, editor. *Radiobiologie*. Paris: Hermann Éditeurs; 2008. p. 187-240.
 27. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411(6835):366-74.
 28. Madhusudan S, Hickson ID. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends in molecular medicine* 2005;11(11):503-11.
 29. Fernet M, Ponette V, Deniaud-Alexandre E, *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase, a major determinant of early cell response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 2000;76(12):1621-9.
 30. Godon C, Cordelieres FP, Biard D, *et al.* PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res* 2008;36(13):4454-64.
 31. Poirier GG, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, Mandel P. Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(11):3423-7.
 32. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 2003;85(11):1101-11.
 33. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003;193(1-2):3-34.
 34. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(5):335-46.
 35. O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nature reviews* 2006;7(1):45-54.
 36. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 2004;73:39-85.
 37. Steel GG. Terminology in the description of drug-radiation interactions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979;5(8):1145-50.
 38. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4(4):307-20.
 39. Begg AC. Cisplatin and radiation: interaction probabilities and therapeutic possibilities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19(5):1183-9.
 40. Yang LX, Douple EB, O'Hara JA, Wang HJ. Production of DNA double-strand breaks by interactions between carboplatin and radiation: a potential mechanism for radiopotential. *Radiat Res* 1995;143(3):309-15.
 41. Frit P, Canitrot Y, Muller C, *et al.* Cross-resistance to ionizing radiation in a murine leukemic cell line resistant to cis-dichlorodiammineplatinum(II): role of Ku autoantigen. *Mol Pharmacol* 1999;56(1):141-6.
 42. Turchi JJ, Henkels KM, Zhou Y. Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK. *Nucleic Acids Res* 2000;28(23):4634-41.
 43. Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* 2007;252(1):9-18.
 44. Giocanti N, Hennequin C, Balosso J, Mahler M, Favaudon V. DNA repair and cell cycle interactions in radiation sensitization by the topoisomerase II poison etoposide. *Cancer Res* 1993;53(9):2105-11.
 45. Yu YQ, Giocanti N, Averbeck D, Megnin-Chanet F, Favaudon V. Radiation-induced arrest of cells in G2 phase elicits hypersensitivity to DNA double-strand break inducers and an altered pattern of DNA cleavage upon re-irradiation. *Int J Radiat Biol* 2000;76(7):901-12.

-
46. Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res* 1998;58(19):4375-82.
 47. Reis C, Giocanti N, Hennequin C, *et al.* A role for PKCzeta in potentiation of the topoisomerase II activity and etoposide cytotoxicity by wortmannin. *Mol Cancer Ther* 2005;4(10):1457-64.
 48. Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988;6(10):1653-64.
 49. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):330-8.
 50. Brusco CE, Shewach DS, Lawrence TS. Fluorodeoxyuridine-induced radiosensitization and inhibition of DNA double strand break repair in human colon cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19(6):1411-7.
 51. Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J. Dependence of 5-fluorouracil-mediated radiosensitization on DNA-directed effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29(3):519-23.
 52. Davis MA, Tang HY, Maybaum J, Lawrence TS. Dependence of fluorodeoxyuridine-mediated radiosensitization on S phase progression. *Int J Radiat Biol* 1995;67(5):509-17.
 53. McGinn CJ, Shewach DS, Lawrence TS. Radiosensitizing nucleosides. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(17):1193-203.
 54. Schlemmer HP, Becker M, Bachert P, *et al.* Alterations of intratumoral pharmacokinetics of 5-fluorouracil in head and neck carcinoma during simultaneous radiochemotherapy. *Cancer Res* 1999;59(10):2363-9.
 55. Shewach DS, Hahn TM, Chang E, Hertel LW, Lawrence TS. Metabolism of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1994;54(12):3218-23.
 56. Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, Hertel LW, Shewach DS. Radiosensitization of pancreatic cancer cells by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34(4):867-72.
 57. Lawrence TS, Davis MA, Hough A, Rehemtulla A. The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)-mediated radiosensitization. *Clin Cancer Res* 2001;7(2):314-9.
 58. Sinclair WK, Morton RA. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1966;29(3):450-74.
 59. Hennequin C, Giocanti N, Balosso J, Favaudon V. Interaction of ionizing radiation with the topoisomerase I poison camptothecin in growing V-79 and HeLa cells. *Cancer Res* 1994;54(7):1720-8.
 60. Choy H, Rodriguez FF, Koester S, Hilsenbeck S, Von Hoff DD. Investigation of taxol as a potential radiation sensitizer. *Cancer* 1993;71(11):3774-8.
 61. Hennequin C, Giocanti N, Favaudon V. Interaction of ionizing radiation with paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) in HeLa and SQ20B cells. *Cancer Res* 1996;56(8):1842-50.
 62. Milas L, Hunter NR, Mason KA, Milross CG, Saito Y, Peters LJ. Role of reoxygenation in induction of enhancement of tumor radioresponse by paclitaxel. *Cancer Res* 1995;55(16):3564-8.
 63. Young JA, Maruyama Y. 5-fluorouracil uptake by irradiation perturbed tumor. *Oncology* 1981;38(3):138-43.
 64. Yang LX, Douple EB, Wang HJ. Irradiation enhances cellular uptake of carboplatin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33(3):641-6.
 65. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133(2):275-88.
 66. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, *et al.* Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300(5622):1155-9.
 67. Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* 2004;5(5):405-6.
 68. Hanna NN, Seetharam S, Mauceri HJ, *et al.* Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 2000;6(5):287-93.

-
69. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The oncologist* 2004;9 Suppl 1:2-10.
 70. Gupta VK, Jaskowiak NT, Beckett MA, *et al.* Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance. *Cancer journal* (Sudbury, Mass 2002;8(1):47-54.
 71. Wachsberger P, Burd R, Dicker AP. Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: exploring mechanisms of interaction. *Clin Cancer Res* 2003;9(6):1957-71.
 72. Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23(2):457-67.
 73. Schmidt-Ullrich RK, Contessa JN, Dent P, *et al.* Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. *Radiation oncology investigations* 1999;7(6):321-30.
 74. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000;19(56):6550-65.
 75. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J, Alsner J, Overgaard J. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58(2):561-6.
 76. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The lancet oncology* 2003;4(9):529-36.
 77. Rischin D, Peters LJ, O'Sullivan B, *et al.* Tirapazamine, Cisplatin, and Radiation Versus Cisplatin and Radiation for Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (TROG 02.02, HeadSTART): A Phase III Trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol* 2010;JCO.2009.27.4449.
 78. Cole K, Kohn E. Calcium-mediated signal transduction: biology, biochemistry, and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13(1):31-44.
 79. Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Developmental biology* 1965;12(3):394-407.
 80. Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 1980;255(10):4834-42.
 81. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(2):127-37.
 82. Mosesson Y, Yarden Y. Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy. *Seminars in cancer biology* 2004;14(4):262-70.
 83. Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6(11):876-85.
 84. Thomas SM, Coppelli FM, Wells A, *et al.* Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003;63(17):5629-35.
 85. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(17):2666-72.
 86. Lin SY, Makino K, Xia W, *et al.* Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature cell biology* 2001;3(9):802-8.
 87. Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, *et al.* Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2005;280(35):31182-9.
 88. Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer* 2006;94(2):184-8.
 89. Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol* 2010;186(1):1-6.
 90. Warren CM, Landgraf R. Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 2006;18(7):923-33.
 91. Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, *et al.* Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 1987;51(6):1063-70.

-
92. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987;237(4811):178-82.
 93. Rosenthal A, Lindquist PB, Bringman TS, Goeddel DV, Derynck R. Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- α cDNA results in transformation. *Cell* 1986;46(2):301-9.
 94. Watanabe S, Lazar E, Sporn MB. Transformation of normal rat kidney (NRK) cells by an infectious retrovirus carrying a synthetic rat type α transforming growth factor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(5):1258-62.
 95. Normanno N, De Luca A, Bianco C, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006;366(1):2-16.
 96. Zhang L, Yuan SZ. Expression of *c-erbB-2* oncogene protein, epidermal growth factor receptor, and TGF- β 1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1(4):620-3.
 97. Tobita K, Kijima H, Dowaki S, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *Int J Mol Med* 2003;11(3):305-9.
 98. Ueda S, Ogata S, Tsuda H, *et al.* The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2004;29(1):e1-8.
 99. Immervoll H, Hoem D, Kugarajh K, Steine SJ, Molven A. Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes. *Virchows Arch* 2006;448(6):788-96.
 100. Tzeng CW, Frolov A, Frolova N, *et al.* EGFR genomic gain and aberrant pathway signaling in pancreatic cancer patients. *J Surg Res* 2007;143(1):20-6.
 101. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
 102. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350(21):2129-39.
 103. Paez JG, Janne PA, Lee JC, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304(5676):1497-500.
 104. Weiner LM, O'Dwyer J, Kitson J, *et al.* Phase I evaluation of an anti-breast carcinoma monoclonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate. *Cancer Res* 1989;49(14):4062-7.
 105. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, *et al.* Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997;15(10):1191-7.
 106. Toulany M, Dittmann K, Kruger M, Baumann M, Rodemann HP. Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiother Oncol* 2005;76(2):143-50.
 107. Kwok TT, Sutherland RM. Enhancement of sensitivity of human squamous carcinoma cells to radiation by epidermal growth factor. *J Natl Cancer Inst* 1989;81(13):1020-4.
 108. Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29(2):243-7.
 109. Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Goldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. *Biochimica et biophysica acta* 1996;1314(1-2):147-56.
 110. Milas L, Fan Z, Andratschke NH, Ang KK. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58(3):966-71.
 111. Ang KK, Berkey BA, Tu X, *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62(24):7350-6.

-
112. Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res* 1996;56(16):3666-9.
 113. Dent P, Reardon DB, Park JS, *et al.* Radiation-induced release of transforming growth factor alpha activates the epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase pathway in carcinoma cells, leading to increased proliferation and protection from radiation-induced cell death. *Molecular biology of the cell* 1999;10(8):2493-506.
 114. Contessa JN, Hampton J, Lammering G, *et al.* Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* 2002;21(25):4032-41.
 115. Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000;6(6):2166-74.
 116. Harari PM, Huang SM. Modulation of molecular targets to enhance radiation. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):323-5.
 117. Rodemann HP, Dittmann K, Toulany M. Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int J Radiat Biol* 2007;83(11-12):781-91.
 118. Toulany M, Kasten-Pisula U, Brammer I, *et al.* Blockage of epidermal growth factor receptor-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling increases radiosensitivity of K-RAS mutated human tumor cells in vitro by affecting DNA repair. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):4119-26.
 119. Friedmann BJ, Caplin M, Savic B, *et al.* Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol Cancer Ther* 2006;5(2):209-18.
 120. Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol* 2005;76(2):157-61.
 121. Saleh MN, Raisch KP, Stackhouse MA, *et al.* Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFr antibody C225 and radiation. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 1999;14(6):451-63.
 122. Milas L, Mason K, Hunter N, *et al.* In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):701-8.
 123. Solomon B, Hagekyriakou J, Trivett MK, Stacker SA, McArthur GA, Cullinane C. EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. Epidermal growth factor receptor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55(3):713-23.
 124. Nyati MK, Maheshwari D, Hanasoge S, *et al.* Radiosensitization by pan ErbB inhibitor CI-1033 in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2004;10(2):691-700.
 125. Li J, Lin ML, Wiepaz GJ, Guadarrama AG, Bertics PJ. Integrin-mediated migration of murine B82L fibroblasts is dependent on the expression of an intact epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1999;274(16):11209-19.
 126. Raben D, Helfrich B, Bunn PA, Jr. Targeted therapies for non-small-cell lung cancer: biology, rationale, and preclinical results from a radiation oncology perspective. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59(2 Suppl):27-38.
 127. Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, *et al.* Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(13):3234-43.
 128. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354(6):567-78.
 129. Matar P, Rojo F, Cassia R, *et al.* Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 2004;10(19):6487-501.
 130. Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM. Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res* 2004;64(15):5355-62.

-
131. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The lancet oncology* 2010;11(1):21-8.
 132. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, *et al.* Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* %R 101200/JCO2006079525 2007;25(15):1960-6.
 133. Nishioka T, West CM, Gupta N, *et al.* Prognostic significance of c-erbB-2 protein expression in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Journal of cancer research and clinical oncology* 1999;125(2):96-100.
 134. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* 2000;6(4):443-6.
 135. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):341-54.
 136. Klapper LN, Vaisman N, Hurwitz E, Pinkas-Kramarski R, Yarden Y, Sela M. A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to ErbB-2/HER2 blocks crosstalk with growth factor receptors. *Oncogene* 1997;14(17):2099-109.
 137. Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene* 1999;18(3):731-8.
 138. Kuwada SK, Scaife CL, Kuang J, *et al.* Effects of trastuzumab on epidermal growth factor receptor-dependent and -independent human colon cancer cells. *International journal of cancer* 2004;109(2):291-301.
 139. Friedman LM, Rinon A, Schechter B, *et al.* Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of mAbs: implications for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(6):1915-20.
 140. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-92.
 141. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, Wongvipat PN, Lee HJ, Slamon DJ. Monoclonal antibody to HER-2/neureceptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res* 1999;59(6):1347-55.
 142. Rodriguez-Viciana P, Sabatier C, McCormick F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 2004;24(11):4943-54.
 143. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol* 1999;9(12):M53-6.
 144. Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998;273(37):24052-6.
 145. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;441(7092):424-30.
 146. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49(17):4682-9.
 147. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66(8):3992-5.
 148. Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 2001;104(4):593-604.
 149. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6(4):313-9.
 150. Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54.
 151. Pirolo KF, Hao Z, Rait A, Ho CW, Chang EH. Evidence supporting a signal transduction pathway leading to the radiation-resistant phenotype in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230(1):196-201.
 152. Russell JS, Lang FF, Huet T, *et al.* Radiosensitization of human tumor cell lines induced by the adenovirus-mediated expression of an anti-Ras single-chain antibody fragment. *Cancer Res* 1999;59(20):5239-44.

-
153. Bernhard EJ, Kao G, Cox AD, *et al.* The farnesyltransferase inhibitor FTI-277 radiosensitizes H-ras-transformed rat embryo fibroblasts. *Cancer Res* 1996;56(8):1727-30.
154. Yacoub A, Park MA, Hanna D, *et al.* OSU-03012 promotes caspase-independent but PERK-, cathepsin B-, BID-, and AIF-dependent killing of transformed cells. *Mol Pharmacol* 2006;70(2):589-603.
155. Ihle NT, Paine-Murrieta G, Berggren MI, *et al.* The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* 2005;4(9):1349-57.
156. Gupta AK, Bernhard EJ, Bakanauskas VJ, Wu J, Muschel RJ, McKenna WG. RAS-Mediated radiation resistance is not linked to MAP kinase activation in two bladder carcinoma cell lines. *Radiat Res* 2000;154(1):64-72.
157. Kim IA, Bae SS, Fernandes A, *et al.* Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2005;65(17):7902-10.
158. Brunner TB, Cengel KA, Hahn SM, *et al.* Pancreatic cancer cell radiation survival and prenyltransferase inhibition: the role of K-Ras. *Cancer Res* 2005;65(18):8433-41.
159. Caron RW, Yacoub A, Zhu X, *et al.* H-RAS V12-induced radioresistance in HCT116 colon carcinoma cells is heregulin dependent. *Mol Cancer Ther* 2005;4(2):243-55.
160. Caron RW, Yacoub A, Mitchell C, *et al.* Radiation-stimulated ERK1/2 and JNK1/2 signaling can promote cell cycle progression in human colon cancer cells. *Cell Cycle* 2005;4(3):456-64.
161. Caron RW, Yacoub A, Li M, *et al.* Activated forms of H-RAS and K-RAS differentially regulate membrane association of PI3K, PDK-1, and AKT and the effect of therapeutic kinase inhibitors on cell survival. *Mol Cancer Ther* 2005;4(2):257-70.
162. Grana TM, Rusyn EV, Zhou H, Sartor CI, Cox AD. Ras mediates radioresistance through both phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-independent signaling pathways. *Cancer Res* 2002;62(14):4142-50.
163. Cengel KA, Voong KR, Chandrasekaran S, *et al.* Oncogenic K-Ras signals through epidermal growth factor receptor and wild-type H-Ras to promote radiation survival in pancreatic and colorectal carcinoma cells. *Neoplasia* 2007;9(4):341-8.
164. Cortot A, Armand JP, Soria JC. [PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors]. *Bull Cancer* 2006;93(1):19-26.
165. Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *Embo J* 1996;15(10):2442-51.
166. Grant S, Qiao L, Dent P. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. *Front Biosci* 2002;7:d376-89.
167. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005;16(4):525-37.
168. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(3):802-7.
169. Altomare DA, Lyons GE, Mitsuuchi Y, Cheng JQ, Testa JR. Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* 1998;16(18):2407-11.
170. Mhashilkar AM, Stewart AL, Sieger K, *et al.* MDA-7 negatively regulates the beta-catenin and PI3K signaling pathways in breast and lung tumor cells. *Mol Ther* 2003;8(2):207-19.
171. Dote H, Burgan WE, Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of hsp90 compromises the DNA damage response to radiation. *Cancer Res* 2006;66(18):9211-20.
172. Toulany M, Kehlback R, Florczak U, *et al.* Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol Cancer Ther* 2008;7(7):1772-81.
173. Mende I, Malstrom S, Tschlis PN, Vogt PK, Aoki M. Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. *Oncogene* 2001;20(32):4419-23.

-
174. Carpten JD, Faber AL, Horn C, *et al.* A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007;448(7152):439-44.
 175. Lee CM, Fuhrman CB, Planelles V, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006;12(1):250-6.
 176. Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, *et al.* Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther* %R 101158/1535-7163MCT-06-0596 2007;6(3):789-801.
 177. Gottschalk AR, Doan A, Nakamura JL, Stokoe D, Haas-Kogan DA. Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase causes increased sensitivity to radiation through a PKB-dependent mechanism. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63(4):1221-7.
 178. Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 1999;9:179-86.
 179. Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 2002;108(2):247-59.
 180. Nagar B, Hantschel O, Young MA, *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 2003;112(6):859-71.
 181. Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, *et al.* Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(13):7457-62.
 182. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(1):33-44.
 183. Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, *et al.* Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 1997;387(6632):516-9.
 184. Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, *et al.* Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* 1998;273(7):3799-802.
 185. Henning W, Sturzbecher HW. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology* 2003;193(1-2):91-109.
 186. Daboussi F, Dumay A, Delacote F, Lopez BS. DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal* 2002;14(12):969-75.
 187. Chen G, Yuan SS, Liu W, *et al.* Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem* 1999;274(18):12748-52.
 188. Foray N, Marot D, Randrianarison V, *et al.* Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Mol Cell Biol* 2002;22(12):4020-32.
 189. Wang JY. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(1):35-43.
 190. Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D. Functional role for the c-Abl protein tyrosine kinase in the cellular response to genotoxic stress. *Biochimica et biophysica acta* 1997;1333(2):O1-7.
 191. Ben-Yehoyada M, Ben-Dor I, Shaul Y. c-Abl tyrosine kinase selectively regulates p73 nuclear matrix association. *J Biol Chem* 2003;278(36):34475-82.
 192. White E, Prives C. DNA damage enables p73. *Nature* 1999;399(6738):734-5, 7.
 193. Chen X, Zheng Y, Zhu J, Jiang J, Wang J. p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene* 2001;20(6):769-74.
 194. Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999;399(6738):809-13.
 195. Wang JY. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 2000;19(49):5643-50.
 196. Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast AM. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 1994;266(5182):129-33.
 197. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 1993;13(12):7587-95.
 198. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(10):3343-56.
 199. Voncken JW, Baram TZ, Gonzales-Gomez II, *et al.* Abnormal stress response and increased fighting behavior in mice lacking the bcr gene product. *Int J Mol Med* 1998;2(5):577-83.
 200. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 1960;25:85-109.

-
201. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996;88(7):2375-84.
 202. Van Etten RA. Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leuk Res* 2004;28 Suppl 1:21-8.
 203. Uemura N, Griffin JD. The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. *J Biol Chem* 1999;274(53):37525-32.
 204. Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 1996;84(3):331-4.
 205. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 2000;96(6):2269-76.
 206. Skorski T. BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* 2002;21(56):8591-604.
 207. Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, *et al.* BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 2001;8:795-806.
 208. Vispe S, Cazaux C, Lesca C, Defais M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* 1998;26:2859-64.
 209. Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, *et al.* Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22(12):4189-201.
 210. Deutsch E, Dugray A, Abdul-Karim B, *et al.* BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 2001;97:2084-90.
 211. Roskoski R, Jr. STI-571: an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309(4):709-17.
 212. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(7):493-502.
 213. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344(14):1031-7.
 214. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, *et al.* Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;346(9):645-52.
 215. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348(11):994-1004.
 216. Verweij J, van Oosterom A, Blay JY, *et al.* Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur J Cancer* 2003;39:2006-11.
 217. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, *et al.* Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347(7):472-80.
 218. Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, *et al.* Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2003;101(2):473-5.
 219. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293(5531):876-80.
 220. Guérin S, Hill C. L'épidémiologie des cancers en France en 2010 : comparaison avec les États-Unis. *Bull Cancer* 2010;97(1):47-54.
 221. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008;56(3):159-75.
 222. Gold EB, Goldin SB. Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 1998;7(1):67-91.
 223. Hruban RH, Petersen GM, Goggins M, *et al.* Familial pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999;10(Suppl 4):69-73.
 224. Kalsner MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 1985;120(8):899-903.
 225. Klinkenbijnl JH, Jeekel J, Sahnoud T, *et al.* Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of

the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* 1999;230(6):776-82; discussion 82-4.

226. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, *et al.* A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004;350(12):1200-10.

227. Stocken DD, Buchler MW, Dervenis C, *et al.* Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2005;92(8):1372-81.

228. Oettle H, Post S, Neuhaus P, *et al.* Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama* 2007;297(3):267-77.

229. Neoptolemos J, Buchler M, Stocken DD, *et al.* ESPAC-3(v2): A multicenter, international, open-label, randomized, controlled phase III trial of adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid (5-FU/FA) versus gemcitabine (GEM) in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2009;27(18S):LBA4505-.

230. Van Laethem J, Van Cutsem E, Hammel P, *et al.* Adjuvant chemotherapy alone versus chemoradiation after curative resection for pancreatic cancer : feasibility results of a randomised EORTC/FFCD/GERCOR phase II/III study (40013/22012/0304). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2008;26(15_suppl):4514-.

231. Le Scodan R, Mornex F, Girard N, *et al.* Preoperative chemoradiation in potentially resectable pancreatic adenocarcinoma: feasibility, treatment effect evaluation and prognostic factors, analysis of the SFRO-FFCD 9704 trial and literature review. *Ann Oncol* 2009;20(8):1387-96.

232. Evans DB, Varadhachary GR, Crane CH, *et al.* Preoperative gemcitabine-based chemoradiation for patients with resectable adenocarcinoma of the pancreatic head. *J Clin Oncol* 2008;26(21):3496-502.

233. Varadhachary GR, Wolff RA, Crane CH, *et al.* Preoperative gemcitabine and cisplatin followed by gemcitabine-based chemoradiation for resectable adenocarcinoma of the pancreatic head. *J Clin Oncol* 2008;26(21):3487-95.

234. Huguet F, Girard N, Guerche CS, Hennequin C, Mornex F, Azria D. Chemoradiotherapy in the management of locally advanced pancreatic carcinoma: a qualitative systematic review. *J Clin Oncol* 2009;27(13):2269-77.

235. Chauffert B, Mornex F, Bonnetain F, *et al.* Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. Definitive results of the 2000-01 FFCD/SFRO study. *Ann Oncol* 2008;19(9):1592-9.

236. Loehrer PJ, Powell ME, Cardenes HR, *et al.* A randomized phase III study of gemcitabine in combination with radiation therapy versus gemcitabine alone in patients with localized, unresectable pancreatic cancer: E4201. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2008;26:4506.

237. Huguet F, Andre T, Hammel P, *et al.* Impact of chemoradiotherapy after disease control with chemotherapy in locally advanced pancreatic adenocarcinoma in GERCOR phase II and III studies. *J Clin Oncol* 2007;25(3):326-31.

238. Krishnan S, Rana V, Janjan NA, *et al.* Induction chemotherapy selects patients with locally advanced, unresectable pancreatic cancer for optimal benefit from consolidative chemoradiation therapy. *Cancer* 2007;110(1):47-55.

239. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15(6):2403-13.

240. Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003;186(3):279-86.

241. Loukopoulos P, Kanetaka K, Takamura M, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* 2004;29(3):193-203.

242. Danovi SA, Wong HH, Lemoine NR. Targeted therapies for pancreatic cancer. *British medical bulletin* 2008;87:97-130.

-
243. Luttgies J, Reinecke-Luthge A, Mollmann B, *et al.* Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch* 1999;435(5):461-8.
244. Gerdes B, Ramaswamy A, Kersting M, *et al.* p16(INK4a) alterations in chronic pancreatitis-indicator for high-risk lesions for pancreatic cancer. *Surgery* 2001;129(4):490-7.
245. Fukushima N, Sato N, Ueki T, *et al.* Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American journal of pathology* 2002;160(5):1573-81.
246. Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC gastroenterology* 2005;5:22.
247. Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, *et al.* DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996;56(11):2527-30.
248. Tzeng CW, Frolov A, Frolova N, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) is highly conserved in pancreatic cancer. *Surgery* 2007;141(4):464-9.
249. Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Buchler M, Beger HG, Korc M. Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res* 1993;13(3):565-9.
250. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, *et al.* Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1936-48.
251. Baker CH, Solorzano CC, Fidler IJ. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2002;62(7):1996-2003.
252. Huang ZQ, Buchsbaum DJ, Raisch KP, Bonner JA, Bland KI, Vickers SM. Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody. *J Surg Res* 2003;111(2):274-83.
253. Durkin AJ, Osborne DA, Yeatman TJ, Rosemurgy AS, Armstrong C, Zervos EE. EGF receptor antagonism improves survival in a murine model of pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Res* 2006;135(1):195-201.
254. Moore MJ, da Cunha Santos G, Kamel-Reid S, *et al.* The relationship of K-ras mutations and EGFR gene copy number to outcome in patients treated with Erlotinib on National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial study PA.3. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2007;25(18_suppl):4521-.
255. Ali S, El-Rayes BF, Sarkar FH, Philip PA. Simultaneous targeting of the epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways for pancreatic cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2005;4(12):1943-51.
256. El-Rayes BF, Ali S, Ali IF, Philip PA, Abbruzzese J, Sarkar FH. Potentiation of the effect of erlotinib by genistein in pancreatic cancer: the role of Akt and nuclear factor-kappaB. *Cancer Res* 2006;66(21):10553-9.
257. Jimeno A, Tan AC, Coffa J, *et al.* Coordinated epidermal growth factor receptor pathway gene overexpression predicts epidermal growth factor receptor inhibitor sensitivity in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2008;68(8):2841-9.
258. Pino MS, Shrader M, Baker CH, *et al.* Transforming growth factor alpha expression drives constitutive epidermal growth factor receptor pathway activation and sensitivity to gefitinib (Iressa) in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 2006;66(7):3802-12.
259. Buck E, Eyzaguirre A, Haley JD, Gibson NW, Cagnoni P, Iwata KK. Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2006;5(8):2051-9.
260. Frolov A, Schuller K, Tzeng CW, *et al.* ErbB3 expression and dimerization with EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib. *Cancer Biol Ther* 2007;6(4):548-54.
261. Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, *et al.* Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. *Mol Cancer Ther* 2007;6(2):532-41.
262. Safran H, Steinhoff M, Mangray S, *et al.* Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 2001;24(5):496-9.

-
263. Novotny J, Petruzalka L, Vedralova J, Kleibl Z, Matous B, Juda L. Prognostic significance of c-erbB-2 gene expression in pancreatic cancer patients. *Neoplasma* 2001;48(3):188-91.
264. Koka V, Potti A, Koch M, Fraiman G, Mehdi S, Levitt R. Role of immunohistochemical identification of Her-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22(3):1593-7.
265. Hermanova M, Lukas Z, Nenutil R, *et al.* Amplification and overexpression of HER-2/neu in invasive ductal carcinomas of the pancreas and pancreatic intraepithelial neoplasms and the relationship to the expression of p21(WAF1/CIP1). *Neoplasma* 2004;51(2):77-83.
266. Saxby AJ, Nielsen A, Scarlett CJ, *et al.* Assessment of HER-2 status in pancreatic adenocarcinoma: correlation of immunohistochemistry, quantitative real-time RT-PCR, and FISH with aneuploidy and survival. *Am J Surg Pathol* 2005;29(9):1125-34.
267. Kimura K, Sawada T, Komatsu M, *et al.* Antitumor effect of trastuzumab for pancreatic cancer with high HER-2 expression and enhancement of effect by combined therapy with gemcitabine. *Clin Cancer Res* 2006;12(16):4925-32.
268. Sharif S, Ramanathan RK, Potter D, Cieply K, Krasinskas AM. HER2 gene amplification and chromosome 17 copy number do not predict survival of patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2008;53(11):3026-32.
269. Safran H, Iannitti D, Ramanathan R, *et al.* Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu. *Cancer Invest* 2004;22(5):706-12.
270. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5(1):119-27.
271. Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, *et al.* Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 2003;22(21):3243-51.
272. Pan X, Arumugam T, Yamamoto T, *et al.* Nuclear factor-kappaB p65/relA silencing induces apoptosis and increases gemcitabine effectiveness in a subset of pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(24):8143-51.
273. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;59(5):987-90.
274. Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML, Sinicrope FA. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 1999;59(17):4356-62.
275. Tseng WW, Deganutti A, Chen MN, Saxton RE, Liu CD. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) induces expression of cell cycle arrest genes and slows tumor growth in human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2002;6(6):838-43; discussion 44.
276. Yip-Schneider MT, Sweeney CJ, Jung SH, Crowell PL, Marshall MS. Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2001;298(3):976-85.
277. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002;62(3):625-31.
278. Rockwell S. Effects of clumps and clusters on survival measurements with clonogenic assays. *Cancer Res* 1985;45(4):1601-7.
279. Lemoli RM, Fortuna A, Tafuri A, *et al.* Interleukin-9 stimulates the proliferation of human myeloid leukemic cells. *Blood* 1996;87(9):3852-9.
280. Tsao YP, D'Arpa P, Liu LF. The involvement of active DNA synthesis in camptothecin-induced G2 arrest: altered regulation of p34cdc2/cyclin B. *Cancer Res* 1992;52(7):1823-9.
281. Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T, Lydon NB, Traxler P. Phenylamino-pyrimidine (PAP)-derivatives : a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 1996;6:1221-6.

-
282. Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T, Lydon NB. Potent and selective inhibitors of the Abl-kinases: phenylamino-pyrimidine (PAP)-derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 1997;7:187-92.
283. Noble ME, Endicott JA, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 2004;303(5665):1800-5.
284. Li D, Ambrogio L, Shimamura T, *et al.* BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 2008;27(34):4702-11.
285. Eskens FA, Mom CH, Planting AS, *et al.* A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2008;98(1):80-5.
286. Piret B, Schoonbroodt S, Piette J. The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage. *Oncogene* 1999;18(13):2261-71.
287. Demarcq C, Bastian G, Remvikos Y. BrdUrd/DNA flow cytometry analysis demonstrates cis-diamminedichloroplatinum (II)-induced multiple cell-cycle modifications on human lung carcinoma cells. *Cytometry* 1992;13(4):416-22.
288. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997;27(1):1-20.
289. Dimri GP, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(20):9363-7.
290. Jacquelin A, Herrant M, Legros L, *et al.* Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *Faseb J* 2003;17(14):2160-2.
291. Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Saito S, *et al.* Ectopic cyclin D1 expression blocks STI571-induced erythroid differentiation of K562 cells. *Leuk Res* 2004;28(6):623-9.
292. Nagy K, Pasti G, Bene L, Nagy I. Involvement of Fenton reaction products in differentiation induction of K562 human leukemia cells. *Leuk Res* 1995;19(3):203-12.
293. Burger PE, Dowdle EB, Lukey PT, Wilson EL. Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor beta-mediated erythroid differentiation in K562 cells. *Blood* 1994;83(7):1808-12.
294. Sattler M, Verma S, Shrikhande G, *et al.* The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2000;275:24273-8.
295. Uemura N, Griffin JD. The ABL kinase inhibitor STI571 does not affect survival of hematopoietic cells after ionizing radiation. *Blood* 2000;96:3294-5.
296. Nowicki MO, Falinski R, Koptyra M, *et al.* BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* 2004;104(12):3746-53.
297. Kumar S, Mishra N, Raina D, Saxena S, Kufe D. Abrogation of the cell death response to oxidative stress by the c-Abl tyrosine kinase inhibitor STI571. *Mol Pharmacol* 2003;63:276-82.
298. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, *et al.* Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 1998;17(18):5497-508.
299. Koike M, Awaji T, Kataoka M, *et al.* Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 22):4031-9.
300. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-36.
301. Lumpkin CK, Jr., McClung JK, Pereira-Smith OM, Smith JR. Existence of high abundance antiproliferative mRNA's in senescent human diploid fibroblasts. *Science* 1986;232(4748):393-5.
302. Park JI, Jeong JS, Han JY, *et al.* Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2000;126(8):455-60.

-
303. Mancini M, Brusa G, Benvenuti M, *et al.* The p210BCR-ABL tyrosine kinase of chronic myeloid leukemia causes resistance to radio-induced apoptotic death by inhibiting the proapoptotic BAX gene. *Leukemia* 2004;18(2):370-2.
304. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, *et al.* BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995;86:1148-58.
305. Nishii K, Kabarowski JH, Gibbons DL, *et al.* ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 1996;13(10):2225-34.
306. Kharbanda S, Yuan ZM, Rubin E, Weichselbaum R, Kufe D. Activation of Src-like p56/p53lyn tyrosine kinase by ionizing radiation. *J Biol Chem* 1994;269(32):20739-43.
307. Uckun FM, Tuel-Ahlgren L, Waddick KG, *et al.* Physical and functional interactions between Lyn and p34cdc2 kinases in irradiated human B-cell precursors. *J Biol Chem* 1996;271(11):6389-97.
308. Kharbanda S, Saleem A, Yuan ZM, *et al.* Nuclear signaling induced by ionizing radiation involves colocalization of the activated p56/p53lyn tyrosine kinase with p34cdc2. *Cancer Res* 1996;56(16):3617-21.
309. Topaly J, Fruehauf S, Ho AD, Zeller WJ. Rationale for combination therapy of chronic myelogenous leukaemia with imatinib and irradiation or alkylating agents: implications for pretransplant conditioning. *Br J Cancer* 2002;86(9):1487-93.
310. Russell JS, Brady K, Burgan WE, *et al.* Gleevec-mediated inhibition of Rad51 expression and enhancement of tumor cell radiosensitivity. *Cancer Res* 2003;63(21):7377-83.
311. Holdhoff M, Kreuzer KA, Appelt C, *et al.* Imatinib mesylate radiosensitizes human glioblastoma cells through inhibition of platelet-derived growth factor receptor. *Blood Cells Mol Dis* 2005;34:181-5.
312. Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J. Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur J Cancer* 2002;38 Suppl 5:S28-36.
313. Quick QA, Gewirtz DA. Enhancement of radiation sensitivity, delay of proliferative recovery after radiation and abrogation of MAPK (p44/42) signaling by imatinib in glioblastoma cells. *International journal of oncology* 2006;29(2):407-12.
314. Oertel S, Krempien R, Lindel K, *et al.* Human glioblastoma and carcinoma xenograft tumors treated by combined radiation and imatinib (Gleevec). *Strahlenther Onkol* 2006;182(7):400-7.
315. Geng L, Shinohara ET, Kim D, *et al.* STI571 (Gleevec) improves tumor growth delay and survival in irradiated mouse models of glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:263-71.
316. Podtcheko A, Ohtsuru A, Namba H, *et al.* Inhibition of ABL tyrosine kinase potentiates radiation-induced terminal growth arrest in anaplastic thyroid cancer cells. *Radiat Res* 2006;165:35-42.
317. Bartkowiak D, Hipp PR, Mendonca MS, Rottinger EM. A radioprotective effect of imatinib (Gleevec) in human squamous carcinoma cells. *Strahlenther Onkol* 2007;183(8):432-9.
318. Xu Y, Fang F, Sun Y, St Clair DK, St Clair WH. RelB-dependent differential radiosensitization effect of STI571 on prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2010;9(4):803-12.
319. Komoto M, Nakata B, Nishii T, *et al.* In vitro and in vivo evidence that a combination of lapatinib plus S-1 is a promising treatment for pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2010;101(2):468-73.
320. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, *et al.* Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009;27(9):2059-68.
321. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase / AKT pathways. *Oncogene* 2005;24(50):7443-54.
322. Nakajima S, Doi R, Toyoda E, *et al.* N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(12 Pt 1):4125-33.
323. Monnier L, Milano G, Penault-Llorca F, Merlin JL. [Targeting of membrane receptor tyrosine kinases: is there resistance in the HER?]. *Bull Cancer* 2004;91(9):685-94.

-
324. Soltoff SP, Carraway KL, 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1994;14(6):3550-8.
325. Sergina NV, Rausch M, Wang D, *et al.* Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445(7126):437-41.
326. Kimple RJ, Vaseva AV, Cox AD, *et al.* Radiosensitization of epidermal growth factor receptor/HER2-positive pancreatic cancer is mediated by inhibition of Akt independent of ras mutational status. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):912-23.
327. Larbouret C, Robert B, Navarro-Teulon I, *et al.* In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007;13(11):3356-62.
328. Larbouret C, Robert B, Bascoul-Mollevis C, *et al.* Combined cetuximab and trastuzumab are superior to gemcitabine in the treatment of human pancreatic carcinoma xenografts. *Ann Oncol* 2010;21(1):98-103.
329. Sartor CI. Mechanisms of disease: Radiosensitization by epidermal growth factor receptor inhibitors. *Nature clinical practice* 2004;1(2):80-7.
330. Diaz R, Nguewa PA, Parrondo R, *et al.* Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC cancer* 2010;10(1):188.
331. Fernet M, Megnin-Chanet F, Hall J, Favaudon V. Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper-radiosensitivity. *DNA Repair (Amst)* 2010;9(1):48-57.
332. Li D, Zhu J, Firozi PF, *et al.* Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):991-7.
333. Warner SL, Munoz RM, Stafford P, *et al.* Comparing Aurora A and Aurora B as molecular targets for growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5(10):2450-8.
334. Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 2005;5(1):42-50.
335. Hung LY, Tseng JT, Lee YC, *et al.* Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res* 2008;36(13):4337-51.
336. Wan XB, Fan XJ, Chen MY, *et al.* Inhibition of Aurora-A results in increased cell death in 3-dimensional culture microenvironment, reduced migration and is associated with enhanced radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009;8(15):1500-6.
337. Tao Y, Leteur C, Calderaro J, *et al.* The aurora B kinase inhibitor AZD1152 sensitizes cancer cells to fractionated irradiation and induces mitotic catastrophe. *Cell Cycle* 2009;8(19):3172-81.

RÉSUMÉ

Les associations chimioradiothérapies occupent une place importante dans le traitement des cancers. De nouveaux médicaments ciblent spécifiquement la cellule tumorale. Ces thérapies ciblées peuvent agir sur les mécanismes de radiorésistance tumorale et sont prometteuses en association avec la radiothérapie. Le STI571 (imatinib ou Glivec®) inhibe spécifiquement l'activité tyrosine kinase de Bcr-Abl. Il entraîne une radiosensibilisation dans la lignée de leucémie myéloïde chronique K562 en agissant sur le cycle cellulaire. Le BIBW2992 est un inhibiteur sélectif d'EGFR et HER2, responsable d'une cytotoxicité et d'une radiosensibilisation des cellules d'adénocarcinome pancréatique BxPC3 et Capan-2, indépendamment de leur statut KRAS. Le mécanisme sous-jacent cette radiosensibilisation n'est pas univoque, faisant intervenir à la fois des modifications du cycle cellulaire et une induction de la mort mitotique. Nos résultats montrent que l'association d'un inhibiteur de tyrosine kinase aux radiations ionisantes peut entraîner une radiosensibilisation *in vitro* dont les mécanismes sont variables en fonction du type de lignée cellulaire.

Mots-clés : chimioradiothérapie, radiations ionisantes, radiosensibilisation, inhibiteur de tyrosine kinase, STI571, leucémie myéloïde chronique, BIBW 2998, cancer du pancréas, EGFR, HER2, KRAS.

ABSTRACT

Concurrent chemoradiation is one of the main weapon in the treatment of cancer. The targeted therapies may act on the mechanisms of tumor resistance to radiation and are therefore very promising in combination with radiotherapy. The STI571 (imatinib or Gleevec®) inhibits specifically the Bcr-Abl tyrosine kinase. It leads to radiosensitization in K562 chronic myeloid leukemia cell line by alterations of the cell cycle. The BIBW2992 is a selective inhibitor of EGFR and HER2. The BIBW 2992 shows cytotoxic and radiosensitizing effects on pancreatic adenocarcinoma cells BxPC3 and Capan-2, regardless of KRAS status. The mechanism underlying this radiosensitization is not unequivocal, involving both changes in the cell cycle and induction of mitotic death. Our results show that the combination of an inhibitor of tyrosine kinase with ionizing radiation may lead to a radiosensitization *in vitro* with mechanisms depending on the type of cell line.

Key-words: chemoradiation, ionizing radiation, radiosensitization, tyrosine kinase inhibitor, STI571, chronic myeloid leukemia, BIBW 2998, pancreatic adenocarcinoma, EGFR, HER2, KRAS.

Directeur de thèse et du laboratoire : Dr. Vincent Favaudon, U 612 Inserm
Institut Curie-Recherche, Bâts. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex

Tél. 01 69 86 31 88 vincent.favaudon@curie.u-psud.fr