



HAL
open science

Analyse du rôle de la voie p53 dans la réponse des sarcomes des tissus mous au traitement par TNF-alpha

Jane Muret

► **To cite this version:**

Jane Muret. Analyse du rôle de la voie p53 dans la réponse des sarcomes des tissus mous au traitement par TNF-alpha. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T111 . tel-00769958

HAL Id: tel-00769958

<https://theses.hal.science/tel-00769958>

Submitted on 4 Jan 2013

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.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

Année 2011

N°attribué par la bibliothèque



THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Médecine

Ecole Doctorale de rattachement : Ecole Doctorale de Cancérologie

*présentée et soutenue publiquement
par*

Jane MURET

le 16 décembre 2011

Titre :

***Analyse du rôle de la voie p53 dans la réponse des
sarcomes des tissus mous au traitement par TNF-alpha.***

Directeur de thèse : CHOUAIB Salem

JURY

Président : Pr Auclair Christian

Rapporteur : Pr Bellet Dominique

Rapporteur : Pr Blay Jean-Yves

Examineur : Dr Bénard Jean

RESUME EN FRANÇAIS

Introduction : Le TNF- α , impliqué dans l'inflammation et la défense de l'hôte, a aussi des propriétés anti-tumorales et est utilisé dans le traitement local des sarcomes des membres. P53 est un anti-oncogène dont la mutation est associée au développement de tumeurs. Des données expérimentales ont démontré une relation entre activité anti-tumorale de TNF- α et le statut de p53.

Matériel et méthodes : Notre objectif a été d'étudier en immunohistochimie le statut de p53 chez 110 patients atteints de sarcomes et traités par TNF- α . Ensuite, dans 8 sarcomes cultivés *ex-vivo*, nous avons étudié la localisation de l'apoptose induite par le TNF- α par microscopie confocale. Puis, dans 9 lignées de sarcomes humains, nous avons testé la relation p53/TNF- α en abrogeant p53 grâce à un sh-RNA, ou en utilisant des petites molécules telles que CP-31398 ou Nutlin-3a aptes à restaurer p53. Enfin, pour mieux comprendre les mécanismes de résistance au TNF- α , nous avons mesuré par méthode EMSA la liaison de NF- κ B à l'ADN et recherché par RT-PCR quels gènes de l'apoptose étaient différentiellement régulés.

Résultats : Le statut muté de p53 corrèle avec la réponse histologique au traitement par TNF- α chez l'homme. L'apoptose induite par le TNF- α est trouvée aussi bien au niveau de la cellule endothéliale que de la cellule tumorale. De plus, la réponse au TNF- α est modulée par le statut de p53 puisque dans les lignées étudiées, l'abrogation de p53 supprime celle-ci alors que la réparation d'une activité p53 permet de l'augmenter. Enfin, une potentialisation de l'apoptose induite par TNF- α est observée lorsqu'il est associé avec CP-31398 ou Nutlin-3a et elle corrèle avec la diminution de la liaison du NF- κ B à l'ADN. Une augmentation de l'expression des gènes RIPK2, TP53BP2 et GADD45 et une diminution de l'expression de TGF- β 1 et FAIM est observée lorsque l'association de Nutlin-3a et TNF- α est synergique sur la mort cellulaire.

Conclusions : Ces résultats suggèrent que l'utilisation de molécules capables de restaurer l'activité de p53 peut inverser la résistance des sarcomes des tissus mous au traitement par TNF- α . Dans ce contexte, des études cliniques pourraient exploiter cette approche pour l'utiliser dans le cadre des sarcomes particulièrement résistants aux traitements conventionnels ainsi que dans d'autres tumeurs.

Mots clés : TNF- α , apoptose, perfusion isolée de membre, sarcome des tissus mous, p53

TITRE EN ANGLAIS:

Role of p53 pathway in the response of soft tissue sarcomas to TNF-alpha treatment.

RESUME EN ANGLAIS

Introduction: Although named for its antitumor properties, TNF- α is implicated in a wide spectrum of diseases including chronic inflammation, autoimmunity and cancer. It is used for the loco regional treatment of limb's sarcoma. P53 is an anti-oncogene whose mutation is associated with tumour development. Experimental data demonstrated that TNF- α cytotoxic activity and p53 status are related.

Material and methods: Our objective was to study by immunohistochemistry the p53 status in 110 sarcoma patients treated by isolated limb perfusion with TNF- α . Then, we studied by confocal microscopy in 8 freshly obtained sarcoma tumours, the localization of apoptosis. Finally, in 9 sarcoma cell lines with different p53 status, we tested the p53/TNF- α relationship by abrogating p53 with a sh-RNA and by using small molecules known to restore p53 functions. To better understand the mechanisms of resistance to TNF- α , we measured by EMSA the NF- κ B-binding to DNA and with RT-PCR, we explored the regulation of some apoptosis related genes.

Results: We demonstrated a relationship between p53 status and the histological response to TNF- α use in humans. TNF- α induced apoptosis was present in endothelial cells as well as in the tumour cells. TNF- α cytotoxicity was dependent on the p53 status since in the cell lines studied, p53 abrogation reduced it and p53 restoration allowed it to increase. Moreover, a potentiation of TNF- α cytotoxic effect was observed when it was combined to CP-31398 or Nutlin-3a. The killing magnitude was therefore related to the decrease in the NF- κ B-binding to DNA when Nutlin-3a was added. A gene expression increase for RIPK2, TP53BP2 and GADD45 and a decrease for TGF- β 1 and FAIM was observed if the combined treatment was synergistic on tumour death cells.

Conclusions: These results suggest that the use of compounds able to restore p53 activity could reverse the soft tissue sarcoma's resistance to TNF- α treatment. Clinical studies should be performed in order to utilize this approach and to use it in the context of sarcomas that are particularly resistant to conventional treatments.

Key words: TNF- α , apoptosis, soft tissue sarcoma, p53, isolated limb perfusion

LABORATOIRES

- Unité INSERM U 753, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif (Dr Chouaib).
- Laboratoire de Pathologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif (Dr Terrier, Pr Fouret).
- Laboratoire de recherche translationnelle, Institut Gustave Roussy, Villejuif (Dr Lacroix, Dr Vielh).
- Unité INSERM U 576, Hôpital de L'Archet, Nice, France (Aude Malavialle).
- Unité INSERM U1016, Institut Cochin, 123, Boulevard de Port-Royal 75014 Paris, CNRS, UMR8104, Paris et Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France (Katy Billot et Véronique Baud).

REMERCIEMENTS

J'exprime ma sincère reconnaissance à l'ensemble des membres de ce jury pour avoir accepté de juger ce travail et pour avoir donné de leur temps précieux.

Je remercie le Pr Christian Auclair de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

J'adresse mes remerciements au Pr Dominique Bellet et au Pr Jean-Yves Blay pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'être rapporteurs de ce travail et de m'avoir donné leurs avis éclairés.

Je remercie également le Dr Jean Bénard d'avoir accepté de participer à ce jury en qualité qu'examinateur.

Cette page ne suffira pas à l'expression de ma grande gratitude à l'égard du Dr Salem Chouaib qui, tout au long de ces années a été et restera le moteur essentiel de ce travail. Quand le découragement ou l'absorption dans mes tâches cliniques m'écartaient du laboratoire, il me rappelait inlassablement et me redonnait la petite flamme du chercheur qui anime et donne un sens à nos journées. Son énergie, son enthousiasme et ses questions sans cesse tournées vers la clinique en font pour moi un modèle de ce qu'un chercheur doit être, ouvert à la fois aux sciences fondamentales mais aussi aux interrogations des cliniciens et sans cesse là pour questionner ou éclairer de ses connaissances en immunologie des cancers.

Bien évidemment tout cela n'aurait pas été possible sans son équipe de l'U753, toujours renouvelée, de jeunes et de moins jeunes, disponibles, ouverts et compétents.

Je remercie donc particulièrement Catherine Gaudin, Catherine Richon, Abdelali Jalil, Ahmed Hamai, Meriem Hasmin, et Jérôme Thiery avec qui j'ai travaillé et que j'admire pour leur patience, leur gentillesse et leur compétence, mais aussi leur éternelle curiosité pour ce qui se passe « en face ».

J'espère n'oublier personne parmi celles et ceux que j'ai croisés dans toutes ces années : Fathia Mamí-Chouaib, Anne Caignard, Claudine Kiéda, Isabelle Vergnon, Emilie Viey, Jean-Henri Bourhis, Sebastian Wittnebel, Maryam Mehrpour, Saoussen Karray, Abdérémane Abdou, Faten Elhage, Soraya Abouzahr, Aleksandra Bielawska, Yosra Messai, Audrey Le Floch, Emmanuelle Fourmentraux, Katarzyna Franciszkiwicz, Géraldine Visentin, Christophe Pichon, Houssein Benlalam, Mokrane Yacoub, Franck Meslin, Zaeem Noman, Mouna Tabbekh, Izabela Stasik, Stéphanie Buart, Thibault Carré, Intissar Akalay, Aurélie Durgeau, Sanam Peyvandi, Mbarka Mokrani, Arash Nanbakhsh, Marie Boutet et Christophe Przybyla. Un grand merci aussi à Christine Leroy toujours efficace et disponible pour résoudre les problèmes complexes et toujours urgents de logistique.

Aussi je tiens à remercier le Dr Paule Opolon, Françoise Drush, les Drs Philippe Terrier, Pierre Fouret et Philippe Vielh qui m'ont initiée à l'anatomopathologie.

En tant que « chercheur-clinicien », ma reconnaissance la plus vive va à ceux « d'en face » qui en prenant ma part de travail clinique et en m'autorisant à passer du temps au labo, m'ont plus que tout permis de mener ce travail à bien. Je pense ici tout particulièrement au Dr Jean-Louis Bourgain, mon chef de service, toujours enthousiaste et soutenant mes projets,

ayant lui aussi la curiosité de savoir ce qui se faisait « de l'autre côté ». Bien évidemment, je remercie Marie-France Cosset, Gérard Treich, Eric Desruennes, Valérie Billard, Cyrus Motamed, Bernard Célestin, Grégoire Weil, Alexandre Eghiaian, Marie-Laurence Guye, German Salazar, Fehmi Ferhi, Christian Jayr, Séverine Rozant, Zeina Moghrabi mes collègues et amis du service d'anesthésie qui ont accepté parfois dans des conditions difficiles et tendues en terme d'effectifs de me libérer « pour la recherche ». Je tiens aussi à remercier ici le reste de l'équipe d'anesthésie avec ses cadres, infirmières et infirmiers, aides soignants, brancardiers et agents qui, par leur travail au quotidien rendent tout cela possible.

Un grand merci à Dominique Delicourt toujours présente et efficace pour son aide logistique et humaine. Houria Djellal, Christel Timera et Catherine Bandin sont aussi remerciées pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Merci aussi à Sylvie Bonvalot qui m'a initiée et impliquée dans les perfusions isolées et toujours aidée et encouragée dans mes projets, ainsi qu'à Axel Le Cesne et Agnès Laplanche.

Je tiens également à remercier Conticanet, l'Institut Gustave Roussy et la Fondation de Recherche Gustave Roussy pour leur soutien financier.

Finalement je remercie Frédéric, Pauline, André et Clémence, les acteurs de ma « deuxième vie », pour leur patience, leurs encouragements constants et pour le temps que je leur ai « volé ». Une pensée va aussi à ma grand-mère Pierrette qui décida à l'âge de 40 ans de commencer ses études, ainsi qu'à mes parents toujours curieux de tout et qui continuent inlassablement d'ouvrir de nouvelles portes dans leur existence.

Enfin, une pensée émue à tous mes amis et à leur soutien indéfectible dans les moments difficiles, à ma poupée Albertine, et à Christine, Anne-Sophie et Françoise, emportées au meilleur de leur vie par La Maladie.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	11
AVANT-PROPOS.....	14
INTRODUCTION.....	15
I. Les sarcomes.....	16
1. Généralités.....	16
2. Classification des sarcomes.....	17
II. L'apoptose.....	22
1. La voie extrinsèque.....	23
2. La voie intrinsèque.....	23
3. La voie perforine/granzyme.....	26
III. p53 et TP53.....	27
1. La protéine p53.....	27
a- <i>Structure de p53.....</i>	<i>27</i>
b- <i>Rôle de p53.....</i>	<i>27</i>
c- <i>Régulation de p53.....</i>	<i>30</i>
d- <i>Activation de p53.....</i>	<i>30</i>
e- <i>Activités non transcriptionnelles de p53.....</i>	<i>32</i>
f- <i>Activation des autres membres de la famille de p53...33</i>	<i>33</i>

2. P53 et cancer.....	34
a- <i>Mutations</i>	34
b- <i>Inactivations fonctionnelles</i>	35
c- <i>P53 en clinique</i>	35
3. P53 en thérapeutique anti cancer.....	35
a- <i>Thérapie génique pour p53</i>	35
b- <i>Vaccination anti p53</i>	37
c- <i>Nutlins</i>	37
d- <i>Inhibiteurs de méthyl transférase</i>	38
e- <i>Peptides de p53</i>	38
f- <i>Correction des mutations</i>	38
g- <i>CP-31398</i>	39
h- <i>PRIMA-1</i>	39
i- <i>Ellipticine</i>	40
4. Inactivations de la voie de p53 et sarcomes.....	40

IV. TNF- α

1. Le TNF- α	42
a. <i>Structure</i>	42
b. <i>Signalisation du TNF-α</i>	43
c. <i>TNF-α et réponse inflammatoire</i>	46

2. TNF- α et cancer.....	48
a. <i>TNF-α, un promoteur tumoral.....</i>	48
b. <i>TNF-α dans le microenvironnement tumoral.....</i>	49
c. <i>Mécanismes conduisant à l'évolution tumorale.....</i>	49
3. TNF- α et thérapies anticancéreuses	52
a- <i>Effets du TNF-α à haute dose</i>	52
b- <i>Différentes utilisations du TNF-α en thérapeutique oncologique.....</i>	54
OBJECTIFS	59
RESULTATS	61
I. Mise en évidence de l'implication de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans la réponse au traitement par TNF-α et melphalan administrés au cours d'une perfusion isolée de membre.	62
1. Introduction.....	64
2. Matériel et méthodes.....	65
3. Résultats.....	67
4. Discussion.....	68

Article I: p53 status correlates with histopathological response in patients with soft tissue sarcomas treated using isolated limb perfusion with TNF- α and melphalan.....69

II. Mise en évidence de l'implication de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans la cytotoxicité du TNF- α *in vitro* sur des cellules de sarcome et implication de NF- κ B dans la résistance à ce traitement.77

1. Introduction.....79
2. Matériel et méthodes.....80
3. Résultats.....83
4. Discussion.....83

Article II: Attenuation of Soft-Tissue Sarcomas Resistance to the Cytotoxic Action of TNF-alpha by Restoring p53 Function.....85

PERSPECTIVES.....119

BIBLIOGRAPHIE.....125

LISTE DES ABREVIATIONS

- 5-FU 5-fluorouracil
- ADAM A-disintegrin-and-metalloproteinase
- ADN acide désoxyribonucléique
- AIF apoptosis-inducing factor
- AP1 activator protein 1
- ARNm acide ribonucléique messenger
- Bak Bcl-2 homologous antagonist/killer
- Bax Bcl-2 associated X protein
- bFGF basic fibroblast growth factor
- BID BH3-interacting domain death agonist
- CARPs caspase 8/10-associated RING proteins
- CDKs cycline-dependent-kinase
- CDRs cysteine-rich domains
- cFLIP cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein
- CGH comparative genomic hybridization
- CMH complexe majeur d'histocompatibilité
- CRP protéine C réactive
- DD domaine de mort ou death domain
- DFS dermato fibro sarcome (Darrier Ferrand)
- DIKK1 Dickkopf-related protein 1
- DISC death inducing signalling complex
- DMT dose maximum tolérée
- E6AP E6-associated protein
- EGFR epidermal growth factor receptor
- EMAPII endothelial monocyte-activating-polypeptide-II
- FADD Fas-associated death domain
- FISH fluorescence in situ hybridation
- GIST gastro intestinal stromal tumors
- GM-CSF granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
- IAPs inhibitor of apoptosis protein
- ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1 (aussi appelé CD54)
- IFN interféron

- IHC immunohistochimie
- IKK I κ B-kinase
- IL interleukine
- ILP isolated limb perfusion
- iNOS inductible NO synthase
- I κ B inhibiteur de κ B
- JNK c-JUN NH2 terminal-kinase
- LMS Léïomyosarcome
- LMSD Léïomyosarcome dédifférencié
- LPS Liposarcome
- LPSD liposarcome dédifférencié
- MAPK mitogen activated protein-kinase
- MFH malignant fibrous histiocytoomas
- MDM2 murine double minute 2
- MFS Myxofibrosarcome
- MMPs matrix metalloproteinases
- MOMP mitochondrial outer membrane permeabilisation
- mTOR mammalian Target of Rapamycin
- MYOCD gène de la myocardine
- NF- κ B nuclear factor kappa-B
- NK natural killer
- NO nitric oxide
- OMS organisation mondiale pour la santé
- p53AIP1 p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
- PACT p53-associated cellular protein-testes-derived
- PAMPs pathogen-associated molecular patterns
- PDGFRA platelet derived growth factor receptor alpha
- Pidd p53 induced protein with a death domain
- PIGs p53-induced genes
- PLAD pre-ligand assembly domain
- PNET primitive neuroectodermal tumor
- PNN polynucléaire neutrophile
- PTEN Phosphatase and TENsin homolog
- PUMA p53 upregulated modulator of apoptosis

- RB1 gène du retinoblastome
- RIP receptor-interacting protein-kinase
- RMS Rhabdomyosarcome
- ROS reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
- RT-PCR real time polymerase chain reaction
- sIMPs, soluble intermembrane mitochondrial proteins
- SNPs single nucleotide polymorphisms
- SODD silencer of death domain
- STS soft tissue sarcomas
- TACE TNF-alpha converting enzyme
- TF procoagulant tissue factor
- Th helper T cell
- TIMPs tissue inhibitor of metalloproteinases
- TNF- α tumor necrosis factor-alpha
- TNF-R TNF receptor
- TRADD TNF receptor associated death domain
- TRAF2 TNFR-associated factor 2
- TUNEL Terminal deoxynucleotidyl Transferase BiotindUTP Nick End Labeling
- UPS undifferentiated pleomorphic sarcoma
- VCAM vascular cell adhesion molecule
- VEGF vascular endothelial growth factor
- VEGFR vascular endothelial cell growth factor receptor
- WDLPS well differentiated liposarcoma

AVANT-PROPOS

Des résultats cliniques remarquables ont été observés lors du traitement des sarcomes localement évolués des membres par perfusion isolée de membre avec injection de TNF- α et de melphalan. Cependant, peu de travaux ont cherché à déterminer les facteurs de résistance à ce traitement ainsi que les éventuels moyens de les contourner. En effet, ayant longtemps considéré que l'action du TNF- α dans cette combinaison se limitait à une atteinte vasculaire sélective facilitant l'accès des cellules tumorales au melphalan, seules les voies de résistance liées au vaisseau ont été étudiées. Cependant, une action directe du TNF- α sur la cellule tumorale a aussi été envisagée, ouvrant la porte à d'autres mécanismes de résistance tels que mutation de facteurs suppresseurs de tumeur comme p53 ou activation de facteurs anti-apoptotiques comme NF- κ B. En effet l'activité de p53 semble liée à l'action cytotoxique du TNF- α *in vitro* et on connaît l'existence de nombreuses mutations ou altérations de cette voie de signalisation dans le cadre des sarcomes. Aussi, l'interdépendance de NF- κ B avec TNF- α est bien connue et confirmée par l'existence d'un site de fixation pour NF- κ B sur le promoteur de p53. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'axe principal de ce travail qui vise l'analyse de certaines bases moléculaires et génomiques de la résistance tumorale à l'action de TNF- α . Un des objectifs de ce projet est de dessiner des approches conduisant à restaurer ou potentialiser l'effet cytotoxique du TNF- α en particulier grâce à l'utilisation de drogues modulant l'activité de p53. Le succès de telles approches permettra sans doute à l'avenir des indications plus large pour le TNF- α , drogue très efficace mais dont la toxicité a jusqu'à présent limité son utilisation à des systèmes sophistiqués tels que perfusion isolée de membre dans le cadre de tumeurs des extrémités.

INTRODUCTION

I. Les sarcomes

1. Généralités

Les sarcomes des tissus mous (STS) constituent un groupe hétérogène de tumeurs mésoenchymateuses qui représentent environ 1 % des cancers chez l'adulte avec environ 1800 nouveaux cas diagnostiqués chaque année en France et une incidence de 5 cas pour 100 000 par an en Europe ^{1,2}. Cependant, des travaux récents laissent penser que cette incidence est probablement sous estimée ³. Les STS sont des tumeurs variées (plus de 70 types et sous-types histologiques) et de diagnostic difficile (6 à 25 % de discordances diagnostiques). Ces tumeurs sont classifiées selon leur type de différenciation histologique et des schémas immunohistochimiques en accord avec les recommandations de l'OMS ⁴ (Tableau 1).

Tableau 1 : Différents types de sarcomes et leur incidence.

Liposarcomes	20 %
Léiomyosarcomes	15 %
Synoviosarcomes	10 %
Rhabdomyosarcomes	5-10 %
Schwannomes malins	5-10 %
Angiosarcomes	< 5 %
PNET	2 %
Divers	5 %
Inclassés-MFH	30 %

Le pronostic des sarcomes est sombre en particulier lorsqu'ils sont peu différenciés (20 à 30 % de récurrences locales, 30 à 50 % de métastases et 50 à 60 % de décès). Ceci est lié à la grande résistance des sarcomes aux traitements classiques, à la faible incidence de la maladie permettant de faire peu d'études de grande envergure pour étudier l'efficacité d'un traitement et enfin à la grande hétérogénéité de cette maladie ^{5,6}. Ces tumeurs doivent donc être prises en charge obligatoirement par des équipes multidisciplinaires entraînées au sein de centres de référence et le « traitement personnalisé » est une des options les plus considérées. Aussi l'absence

quasi totale de réponse immunitaire de l'organisme face à un sarcome lorsqu'il est localisé dans le rétro-péritoine, ainsi que l'absence de symptomatologie digestive expliquent que ces tumeur atteignent souvent des tailles gigantesques sans entraîner de symptômes cliniques, ce qui rend leur exérèse et leur traitement d'autant plus difficile. Les facteurs impliqués dans la récurrence des STS sont liés à la qualité de l'exérèse chirurgicale avec des marges d'exérèse convenables et l'évaluation de celles-ci à la fois par le chirurgien et le pathologiste. Les facteurs prédictifs de métastases et de décès sont avant tout le grade histologique basé sur la différenciation, l'index mitotique et la nécrose ⁷. Mais celui-ci n'est pas applicable à tous les sarcomes et peut être surclassé par le type histologique et la taille tumorale en particulier pour les synoviosarcomes et les liposarcomes.

2. Classification des sarcomes

Les STS peuvent aussi être caractérisés par les anomalies moléculaires auxquelles ils sont associés et qui sont diagnostiquées soit de façon globale par caryotype ou hybridation génomique comparative par micro-array (CGH) soit par analyse ciblée en cytogénétique par FISH (fluorescent *in situ* hybridation) ou par RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). Ces anomalies sont représentées par deux types principaux : les sarcomes à génétique simple et les sarcomes à génétique complexe. Les sarcomes à génétique simple sont caractérisés par des caryotypes simples avec des translocations spécifiques avec des gènes de fusion (Tableau 2) (soit environ 25 % des sarcomes pour une dizaine de types histologiques) ou par des anomalies numériques modérées (par exemple amplification simple du chromosome 12 englobant les locus de MDM2 et CDK4 dans les liposarcomes (LPS) bien différenciés (WDLPS) ou dédifférenciés (LPSD). Ces derniers étaient anciennement appelés histiocytofibromes fibreux malins (MFH). Les tumeurs stromales ou GIST sont caractérisées par des délétions/mutations de KIT et de PDGFRA (Tableau 3) ^{8,9}. Les sarcomes à génétique complexe sont caractérisés par des caryotypes complexes et non informatifs car présentant en CGH des profils avec de nombreuses altérations numériques et structurales (amplifications, délétions, réarrangements déséquilibrés avec gain et/ou perte de segments chromosomiques). Ce groupe comporte principalement les léiomyosarcomes (LMS) associés à de nombreuses délétions en 10q, au locus de PTEN entraînant une altération de la voie

de signalisation PTEN/AKT/mTOR. En effet, PTEN est un des gènes les plus fréquemment altérés au cours du cancer et joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire et la migration. Son inactivation dans un modèle murin de lignées musculaires lisses a été décrite comme une des étapes fondamentales de l'oncogenèse des LMS ¹⁰.

Tableau 2 : Translocations des différents types de sarcomes dits à génétique simple (adapté de Letson et al, ¹¹).

Sarcome d'Ewing/PNET	t (11;22) ; t (21;22) ;...
Liposarcome Myxoïde	t (12;16) et t (12;22)
Synovialosarcomes	t (X;18)
Rhabdomyosarcomes alvéolaires	t (2;13) et t (1;13)
Chondrosarcome myxoïde	t (9;22) ; t (9;17) ; ...
Sarcome à cellules claires	t (12;22)
T. desmoplastique à cellules rondes	t (11;22)
Darier-Ferrand (DFS)	t (17;22)
Fibrosarcome infantile	t (12;15)
Sarcome alvéolaire	t (X;17)
Sarcome fibromyxoïde bas grade	t (7;16)

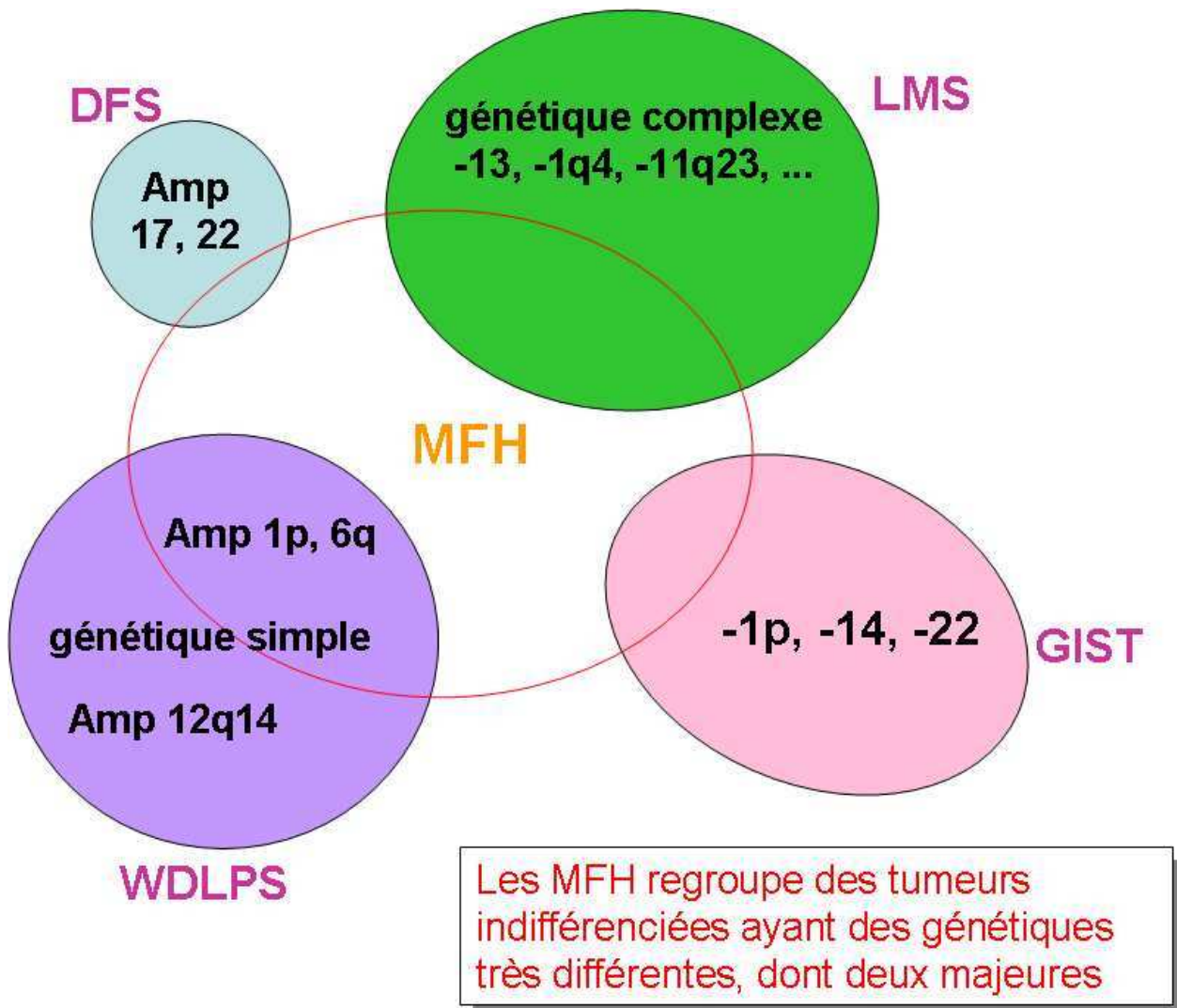
Tableau 3 : Amplifications spécifiques, mutations/délétions.

Liposarcome bien différencié et Liposarcome dédifférencié	Chromosome en anneau ou géant surnuméraire 12q13-15 ; Idem + anomalies génétiques surajoutées 1q32, 12q24 et 6-q23
GIST	Mutation KIT, PDGFRA
Tumeur rhabdoïde maligne	hSNF5/INI1

Aussi, trouve-t-on dans ce groupe des tumeurs pléomorphes indifférenciées précédemment dénommées MFH correspondant aux myxofibrosarcomes (MFS), aux liposarcomes/rhabdomyosarcomes pléomorphes (P-LPS, P-RMS) ¹², aux LMS non différenciés ¹³ et aux sarcomes pléomorphes indifférenciés (UPS) (Figure 1) ^{14,15}.

Chez ces derniers on a décrit une activation de DKK1, un inhibiteur de la voie canonique WNT qui joue un rôle important dans l'ostéogénèse et l'ostéolyse.

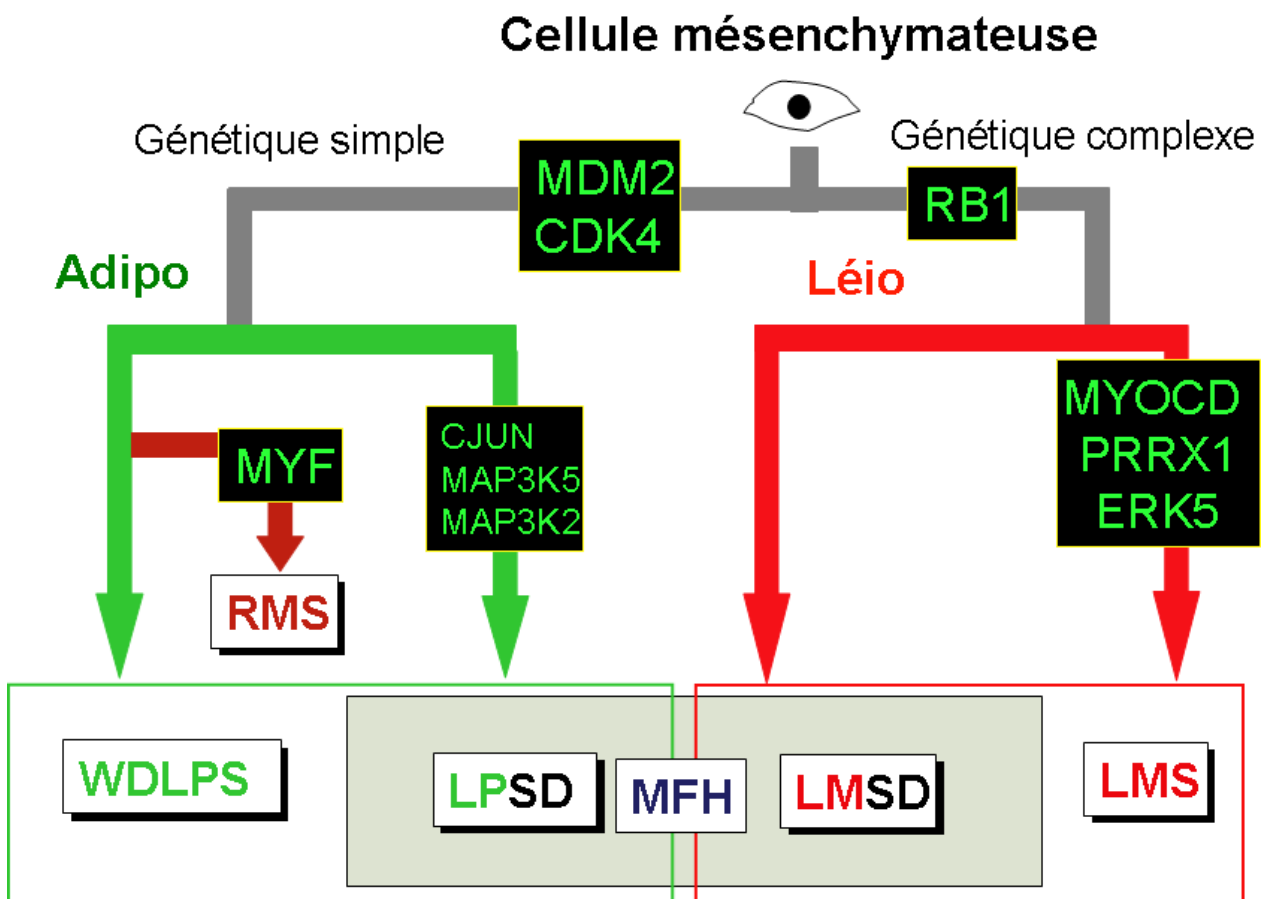
Figure 1: Répartition des MFH selon le type de génétique, simple ou complexe.



On trouve aussi plus rarement les angiosarcomes, les ostéosarcomes, les schwanomes malins et les sarcomes épithélioïdes (inactivation 22q). Les sarcomes à génétique complexe ont été associés à l'altération/inactivation du gène RB1 par délétion du chromosome 13 ce qui pourrait consister en un évènement précoce du processus oncogénique ^{16,17}. La différenciation est modulée par les accidents chromosomiques surajoutés avec blocage de la différenciation adipocytaire par activation de la voie de signalisation JNK (c-JUN NH2 terminal-kinase) (LPS dédifférencié) ¹⁸ ou activation d'une différenciation musculaire lisse par amplification

de MYOCD sur le chromosome 17p pour les LMS bien différenciés (WD-LMS) (Figure 2). Dans cette même famille, on a démontré que la différenciation musculaire lisse médiée par MYOCD est rendue possible par la surexpression de AKT et l'activation de WNT qui sont responsables de l'inhibition de GSK3B¹⁹. L'activation de la voie canonique de WNT se fait aux dépens du défaut d'expression de DKK1 contrairement à ce qui se passe dans les UPS où l'activation de DKK1 entraîne l'inhibition de WNT. Ainsi, dans des tumeurs aux phénotypes proches, on peut observer aussi bien un défaut d'expression qu'une hyper expression de DKK1, suggérant un rôle complexe dans l'oncogenèse et l'absence de différenciation pour cette molécule. Aussi, de nombreuses délétions et/ou mutations de *TP53* sont décrites au cours des sarcomes. En effet, les mutations et délétions de *TP53* sont plus fréquentes dans les LMS que dans les UPS. De plus, 50 % des LMS ont une inactivation bi-allélique de *TP53* alors que plus de 85 % des UPS gardent au moins un allèle *TP53* sauvage. On peut noter que les LMS sont des tumeurs à pronostic très sombre alors que les UPS ont un pronostic un peu meilleur²⁰.

Figure 2: Classification des sarcomes selon le type de génétique, simple ou complexe et principales anomalies génétiques associées.



Récemment, il a été démontré que dans un sous groupe de LMS et de UPS, bien qu'appartenant au groupe à génétique complexe, on mettait en évidence un profil génomique assez simple avec perte ou gain de bras entiers de chromosomes et hyporégulation de gènes impliqués dans le contrôle mitotique. Dans une analyse multivariée, ce profil définissait un sous-groupe de sarcomes avec un pronostic plutôt favorable en termes de métastases ²¹. Ceci corrobore le fait que les tumeurs à génétique complexe constituent un groupe de sarcomes à plus mauvais pronostic que celles à génétique simple.

Ainsi, devant la complexité des mécanismes d'oncogenèse des sarcomes et la faible incidence de cette maladie, un réseau européen de recherche médicale entièrement dédié aux tumeurs des tissus conjonctifs a été créé en 2006 (CONTICANET pour CONnective Tissue CAncer NETwork). Celui-ci a permis des avancées sur le plan de la prise en charge médicale de ces tumeurs rares, ainsi que des avancées sur le plan de la recherche fondamentale au niveau européen (<http://www.conticanet.com>) aidant ainsi la communauté médico-scientifique à développer des nouvelles modalités thérapeutiques ²².

II. L'Apoptose

Le processus de mort cellulaire programmée, ou apoptose, se définit par des caractéristiques morphologiques et par des mécanismes biochimiques énergie-dépendants. L'apoptose est considérée comme un élément vital pour différents processus tels que turnover physiologique des cellules, développement et fonction du système immunitaire, atrophie hormono-dépendante, développement embryonnaire et mort cellulaire chimio-induite. Un niveau d'apoptose inappropriée (trop ou pas assez) est un facteur reconnu pour de nombreuses pathologies telles que maladies neurodégénératives, ischémiques, auto-immunes ainsi que dans de nombreux types de cancers. Cette capacité à moduler la vie ou la mort d'une cellule représente un potentiel thérapeutique immense. Le terme apoptose a été utilisé la première fois en 1972 par Kerr, Willie et Currie pour décrire une forme morphologique particulière de mort cellulaire²³. Il désigne une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire, notamment l'externalisation de la phosphatidylsérine membranaire²⁴. Les connaissances sur ce mécanisme ont progressé avec les travaux de Horvitz portant sur l'embryogénèse du nématode *Caenorhabditis elegans*²⁵. En effet, dans cet organisme, 1090 cellules somatiques sont générées au cours de la formation du vers adulte, parmi lesquelles 131 vont aller vers la mort programmée. Ces 131 cellules meurent à un moment particulier du développement qui est invariable entre les vers démontrant la précision remarquable et le contrôle très précis de ce programme moléculaire permettant aux cellules de déclencher leur mort. Ainsi l'apoptose se produit spontanément au cours du développement et de la sénescence comme un mécanisme homéostatique permettant le maintien des populations cellulaires au sein des tissus. L'apoptose intervient aussi comme un mécanisme de défense dans les réponses immunitaires ou quand les cellules sont endommagées par la maladie ou par des agents nuisibles. Des conditions à la fois physiologiques et pathologiques peuvent induire l'apoptose. La radiothérapie ou les chimiothérapies utilisées pour traiter les cancers résultent en dommages à l'ADN dans certaines cellules, qui peuvent conduire à de l'apoptose grâce à la voie de p53. Certaines hormones comme les corticostéroïdes peuvent conduire à la mort cellulaire par apoptose dans certaines

cellules (par exemple les thymocytes) alors que d'autres cellules ne seront pas atteintes. Certaines cellules expriment des récepteurs de mort tels que Fas ou TNF qui peuvent conduire à l'apoptose grâce à la liaison de ligands. D'autres cellules ont une altération d'une voie de signalisation de mort qui est bloquée par un signal de survie comme une hormone ou un facteur de croissance. L'apoptose est donc un processus coordonné, énergie-dépendant qui implique l'activation d'un groupe de protéases appelées « caspases » et une cascade complexe d'évènements qui relie le stimulus initial à la mort finale de la cellule. Deux voies de signalisation principales convergent : les voies extrinsèques et intrinsèques qui peuvent conduire à l'initiation du processus d'apoptose en activant la caspase 3, effecteur principal de ce processus. La caspase 3 va effectuer le clivage de protéines cibles telles que certains composants structurels de la cellule et ainsi entraîner sa destruction (Figure 3). L'activation de la caspase 3 nécessite le clivage protéolytique de son précurseur enzymatique, la procaspase 3 et s'effectue grâce à l'activation des caspases initiateuses 8 ou 9, lorsqu'elles même ont été activées.

1. La voie extrinsèque

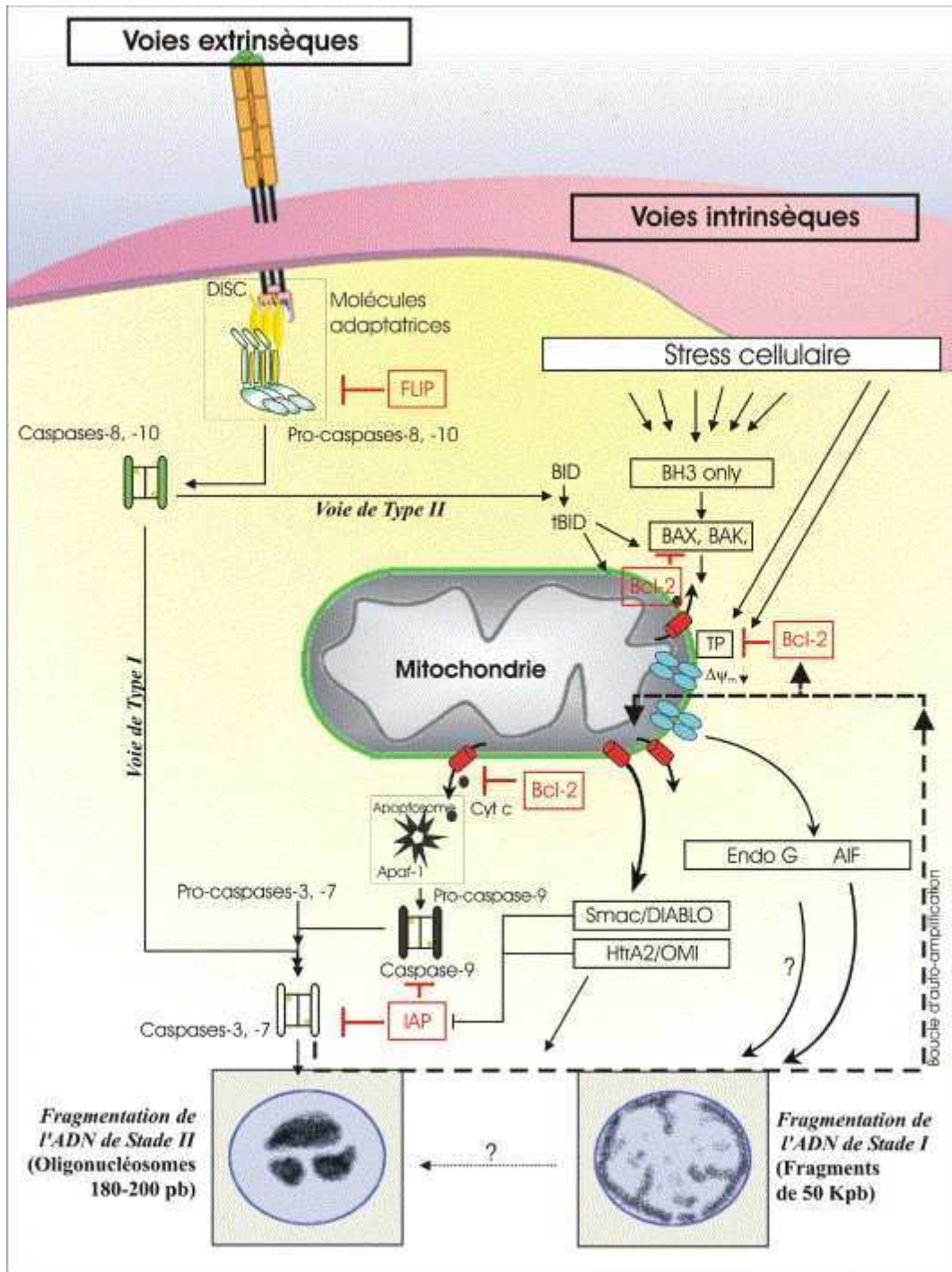
Cette voie joue un rôle important dans la réponse immunitaire, mais moindre dans la réponse au stress génotoxique. Cette voie dite récepteur dépendante, est activée par la liaison de ligands à des récepteurs de mort extracellulaires. Grâce à une protéine adaptatrice telle que FADD, le récepteur de mort activé va permettre le recrutement de procaspases initiateuses, notamment la procaspase-8, par l'intermédiaire d'interactions homotypiques entre les domaines effecteurs de mort de FADD et de la procaspase-8²⁶. Le recrutement de la procaspase-8 va entraîner son oligomérisation puis son activation par auto- et transprotéolyse. Le complexe ainsi formé est appelé « complexe de signalisation induisant la mort » ou DISC (death-inducing signaling complex) aboutissant à la formation de la caspase-8 active (dimère des sous-unités p10/p18)²⁷. Si la caspase-8 est suffisamment activée au niveau du DISC, l'activation directe des procaspases effectrices s'en suit, notamment de la procaspase-3, prototype des caspases effectrices de mort.

2. La voie intrinsèque

Cette voie est activée principalement en cas de lésions sévères sur l'ADN comme celles induites par les radiations ou les chimiothérapies. Cette voie passe par

la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) qui induit la libération de molécules de signalisation depuis l'espace entre membrane interne et externe de la mitochondrie, vers le cytoplasme. La MOMP est contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 qui sont caractérisés par la présence de un à quatre domaines BH (Bcl-2 Homology) ²⁸.

Figure 3 : Voies de signalisation conduisant à l'apoptose.



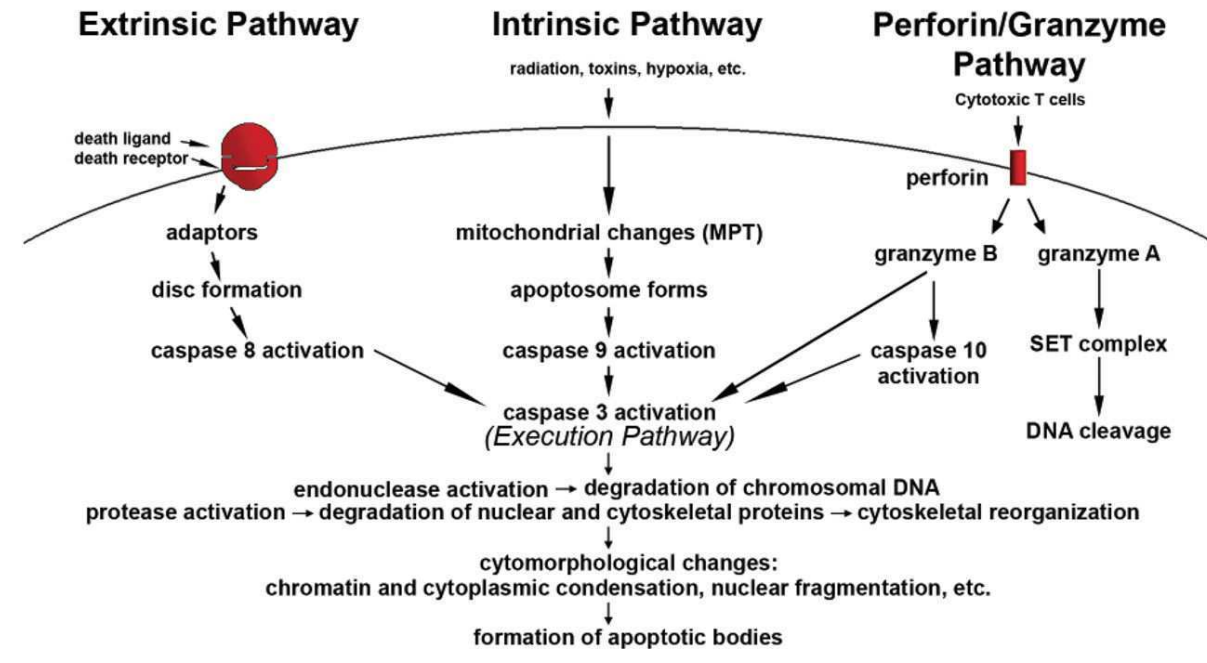
Les protéines anti-apoptotiques de cette famille (Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1) antagonisent la MOMP en maintenant l'intégrité membranaire alors que les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Noxa, Puma) induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale. L'induction de cette voie d'apoptose requiert l'activation de Bax ou de Bak. Leur activation nécessite une modification conformationnelle et la formation d'homo-oligomères. Ceux-ci sont fondamentaux pour la formation de pores dans la membrane mitochondriale. Bak est présent de façon constitutive au sein de la membrane mitochondriale tandis que l'activation de Bax implique sa translocation du cytoplasme vers la membrane externe de la mitochondrie et son insertion dans celle-ci. L'activation de Bax et de Bak se fait soit directement lorsqu'une protéine activatrice telle que t-Bid, provenant du clivage de Bid par une faible quantité de caspase-8 activée, migre au niveau de la membrane mitochondriale externe. On parle alors de boucle d'amplification car peu d'activation de caspase 8 conduit néanmoins à de l'apoptose par la voie intrinsèque et non pas par la voie extrinsèque comme c'est le cas habituellement en présence de caspase 8 activée. Son activation peut se faire aussi indirectement, par neutralisation des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 qui maintiennent Bax et Bak inactives. L'activation de Bax et de Bak induit la libération des différents facteurs apoptogéniques de la mitochondrie. Les protéines « BH3-only », qui ne possèdent qu'un domaine BH telles que Puma, Noxa, Bid et Bad jouent un rôle très important dans ce processus de neutralisation. Certaines autres protéines « BH3-only » peuvent aussi activer directement Bax ou Bak pour déclencher leur homo-oligomérisation. Le rapport protéique entre les pro- et les anti-apoptotiques, leur localisation intracellulaire, leurs modifications post-transcriptionnelles, leur conformation et leurs interactions physiques les unes avec les autres fournissent différents niveaux de régulation de cette famille et de l'induction de l'apoptose. Le cytochrome c constitue la principale molécule ainsi libérée grâce au phénomène de MOMP et son association à Apaf 1 et au dATP entraîne la formation de l'apoptosome, un complexe protéique qui grâce à l'activation de la procaspase 9, active secondairement la caspase 3. Smac/DIABLO et HtrA2/Omi, autres facteurs libérés par la mitochondrie favorisent l'activation de la caspase 3 et l'apoptose en neutralisant l'IAP (Inhibitor of apoptosis proteins). Enfin, les endonucléases AIF (apoptosis induced factor) et endoG, contribuent à la fragmentation de la chromatine au sein du noyau.

3. La voie perforine/granzyme

Il existe une voie d'apoptose additionnelle qui implique la cytotoxicité à médiation lymphocytaire T et le mécanisme perforine-granzyme dépendant. Ce mécanisme peut induire l'apoptose aussi bien à travers le granzyme A que le granzyme B. La voie du granzyme B converge vers la même voie terminale ou voie d'exécution que les voies extrinsèques ou intrinsèques (Figure 4).

Figure 4 : place de la voie perforine/granzyme dans le phénomène d'apoptose (d'après Elmore ²⁴).

Chaque voie (extrinsèque, intrinsèque et perforine/granzyme) nécessite l'activation de ses signaux initiateurs propres (caspase 8, 9 et 10) pour démarrer la cascade d'évènements moléculaires conduisant à l'apoptose qui conduira à l'activation de la caspase 3. Seul le granzyme A fonctionne de façon indépendante de la caspase 3.



III p53 et TP53

La voie de p53, responsable de l'apoptose chimio-induite, est non fonctionnelle dans de nombreux sarcomes. La possibilité depuis peu, d'utiliser en clinique humaine des petites molécules capables de restaurer ses fonctions, peut permettre d'améliorer l'efficacité de nombreux traitements anticancéreux en particulier dans le cadre des sarcomes.

1. La protéine p53

a. Structure de p53

La mutation du gène de p53 (*TP53^{Mut}*) dans la moitié des cancers humains et l'altération de protéines régulant p53 dans l'autre moitié, témoignent du rôle essentiel de p53 dans la suppression tumorale ²⁹. P53 est un anti-oncogène situé sur le chromosome 17p13 localisé principalement dans le noyau et qui, en réponse à divers stress cellulaires comme l'activation d'oncogènes, l'hypoxie, la déplétion en facteurs de croissance ou la présence de cassures sur l'ADN ^{30,31}, a la capacité de se stabiliser et de se lier à l'ADN de manière séquence spécifique afin d'activer ou de réprimer la transcription de nombreux gènes cibles (Figure 5). P53 se compose de 393 acides aminés avec 5 domaines principaux ³². Le domaine de transactivation (acides aminés 1-40) en N-terminal, responsable de l'activation transcriptionnelle ainsi que de la liaison à MDM2. Le domaine riche en proline (61-94), contenant 5 motifs PXXP (P=Proline et X= n'importe quel autre acide aminé), qui a un rôle dans la régulation de la stabilisation et de l'activation de p53. Le domaine de liaison à l'ADN (100-300), qui se lie spécifiquement aux promoteurs des gènes cibles de p53. Le domaine de tétramérisation (324-355) et le domaine C-terminal (360-393), qui se lie de façon non spécifique à l'ADN et qui régule la fixation spécifique à l'ADN par l'intermédiaire du domaine de liaison à l'ADN. Il existe aussi un site d'exportation nucléaire insérée dans le domaine de tétramérisation.

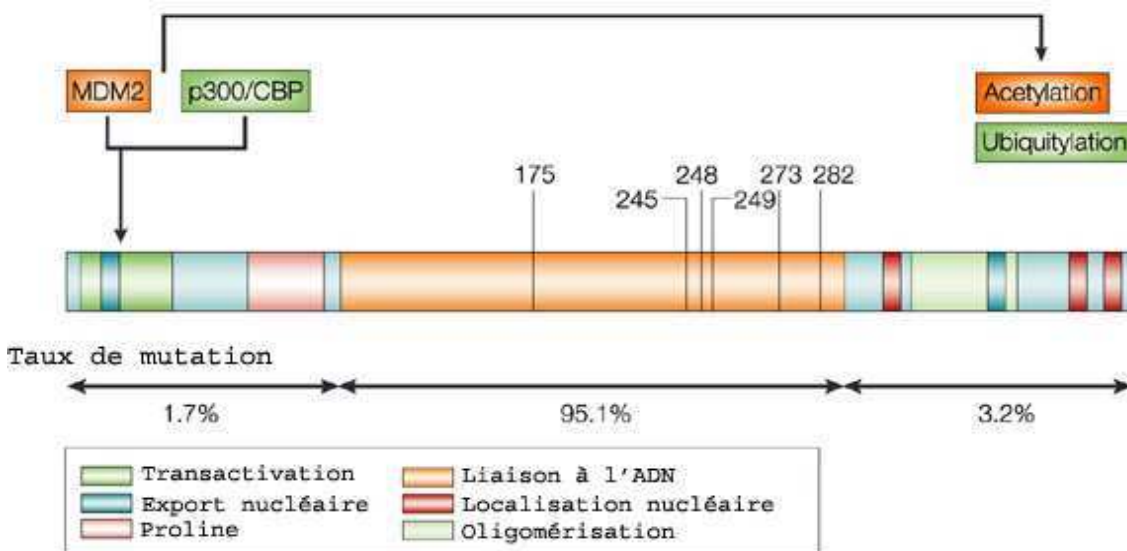
b. Rôle de p53

P53 agit comme un gardien du génome car ses gènes cibles sont des régulateurs des voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire,

phénomène réversible, qui permet la réparation de l'ADN (en G1 et en G2) ou bien, régulent de façon irréversible, les voies de signalisation conduisant au programme de mort cellulaire (apoptose) ou à l'arrêt de prolifération permanent (sénescence).

Figure 5 : Structure et organisation des différents domaines de la protéine p53 (d'après Vousden et Lu³³).

P53 est un facteur de transcription qui contient différents domaines structuraux distincts, dont un domaine N-terminale d'activation de la transcription, une région centrale de liaison spécifique à l'ADN et une région C-terminale qui contient des séquences d'oligomérisation et des signaux de localisation nucléaire. L'interaction de p53 avec des protéines comme Mdm2 ou P300/CBP va conduire à des modifications post-traductionnelles comme des acétylations ou ubiquitination de la partie C-terminale de p53. La plupart des mutations retrouvées au niveau de p53 sont situées au niveau de sa région centrale de liaison à l'ADN (le pourcentage de mutation de chaque région est indiqué). Près de 28% des mutations identifiées sont situées au niveau des résidus indiqués.

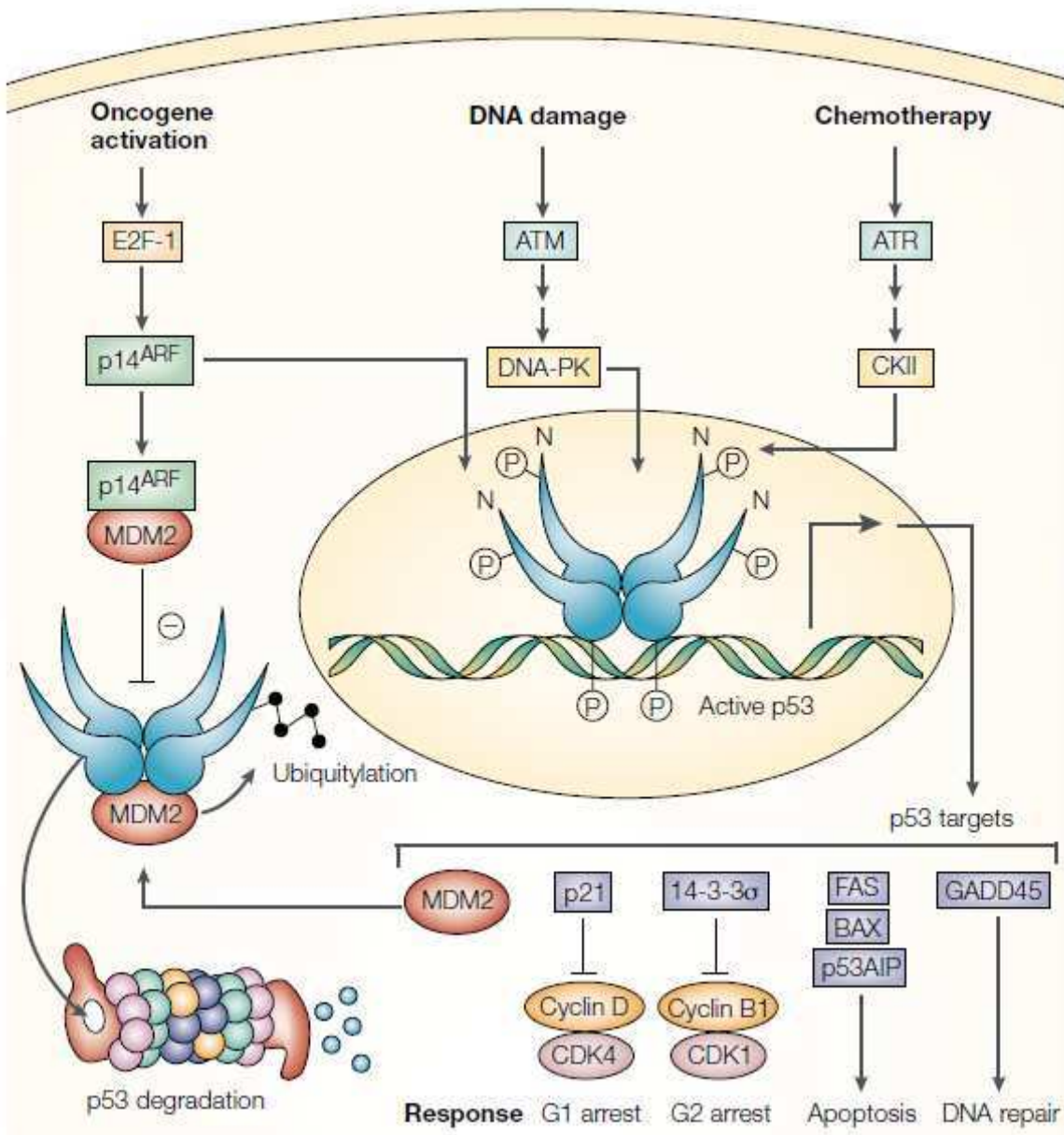


Les gènes impliqués dans la capacité de p53 à contrôler le cycle cellulaire sont $p21^{WAF1}$, $GADD45$ et $14-3-3\sigma$ ³¹. $p21$ entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et prévient l'entrée en phase S tandis que $GADD45$ et $14-3-3\sigma$ contrôlent la transition G2/M. L'apoptose est sous la dépendance de la transcription des gènes cibles *Bax*, *CD95 (Fas/APO-1)*, *DR5*, *Ei24/PIG8*, *Noxa*, *PERP*, *Pidd*, *p53AIP1* et *PUMA* codant soit pour des protéines de surface cellulaire (*DR5*, *CD95* et *PERP*), soit pour des protéines mitochondriales (*Bax*, *Noxa*, *PUMA* et *p53AIP1*)^{34,35}, soit pour des protéines cytoplasmiques (*PIG8* et *Pidd*). P53 induit la répression en outre de facteurs anti-apoptotiques tels que *Bcl-2*, *Bcl-XI* et *IAP* (Figure 6). La plus grande part des propriétés pro-apoptotiques de p53 passent par la voie intrinsèque mitochondriale de

l'apoptose contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. Enfin on a montré que p53 influençait aussi le métabolisme à travers différents mécanismes ³⁶.

Figure 6 : Rôle de la protéine p53 avec ses différentes voies d'activation, d'inhibition et ses gènes cible (d'après Bullock et Fersht ³⁷).

Un stress cellulaire tel qu'une activation d'un oncogène induit p14ARF qui va se lier à MDM2 et empêcher ainsi son action inhibitrice. De plus, une lésion à l'ADN ou une chimiothérapie vont activer des protéines kinases telles que ATM ou ATR, qui vont phosphoryler p53 à la fois en N-terminal et prévenir ainsi la liaison de MDM2, et en C-terminal et augmenter la liaison de p53 sur l'ADN favorisant la transcription de ses gènes cible : p21 et 14-3-3 σ qui favorisent l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et G2 en inhibant l'activité de CDK ; FAS, BAX et p53AIP qui favorisent l'apoptose si la réparation n'est pas possible et GADD45 qui favorise la réparation de l'ADN. (DNA-PK, DNA-dependent protein kinase; CKII, casein kinase II; CDK, cyclindependent. protein kinase).



c. Régulation de p53

De part les propriétés limitant la croissance et induisant le suicide de ses gènes cible, l'expression de p53 est finement régulée et contrôlée dans les conditions physiologiques. P53 est une protéine à demie vie courte restant à un niveau de base faible ou indétectable dans la plupart des tissus et ceci bien que l'ARNm de p53 soit exprimé de façon constitutive³⁸. Ainsi, la régulation du niveau cellulaire de p53 est contrôlée par d'une boucle d'autorégulation inhibitrice impliquant MDM2, une ligase de la famille des E3 ubiquitine. MDM2 est en effet une cible transcriptionnelle de p53 qui est libérée en même temps que p53. Elle représente son principal inhibiteur et agit de deux façons : d'une part en obstruant le domaine de transactivation et en empêchant ainsi p53 de recruter des co-activateurs tels que p300 et d'autre part à travers son activité ubiquitine ligase, en conjuguant de nombreux résidus ubiquitine sur le domaine C-terminal de p53 grâce à son domaine RING C-terminal et induisant ainsi sa dégradation par le protéasome³⁹. Le fait que la létalité des souris déficientes en MDM2 soit supprimée en les rendant déficientes en p53 a révélé le rôle fondamental de MDM2 dans la régulation de p53^{40,41}. MDM4 (aussi appelé MDMX) est un autre inhibiteur spécifique de p53, Contrairement à MDM2, il ne contrôle pas la stabilité de p53 mais son activité transcriptionnelle. Il se lie à p53 grâce à une poche hydrophobe de structure voisine, mais différente de celle présente à la surface de MDM2. MDM4 n'est par contre pas une cible transcriptionnelle de p53. Aussi, en réponse à un stress oncogénique, le suppresseur de tumeur ARF/p14 va inhiber MDM2 et agir sur cette voie de régulation. ARF est l'un des deux transcrits du locus *CDKN2A* dont la délétion est observée dans certaines tumeurs mais dont l'expression est plus fréquemment abolie par la méthylation de son promoteur. Mais d'autres inhibiteurs de p53 ont été mis en évidence ces dernières années, comme Cop1, Pirh2, Daxx, PACT et CARPs.

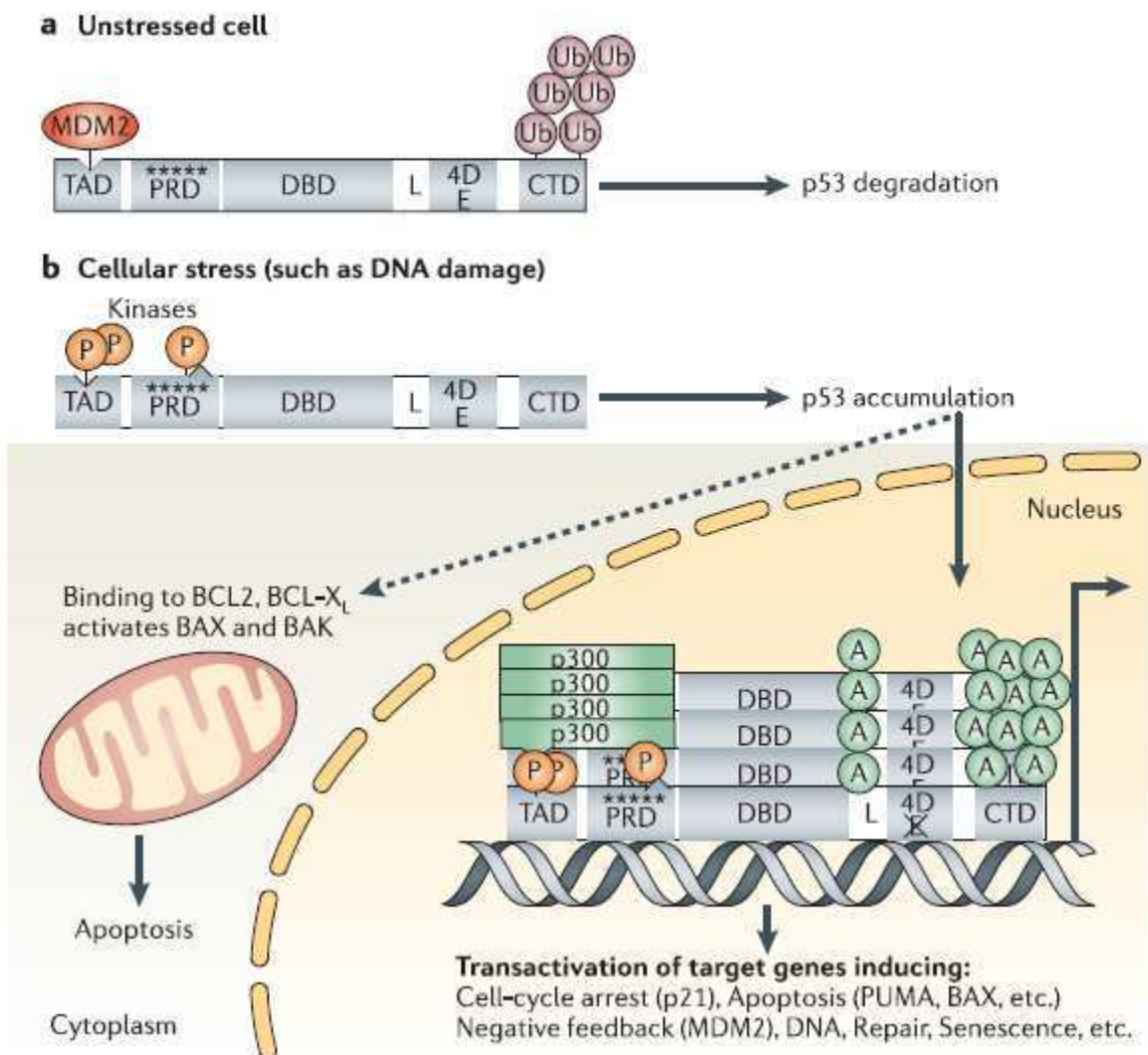
d. Activation de p53

Lors d'un stress cellulaire, des kinases induites par le stress vont phosphoryler p53 au niveau des sérines et des thréonines sur le domaine de transactivation (sérine 15, thréonine 18 et sérine 20). Ceci va induire un relâchement de la liaison de p53 à MDM2, libérant ainsi p53 qui va s'accumuler et former des tétramères. La tétramérisation masque les sites d'exportation nucléaire permettant à la p53 qui s'accumule de rester à l'intérieur du noyau. La phosphorylation du domaine de transactivation favorise l'interaction avec des histones acetyl transférase comme p300

qui se fixe au domaine riche en prolines grâce aux motifs PXXP. Ceci conduit à l'acétylation des lysines au niveau du domaine C-terminal qui favorise la stabilisation de p53 et augmente la fixation spécifique au DNA des gènes cibles. P300 peut aussi acétyler des histones au niveau des promoteurs des gènes cibles, induisant ainsi une ouverture du promoteur et autorisant une activation de la transcription (Figure 7).

Figure 7 : Modèle de l'activation de p53. Pour les explications se référer au texte (d'après Toledo et Wahl ³²).

a | Régulation de p53 dans des cellules au repos : dans les cellules au repos, p53 est maintenue inactive et à un niveau d'expression faible grâce à l'action de MDM2. (TAD, transactivation domain ; PRD, proline-rich domain ; DBD, DNA-binding domain ; 4D, tetramerization domain ; CT, C-terminal regulatory domain ; L, nuclear localization signal ; E, nuclear export signal). **b** | Stabilisation et activation de p53 après un stress. (A, acetylated lysines ; P, phosphorylated serines and threonines ; Ub, ubiquitylated lysines).



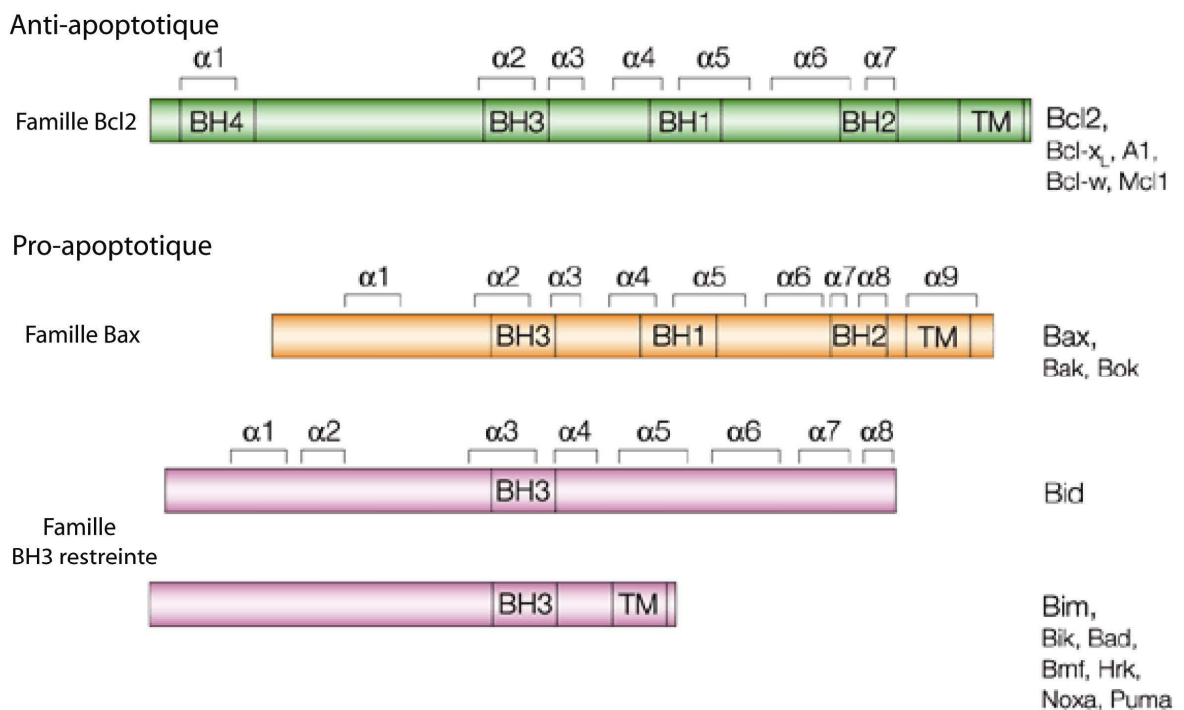
e. Activités non transcriptionnelles de p53

En plus de ses fonctions de transcription au sein du noyau et d'induction de l'apoptose par la voie mitochondriale, on sait depuis 15 ans que p53 peut agir au niveau du cytoplasme et de la mitochondrie pour induire l'apoptose grâce à des mécanismes indépendants de la transcription⁴². Cette activité non transcriptionnelle de p53 est contrôlée par les membres de la famille de Bcl-2 (Figure 8). De plus, de part sa capacité à se lier et à réguler l'activité des protéines Bcl-2 possédant plusieurs domaines BH, p53 ressemble fonctionnellement à une protéine « BH3-only » car ces dernières interagissent et régulent les autres protéines à plusieurs domaines BH et induisent ainsi l'apoptose. Aussi, lors d'un stress cellulaire, p53 s'accumule dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie et ceci conduit à une activation directe de Bax et/ou Bak sans passer par leur transcription. En effet, la fixation de p53 à Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe catalyse l'activation de Bak et en conséquence, une MOMP suivie de la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. Dans le même temps, p53 peut libérer Bak de son complexe inhibiteur avec Mcl-1, une autre protéine de la famille de Bcl-2 qui maintient Bak dans sa conformation inactive. P53 peut aussi favoriser l'activation de Bax en catalysant sa translocation vers la mitochondrie et son oligomérisation entraînant ainsi la perméabilisation de membranes artificielles ou de mitochondries isolées *in vitro*⁴³. C'est la partie N-terminale de p53 qui est impliquée dans ce phénomène contrairement à la liaison de p53 avec Bak qui passe par le domaine central de liaison à l'ADN. En cas de stress, p53 peut aussi interagir directement avec Bad, la formation de complexes p53-Bad favorisant l'accumulation de p53 dans le cytoplasme et dans la mitochondrie, facilitant ainsi son interaction avec Bax ou Bak. Dans ce contexte, MDM2 peut aussi conjuguer un unique résidu ubiquitine à p53 qui, au lieu de conduire à sa dégradation comme en cas de poly-ubiquitylation, induit dans ce cas son transport vers le cytoplasme et la mitochondrie, favorisant ainsi les fonctions transcription-indépendantes de p53 cytoplasmique et mitochondriale. De façon semblable, p53 mitochondriale libérée lors d'un stress peut aussi antagoniser les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-xL ou de Bcl-2 en se liant directement à ces protéines au niveau de son site central de liaison à l'ADN et entraînant ainsi la libération de Bax et de Bak préalablement fixée et antagonisée par Bcl-2 et Bcl-xL, favorisant ainsi l'apoptose. P53 peut aussi augmenter la concentration de récepteurs de mort à la surface cellulaire. Aussi il a été montré que p53 cytoplasmique inhibait l'autophagie. Ce phénomène de séquestration puis de

digestion d'une partie du cytoplasme est réputée maintenir la stabilité du génome puisqu'il permet ainsi à la cellule d'être nettoyée de ses organelles cytoplasmiques abimées et potentiellement toxiques. Le fait que p53 inhibe cette fonction peut donc paraître paradoxal. Mais, en cas de mutation de p53 qui touche le plus souvent le domaine de liaison à l'ADN, cette fonction n'est pas altérée. P53 mutée s'accumule alors car elle n'est plus contrôlée par MDM2 et l'autophagie est inhibée, ceci pouvant rendre compte d'une partie des effets oncogéniques de la mutation de p53 ⁴⁴.

Figure 8 : Les différents membres de la famille Bcl-2 (d'après Cory et Adams ⁴⁵).

La famille des homologues de Bcl-2 se divise en deux sous familles, une pro-apoptotique et une anti-apoptotique. Ces différents membres se caractérisent par la présence de domaines BH (BH 1-4). La sous famille pro-apoptotique comporte des membres de la famille de Bax, et des membres ne comportant que le domaine BH3 comme Puma, Bad et Bid. Les différentes régions en hélice α sont indiquées pour chaque catégorie de protéines



f. Activation des autres membres de la famille de p53

Presque vingt ans après sa découverte, des homologues de p53 ont été identifiés tels que p73 et p63 ⁴⁶. Comme p53, p73 et p63 comportent un domaine de transactivation acide en partie N-terminale, un domaine de liaison à l'ADN central hautement conservé et un domaine C-terminal d'oligomérisation. P73 ainsi que p63

peuvent se lier aux séquences p53-spécifiques de liaison à l'ADN et peuvent transactiver la transcription de gènes cibles de p53, tels que *p21*, *MDM2*, *Bax* et *GADD45*. P73 et p63 comportent deux points de départ majeurs distinct pour la transcription qui peuvent produire deux catégories de protéines actives différentes structurellement. Le produit issu du premier point de départ pour la transcription contient le domaine de transactivation N-terminal et s'appelle TAp73 ou TAp63. Le second produit de transcription issu du second point de départ est une isoforme tronquée qui a perdu la partie N-terminale et s'appelle Δ Np73 ou Δ Np63. Un épissage alternatif introduit une complexité supplémentaire à la partie C-terminale et donne naissance à au moins 6 isoformes pour p73 (isoformes α , β et γ pour TAp73 et pour Δ Np73) et six isoformes pour p63. De nombreuses publications ont démontré le rôle de p73 et de p63 dans la tumorigenèse et la réponse aux chimio- et radiothérapies mais les études génétiques n'ont pas pu démontrer un lien clair entre mutation de p73 ou de p63 et la survenue de tumeurs humaines ⁴⁷.

L'activation ou la libération de p73 ou de p63 par des cellules mutées pour p53 semble être une voie alternative de reconstitution de p53 ou d'activité p53-like dans les cellules tumorales.

2. p53 et cancer

a. Mutations

Les mutations de p53 conduisent à l'abrogation de ses fonctions et à son absence au niveau nucléaire. En effet, l'échange d'un seul acide aminé peut conduire à un changement conformationnel de p53 qui la rend inapte à se lier à son élément de réponse sur l'ADN et à transcrire ses gènes cible, la plupart des mutations ponctuelles concernant le domaine de liaison à l'ADN. Paradoxalement, on retrouve de grandes quantités de p53 mutée accumulée au niveau du cytoplasme où elle ne subit plus la dégradation par MDM2. De plus, d'après la théorie de «gain-of-functions» ⁴⁸, les protéines p53 mutées acquièrent aussi une capacité de transformation ce pourquoi en oncologie chez l'homme, les mutations de *TP53* (*TP53^{Mut}*) sont volontiers associées à un mauvais pronostic ⁴⁹. De plus, les tumeurs p53 mutées sont plus chimio résistantes car capables de transactiver illégitimement des gènes cibles tels que *MDR1* ⁴⁸ et certaines semblent aussi plus invasives et plus aptes à métastaser en

transactivant c-myc, VEGF et en inactivant d'autres membres de la famille de p53 par hétérodimérisation ^{50,51}.

b. Inactivations fonctionnelles

Dans 10 % des cancers, l'inactivation de p53 est la conséquence d'une amplification du gène codant pour MDM2. MDM4 est amplifié ou surexprimé dans 10 à 20 % des cancers ³² et jusqu'à 65 % des cas de rétinoblastome ⁵². P14 ou ARF, inhibiteur de MDM2 peut aussi être inactivé en particulier lors de mutations/délétions du gène CDKN2A dont il est un des transcrits ²⁰. La surexpression d'autres inhibiteurs de p53 tels que CARPs a aussi été démontrée comme étant reliée à des transformations cellulaires et/ou à la tumorigénicité. Aussi, des facteurs exogènes tels que infection virale, peuvent contribuer à l'inactivation fonctionnelle de p53 et contribuer par là au développement de nombreuses tumeurs humaines. Par exemple, le papilloma virus humain induit la transformation cellulaire en éliminant p53 par son E6, qui attire E6AP contenant un domaine HECT qui ubiquitinye l'activité de la ligase E3. E1A exprimée par l'adénovirus stabilise p53 en ciblant MDM4 pendant qu'une autre protéine, E1B55KD inactive p53 en supprimant son activité transcriptionnelle ³⁸.

c. P53 en clinique

Le statut fonctionnel de p53 a été relié au pronostic et à la progression de certains cancers ainsi qu'à la réponse thérapeutique à certains traitements tels que radiothérapie ou chimiothérapie ⁵³. Ces caractéristiques font de p53 une cible potentielle pour la suppression tumorale et la reconstitution des fonctions de p53 peut représenter une nouvelle voie thérapeutique contre le cancer.

4. P53 en thérapeutique anti cancer

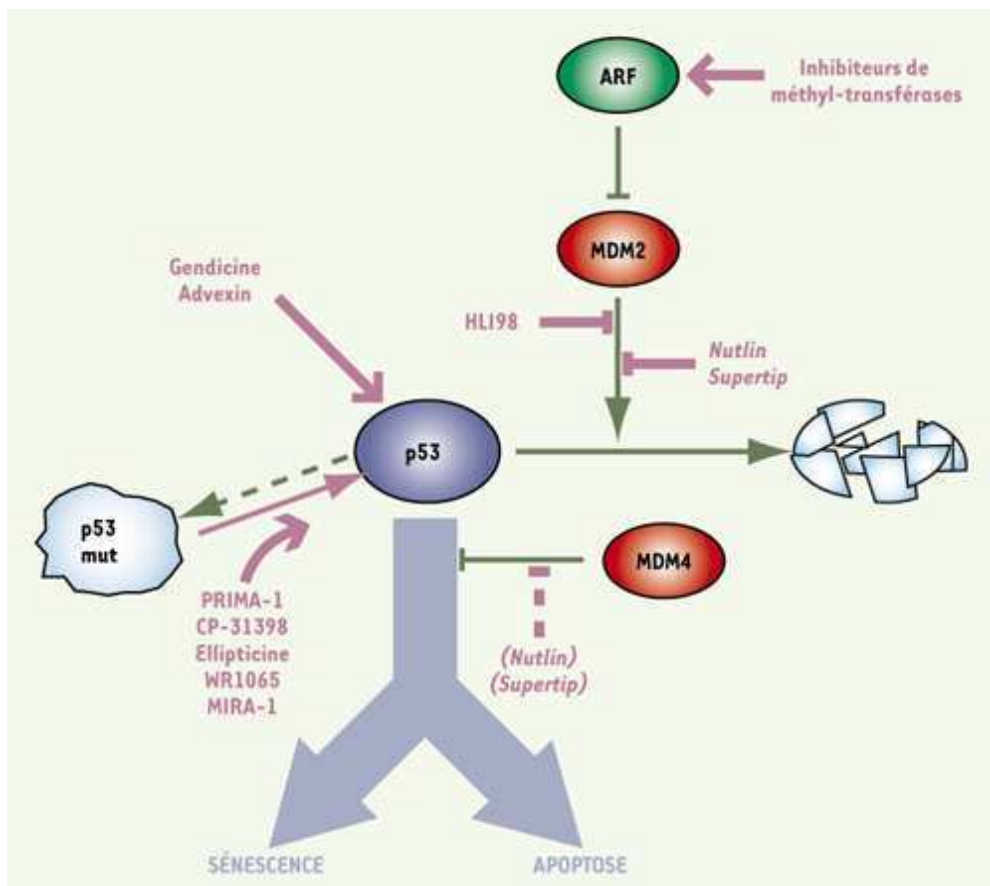
a. Thérapie génique pour p53

L'idée est de réintroduire ou bien de sur exprimer une p53 exogène dans les cellules tumorales ⁵⁴. Différents vecteurs, (adénovirus, rétrovirus et plasmides des DNA nus) ont été utilisés pour faire exprimer la protéine de p53 dans des cellules tumorales, quel que soit leur statut p53 (Figure 9). En particulier, le transfert génique de p53 par adénovirus a été démontré efficace *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ⁵⁵. Plusieurs études cliniques utilisant un adénovirus pour p53 (Advexin®) sont en cours

aux USA (<http://clinicaltrials.gov/>) et en Chine, la Gendicine a déjà été approuvée depuis 2003 et fait partie de la pratique clinique ⁵⁵. Une utilisation combinée de ce type de vecteur avec les approches classiques de chimio- ou de radiothérapie semble donner de bons résultats pour les cancers épidermoïdes de la tête et du cou. Cependant, cette approche n'a pas été à la mesure des espoirs suscités, étant donné l'efficacité limitée de la disponibilité du gène transféré aux cellules tumorales et aux problèmes reliés au transfert viral associé avec ses effets sur la réponse immunitaire du patient ⁵⁶.

Figure 9 : Stratégies d'activation de p53 dans les tumeurs (d'après Toledo, ³⁰)

À gauche : dans la moitié des tumeurs, p53 est absente ou mutée (p53 mut). La réintroduction de p53 sauvage par thérapie génique (Gendicine, Advexin) ou la restauration d'une conformation sauvage de p53 par différentes molécules (PRIMA-1, etc.) peuvent être envisagée. À droite : dans l'autre moitié des cancers, une p53 sauvage est présente mais sa stabilité ou son activité est altérée, le plus souvent à cause de la surexpression des oncogènes MDM2 ou MDM4, ou de l'inactivation du suppresseur de tumeurs ARF. Dans ces cas, des inhibiteurs de méthyl-transférases peuvent réactiver ARF, HLI98 inhiber l'activité ubiquitine-ligase de MDM2, et les Nutlins ou Supertips être efficaces pour bloquer les interactions MDM2-p53, mais peu efficaces envers MDM4. Toutes ces approches visent à restaurer la fonction de p53 sauvage et conduire la cellule tumorale vers la sénescence ou l'apoptose.



b. Vaccination anti p53

Certaines études précliniques ont démontré que p53 pourrait être un excellent candidat comme antigène tumoral. En effet, son niveau d'expression élevé ainsi que sa spécificité tumorale et son taux élevé de mutation dans les cancers laisse suggérer que p53 pourrait être perçu par le système immunitaire comme un antigène cible. Ceci a conduit à la réalisation de nombreuses études cliniques en immunisant grâce à de grands peptides dérivés de p53 et à la recherche de la mise en évidence d'une réponse immune naturelle anti p53 chez les patients atteints de cancer. Il a été d'ailleurs établi que certains patients cancéreux fabriquaient des anticorps anti p53⁵⁵. D'autre part, de nombreux patients cancéreux fabriquent des lymphocytes T anti p53. Ces résultats ont servi de justification à la réalisation d'essais de vaccination utilisant des peptides dérivés de p53. Ainsi, certaines études de phase I et II sont en cours chez des patients atteints de cancer colorectal (p53-SLP ; ISA pharmaceuticals, Bilthoven, the Netherlands) ainsi que de cancer bronchique à petites cellules (INGN-225 ; Introgen).

c. Nutlins

Vassilev et ses collègues⁵⁷ ont identifié un groupe de petites molécules qui ciblent l'interaction MDM2-p53. Ces dérivés imidazolés appelés Nutlins, se lient spécifiquement à MDM2 et le dissocient de p53, détournant ainsi p53 de la dégradation et induisant ainsi les fonctions de p53 telles qu'arrêt du cycle cellulaire et apoptose. Des études en cristallographie ont révélé que les Nutlins mimaient et occupaient la place des trois résidus de la région en hélice du domaine de transactivation de p53 (Phe 19, Trp 23 et Leu 26), domaine ultra conservé au travers des espèces et site de la liaison à MDM2 et dissocient ainsi p53 par fixation compétitive. Des études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal (xénogreffes) ont démontré des effets anti tumoraux importants des Nutlins sans effets secondaires³². Les études chez la souris avaient démontré que la délétion de MDM2 dans des cellules exprimant p53 sauvage induisait la mort cellulaire sans exposition à un stress additionnel, la question qui se pose est pourquoi des agents tels que les Nutlins ne provoquent pas plus d'effets secondaires en tuant les cellules normales? Une des explications avancées est que les Nutlins pourraient cibler spécifiquement les cellules cancéreuses du fait de l'altération de leurs voies de signalisation. L'autre hypothèse avancée est que, au contraire de modèles murins de délétion de MDM2, les Nutlins activeraient

p53 uniquement de façon partielle du fait de la dissociation limitée de MDM2 de sa cible. Aussi, la plus forte toxicité de la délétion de MDM2 s'expliquerait car la délétion entraîne une perte totale des autres fonctions de MDM2, incluant son rôle dans la régulation d'autres protéines et voies de signalisation^{32,55}. Nutlin-3a a par ailleurs été testée en association avec des agents anti cancéreux tels que ceux ciblant les microtubules (vinblastine), les inhibiteurs des kinases cycline dépendantes (roscovitine), des inhibiteurs des kinases aurora (VX-680), des agents induisant des lésions de l'ADN (doxorubicine), des agents agissant en phase S (fludarabine, gemcitabine) et les radiations. De plus, il a été démontré que les Nutlins agissaient en synergie avec le TRAIL (tumor necrosis factor alpha-related apoptosis inducing ligand) dans les leucémies myéloïdes aiguës. Enfin, la protection de p53 des ses inhibiteurs est une voie prometteuse dans le traitement des tumeurs p53 sauvage, en évitant les lésions à l'ADN entraînées par les autres cytotoxiques employés habituellement.

d. Inhibiteurs de méthyl transférase

Ces produits visent à stabiliser l'expression de p14/ARF qui est un inhibiteur de MDM2, contribuant ainsi à stabiliser p53 et à lui rendre ses fonctions inhibitrices de tumeurs. Des essais cliniques sont en cours⁵⁸.

e. Peptides de p53

Certains peptides synthétiques correspondant à des fragments de séquence de p53 ont été démontrés comme étant efficaces pour stabiliser p53 (spiro-oxindoles et benzodiazépines) ou restaurer p53 s'il est muté⁵⁹. Aussi certains peptides peuvent augmenter la capacité de p53 sauvage à se lier à l'ADN mais aussi de p53 muté à retrouver la conformation lui permettant de se lier à l'ADN. Certains autres peptides empêchent la liaison de MDM2 à p53 et ainsi protègent p53 de la dégradation par le protéasome. Ces stratégies (TDP665759, MI-219, MI-319), malgré leur efficacité, leur spécificité et leur absence de toxicité ont vu leur développement limité par le coût de leur production à grande échelle⁶⁰. L'autre difficulté rencontrée est leur introduction dans les cellules tumorales⁶¹.

f. Correction des mutations

Un grand nombre de mutations de p53 perturbent sa structure et réduisent ainsi son efficacité à se lier à l'ADN et à activer la transcription de ses gènes cibles. Mais,

les modifications conformationnelles du domaine de liaison à l'ADN observées dans certaines p53 mutées sont réversibles, au moins en partie. Le meilleur exemple en est les mutations de p53 sensibles à la température qui peut garder sa forme sauvage à des températures en général inférieures à la température corporelle mais qui, quand la température augmente, perd sa conformation sauvage ⁶². Certains osmolytes comme le glycérol, le triméthylamine N-oxide ou l'eau deutérée ont aussi été démontrés comme capables de conserver la conformation sauvage à certaines concentrations. Un autre phénomène observé est que l'addition d'une mutation supplémentaire à une p53 déjà mutée peut restaurer sa fonction sauvage. La délétion de la séquence inhibitrice C-terminale non seulement améliore les fonctions de p53 sauvage mais aussi restaure une certaine activité si p53 est mutée. Aussi des peptides et des anticorps contre la partie C-terminale de p53 restaurent dans certains cas, une activité p53 sauvage à des p53 mutées. Contrairement à p53 sauvage, p53 mutée est exprimée à des niveaux élevés dans les cellules tumorales, probablement de part de son inhabilité à subir le rétrocontrôle négatif de MDM2 de Cop1 ou de Pirh2. Ainsi, la restauration de larges quantités accumulées de p53 mutée en p53 sauvage peut entraîner une réponse thérapeutique considérable.

g. CP-31398

CP-31398, un styrylquinazoline, est une petite molécule ayant *in vitro* la propriété de stabiliser mAb1620, un épitope de p53 sauvage appartenant au domaine de liaison à l'ADN ⁶³. Elle a été identifiée parmi une bibliothèque de plus de 300 000 composés synthétiques. Ses propriétés conduisent à modifier la conformation mutée de p53 en conformation sauvage en restaurant ainsi des fonctions de p53 sauvage *in vitro* dans des lignées cellulaires et des modèles de xénogreffes ⁶⁴. Aussi l'utilisation de CP-31398 entraîne une augmentation du niveau de protéine p53 en bloquant l'ubiquitinylation et la dégradation de p53 ³⁸. Il a, par ailleurs été démontré pour CP-31398, que bien que la plupart de ses effets cellulaires dépendaient de p53, certains effets p53-indépendants avaient aussi été mis en évidence ce qui explique son efficacité dans un contexte p53 sauvage.

h. PRIMA-1

PRIMA-1 appartient à la seconde classe de composés capables de restaurer la conformation sauvage à une p53 mutée en restaurant ainsi sa fonction suppresseur de

tumeur par le biais de la régulation des gènes cibles de p53 tels que *p21*, *MDM2* et *Bax*. L'apoptose se fait ensuite aux dépend de l'activation de la caspase-2 et de la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose. PRIMA-1 a été découverte par screening d'une bibliothèque en utilisant une lignée délétée pour p53 (*TP53^{Null}*) et modifiée pour exprimer de façon stable une p53 mutée (His-273), PRIMA-1 induisait l'apoptose de façon dépendante de l'expression de p53 mutée ⁶⁵. Le mode d'action exact de ce composé n'est pas connu mais il semble que les produits de conversion de PRIMA-1 modifient la protéine p53 mutée en se liant à ses groupes thiols au niveau du domaine de liaison à l'ADN et que ces modifications suffisent à induire l'apoptose dans les cellules tumorales. Ces produits de conversion de PRIMA-1 semblent modifier aussi un certain nombre d'autres protéines incluant d'autres membres de la famille de p53 tels que p63 et p73. Ces modifications entraînent la libération de p53 mutée et sa réactivation. Aussi, il a été démontré que PRIMA-1 agit dans un contexte de *TP53^{Null}* laissant supposer l'existence d'une voie de signalisation indépendante de p53 ⁶⁶.

i. Ellipticine

L'ellipticine est un agent anticancéreux puissant isolé à partir de l'arbre Australien de la famille des Apocynaceae il y a près de 50 ans ⁶⁷. L'ellipticine inhibe la croissance tumorale en intercalant l'ADN, en inhibant l'activité de la topo isomérase II et en générant des radicaux libres. Son mode d'action précis n'a néanmoins pas encore été élucidé. 112 analogues de l'ellipticine ont été testés sur 60 lignées tumorales et il a été démontré qu'un certain type d'ellipticine était plus efficace en cas de présence de p53 mutée que lorsque p53 était sauvage ⁶⁸. Le mode d'action de l'ellipticine semble passer par la transformation de la conformation p53 mutée en p53 sauvage, induisant ainsi une mort cellulaire *TP53^{Mut}* dépendante.

5. Inactivations de la voie de p53 et sarcomes

Les sarcomes figurent parmi les tumeurs le plus résistantes à la chimiothérapie. Le traitement préopératoire basé sur la doxorubicine aux doses maximum tolérées est le plus souvent inefficace (40 % de réponses radiologiques et 6 % de réponses histologiques) ⁵. Dans de nombreuses études, on a retrouvé une corrélation entre le pronostic et la présence de mutations et/ou inactivations de p53 ⁶⁹. Aussi la mesure de la prévalence des mutations de *TP53* au sein des sarcomes chez l'homme ne cesse

d'augmenter au fur et à mesure que les données sont intégrées à la database de *TP53*⁷⁰ (IARC *TP53* mutation database). En effet, entre octobre 2006 (R11 release) et novembre 2010, (R15 release), celle-ci est passée de 17 à 21,5 % pour les mutations somatiques. Ces mutations des sarcomes sont constituées de mutations faux-sens dans 76 % des cas et de mutations non sens ou silencieuses dans 7 et 18 % des cas respectivement. Par ailleurs, la prévalence des inactivations de p53 au cours des sarcomes est très élevée. Une publication récente ayant étudié une série de 143 STS a rapporté que la voie de p53/p14 était altérée dans toutes les tumeurs étudiées²⁰.

IV. Le TNF- α

1. TNF- α

Le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) est une cytokine impliquée dans l'inflammation systémique et dans la réponse de phase aiguë. Cette cytokine pléiotrope est principalement produite par les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles NK (natural killer) stimulés. Elle a été isolée en 1975 par Carswell et al. sous forme d'un facteur soluble dans le sérum de souris traitées par l'endotoxine bactérienne et qui provoquait la nécrose hémorragique d'une tumeur transplantée, le « sarcome Meth A » d'où son nom ⁷¹. Le gène codant pour le TNF- α , localisé sur le chromosome 6 à proximité du locus codant pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), n'a été cloné que dans les années 1980 ⁷². Il est principalement sous le contrôle du facteur nucléaire kappa-B (NF- κ B). Depuis la découverte du TNF- α , la superfamille des tumor necrosis factor, formée de facteurs solubles et membranaires, régulant les systèmes de défense immunitaire, s'est considérablement agrandie et compte plus de 40 systèmes ligands récepteurs qui n'existent que chez les vertébrés. C'est pour ses propriétés anti-tumorales que le TNF- α , est utilisé depuis le début des années 90 dans les perfusions isolées de membre.

a. Structure

Le TNF- α est une glycoprotéine exprimée sous deux formes : une protéine membranaire de type II de 233 acides aminés (26 kDa) assemblée en homotrimère avec des ponts disulfures intra chaîne ⁷³ et une protéine soluble de 157 acides aminés (17 kDa) résultant du clivage de la forme membranaire par une métallo protéase TACE (TNF-alpha converting enzyme) ⁷⁴. Ces deux formes sont actives mais ont des affinités différentes pour les récepteurs au TNF- α ⁷⁵. Chez l'homme, deux récepteurs membranaires distincts pour le TNF- α ont été identifiés : le récepteur de type I (TNF-RI/p55/CD120a) et le récepteur de type II (TNF RII/p75/CD120b). TNF-RI est principalement stimulé par la forme soluble du TNF- α , tandis que TNF-RII stimulé par sa forme membranaire à travers un contact direct de cellule à cellule. Ces deux récepteurs présentent une homologie de structure au niveau de leur domaine

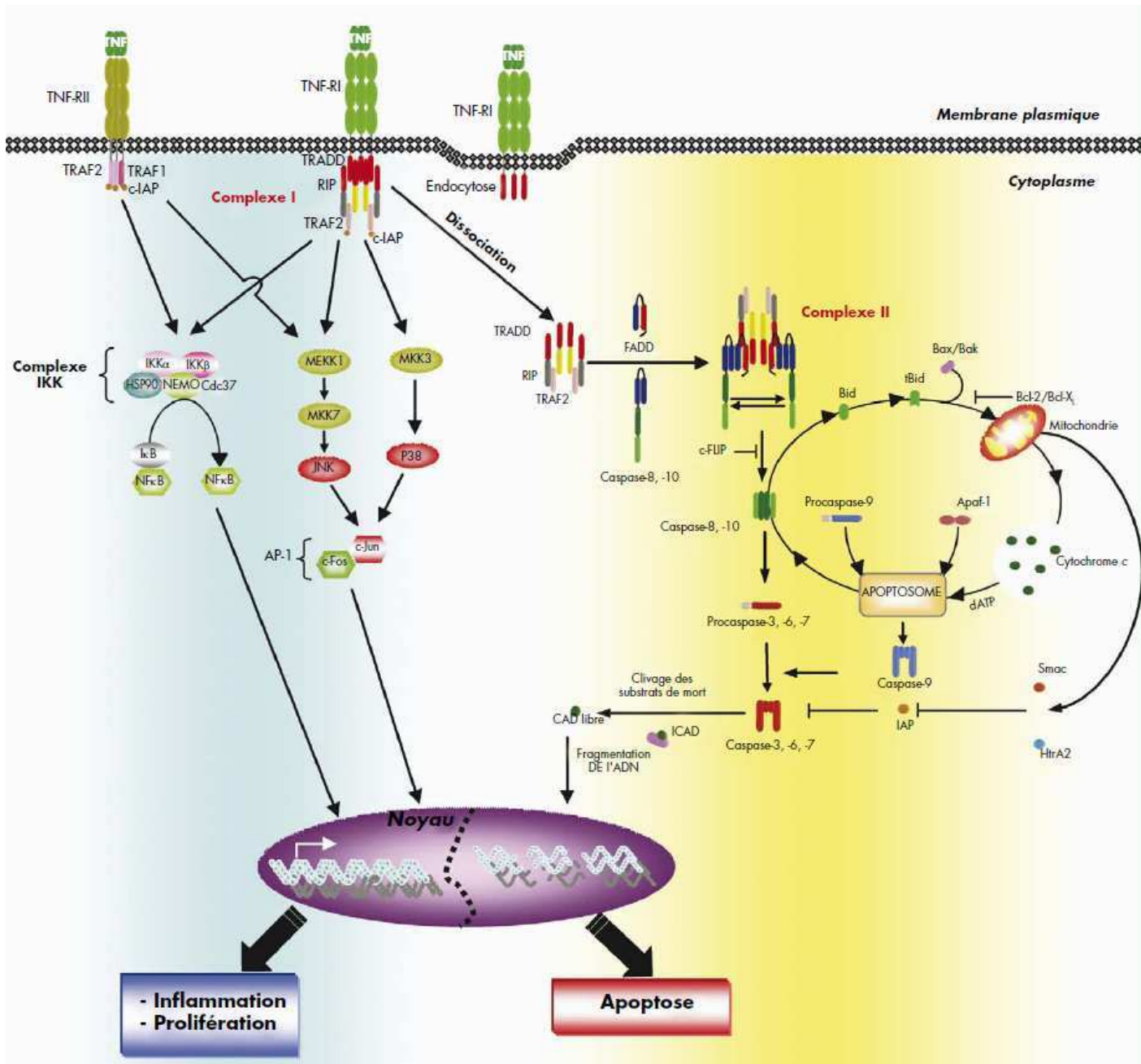
extracellulaire incluant des régions riches en cystéines (CDRs, cysteine-rich domains), communes aux différents membres de la famille des récepteurs au TNF- α . En revanche, ces deux récepteurs présentent des domaines intracellulaires distincts : TNF-RI possède un domaine de mort capable d'induire un signal apoptotique, alors que TNFRII en est dépourvu ⁷⁶. Par ailleurs, TNF-RI est exprimé constitutivement et semble initier la plupart des fonctions biologiques du TNF- α , notamment son activité cytotoxique. Cependant, TNF-RII est exprimé constitutivement sur les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques ou induit sur les autres cellules et aurait plutôt un rôle de régulation de la prolifération, notamment au niveau des cellules du système immunitaire ⁷⁷. Ainsi, les différentes activités biologiques de TNF- α sont médiées par ces deux récepteurs distincts. Il est à noter qu'il existe une coopération fonctionnelle entre les deux types de récepteurs ⁷⁸. De plus, la métalloprotéase TACE appartenant à la famille ADAM (a-disintegrin-and metalloproteinase) est également capable de libérer les récepteurs au TNF- α depuis la surface cellulaire conduisant à la neutralisation du TNF- α circulant ⁷⁹. Cela représente un mécanisme important de la régulation négative de l'activité biologique du TNF- α .

b. Signalisation du TNF- α

Les récepteurs au TNF- α sont exprimés à la surface cellulaire sous forme d'homotrimères pré associés en l'absence de ligand. Cette pré association, induite par la présence d'un domaine PLAD (pre-ligand assembly domain) au niveau du dernier CRD, est essentielle pour la liaison du ligand ^{80,81}. Cependant, TNF-RI est maintenu inactif par la protéine SODD (silencer of death domain) qui bloque l'auto agrégation des domaines de mort (death domain [DD]) en l'absence de ligand, empêchant ainsi l'activation constitutive du récepteur ⁸². La liaison du TNF- α , lui-même sous forme homotrimérique sur son récepteur TNF-RI, va induire la dissociation de SODD et le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (TNF receptor associated death domain) par interaction entre le domaine de mort de TNF-RI et un domaine de mort homologue présent au niveau de TRADD ⁸³. La molécule TRADD va ainsi jouer le rôle de point d'ancrage permettant le recrutement de différentes molécules impliquées dans différentes voies de signalisation. Plusieurs travaux indiquent que TNF-RI possède la capacité d'induire, d'une part, un signal apoptotique et, d'autre part, les voies JNK/p38MAPK et NF- κ B (Figure 10). Le signal apoptotique est induit par le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain) via

TRADD par l'interaction entre les domaines de mort ⁸⁴. FADD va permettre le recrutement de procaspases initiatrices, notamment la procaspase-8, puis la formation du complexe DISC décrit plus haut aboutissant à la formation de la caspase-8 active. Si la caspase-8 est suffisamment activée au niveau du DISC, l'activation directe de la procaspase-3 et l'apoptose de la cellule cible s'en suit.

Figure 10 : Voies de signalisation du TNF- α .



Par ailleurs, la molécule TRADD est capable d'induire un signal anti-apoptique par le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF2 (TNF-R -associated factor 2) et la

kinase RIP (receptor-interacting protein) ⁸³ qui vont permettre respectivement l'activation des voies JNK/p38MAPK et NF- κ B ⁸⁵⁻⁸⁷. L'activation de la voie NF- κ B résulte de l'activation du complexe IKK par RIP. Il s'agit d'un complexe multi protéique à activité kinase dont le rôle après activation consiste à phosphoryler l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B, induisant sa dégradation par le protéasome et facilitant la libération de NF- κ B et sa migration dans le noyau ⁸⁸. L'activation des voies JNK/ p38MAPK se fait, quant à elles, par TRAF2 qui va initier une cascade de kinases aboutissant à l'activation de JNK/ p38MAPK et à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle à travers AP1. Ces voies contrôlent l'expression de nombreuses protéines anti-apoptotiques, en particulier NF- κ B pour cIAP1, cIAP2, XIAP, cFLIP et BclXL, mais également les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et de prolifération ou de survie cellulaire. Par ailleurs, TRAF2 est capable d'inhiber l'apoptose via le recrutement direct de cIAP1 et de cIAP2. Dépourvu de domaine de mort, le récepteur TNF-RII induit également l'activation de ces voies via le recrutement de TRAF2 et implique également le recrutement de TRAF1 conduisant au recrutement de cIAP1 et de cIAP2 ⁸⁹. Il existe ainsi un paradoxe au niveau de la signalisation par TNF-RI, puisque ce même récepteur est capable d'induire des voies antagonistes, à savoir une voie proapoptotique passant par TRADD-FADD-caspase-8 et une voie anti-apoptotique passant par TRADD-TRAF2-RIP-NF- κ B. Néanmoins, il existe un degré de complexité supplémentaire en particulier dans la voie JNK. En effet, il a été montré qu'elle possède une activité proapoptotique pouvant être inhibée par la voie NF- κ B ⁹⁰. D'autres voies métaboliques ont été décrites comme participant à l'induction de l'apoptose induite par TNF- α incluant la voie de la céramide inhibant les facteurs anti-apoptotiques ^{91,92}. D'autres travaux ont suggéré l'existence d'une compartimentalisation de la signalisation du TNF- α ⁹³. Grâce à des études utilisant des inhibiteurs pharmacologiques, il a été montré que l'induction de l'apoptose requiert l'internalisation de TNF-RI ⁹⁴ et que l'activation de NF- κ B par TNF- α était liée au recrutement de TNF-RI dans les rafts lipidiques à la surface cellulaire ⁹⁵. Micheau et al. ont proposé récemment un modèle impliquant la formation de deux complexes spatiotemporellement distincts qui activent séquentiellement la voie NF- κ B puis la voie des caspases suite à la stimulation de TNF-RI. Peu de temps après l'activation de TNF-RI se formerait un complexe I contenant TNF-R1, TRADD, TRAF2 et RIP, localisé à la membrane plasmique et conduisant à l'activation de la voie NF- κ B. Plus tard après stimulation de TNF-RI et après internalisation du récepteur, RIP et TRAF2

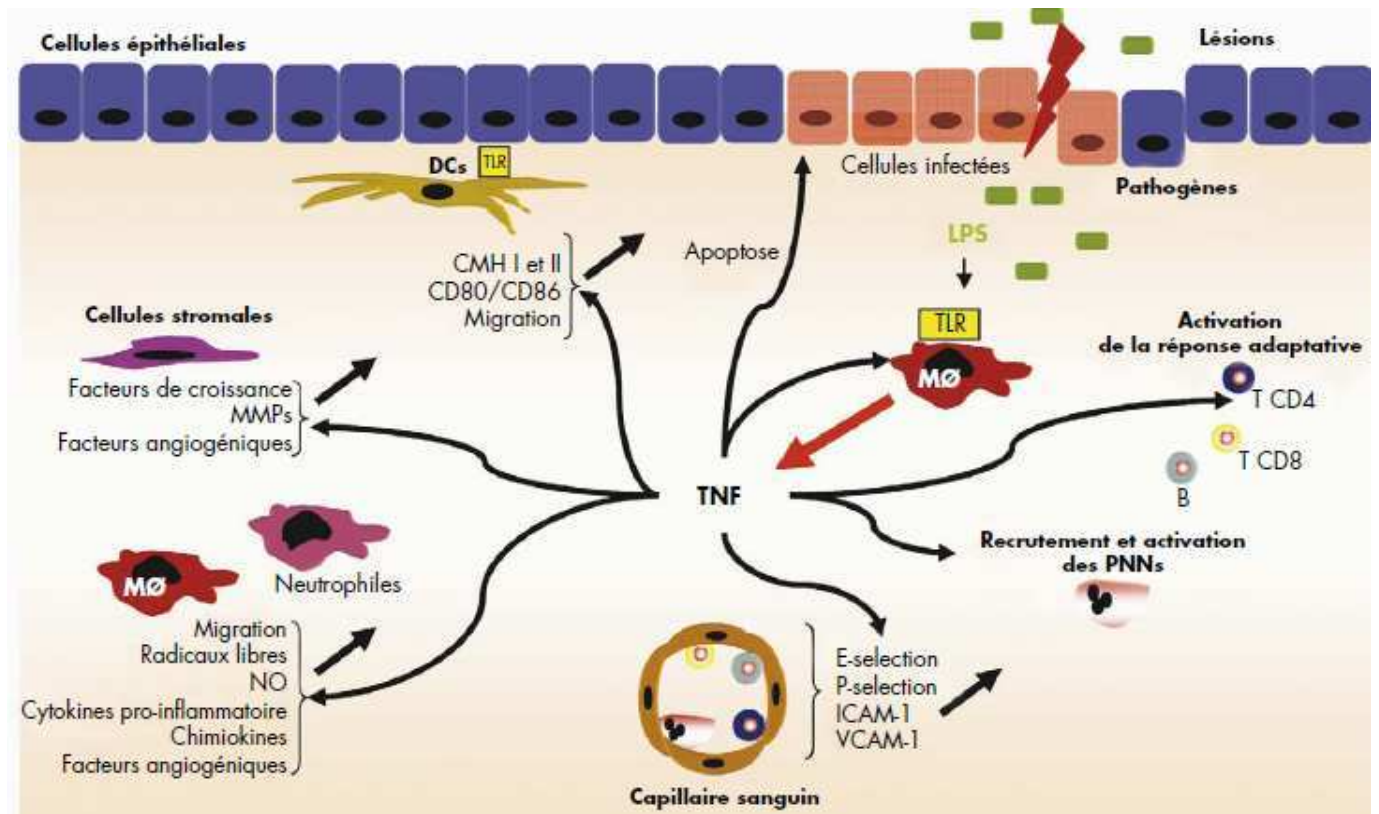
se dissocieraient du récepteur permettant le recrutement de FADD et de la procaspase-8 formant ainsi le complexe II. Avant la formation du complexe II, NF- κ B pourrait ainsi avoir le temps d'induire l'expression de gènes anti-apoptotiques (cFLIP, clAPs), d'inhiber l'activation des caspases et de la voie JNK, le complexe I jouerait le rôle de point de contrôle décidant si le complexe II peut induire ou non l'apoptose. Ainsi, il existe une compétition et une interdépendance très complexe au niveau des différentes voies induites par le TNF- α qui est sans doute le reflet de la remarquable pléiotropie de cette cytokine.

c. TNF- α et réponse inflammatoire

Le TNF- α joue un rôle central dans le développement de l'inflammation. Il est induit par les récepteurs toll-like, permettant de reconnaître la structure conservée des molécules de pathogènes (pathogen-associated molecular patterns [PAMPs]) à la suite de lésions cellulaires ou bactériennes, exprimées par les cellules résidentes du tissu conjonctif (mastocytes, macrophages, neutrophiles, fibroblastes, cellules dendritiques) (Figure 11) ⁹⁶. Le TNF- α exerce une action apoptotique directe sur les cellules infectées. Il stimule aussi l'activité cytotoxique des macrophages. En même temps, il induit la libération de molécules cytotoxiques de la défense immédiate (radicaux libres, monoxyde d'azote [NO]) par les neutrophiles, les cellules endothéliales, les fibroblastes. Ces médiateurs sont susceptibles de moduler les phénomènes primaires de l'inflammation comme la vasodilatation, la perméabilité, le chimiotactisme et favorisent les mécanismes de destructions tissulaires. Le TNF- α active la transcription de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, IL18) et de facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) pour amplifier la réponse inflammatoire conduisant à la synthèse des protéines de l'inflammation (CRP) d'origine hépatique, notamment via l'IL6 et la prostaglandine PGE2. Il stimule l'expression des facteurs angiogéniques (VEGF, VCAM) et facilite ainsi la néoangiogenèse. Cette cytokine induit la synthèse de métalloprotéinases matricielles (MMPs) de type collagénase (MMP1), gélatinases (MMP2 et 9), qui sont impliquées dans la migration cellulaire, et stromélysine 1 (MMP3), impliquée dans la destruction de la matrice. Elle augmente ainsi la migration des polynucléaires neutrophiles (PNN) à l'aide d'un gradient chimiotactique de TNF- α . En effet, au niveau de l'endothélium, le TNF- α augmente la perméabilité vasculaire, induit l'activité pro coagulante et l'expression des molécules d'adhésions (ICAM1, VCAM1, sélectines) et des

chimiokines (MCP1, IL8). Ces molécules favorisent le recrutement et l'activation des cellules de la réponse innée, les neutrophiles et les macrophages, au niveau du site d'infection ou de dommage, suivies par les lymphocytes, cellules de la réponse adaptative. Le TNF- α joue ainsi un rôle dans la génération d'une réponse immune spécifique impliquant les lymphocytes T et B spécifiques d'antigène et l'initiation d'une réponse mémoire. Il augmente en effet la production de cellules Th (T helper). Il contrôle directement et indirectement, par l'intermédiaire d'autres cytokines, la prolifération des cellules B et leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps. La réaction inflammatoire est suivie d'une réponse anti-inflammatoire initiée également par le TNF- α et en coopération avec l'IL1 induite par les récepteurs solubles du TNF- α et de l'IL1 et aux inhibiteurs de MMPs, TIMP1 et TIMP2. IL10, comme IL4 et IL13, induite également par le TNF- α , joue un rôle important dans cette réaction par sa capacité à inhiber la production de TNF- α , d'IL1, d'IL6 par les macrophages et les neutrophiles, et à inhiber l'expression de la NO synthase inducible. Cette phase est suivie par la réparation tissulaire ou la cicatrisation assurée par les plaquettes, les neutrophiles, les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes.

Figure 11 : TNF- α et réponse inflammatoire.



2. TNF- α et cancer

Le TNF- α est caractérisé par son rôle paradoxal dans les pathologies cancéreuses avec, d'une part, la défense de l'hôte contre les tumeurs et, d'autre part, son implication dans l'initiation et la progression tumorale. En effet, des souris génétiquement déficientes pour le gène codant pour le TNF- α ont permis de montrer le rôle du TNF- α dans l'immunosurveillance anti tumorale, concept initialement proposé par Burnet en 1957 et Thomas en 1959⁹⁷⁻¹⁰⁰. Cependant, d'autres travaux ont mis en évidence l'implication de cette cytokine dans le développement tumoral et des métastases^{101,102}. En effet, l'incidence de certaines tumeurs comme celles de la peau est diminuée chez ces souris transgéniques par rapport aux souris immunocompétentes après traitement par un carcinogène suivi par des traitements répétés par le TPA (12-o-tétradécanoylphorbol-13-acétate). Ce retard de développement tumoral semble être dû au déficit de l'expression de certains gènes tels que GM-CSF, MMP3 et 9. De même, les souris déficientes en TNF-RI et également en TNF-RII montrent une résistance à la carcinogenèse cutanée¹⁰³. Le rôle de TNF- α dans l'initiation tumorale a été aussi étudié dans les modèles de carcinogenèse hépatique¹⁰⁴. En effet, le TNF- α pourrait induire l'expression de chimiokines qui réguleraient la migration et l'accumulation des cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques¹⁰⁵. Il a été également démontré que l'injection de TNF- α chez l'animal est susceptible d'augmenter les métastases pulmonaires issues de fibrosarcome¹⁰⁶. De même, les métastases pulmonaires sont réduites par l'addition d'un anticorps anti-TNF- α neutralisant. Malik et al. ont rapporté que la surexpression de TNF- α confère des propriétés invasives dans les xénogreffes de différentes tumeurs¹⁰⁷. Cependant, l'effet du TNF- α est clairement dépendant du type de tumeur, puisque le transgène codant pour le TNF- α peut induire dans un cas le rejet de la tumeur et dans l'autre, le développement de métastases hépatiques¹⁰⁸.

a. TNF- α , un promoteur tumoral

Le rôle du TNF- α dans le développement tumoral a été mis en évidence lors de plusieurs études précliniques et cliniques. Ces dernières ont montré une concentration importante du TNF- α dans le site tumoral, ainsi que son implication dans les lésions pré néoplasiques spécifiques et dans les stades avancés de la maladie. Ces études ont suggéré *in vitro* et *in vivo* un rôle pro tumoral du TNF- α . De plus, plusieurs syndromes paranéoplasiques bien connus chez les patients présentant un cancer

semblent être dus à plusieurs facteurs sécrétés par l'hôte ou la tumeur elle-même incluant le TNF- α . Enfin, plusieurs SNPs (single nucleotide polymorphisms) qui influenceraient l'étendue de l'expression du TNF- α sont associés à une incidence accrue de cancer ¹⁰⁹.

b. TNF- α dans le microenvironnement tumoral

Les études immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* ont confirmé l'expression du TNF- α dans le stroma et dans la tumeur même dans les cancers du sein, ovarien, colorectal, de la prostate, de l'œsophage et du rein, dans le mélanome, dans les lymphomes et les leucémies. Les études concernant des carcinomes ovariens, le lymphome non hodgkinien, les leucémies aiguës, la leucémie myéloïde chronique et la leucémie lymphatique chronique ont montré une association entre l'expression du TNF- α , le faible taux de survie et la résistance aux thérapies ¹¹⁰⁻¹¹⁴.

c. Mécanismes conduisant à l'évolution tumorale

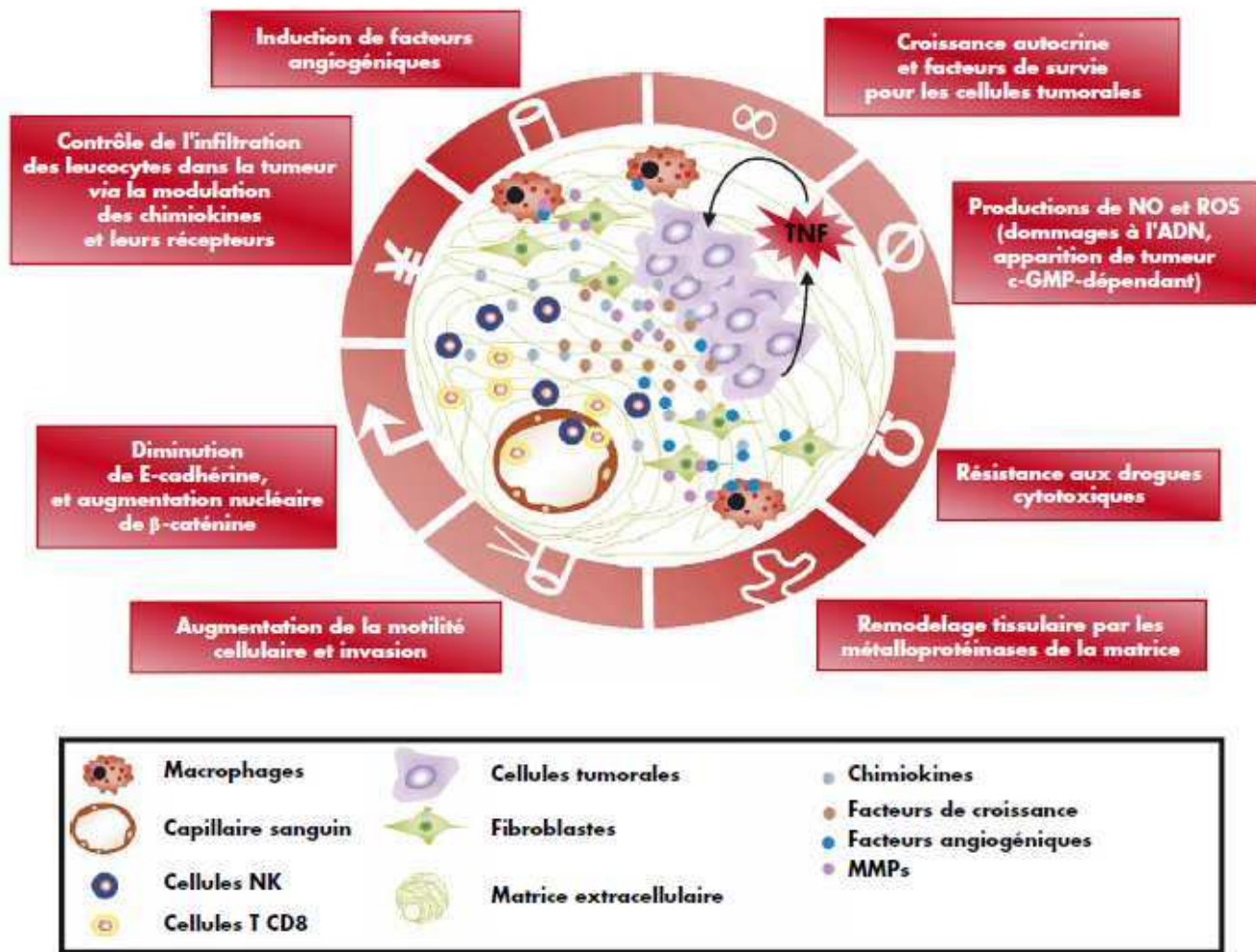
Le TNF- α seul est rarement cytotoxique contre des cellules tumorales *in vitro*. En effet, les cellules tumorales sont souvent résistantes au TNF- α grâce à un mécanisme impliquant la « manganèse superoxyde dismutase » qui neutralise les radicaux libres induits par le TNF- α ¹¹⁵. De plus, plusieurs arguments expérimentaux suggèrent un rôle clef de la p53 sauvage dans le contrôle de la sensibilité tumorale au TNF- α . En effet, les mutations du gène suppresseur de tumeur p53 ont été fréquemment associées au processus de tumorigenèse. Cai et al ¹¹⁶ ont travaillé sur la relation entre le développement d'une résistance tumorale à l'action de TNF- α et la fonction p53 en utilisant la lignée TNF- α sensible d'adénocarcinome du sein humain MCF7 qui est porteuse de p53 sauvage et ses deux lignées dérivées résistantes au TNF- α et porteuses d'une mutation R280K et d'une délétion de p53 respectivement (MCF7/R-A1 and MCF7/Adr). Ces mutations entraînent une incapacité à induire la transcription de p21waf1/CIP1 et MDM2 qui sont des gènes cibles de p53 lors de la stimulation par TNF- α ou par irradiation. D'autre part, la transfection de MCF7 par le papillomavirus humain 16 E6, connu pour sa capacité à inactiver p53 entraîne une suppression de l'activité cytotoxique mais pas cytotatique de TNF- α . Ces résultats suggèrent que l'activité p53 est impliquée dans la toxicité au TNF- α et que la perte de cette activité entraîne une résistance des cellules tumorales à l'action cytotoxique de TNF- α . De plus, la même équipe a démontré que l'introduction d'un adénovirus recombinant

porteur du gène p53 sauvage (Adwtp53) dans des cellules issues de lignées MCF-7 rendues résistantes au TNF- α par mutation ou inactivation de p53 (1001 and MCF7/Adr) permettait à ces cellules d'exprimer p53 sauvage et d'induire les gènes cibles de p53 : MDM2 and p21. De plus, la restauration des fonctions de p53 sensibilisait ces cellules à l'action cytotoxique de TNF- α . Ceci corrélait avec la baisse de la sécrétion de la protéine c-myc dans les 2 lignées et avec la baisse de la sécrétion de la protéine du rétinoblastome (Rb) dans la lignée 1001 ¹¹⁷. Par ailleurs, la résistance à l'action du TNF- α de la lignée p53 mutée 1001 était liée à une réduction de l'activation de la caspase 8 ainsi qu'à un défaut de perméabilisation de la membrane mitochondriale. De plus, en réponse au TNF- α , ces cellules se sont révélées incapables de transloquer l'AIF mitochondrial et le cytochrome c vers le noyau et le cytoplasme respectivement. Ces résultats suggèrent une relation entre l'action du TNF- α et la mitochondrie ¹¹⁸. Au contraire, certains travaux font état de l'absence de relation entre la voie de p53 et la toxicité au TNF- α . En effet, il a été démontré que le paclitaxel agissait aussi bien, voire mieux, en présence de p53 mutée que de p53 sauvage. Or ces résultats obtenus dans des modèles de xélogreffe humaine n'étaient pas reproductibles *in vitro* sur des lignées murines transformées. Ainsi, le rôle du microenvironnement et des macrophages, stimulés par le paclitaxel à produire du TNF- α a été évoqué. Ce dernier agissait aussi bien en présence qu'en l'absence de p53 et donc *via* une voie de signalisation différente ¹¹⁹. Cependant, ces travaux ont été réalisés sur des lignées murines de fibroblaste transformées et les résultats sont sans doute à interpréter en fonction du contexte très éloigné de la clinique humaine. Enfin, l'interrelation TNF- α /p53 pourrait passer par l'induction de NF- κ B. Ainsi, il a été démontré *in vitro* qu'en présence de p53 mutée, l'action cytotoxique du TNF- α était diminuée alors que celle-ci augmentait quand p53 mutée était inactivée. Parallèlement, l'activité NF- κ B était augmentée en présence de p53 mutée et diminuée quand celle-ci était inactivée ¹²⁰. Ainsi, l'activation constitutive de NF- κ B en présence de p53 mutée pourrait protéger les cellules de l'apoptose induite par TNF- α . Aussi l'inactivation de la voie NF- κ B dans un contexte p53 sauvage conduit à l'abrogation de la transcription de p21 en présence de TNF- α dans les cellules MCF-7 ainsi que dans un modèle dérivé du sarcome d'Ewing ^{121,122}. La transcription de p21 en réponse au TNF- α est par ailleurs indépendante du statut de p53 dans le modèle MCF-7. On note toutefois que p53 s'accumule en présence de TNF- α dans des MCF-7 sauvages mais pas lorsque p53 a été muté ou inactivé dans ces lignées mais que

cette accumulation est inactive fonctionnellement puisqu'elle ne s'associe pas à la phosphorylation des serines 15, 20 et 392, étape indispensable à l'activation transcriptionnelle de p53¹²¹.

Enfin, le TNF- α promeut la croissance tumorale, l'invasion et les métastases par différents mécanismes. Il agit comme un facteur de croissance dans certains types de cancer, en augmentant l'expression des régulateurs positifs du cycle cellulaire (Ras ou c-Myc) et en diminuant le niveau des inhibiteurs CDKs (cyclin-dependent-kinases)¹²³⁻¹²⁵. Les autres rôles directs du TNF- α incluent l'induction de la chimiorésistance dans plusieurs cancers¹²⁶. Cette cytokine promeut également le dommage à l'ADN et inhibe la réparation de l'ADN par augmentation de la production de molécules génotoxiques (NO et ROS) par les cellules cancéreuses elles-mêmes ou les cellules du stroma comme les macrophages infiltrants¹²⁷. Notamment, il a été démontré qu'une faible concentration de NO était impliquée dans plusieurs aspects de la tumorigenèse. Au niveau du stroma, TNF- α peut promouvoir l'angiogenèse¹²⁸. En effet, plusieurs facteurs médient l'effet pro-angiogénique du TNF- α incluant VEGF et son récepteur VEGFR2, β FGF, IL8, PAF (platelet activating factor), éphrine A, NO, E-sélectine, ICAM1, et thymidine-phosphorylase¹²⁹⁻¹³³. Il promeut également la tumeur en stimulant l'activité des fibroblastes, la motilité cellulaire tumorale et l'invasion tumorale via l'induction de métalloprotéinases matricielles¹³⁴⁻¹³⁶. Il a été proposé également que le TNF- α soit capable de promouvoir l'invasion tumorale à travers l'activation de l'oncogène c-Src et par la production des ROS qui conduit à la diminution du niveau de l'Ecadherine, une molécule importante dans l'adhésion cellulaire et a une augmentation du niveau cytoplasmique et nucléaire de la β -caténine¹³⁷. Ainsi, le TNF- α , cytokine pro inflammatoire, libérée par l'hôte ou par les cellules tumorales elles-mêmes, est un facteur important dans l'initiation, la prolifération, l'angiogenèse et les métastases de différents types tumoraux (Figure 12).

Figure 12 : TNF- α et cancer.



3. TNF- α et thérapies anticancéreuses

Le TNF- α possède ainsi un rôle paradoxal au cours de la progression tumorale : il induit, d'une part, la destruction vasculaire et tumorale de certains cancers lorsqu'il est utilisé à haute dose et, d'autre part, il est capable d'agir comme un promoteur tumoral lorsqu'il est produit de façon chronique à faibles doses.

a. Effets du TNF- α à haute dose

Les effets du TNF- α à haute dose sur des modèles animaux de cancer et chez l'homme sont variés et comportent :

– une action sélective sur les cellules endothéliales tumorales par inactivation de l'intégrine- α V β 3 qui est exprimée sélectivement sur les cellules endothéliales en

prolifération telles que dans les cancers en poussée évolutive et de façon moindre sur les cellules endothéliales quiescentes¹³⁸. L'inhibition chimique de cette molécule de surface provoque l'apoptose des vaisseaux et peut être responsable de la sélectivité de la destruction vasculaire tumorale du TNF- α . D'autres hypothèses concernant la sélectivité vasculaire tumorale impliqueraient la voie du NO : des niveaux plus élevés de NO-synthase inductible (iNOS) ont été retrouvés dans les vaisseaux tumoraux par rapport aux tissus adjacents, alors que l'inhibition de NO diminue la sensibilité endothéliale au TNF- α in vitro¹³⁹. Enfin, EMAPII (endothelial monocyteactivating-polypeptide-II) s'accumulerait sur les sites tumoraux hypoxiques¹⁴⁰ et sensibiliserait ainsi à l'effet du TNF- α en augmentant l'expression de TNF-R1 sur les cellules endothéliales tumorales ;

– une action pro coagulante sur l'endothélium vasculaire : TNF- α induit l'expression de facteur TF (procoagulant tissue factor) et de facteur von Willebrand par les cellules endothéliales et les monocytes activés entraînant une thrombose sélective de la vascularisation tumorale dès les premières heures¹⁴¹. Cette activation d'un état pro coagulant semble responsable de la nécrose hémorragique tumorale observée en présence de TNF- α ⁷¹;

– une leucostase en liaison avec la libération de EMAPII qui active les cellules endothéliales et induit l'expression de P- et E-sélectines, activant les leucocytes (induction de chimiotactisme et dégranulation) et les monocytes (libération de cytokines, de TF et chimiotactisme des monocytes/macrophages au site inflammatoire). Cela conduit à l'adhésion des cellules circulantes et des plaquettes, au recrutement intra vasculaire de PNN (dans les trois premières heures), à la diapédèse et à la colonisation intra tumorale de PNN dans les trois jours, et au recrutement de lymphocytes T et B et de macrophages dans les deux premières semaines¹⁴²;

– une diminution de la pression interstitielle intratumorale¹⁴³ et une augmentation de la perméabilité vasculaire^{144,145} qui conduit à une augmentation de la concentration des autres substances éventuellement coadministrées^{146,147}. Cet effet est précoce dans les 30 premières minutes de contact avec le TNF- α et découle de l'altération morphologique des cellules endothéliales¹⁴⁸;

– une apoptose de certains types de cellules tumorales¹⁴⁹.

b. Différentes utilisations TNF- α en thérapeutique oncologique

- Administration par voie systémique

Entre 1988 et 1990, une quarantaine d'essais de phases I et II d'administration du TNF- α par voie systémique en bolus ou en injection continue, seul ou en association avec divers facteurs (IL2, melphalan, hyperthermie, IFN γ et α , VP16, 5-FU, dactinomycine, OKT3) ont été entrepris (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/>)¹⁵⁰⁻¹⁵⁴. Ces essais se sont soldés par une absence de réponse clinique significative accompagnée d'une toxicité excessive, dose-dépendante, à type de syndrome inflammatoire majeur analogue aux effets d'un choc septique (hypotension artérielle par vasoplégie, insuffisance cardiaque et défaillance d'organe). Il a été impossible de délivrer la dose anti tumorale nécessaire aux patients sans effets toxiques secondaires sévères. En effet, la DMT (dose maximum tolérée) va de 30 à 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ en cas d'injection quotidienne pendant cinq jours et de 200 à 545 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ en cas d'injection de 24 h¹⁵⁵ et à cette dose, l'efficacité n'est pas démontrée. Les essais de phase II comportant des doses de 350 à 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ étaient donc inefficaces et toxiques. Au début des années 1990, les essais de TNF- α en systémique ont été abandonnés. De nouvelles approches ont été élaborées pour améliorer l'efficacité thérapeutique du TNF- α : le principe de ces approches a été fondé sur des stratégies visant une augmentation des doses et une diminution de la toxicité (Tableau 4 et 5).

Tableau 4: Approches élaborées pour améliorer l'efficacité thérapeutique du TNF- α dans des modèles expérimentaux.

Molécules	Stratégies	Références
Analogues du TNF (ou <i>TNF muteins</i>)	Scinder les domaines du TNF- α responsables de son activité de ceux responsables de sa toxicité	156
	Synthèse de molécules se fixant exclusivement sur le TNF-RI ou RII.	157
Formes modifiées de TNF- α associées ou encapsulées dans des liposomes	Diminuer la toxicité par libération au contact de la tumeur	158
PVP-TNF- α et MPEG-TNF- α	Bio-conjuguer le TNF- α avec des polymères solubles (PEG ou PVP) qui le protègent contre la dégradation protéolytique et augmentent sa stabilité et son temps de transit	159
TNF-SAM2	Augmenter les bases N-terminales du TNF- α ce qui lui confère une meilleure activité biologique et une moins grande toxicité	146
Transfert de gènes	Répliquer des adénovirus déficients codant pour la version active du TNF-RI sous le contrôle d'un promoteur/enhancer élément spécifique du mélanome	
Bab	Fusionner le TNF- α à un anticorps monoclonal (anticorps bispécifique) capable de se fixer sélectivement à des molécules exprimées par la tumeur (antigène carcino-embryonnaire, isoforme ED-B de fibronectine, et glycoprotéine présente sur les mélanomes)	160-164

Tableau 5 : Approches élaborées pour améliorer l'efficacité thérapeutique du TNF- α dans des études cliniques.

Molécules	Stratégies	Références
Or colloïdal associé au TNF- α (CYT-6091)	Libérer le TNF- α au contact de la tumeur : essai de phase I.	165–167
TNFRerade	Développer des adénovirus déficients pour leur réplication et transportant un transgène codant pour le TNF- α sous le contrôle d'un promoteur radiation dépendant : - des études de phase I et II ont démontré l'absence de toxicité et une réponse objective chez 70% des patients traités ; - d'autres études randomisées dont une phase III sont en cours associées à la radiothérapie seule ou à d'autres chimiothérapies (capecitabine, 5-FU, hydroxyurée, cetuximab).	168–170 171
NGR-TNF	Utiliser des molécules de TNF- α adhérentes à la vascularisation tumorale en couplant le TNF- α à un peptide tumoral qui se lie à CD13 exprimé sur les cellules endothéliales tumorales. Essais de phase II en cours : molécule seule ou en association avec la doxorubicine, l'oxaliplatine et le cisplatine dans divers types de tumeurs avancées ou métastatiques.	172

- Administration par voie intra tumorale

Plusieurs essais d'administration du TNF- α par voie locale (vessie, foie, péritoine et peau) ont échoué du fait d'une absence de réponse prolongée ^{173,174}.

- Administration par perfusion isolée locorégionale

- Essais en perfusion isolée de membre

La technique de perfusion de membre isolé (isolated limb perfusion [ILP]) par un garrot a été décrite par Creech ¹⁷⁵. Elle consiste à administrer des chimiothérapies à des concentrations supérieures aux doses systémiques tolérables tout en minimisant les effets généraux secondaires. Elle est fondée sur l'abord chirurgical des vaisseaux irriguant le membre, la canulation de ceux-ci et la connexion à une pompe pour maintenir la perfusion et l'oxygénation. En mettant des garrots, on obtient ainsi un circuit extracorporel dans lequel on peut injecter les substances à haute concentration. L'adjonction d'une hyperthermie modérée (38,5 à 40 °C) permet d'en potentialiser l'effet. La toxicité systémique est ainsi abolie, selon l'efficacité de l'isolation. Les sarcomes et les mélanomes des membres peuvent conduire à une amputation ou à une désarticulation dans 5 à 10 % des cas. Le traitement chirurgical mutilant ne modifiait pas les courbes de survie par rapport au traitement conservateur ¹⁷⁶. Cela a

conduit à développer ces traitements locorégionaux permettant une conservation des membres. L'utilisation de la technique de l'ILP avec du melphalan seul a conduit à des réponses satisfaisantes en cas de mélanome mais faibles (5 à 10 %) et de courte durée pour le sarcome. L'adjonction de TNF- α à forte dose (3 à 4 mg) au melphalan a permis une amélioration sensible de l'efficacité en cas de sarcomes des membres¹⁷⁷. Avec ce protocole, la réponse clinique est de 70 %, la réponse complète entre 30 et 45 % et le taux de sauvetage du membre de 70 à 80 %. Les sarcomes ainsi traités sont alors rendus extirpables et peuvent alors être opérés par chirurgie conservatrice deux mois après la perfusion (Figure 13)^{155,178,179}. Le TNF- α humain recombinant (tasonermine, Beromun®, Boehringer Ingelheim GmbH) a été enregistré depuis 1999 dans l'indication de conservation de membre pour les sarcomes des tissus mous en Europe. Il a ensuite pu être démontré que la dose de TNF- α pouvait être réduite à 1 mg avec une efficacité identique mais une moindre toxicité^{180,181}. La perfusion isolée de membre avec TNF- α et melphalan a ensuite été étendue aux tumeurs cutanées : carcinomes épidermoïdes, ou neuroendocrines cutanés (ou tumeurs de Merkel) avec une efficacité remarquable : 60 % de réponses complètes histologiques et 27 % de réponses partielles (Figure 14).

Figure 13 : Aspect radiologique (IRM) avant et après traitement par ILP avec TNF- α et melphalan d'un sarcome du membre inférieur. On note la prise de contraste majeure sur la vue de gauche (avant ILP) avec le rehaussement blanc correspondant à la vascularisation tumorale. En revanche, sur la vue de droite, post-ILP, les vaisseaux (en rouge) ne perfusent plus la tumeur.



Il est à noter que les facteurs biologiques de réponse à l'ILP ont été peu étudiés : une seule étude ¹⁸² a recherché une relation entre le grade tumoral, l'activité mitotique, le degré de prolifération et d'apoptose présents dans les biopsies réalisées avant et après ILP et la réponse au traitement, et la survie. Aucun de ces paramètres n'était corrélé à la réponse au traitement clinique ou histologique. La diminution de l'activité mitotique avant et après ILP corrélait avec la réponse clinique mais pas histologique. En cas de mélanome, le taux de réponses complètes corrélait avec le niveau d'expression d'EMAPII ¹⁸³. Des essais de transfection d'EMAPII ont d'ailleurs montré une augmentation de sensibilité au TNF- α dans des modèles animaux ¹⁸⁴. Par ailleurs, le facteur p53 joue un rôle majeur dans le contrôle de la sensibilité à l'action cytotoxique du TNF- α ¹⁸⁵.

Figure 14 : Aspect pré- (à gauche) et post- (à droite) thérapeutique (ILP avec TNF- α et melphalan) deux mois après la perfusion d'une tumeur cutanée de Merkel chez un même patient.



- Essais en perfusion isolée de poumon ou de rein

Quelques cas isolés ont été publiés, mais la toxicité était importante sans efficacité majeure^{186,187}.

- Essais en perfusion isolée de foie

On a retrouvé dans une vingtaine d'essais de phases I et II de perfusion isolée de foie de 20 à 90 % de réponses objectives après une seule cure avec 1 mg de TNF- α associé à différents médicaments (melphalan, mitomycine C, cisplatine, etc.). Quelques essais de phase III ont retrouvé une durée de réponse relativement courte (4 à 14 mois) et une survie entre 6,5 et 27 mois. Celle-ci était prolongée par l'adjonction d'un cathéter intra hépatique artériel permettant de poursuivre la chimiothérapie. La technique chirurgicale est très complexe mais permet une bonne isolation du foie¹⁸⁸. Cependant, la perfusion comporte un taux de mortalité élevé (5 à 27 %). Les complications sont à type de coagulopathie, de thrombose portale, de cytolysse et d'insuffisance hépatocellulaire et de défaillance d'organes multiples. Dans ce contexte, des résultats plus probants ont été obtenus à partir de tumeurs hépatiques d'origine mésoenchymateuse (hyper vascularisée) que sur des métastases de cancer colorectal¹⁸⁹. Il est à noter qu'au cours des perfusions isolées de foie, le TNF- α ne semble pas permettre l'accumulation de melphalan dans la tumeur hépatique^{190,191}. Seule l'association du TNF- α à un autre médicament a prouvé son efficacité dans ce contexte¹⁹². Cette technique est donc extrêmement complexe, avec un taux élevé de morbi-mortalité. Ses résultats ne sont pas supérieurs à ceux obtenus à l'aide de cathéters intra artériels hépatiques en cas de métastases de cancer colorectal. Cette technique reste expérimentale et mérite encore d'être testée dans le cadre d'essais cliniques sur des groupes de patients sélectionnés.

- Essais en perfusion isolée de pelvis

Un essai de phases I/II a administré du TNF- α à très faible dose (0,3 mg) en association avec le melphalan dans un système d'isolation du pelvis au moyen de canules à ballonnets dans la veine cave inférieure et l'aorte sous-rénale, de garrots des membres inférieurs et de combinaison gonflée sur le thorax. Les premiers résultats semblent prometteurs (plus de 30 % de réponses complètes) avec une toxicité acceptable¹⁹³. Une étude de phase III dans l'indication de cancers avancés ou récidivants du col de l'utérus ou du rectum est en cours (<http://clinicaltrials.gov/>).

OBJECTIFS

Les formidables progrès accomplis ces dernières années en cytogénétique dans la caractérisation, le diagnostic et le traitement des sarcomes des tissus mous a permis le développement de thérapeutiques ciblées très efficaces telles que l'imatinib dans les GIST ¹⁹⁴. Cependant, la prise en charge thérapeutique de ces tumeurs reste un défi majeur. On observe, en effet, une résistance naturelle aux traitements conventionnels, peut-être secondaire à la forte proportion de mutations ou d'inactivations de la voie p53. Le développement, depuis 20 ans, des chimiothérapies loco régionales perfusant TNF- α et melphalan a radicalement modifié la prise en charge thérapeutique des STS des membres auparavant basée sur la chirurgie délabrante. Les facteurs expliquant les résistances à ce traitement restent néanmoins encore mal connus.

C'est dans ce contexte que se situent nos travaux qui reposent sur l'évaluation du rôle de p53 dans la sensibilité aux ILP et au TNF- α puis sur la modulation de ce phénomène par l'exposition à des ré activateurs de p53 (CP 31-398) ou à des inhibiteurs de l'interaction p53/MDM2. Certains facteurs moléculaires et génomiques pouvant intervenir dans la résistance tumorale à l'action du TNF- α ont ensuite été analysés.

Une meilleure connaissance des phénomènes de résistance au traitement par ILP et TNF- α ainsi qu'un éventuel contournement de ceux-ci pourra permettre, à l'avenir, d'optimiser la place de ce traitement dans cette population extrêmement hétérogène des STS et son utilisation dans le cadre d'autres tumeurs partageant la même complexité thérapeutique.

RÉSULTATS

I. Mise en évidence de l'implication de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans la réponse au traitement par TNF- α et melphalan administrés au cours d'une perfusion isolée de membre

ARTICLE 1

p53 status correlates with histopathological response in patients with soft tissue sarcomas treated using isolated limb perfusion with TNF- α and melphalan

J. Muret, M. Yacoub, P. Terrier, F. Drusch, A. Laplanche, C. Gaudin, C. Richon, C. Le Péchoux, A. Le Cesne, F. J. Lejeune, T. Tursz, P. Fouret, S. Bonvalot & S. Chouaib

Annals of Oncology 19: 793–800, 2008

doi:10.1093/annonc/mdm559

1. Introduction

Les sarcomes des tissus mous représentent en France 1000 nouveaux cas par an, dont 600 localisés aux membres. Ce sont des tumeurs fréquemment volumineuses au moment du diagnostic, dont le traitement repose sur la chirurgie qui est susceptible d'être mutilante. A partir des années 70, se sont développées des associations thérapeutiques de plus en plus fonctionnelles (chirurgie non mutilante, radiothérapie, chimiothérapies néo-adjuvantes), dont l'objectif était d'éviter l'amputation qui était jusque là le traitement de référence. Les chimiothérapies d'induction locorégionales se sont développées dans ce cadre. La technique de perfusion de membre isolé (Isolated Limb Perfusion ou ILP) par un garrot a été décrite par Creech en 1958¹⁷⁵. Elle repose sur l'administration de concentrations de médicaments 10 fois supérieures aux doses systémiques tolérables et permet de diminuer au maximum le volume tumoral tout en minimisant les effets généraux secondaires. Cependant, une telle approche a été abandonnée dans les indications de sarcome compte tenu du faible taux de réponses objectives (RO) et de l'importante toxicité locorégionale observée avec les différentes drogues utilisées (cisplatine, carboplatine, doxorubicine). Cette technique restait utilisée dans les indications de métastases en transit de mélanome avec perfusion de melphalan, permettant d'obtenir des taux de RO de 70 %. Les taux de RO ont été améliorés par l'adjonction de l'hyperthermie. Le TNF- α , découvert en 1975, possède des propriétés anti-tumorales démontrées dans une grande variété de tumeurs *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et dans des modèles expérimentaux. Cependant, son utilisation par voie systémique chez l'homme est limitée en raison d'une toxicité importante. L'utilisation du TNF- α en technique de perfusion de membre et en association avec le melphalan, a permis d'obtenir des réductions tumorales de 75%, ce qui permet d'entreprendre une chirurgie radicale deux mois après l'ILP et d'éviter l'amputation dans près de 80 % des cas¹⁷⁷. Plusieurs équipes ont rapporté ensuite un taux de réponse objective de 75 % avec près de 30 % de réponses complètes¹⁹⁵. Néanmoins, les mécanismes de réponse, ainsi que les éventuels facteurs prédictifs de réponse, demeurent hypothétiques. En effet, l'action anti-tumorale du TNF- α , semble médiée par différents facteurs : un effet apoptotique direct, une cytostase et une nécrose des cellules tumorales, une augmentation de la perméabilité vasculaire au melphalan et enfin une activité anti-angiogénique. Plusieurs arguments expérimentaux suggèrent un rôle clef de la p53 sauvage dans le contrôle de la sensibilité tumorale au TNF- α . En effet, les mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* ont été

fréquemment associées au processus de tumorigénèse et à la résistance des cellules tumorales aux traitements conventionnels de radio- et chimiothérapie. De plus, il a été montré *in vitro*, dans un modèle d'adénocarcinome mammaire, une corrélation entre la résistance à l'action cytotoxique du TNF- α et la perte de la fonction transactivatrice de la p53 en réponse à une mutation ponctuelle au sein du gène *TP53*¹¹⁶. La restauration de cette fonction p53 sauvage déficiente dans les cellules résistantes au TNF- α , à l'aide d'un adénovirus recombinant pour la p53 sauvage (Adp53wt), a permis de restaurer très significativement la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par le TNF- α ¹¹⁷. L'analyse moléculaire des déterminants impliqués dans la résistance au TNF- α de ces cellules a permis de mettre en évidence une expression constitutivement élevée des protéines c-Myc et Rb. L'infection de ces cellules par l'Adp53wt induit une diminution de l'expression de c-Myc ainsi qu'un clivage de la protéine Rb, qui sont à corrélés directement avec la sensibilisation au TNF- α des cellules p53 mutée et résistantes au TNF- α suite au rétablissement de la fonction p53 sauvage par l'infection par l'Adp53wt²³. En outre, la sensibilisation des cellules p53 mutées résistantes au TNF- α par le rétablissement de la fonction p53 sauvage semble impliquer des étapes précoces de la voie de signalisation de cette cytokine (rétablissement du clivage de la procaspase 8) induisant une activation de la voie mitochondriale conduisant à l'apoptose. Aussi, plus récemment, dans un modèle de lignées tumorales de cancer pulmonaire, l'introduction d'une mutation de p53 dans ces lignées réduisait la sensibilité au TNF- α ¹²⁰. Les mêmes résultats étaient obtenus par une autre équipe¹⁹⁶. Il semble donc que le facteur p53 joue un rôle majeur dans le contrôle de la sensibilité à l'action cytotoxique du TNF- α .

2. Matériel et méthodes

a. Origine des prélèvements

Dans ce cadre, et compte tenu des résultats obtenus *in vitro*, nous nous sommes donc particulièrement intéressés à l'inactivation de la p53 et à sa relation avec la réponse clinique au cours du traitement par ILP de sarcomes des membres avec TNF- α et melphalan. Pour cette étude, nous avons inclus des patients présentant des STS localement évolués des membres et traités par ILP à l'IGR entre juin 2000 et juin 2005. Les patients étaient inclus si nous disposions de matériel histologique conservé en paraffine avant l'ILP (biopsies initiales) et/ou après l'exérèse de la tumeur

pratiquée 2 mois après l'ILP (pièces opératoires). Cette étude avait été validée par notre comité d'éthique au préalable.

b. Technique d'immunohistochimie

b1) Préparation des coupes

Les blocs de tumeurs inclus en paraffine étaient analysés ensuite par un pathologiste expérimenté (Dr Terrier, Pr Fouret et Dr Yacoub) et les portions contenant de la tumeur étaient coupées fraîchement afin de les utiliser pour les techniques d'immunohistochimie. Les anticorps primaires d'origine murine utilisés contre p53 étaient DO7 (M 7001, DAKO, Glostrup, Denmark, 1 : 50, 20 min à 37°C) qui réagit avec un épitope localisé en N-terminal et qui se fixe aussi bien sur la p53 mutée que sauvage et PAb1620 (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA, 1 : 320, toute la nuit à 4°C), qui reconnaît la conformation native sauvage de la protéine p53. Après déparaffinage des lames, les épitopes étaient démasqués par la chaleur dans un bain-marie à 98°C pendant 20 minutes dans un tampon sodium citrate (pH 7.3, 10 mM Microm Microtech, Francheville, France; Diapath, Bergame, Italie, 30PA-0310) pour DO7 et à 98°C pendant 30 min dans un tampon sodium citrate (pH 6.0, Zymed, San Francisco, CA, 00-5000) pour PAb1620. Après refroidissement à la température de la pièce, les étapes suivantes étaient réalisées selon les protocoles standards grâce à l'automate Nexes® (Ventana, Tucson, AZ) avec le kit de détection iView DAB (Ventana) pour DO7, et un kit ABC avidin-biotin (VECTASTAIN® ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, PK-6200) pour PAb1620. La révélation se faisait à la diaminobenzidine (Ventana pour DO7 et NovaRed vector, SK-4800 pour PAb1620) et la contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer (Hemalun, Mayer, RAL reactivities, Martillac, France). Le contrôle positif pour l'anticorps DO7 se faisait sur des lames de cancer du sein avec mutation faux-sens confirmée par séquençage direct du gène de p53 et pour l'anticorps PAb1620, sur des culots cellulaires provenant de la culture de la lignée MCF-7 et enrobés en paraffine. La lignée MCF-7 dérive d'un cancer du sein présentant une accumulation de p53 sauvage. Les contrôles négatifs comportaient des coupes d'un autre cancer du sein avec une mutation non-sens de p53. Les contrôles étaient réalisés lors de chaque analyse avec DO7 et PAb1620. L'anticorps PAb1620 était utilisé dans les prélèvements qui se révélaient être positifs pour DO7.

Les conditions d'incubation pour PAb1620 étaient ajustées afin qu'ils réagissent avec les cellules MCF-7 mais non avec la tumeur mutée pour p53.

b2) Analyse des immunomarquages

Les lames marquées pour DO7 et PAb1620 étaient évaluées de façon aveugle par deux pathologistes expérimentés. Le pourcentage de cellules marquées positivement était noté et utilisé pour attribuer un score sur une échelle de 0 à 3 comme suit :

- Score de 0 si < 10 % des cellules étaient positives
- Score de 1 si 11% à 25% des cellules étaient positives
- Score de 2 si 26% à 50% des cellules étaient positives
- Score de 3 si >50% des cellules étaient positives

Si le score était de 2 ou de 3, l'échantillon était considéré comme positif pour l'anticorps testé et négatif en dessous de 2. Les échantillons étaient considérés comme mutés pour la protéine p53 s'ils étaient positifs pour DO7 mais pas pour PAb1620. Si une discordance était observée quand nous disposions d'échantillons pré et post-ILP, p53 était considérée comme mutée.

c) Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en pourcentages ou moyennes et intervalle. La survie et la survie sans progression (premier évènement survenu, i.e. métastases, second cancer, récurrence locale ou décès) étaient calculées avec la méthode de Kaplan-Meier et 95% de l'intervalle de confiance de Rothman. Les courbes de survie étaient comparées grâce au log-rank test.

3. Résultats

110 patients consécutifs présentant un sarcome localement évolué des membres et traités par ILP ont été inclus dans cette étude. Le tableau des caractéristiques cliniques des patients inclus est présenté dans l'article ci-joint (table 1). L'évolution clinique des patients est présentée dans la table 2.

170 lames ont été analysées en ce qui concerne le statut de p53 (prélèvements pré et/ou post ILP). P53 était hyper exprimée (anticorps DO7 positif) sur 39 lames. PAb1620 était positif dans 15. Donc au total, 24 lames chez 20 patients présentaient une protéine p53 mutée en immunohistochimie. Enfin, comme cela est suggéré sur la

figure 3 de l'article, 94% des patients ayant la mutation p53 avaient aussi une mauvaise réponse histologique post ILP.

4. Discussion

Nous avons donc démontré que dans le contexte de patients traités par ILP avec TNF- α et melphalan pour sarcome des membres, la mutation de p53 détectée par immunohistochimie avec deux anticorps différents, corrèle significativement avec une mauvaise réponse histologique au traitement. Un meilleur contrôle de la maladie après traitement pourrait être en relation avec une meilleure sensibilité des cellules tumorales au TNF- α et au melphalan en présence de p53 sauvage. L'absence de groupe contrôle (patients non traités) ne nous a pas permis de confirmer cette hypothèse qui était suggérée par les études précliniques sur des lignées cellulaires. De plus le melphalan peut aussi être responsable de cette résistance au traitement. En effet, le melphalan, agent alkylant, induit la mort cellulaire grâce à p53 qui est activée lors d'une lésion cellulaire. Les patients qui n'ont pas répondu histologiquement au traitement par ILP et qui étaient p53 mutés ont potentiellement pu être résistants au melphalan du fait de l'absence d'activation de p53. Nous avons conclu que dans le futur, si la manipulation du statut de p53 améliorerait l'efficacité des ILP, on pourrait envisager une nouvelle stratégie thérapeutique consistant à restaurer les fonctions de p53 en utilisant des composés chimiques ou bien par transfert génique, afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique du TNF- α dans le traitement des sarcomes chez l'homme.

p53 status correlates with histopathological response in patients with soft tissue sarcomas treated using isolated limb perfusion with TNF- α and melphalan

J. Muret^{1,8*}, M. Yacoub^{2,8}, P. Terrier², F. Drusch⁷, A. Laplanche³, C. Gaudin⁸, C. Richon⁸, C. Le P  choux⁴, A. Le Cesne⁵, F. J. Lejeune⁹, T. Tursz⁵, P. Fouret^{2,8†}, S. Bonvalot^{6†} & S. Chouaib⁸

¹Department of Anesthesia; ²Department of Pathology; ³Department of Public Health; ⁴Department of Radiotherapy; ⁵Department of Medical Oncology; ⁶Department of Surgery; ⁷Laboratoire de Recherche Translationnelle, Module d'Histocytopathologie; ⁸Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U753 Unit, Immunologie des Tumeurs Humaines: Interaction Effecteurs Cytotoxiques-système Tumoral, Institut Gustave-Roussy, Villejuif Cedex, France; ⁹Multidisciplinary Oncology Centre, Centre Pluridisciplinaire d'Oncologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Lausanne, Switzerland

Received 11 May 2007; revised 8 November 2007; accepted 8 November 2007

Background: Recombinant tumor necrosis factor- α (TNF- α) combined to melphalan is clinically administered through isolated limb perfusion (ILP) for regionally advanced soft tissue sarcomas of the limbs. In preclinical studies, wild-type p53 gene is involved in the regulation of cytotoxic action of TNF- α and loss of p53 function contributes to the resistance of tumour cells to TNF- α . The relationship between p53 status and response to TNF- α and melphalan in patients undergoing ILP is unknown.

Patients and methods: We studied 110 cases of unresectable limbs sarcomas treated by ILP. Immunohistochemistry was carried out using DO7mAb, which reacts with an antigenic determinant from the N-terminal region of both the wild-type and mutant forms of the p53 protein, and PAb1620mAb, which reacts with the 1620 epitope characteristic of the wild-type native conformation of the p53 protein. The immunohistochemistry data were then correlated with various clinical parameters.

Results: P53DO7 was found expressed at high levels in 28 patients, whereas PAb1620 was negative in 20. The tumours with poor histological response to ILP with TNF- α and melphalan showed significantly higher levels of p53-mutated protein.

Conclusions: Our results might be a clue to a role of p53 protein status in TNF- α and melphalan response in clinical use.

Key words: isolated limb perfusion, limb sarcoma, melphalan, p53 status, tumour necrosis factor-alpha

introduction

Sarcomas are among the most resistant tumours to chemotherapy (CT). In these tumours, preoperative doxorubicin-based CT, at maximum tolerated drug doses, is not very effective [40% of radiological response and 6% of pathological complete response (CR)] [1] and does not permit limb salvage in patients who needed an amputation before CT [2].

Hyperthermic isolated limb perfusion (ILP) [3] combined with tumour necrosis factor- α (TNF- α) and melphalan [4] is currently one of the therapies available for patients with advanced soft tissue sarcomas (STSs) of the limbs, allowing conservative surgery. ILP requires isolation of the patients

involved limb, its connection to a heart–lung machine and the administration of TNF- α and melphalan at 39–40°C, followed by conservative surgery 2 months later. The rationale is to improve the response rate by increasing the drug concentration while avoiding systemic toxicity. In a multicentre European trial, ILP with high-dose TNF- α and melphalan resulted in a 76% response rate and 71% limb salvage in patients with limb-threatening STSs [5]. In a dose–response study [6], objective tumour response (OR) (65%) and limb salvage (71%) did not vary in the four different dose groups tested (TNF- α dose between 0.5 and 4 mg). The well-studied mechanisms involved in TNF- α activity are an early effect on tumour vascularisation that is an increase in endothelium permeability, leading to increased melphalan concentration within the tissue tumour. The apoptosis pathway mediates a late effect that induces a selective destruction of tumour vessels with vascular occlusion due to intravascular coagulation followed by haemorrhagic necrosis [7–9].

*Correspondence to: Dr J. Muret, Service d'Anesthésie, Institut Gustave-Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France. Tel: +33 1 42 11 40 18; Fax: +33 1 42 11 52 09; E-mail: muret@igr.fr

†Both these authors contributed to this article on a par.

p53 is a suppressor gene located on chromosome 17p13 and is mutated in 17% of soft tissue tumours [10] (IARC TP53 mutation database, R11 release, October 2006). Evidence has been provided indicating that in sarcomas, *p53* protein mutation correlated with a worse outcome especially if associated to an amplification of *mdm2* gene [11]. *In vitro* studies revealed that the tumour resistance to TNF- α -induced cell death was associated with *p53* gene mutation and the subsequent loss of its transactivation activities [12, 13]. While the disruption of wild-type *p53* gene function by E6 gene transfection protects MCF7 cells from TNF- α -induced apoptosis, the adenovirus-mediated transfer of the wild-type *p53* gene sensitises TNF- α -resistant MCF7 cells to the cytotoxic effects of this cytokine [14]. The mechanisms by which the restoration of the wild-type *p53* gene function in *p53* gene mutant cells increases their susceptibility to the cytotoxic action of TNF- α include a restoration of caspase 8 cleavage and the re-establishment of mitochondrial signs of apoptosis [15]. This also correlated with a significant down-regulation of *c-myc* and a decrease in retinoblastoma protein [16].

Moreover, melphalan, as an alkylating agent, induces cell death through *p53* that is activated by DNA damage [17, 18]. Mutated *p53* may prevent from this activation and could explain resistance of sarcomas to melphalan during ILP treatment.

These findings indicate that *p53* protein status may be an important determinant of the efficacy of treatment protocols on the basis of the use of apoptosis inducers such as TNF- α and melphalan. In this context, wild-type *p53* may be an essential component in promoting the dynamic of cell death and may help to achieve a significant therapeutic index of cytotoxic mechanisms and develop more effective therapeutic immune interventions.

These studies were designed to investigate whether treatment response and clinical outcome of patients treated with ILP were associated with *p53* protein status. We demonstrated that *p53* protein mutation correlates with histopathological response in patients with STS following ILP treatment with TNF- α and melphalan.

patients and methods

Patients with unresectable STS of the lower or upper limb were treated with ILP in the reporting centre. Cases undergoing such treatment in our institution from June 2000 to June 2005 were included when paraffin-embedded material of the tumour was available before (named preoperative specimens) and/or after ILP at the time of the residual tumour excision 2 months later (named postoperative specimens). All cases were reviewed by a pathologist before treatment to ascertain diagnosis and to verify the quality of the tissue samples submitted to the study. Our institutional ethics committee approved the study.

hyperthermic ILP

Under general anaesthesia, the main artery and vein of the affected limb were clamped and cannulated after heparinisation. Cannulae were then connected to a heart–lung machine and a pneumatic tourniquet was applied proximally to prevent leakage into the general circulation. ILP consisted of extracorporeal circulation with mild hyperthermia (38–40°C) obtained with a heat exchanger. TNF- α (TNF- α -1a, Beromum™,

Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) was injected into the arterial line and 30 min later, 10-mg/l melphalan (Alkeran, GlaxoSmithKline, London, UK) per limb volume was added for the following 60 min. At the end of the procedure, a 4- to 6-l wash out of the limb, using a mixture of Hartmann's solution and macrodex, was carried out. A delayed excision of the residual tumour was planned 2 months after ILP excepted in the case of multiple tumours or metastatic progression. The aim was to carry out *en bloc* residual tumour excision with free margins whenever possible.

magnetic resonance imaging clinical response criteria

The clinical response was determined by magnetic resonance imaging (MRI) carried out before and 2 months after ILP. The MRI examinations included T1-weighted spin echo (SE) and fast SE T2-weighted fat-saturated sequences, as well as dynamic sequences (T1-weighted SE repeated six times every 40 s), displaying the maximum intensity slope in each pixel. CR was defined by complete necrosis (>90%) of the tumour or disappearance of all measurable disease. A partial response (PR) was defined as a regression of the tumour size >50% in the product of the bi-dimensional measurements. Stable disease (SD) was defined as no change in the percentage of necrosis and in the tumour size. Progressive disease (PD) was defined as a >25% disease progression or the appearance of any new lesion. OR included CR and PR and nonresponse (NR) included SD and PD.

histopathological response criteria

Histopathological response was defined as good if \leq 10% identifiable residual tumour cells were present in the postoperative specimens obtained 8 weeks after ILP. If >10% residual tumour cells were identifiable, histopathological response was defined as poor.

immunohistochemistry analysis

Blocks of tumour embedded in paraffin were analysed by a pathologist and portions containing tumour were sectioned in freshly cut slides to carry out immunohistochemistry following standard protocols using an automated immunohistochemical processor [NexES® IHC (Ventana, Tucson, AZ)]. The murine monoclonal primary antibodies were DO7 (M 7001, DAKO, Glostrup, Denmark, 1 : 50, 20 min at 37°C), which react with an epitope which is localised in the amino-terminal region of both the wild-type and mutant forms of the *p53* protein [19], and PAb1620 (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA, 1 : 320, overnight at 4°C), which recognises the wild-type native conformation of *p53* protein [20]. After dewaxing, epitopes were retrieved using a temperature-controlled water bath at 98°C during 20 min in sodium citrate buffer (pH 7.3, 10 mM Microm Microtech, Francheville, France; Diapath, Bergamo, Italy, 30PA-0310) for DO7 and at 98°C during 30 min in sodium citrate buffer (pH 6.0, Zymed, San Francisco, CA, 00-5000) for PAb1620. After cooling at room temperature, the following steps were carried out according to the manufacturers' instructions using an iView DAB Detection Kit (Ventana) for DO7, and an ABC avidin–biotin kit (VECTASTAIN® ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, PK-6200) for PAb1620. For DO7, diamino benzidine (Ventana for DO7 and NovaRed vector, SK-4800 for PAb1620) was used as chromogen with haematoxylin (Hemalun, Mayer, RAL reactivities, Martillac, France) as counter stain. Positive controls for DO7 mAb included sections from a breast cancer showing genetically proven missense mutation of the *p53* gene (Figure 1A) and for PAb1620, paraffin-embedded MCF-7 cell pellets derived from a breast adenocarcinoma including an accumulation of wild-type *p53* protein (Figure 1B). Negative controls included sections from another breast tumour with a nonsense *p53* mutation. Controls were included in each analysis with DO7 and PAb1620. PAb1620 antibody was used in those samples positive for DO7. The incubation conditions for PAb1620 were

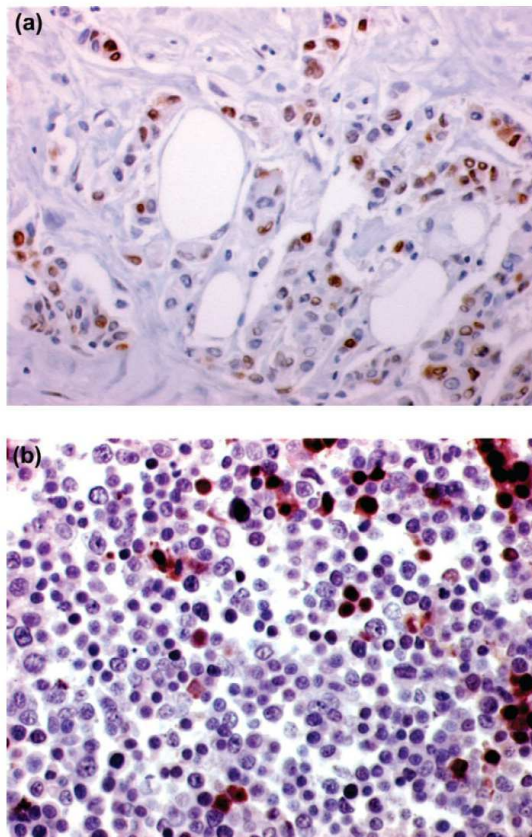


Figure 1. Immunohistochemical positive controls: sections of a breast cancer showing genetically proven missense mutation of the *p53* gene were used as a positive control for DO7 (A) and paraffin-embedded MCF-7 cell pellets deriving from a breast adenocarcinoma cell line including an accumulation of wild-type *p53* protein were used as a positive control for PAb1620 (B).

adjusted so that it reacted with MCF-7 cells, but not with the *p53*-mutated tumour cells.

analysis of immunostaining

Two pathologists blindly evaluated specimens for *p53* staining with DO7 and PAb1620. The percentage of positive cells was recorded and used to attribute a score on a scale 0–3 as follows: score 0 if <10% cells were positive; score 1 if 11%–25% of cells were positive; score 2, 26%–50% positive cells and score 3, >50% positive cells [21]. If the score was 2 or 3, samples were considered as positive for the antibody tested and negative under 2. Samples were considered to be mutated for *p53* protein when they reacted with DO7, but not PAb1620. If a discordance was observed for *p53* status between pre- and postoperative specimens in patients with both specimens available, *p53* was considered to be mutated.

statistical design

Results are expressed as percentages or medians and ranges. Survival and disease-free survival (first recurrence to occur, i.e. metastases, second cancer, local relapse and death) were calculated using the Kaplan–Meier method [22] and Rothman's 95% confidence intervals (95% CIs) [23]. Survival curves were compared using the log-rank test [24].

results

patient characteristics

One hundred and six consecutive patients with a locally unresectable limb STS were treated by ILP and included in this study. Clinical characteristics of the patients are represented in Table 1. Four patients with a locally unresectable desmoid tumour were also treated by ILP and included in this study. Tumour concerned superior limb in 37% of patients and inferior limb in 63%. Size of the tumour was 50 and 80 mm, respectively. Histopathological subtypes are liposarcoma ($n = 24$, 22%), synovial sarcoma ($n = 24$, 22%), undifferentiated sarcoma ($n = 19$, 17%), malignant peripheral nerve sheath tumours ($n = 13$, 12%), epithelioid sarcoma ($n = 9$, 8%), leiomyosarcoma ($n = 5$, 5%), fibroblastic sarcoma ($n = 3$, 3%), desmoids tumours ($n = 4$, 4%), angiosarcoma ($n = 3$, 3%) and other ($n = 6$).

Before ILP, 30 patients (27%) had been treated with radiotherapy, 56 (51%) by CT, 1 had a previous ILP and 63 had undergone surgery (37 once, 11 twice, 15 three to nine).

tumour response and post-ILP evolution

Complete clinical response evaluated by MRI reached 45% and overall response 70%. Good histopathological response to ILP treatment was found up to 33% (Table 2).

Limb salvage was initially achieved in 90% of our patient population but this fell to 82% at a median time of 19 months after ILP.

By 1st December 2005, 66 patients of the 110 were still being followed, whereas follow-up was lost for 18 patients (16 had been followed until 2004 and 2 until 2003). In all, 26 (24%) patients had died. Of the patients in this study, nine had metastasis before treatment, seven of who died. In the remaining 101 patients, 18 patients (18%) had local recurrence [at a median time of 12 months (2.5–30)] and 30 (30%) had

Table 1. Clinical characteristics of the patients before ILP

	No. and %	Median (range)
Male/female	58/52	
Age (years)		45 (8–81)
Location and size		
Superior limb size (mm)	41 (37%)	50 (10–200)
Inferior limb size (mm)	69 (63%)	80 (10–208)
Histological grade ^a		
I	16 (16%)	
II	46 (46%)	
III	38 (38%)	
Recurrences before ILP		
0	43 (39%)	
1	42 (38%)	
2	11 (10%)	
3	9 (8%)	
≥3	5 (5%)	
Synchronous metastasis	9 (8%)	

^aIn 100 patients, histological grade could not be retrieved in 10 patients because initial histological diagnosis was made years before. ILP, isolated limb perfusion.

Table 2. Responses to ILP according to p53 protein mutation

	No. and (%)	Wild-type p53 protein	Mutated p53 protein
TNF- α dose			
0.5 mg	18	15	3
1 mg	53	46	7
2 mg	20	13	7
3 mg	11	9	2
4 mg	8	7	1
MRI response			
CR	50 (45%)	43	7
PR	27 (25%)	18	9
OR	77 (70%)	61	16
NR	32 (29%)	29	3
Histopathological response ^a			
Good	32 (33%)	31	1
Poor	64 (67%)	47	17
Post-ILP surgery			
No surgery	13 (12%)	11	2
Conservative surgery	86 (78%)	69	17
Initial amputation	11 (10%)	10	1
Local recurrence ^b	18 (18%)	15	3
Metastatic recurrence ^b	30 (30%)	22	8

^aIn 96 patients, histopathological response was not carried out in 13 patients who were not operated on and in one patient amputated outside our institution.

^bIn 101 patients, 9 patients had a synchronous metastasis at the time of ILP. TNF- α , tumour necrosis factor- α ; MRI, magnetic resonance imaging; CR, complete response; PR, partial response; OR, Objective tumour response; NR, nonresponse; ILP, isolated limb perfusion.

metastasis [at a median time of 10 months (2–40)], 10 had both and 2 deceased during follow-up without metastasis or recurrence.

After ILP (and eventually residual tumour excision), 57 patients (52%) received adjuvant therapy consisting of radiotherapy in 48 patients, systemic CT in 3 patients and a combination of both in 6 patients. In 40 patients (36%), surgery was the sole treatment after ILP.

p53 protein status

We analysed a total of 170 slides belonging to 110 different patients. Sixty patients had both pre- and postoperative specimens, 35 had preoperative specimens only and 15 had postoperative specimens only. Among the 35 patients without postoperative specimens, no residual tumour was found after ILP in 13, and 13 patients (12%) were not operated on after ILP (six for multiple tumour and seven for metastatic progression). Three patients were amputated outside our institution and specimens could not be retrieved. Six patients had surgery but histochemistry could not be carried out due to lack of tumour material. All the 15 patients without preoperative specimens had been treated before ILP in other hospitals and this material could not be retrieved.

Ninety-five preoperative specimens and 75 postoperative specimens were immunostained with p53 DO7 mAb. p53 protein was overexpressed in 39, which were immunostained with PAb1620 mAb (Figure 2). Afterwards, 10 preoperative

specimens and 14 postoperative specimens were p53 DO7 accumulated and PAb1620 negative corresponding to 20 patients with a mutated p53 protein. Among the 60 patients with both pre- and postoperative specimens available, we did not find the same result before and after ILP in nine (Table 3).

Patients' tumour characteristics in relation to p53 protein mutation are represented in Table 2.

p53 protein mutation and clinicopathological implications

As depicted in Figure 3, tumours of patients with poor histological response to ILP with TNF- α showed significantly higher levels of mutated p53 protein as 94% of patients with mutated p53 protein had a poor histopathological response. We, however, found a lack of correlation between mutated p53 protein and survival (Figure 4), disease-free survival (Figure 5) or MRI response. No correlation was observed between histopathological response and disease-free survival either (data not shown, $P = 0.65$).

With a median follow-up of 25 months, the 2-year overall survival rates (95% CI) were 88% (78%–93%) and 69% (43%–86%) in the p53 wild-type and mutated p53 protein groups ($P = 0.1$) (Figure 4). The 2-year disease-free survival rates were 62% (50%–73%) and 40% (19%–65%), respectively, ($P = 0.31$) (Figure 5).

discussion

In the course of these studies, we examined the immunohistochemical expression of p53 in STS patients and analysed correlations between the immunohistochemical findings and treatment response following ILP with TNF- α and melphalan.

Our current results by immunohistochemical detection of mutated p53 protein with two different antibodies support the notion that mutated p53 protein significantly correlates with poor histopathological response. A better control of the disease, at least by histopathological examination, may be due to a better sensitivity of tumour cells to TNF- α and melphalan when p53 protein is wild type. Since we had no control group (i.e. not treated with TNF- α and melphalan), we cannot make any final statement regarding this hypothesis. Preclinical studies on cell lines, however, indicate the role of p53 gene mutation in tumour response to TNF- α since transfection of wild-type p53 gene in cell lines with mutant p53 gene sensitises cells to the cytotoxic effect of TNF- α [16]. Moreover, melphalan can be discussed as another aspect of drug resistance. It has been established that STSs do not respond to melphalan alone even in the context of ILP. It was demonstrated experimentally [25, 26] that TNF- α selectively increases melphalan penetration in tumour tissue and we postulate that it is the case in this clinical setting. STS are not necessarily resistant to melphalan, but rather there is a lack of drug penetration in the tumour in the absence of TNF- α . ILP uses two compounds that are synergistic but do not hit the same target. TNF- α has an early effect on tumour vascularisation that increases permeability. The late effect is to induce a strong apoptosis of

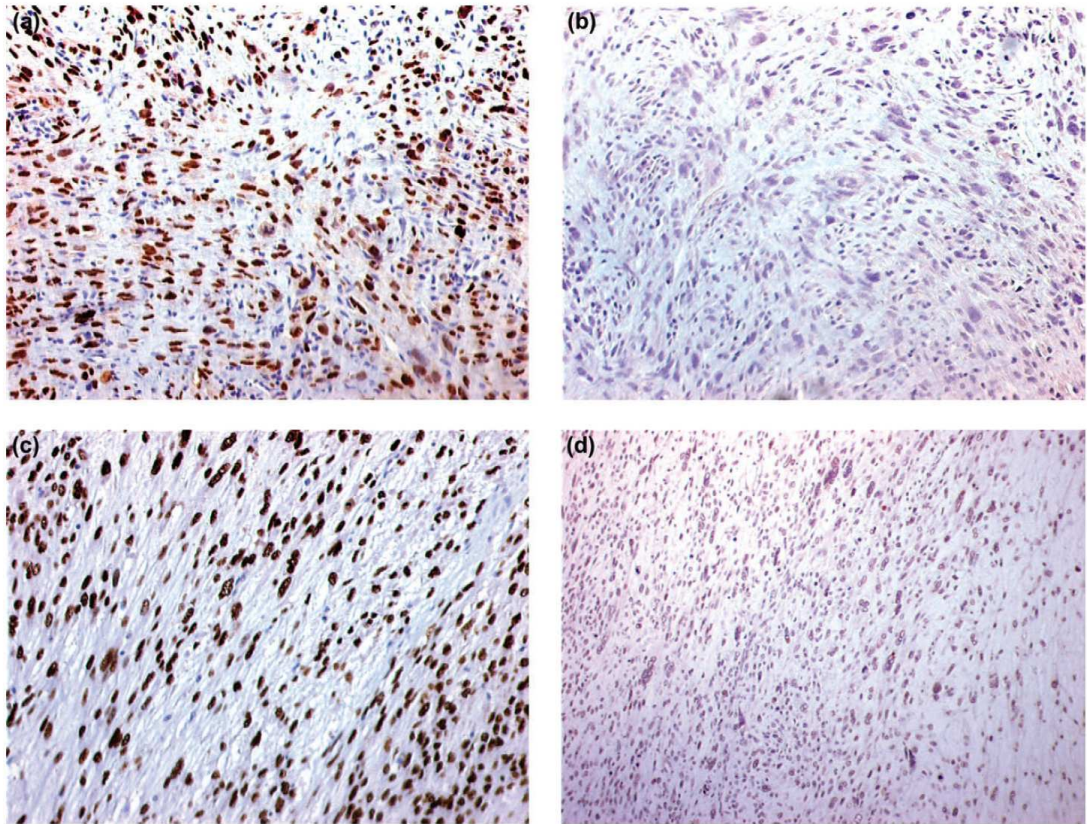


Figure 2. Immunohistochemical analysis of p53 (DO7, detecting both wild-type and mutant forms of p53 protein and PAb1620 detecting only wild-type p53 protein) in a sarcoma with p53 protein mutation (A and B) showing (A) nuclear immunostaining for DO7 and (B) negative staining for PAb1620 and in a sarcoma with nonmutational accumulation of wild-type p53 protein (C and D) showing (C) nuclear immunostaining for DO7 and (D) for PAb1620.

Table 3. Immunochemistry data using D07 and PAb1620mAb in the 60 patients with both pre-and postoperative specimens available

Patients (n)	p53 DO7 expression and negative PAb1620 staining in the preoperative specimens	p53 DO7 expression and negative PAb1620 staining in the postoperative specimens
47	No	No
4	Yes	Yes
4	Yes	No
5	No	Yes

endothelial cells and the collapses of the tumour vessels. In contrast, as an alkylating agent, melphalan induces cell death through p53 that is activated by DNA damage [17, 18]. In our study, we observed an increased accumulation of p53 protein in tumours that did not respond histologically to ILP. p53 protein-increased expression indicates p53 mutation and inactive protein accumulation. In other words, sarcomas that did not respond histologically to ILP may be resistant to TNF- α and also to melphalan because of the lack of p53 activation.

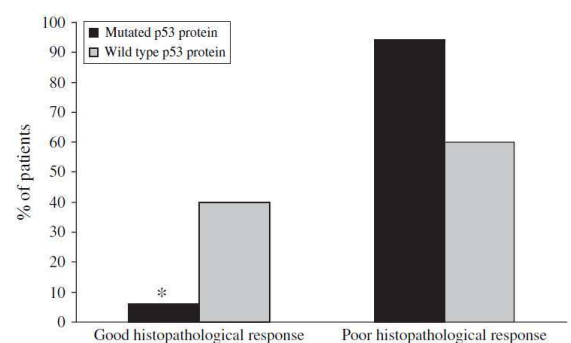


Figure 3. Correlation between mutated p53 protein and poor histopathological response; * $P = 0.005$ (Fisher).

Our patients' population of 110 included 14 different histological subgroups of STS and different types of pretreatment (surgery, radiotherapy, CT and combinations). STS are very uncommon tumours, and in studies with STS patients treated by ILP, it was previously demonstrated that despite different histological subgroups are characterised by

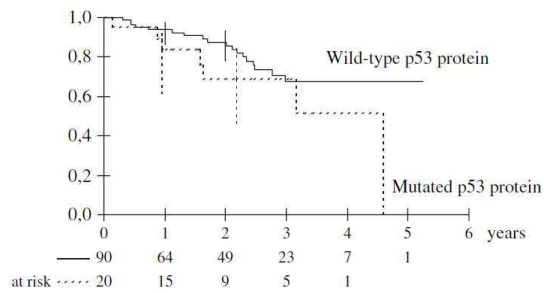


Figure 4. Survival according to p53 protein mutation; $P = 0.10$ (log-rank).

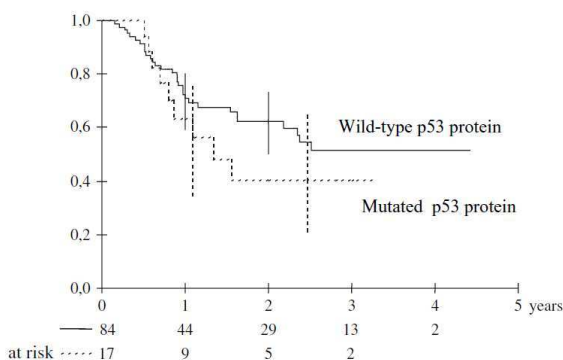


Figure 5. Disease-free survival according to p53 protein mutation; $P = 0.31$ (log-rank).

different molecular backgrounds, TNF- α response in ILP treatment was independent of the type of STS [5, 6, 27]. Moreover, overall response to TNF- α and melphalan did not differ significantly according to pre-irradiation, preoperative CT and TNF- α doses [6, 28].

Although a good correlation (73%) between radiological and histopathological responses was observed in our study, no significant correlation between mutated p53 protein and clinical tumour response assessed by radiology was found as we found for histopathological response. This discordance may be attributable to the fact that a notable discrepancy exists between the clinical and the histopathological response assessment in ILP studies. The clinical evaluation of tumour regression is on the basis of the estimated size of the necrosis of the tumour, which is measured 2 months after ILP and can be operator dependant. The histopathological response, i.e. assessment of the percentage of viable cells, can be difficult to evaluate because it is on the basis of the residual volume of the tumour. If the tumour shrinks but still contains viable tumour cells, the percentage of residual tumour is often overestimated. Our series shows a higher rate of clinical CR (45%) than other series [9]. This may be due to the fact that we did not combine clinical and histopathological response to define the final outcome [5]. CR *per se*, however, is not crucial, whether the tumour responds completely or partially is irrelevant, as long as it becomes amenable to residual tumour excision without loss of limb function. Our overall response rate (70%) was not different from other studies [9, 27].

Contrary to other studies [11, 29], we did not find any correlation between p53 protein mutation and survival or disease-free survival. Interestingly, in Cordon-Cardos et al. [11] study, the presence or absence in tumour cells of p53 protein in high levels as measured by immunohistochemistry was a very good indicator of patient survival. Treatment modalities, however, were not specified and patients had apparently less locally advanced sarcomas. It should be noted that our results were obtained in a selected group of patients with very extensive disease. All had a locally advanced tumour considered as unresectable and were candidates for amputation. Nine patients of our series had already distant metastasis. The majority of the tumours were high grade (84%) and with a high number of recurrences before ILP [53 patients (48%) had at least one recurrence and 14 patients (13%) had >2]. In this rather restricted group of patients with very bad prognoses, survival rates are difficult to analyse if compared with other studies on sarcoma with all types of patients (low grade, absence of recurrence etc.).

We did not study p53 gene status mutation in our patients' tumours but we searched for p53 protein mutation by immunohistochemistry. In the case of missense gene mutation, mutant p53 gene product is characterised by a conformational change of the protein with subsequent prolonged half-life and stability. The accumulated mutant protein is therefore detectable by immunohistochemistry, and immunostaining of tissue sections may be an important surrogate for p53 genetic analysis [30–32]. In nonsense p53 gene mutations, products however, are truncated proteins and are undetectable by immunohistochemistry. In our experience with carcinomas of the head and neck with p53 gene sequencing, a good correlation was found between tumours harbouring missense mutations and p53 DO7 mAb detection [33]. Moreover, use of DO7 mAb with antigen retrieval was found to be the most sensitive and specific procedure for assessing p53 protein mutations [34]. In our study, 28 of 110 patients were p53 DO7 accumulated (25.4%). In Cordon-Cardo et al. [11] study, 56 of 211 sarcomas had an overexpression of p53 (26.5%). In his study, in the last analysis with DNA sequencing carried out on 73 tumours, the overexpression of p53 protein correlated with missense mutations characterised by a conformational change of the protein. The majority of p53 gene mutations are missense (78% in germ line mutations and 74% in somatic mutations) [10] (IARC TP53 mutation database, R11 release, October 2006) and among sarcoma, 69% of the p53 mutations are missense, 13.4% are silent and 6.06% nonsense [10] (IARC TP53 mutation database, R11 release, October 2006). We, however, could not even do the RT-PCR technique procedure because we did not have any frozen material. In fact, in the postoperative specimens, it was not possible to do the sections for freezing because it was not possible to distinguish the tumour areas.

Moreover, the presence of p53 protein accumulation may be the result of a nonmutational stabilisation of this protein which binds to viral (adenovirus) or cellular (mdm2) oncoproteins [11]. In our study, considering to discriminate p53 protein accumulation with and without any p53 gene mutation, we used the PAb1620 antibody which recognises

the 1620 epitope present only in the wild-type p53 protein. Out of 39 specimens expressing p53 DO7, 24 did not express 1620 epitope corresponding to 20 patients (18.2%). Prevalence of p53 gene mutation in soft tissue tumour is 17.2% [10].

The data of the present studies also emphasise that among the 60 patients with both pre- and postoperative specimens available, in nine patients, p53 protein status was different. In five cases, we found p53 protein to be mutated in postoperative but not in the preoperative specimens. This discordance may be explained by the fact that the biopsy was carried out in some cases at the beginning of the disease and the tumour may have modified its p53 gene status after systemic chemotherapies performance [35]. Moreover, cytotoxic treatment leads to a significant reduction in the number of tumour cells that are sensitive to the therapy. Tumours that survive the treatment are enriched in resistant clones and are likely to display the p53 status associated with chemoresistance. In four other cases, p53 protein was mutated in the pre- but not postoperative specimens. This may be due to the fact that a different tumour clone was selected in the pre- and postoperative specimens.

In addition, as it is known that therapy-caused events in the context of ILP occur timely close to the treatment event [36], the p53 status detected 2 months following ILP may represent the late outcome, resulting not only from the direct effect of the therapy but also from several events such as inflammation and hypoxia. It is, however, not possible for ethical reasons to obtain samples from these patients before the residual tumour excision carried out 2 months after ILP.

p53 status may influence histological response to ILP treatment. If this result is confirmed in a largest study, it may play a role in TNF- α response in clinical use: it could help us to decide on postoperative treatments after ILP. Patients with mutated p53 protein could benefit from a more aggressive treatment including postoperative radiotherapy and further CT. Radiotherapy post-ILP improves local tumour control in limb-saving treatment of STS even after radical resection [37]. The decision of its use in this combined modality treatment might be difficult to take since adjuvant irradiation may result in acute and late morbidity such as worse limb strength, oedema and delayed pathologic fractures with pseudarthrosis which are difficult to treat. In patients for whom the decision is difficult to take, we suggest analysing p53 status because a mutated p53 may tend to have a high risk of histological NR. Moreover, in the future, manipulation of p53 status may improve effectiveness of ILP treatment and the clinical use of compounds [38] able to restore p53 function or p53 gene transfer [39] could be a novel strategy for optimising the efficiency of TNF- α in human cancer treatment.

funding

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Association pour la recherche sur le cancer (3501); Cancéropôle Ile de France; Institut National du Cancer.

acknowledgements

The authors thank G. Goma for her help with data management.

references

- Pisters PW, Patel SR, Varma DG et al. Preoperative chemotherapy for stage IIIB extremity soft tissue sarcoma: long-term results from a single institution. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3481–3487.
- Meric F, Hess KR, Varma DG et al. Radiographic response to neoadjuvant chemotherapy is a predictor of local control and survival in soft tissue sarcomas. *Cancer* 2002; 95: 1120–1126.
- Creech O, Krementz ET, Ryan RF, Winblad JN. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Ann Surg* 1958; 148: 616–632.
- Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ et al. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 52–60.
- Eggemont AM, Schraffordt KH, Klausner JM et al. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann Surg* 1996; 224: 756–764.
- Bonvalot S, Laplanche A, Lejeune F et al. Limb salvage with isolated perfusion for soft tissue sarcoma: could less TNF-alpha be better? *Ann Oncol* 2005; 16: 1061–1068.
- Renard N, Nooijen PT, Schalkwijk L et al. WWF release and platelet aggregation in human melanoma after perfusion with TNF alpha. *J Pathol* 1995; 176: 279–287.
- Rossi CR, Mocellin S, Pilati P et al. TNF alpha-based isolated perfusion for limb-threatening soft tissue sarcomas: state of the art and future trends. *J Immunother* 2003; 26: 291–300.
- Lejeune FJ, Lienard D, Matter M, Ruegg C. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* 2006; 6: 6.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19: 607–614.
- Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M et al. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994; 54: 794–799.
- Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C et al. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 1997; 15: 2817–2826.
- Thiery J, Echchakir H, Dorothee G et al. Role of p53 in the sensitization of tumor cells to apoptotic cell death. *Mol Immunol* 2002; 38: 977–980.
- Thiery J, Dorothee G, Haddada H et al. Potentiation of a tumor cell susceptibility to autologous CTL killing by restoration of wild-type p53 function. *J Immunol* 2003; 170: 5919–5926.
- Ameyar-Zazoua M, Larochette N, Dorothee G et al. Wild-type p53 induced sensitization of mutant p53 TNF-resistant cells: role of caspase-8 and mitochondria. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 219–227.
- Ameyar M, Shatrov V, Bouquet C et al. Adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene sensitizes TNF resistant MCF7 derivatives to the cytotoxic effect of this cytokine: relationship with c-myc and Rb. *Oncogene* 1999; 18: 5464–5472.
- Gould KA, Nixon C, Tilby MJ. p53 elevation in relation to levels and cytotoxicity of mono- and bifunctional melphalan-DNA adducts. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 1301–1309.
- Nelson WG, Kastan MB. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1815–1823.
- Anwar K, Nakakuki K, Imai H et al. Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 53: 952–956.
- Xirodimas DP, Lane DP. Molecular evolution of the thermosensitive PAb1620 epitope of human p53 by DNA shuffling. *J Biol Chem* 1999; 274: 28042–28049.

21. Wang YC, Lin RK, Tan YH et al. Wild-type p53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 154–164.
22. Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assoc* 1958; 53: 457–481.
23. Rothman KJ. Estimation of confidence limits for the cumulative probability of survival in life table analysis. *J Chronic Dis* 1978; 31: 557–560.
24. Peto R, Pike MC, Armitage P et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. *Br J Cancer* 1977; 35: 1–39.
25. Van Der Veen AH, de Wilt JH, Eggermont AM et al. TNF-alpha augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF-alpha-based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects. *Br J Cancer* 2000; 82: 973–980.
26. de Wilt JH, ten Hagen TL, de Boeck G et al. Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. *Br J Cancer* 2000; 82: 1000–1003.
27. Grunhagen DJ, de Wilt JH, Graveland WJ et al. Outcome and prognostic factor analysis of 217 consecutive isolated limb perfusions with tumor necrosis factor-alpha and melphalan for limb-threatening soft tissue sarcoma. *Cancer* 2006; 106: 1776–1784.
28. Bedard V, Vataire A, Desouche C et al. A prospective database of 100 patients with locally soft tissue sarcoma (STS) treated by isolated limb perfusion with melphalan and TNFa 1 mg. ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. *J Clin Oncol* 2007; (18S): (Abstr 10010).
29. Onel K, Cordon-Cardo C. MDM2 and prognosis. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 1–8.
30. Schneider-Stock R, Radig K, Oda Y et al. p53 gene mutations in soft-tissue sarcomas—correlations with p53 immunohistochemistry and DNA ploidy. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 211–218.
31. Rieske P, Bartkowiak JK, Szadowska AM et al. A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in soft-tissue sarcomas. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 403–416.
32. Mousse S, McAuley L, Bell RS et al. Molecular and immunohistochemical identification of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Mod Pathol* 1996; 9: 1–6.
33. Temam S, Flahault A, Perie S et al. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 2000; 18: 385–394.
34. Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ et al. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 1994; 172: 5–12.
35. Righetti SC, Perego P, Corna E et al. Emergence of p53 mutant cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells following drug exposure: spontaneously mutant selection. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 473–478.
36. Lassau N, Lamuraglia M, Vanel D et al. Doppler US with perfusion software and contrast medium injection in the early evaluation of isolated limb perfusion of limb sarcomas: prospective study of 49 cases. *Ann Oncol* 2005; 16: 1054–1060.
37. Thijssens KM, van Ginkel RJ, Pras E et al. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and melphalan for locally advanced soft tissue sarcoma: the value of adjuvant radiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 518–524.
38. Bykov VJ, Selivanova G, Wiman KG. Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1828–1834.
39. Cristofanilli M, Krishnamurthy S, Guerra L et al. A nonreplicating adenoviral vector that contains the wild-type p53 transgene combined with chemotherapy for primary breast cancer: safety, efficacy, and biologic activity of a novel gene-therapy approach. *Cancer* 2006; 107: 935–944.

II. Mise en évidence de l'implication de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans la cytotoxicité du TNF- α *in vitro* sur des cellules de sarcome et implication de NF- κ B dans la résistance à ce traitement.

ARTICLE 2

Attenuation of Soft-Tissue Sarcomas Resistance to the Cytotoxic Action of TNF-alpha
by Restoring p53 Function

**Jane Muret, Izabela Stasik, Meriem Hasmim, Abdelali Jalil, Aude Mallavialle,
Arash Nanbakhsh, Ludovic Lacroix, Katy Billot, Véronique Baud, Jérôme Thiery,
Philippe Vielh, Philippe Terrier, Lyubomir Vassilev, Axel Lecesne, Sylvie
Bonvalot, Salem Chouaib.**

Soumis à Plos one

1. Introduction

L'efficacité du TNF- α dans les traitements des STS en perfusion isolée de membre semble liée essentiellement à son action anti-vasculaire. En effet, des études radiologiques ont montré la disparition sélective des zones tumorales hyper vascularisées après traitement par TNF- α . De plus, cette destruction vasculaire corrèle *in vivo* avec l'induction d'apoptose au niveau de la cellule endothéliale ¹⁹⁷ et *in vitro* avec la suppression spécifique de la molécule d'adhésion endothéliale $\alpha V\beta 3$ ¹³⁸. Plus récemment, il a été démontré que la VE-cadherin était une cible pour le TNF- α , conduisant à l'altération de l'intégrité vasculaire et de la viabilité tumorale ¹⁹⁸. Il a aussi été démontré que le TNF- α augmentait la perméabilité vasculaire intra tumorale et réduisait la pression interstitielle, facilitant la pénétration des drogues à l'intérieur de la tumeur. Ces résultats suggèrent que la puissante activité anti tumorale de l'ILP avec TNF- α et melphalan est liée à une double action : premièrement, TNF- α augmente la perméabilité vasculaire tumorale et secondairement, le melphalan atteint les cellules tumorales et induit la mort cellulaire ¹⁹⁹. Cependant, un processus plus complexe au cours duquel le TNF- α ciblerait directement les cellules tumorales a aussi été évoqué. Dans la littérature, l'action du TNF- α sur des lignées cellulaires tumorales est extrêmement variable allant de antiproliférative à pro-tumorale ou bien encore, inefficace. Son utilisation chez l'homme au cours des premiers essais cliniques où il a été administré de façon systémique a été aussi très décevante. En plus de cette grande variabilité de sensibilité des cellules tumorales, la valeur thérapeutique du TNF- α dans le traitement des cancers a été limitée par sa grande toxicité aux fortes doses. Même si l'administration locorégionale de TNF- α grâce à l'ILP a partiellement résolu ces problèmes de toxicité, la résistance des cellules tumorales à son action reste la principale limitation de son utilisation effective. Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires et biochimiques de la résistance tumorale cellulaire à l'action cytotoxique du TNF- α pourrait fournir de nouvelles approches pour améliorer l'efficacité thérapeutique du TNF- α dans les cancers humains. Dans cet esprit, nous avons ainsi que d'autres, rapporté la dépendance de la mort cellulaire induite par le TNF- α au statut de *TP53* *in vitro* et *in vivo* chez des patients traités pour des sarcomes par TNF- α et melphalan par ILP ^{116,117,200}. De plus, *TP53* est muté dans plus de 20% des sarcomes et est non fonctionnel dans plus de 60% des sarcomes sauvages pour *TP53* (IARC *TP53* mutation database, R15 release, Nov. 2010) ²⁰¹. De plus, dans une étude récente sur 143 sarcomes de type varié, on a démontré que la voie p53/p14

était altérée dans toutes les tumeurs étudiées ²⁰. Enfin, p53 sauvage peut être inactivée lors de l'hyper-expression de MDM2 et ceci corrèle, ainsi que la mutation de *TP53*, avec le mauvais pronostic clinique chez les patients atteints de sarcome ⁶⁹.

Enfin, des travaux ont rapporté que la correction pharmacologique et/ou génétique de la voie sauvage de p53 entraîne des régressions tumorales *in vitro* ou *in vivo* ³⁸. Par ailleurs, les modifications conformationnelles observées en cas de mutation faux-sens de p53, sont réversibles, du moins jusqu'à un certain point. Ainsi, le CP-31398, une styrilquinazoline, peut rétablir certaines conformations de p53 muté dans la conformation sauvage et augmenter ainsi le niveau de base de p53 à un niveau équivalent à ceux observés après une lésion de l'ADN ⁶³. Les Nutlins, sont des dérivés imidazoline qui se lient spécifiquement à MDM2, le dissociant de p53, et empêchant ainsi sa dégradation ⁵⁷. Ces molécules ont été rapportées comme réactivant efficacement p53 avec arrêt du cycle cellulaire et apoptose. Dans ce travail, nous avons donc questionné le rôle du TNF- α dans l'apoptose de la cellule tumorale. Ceci impliquant que les phénomènes de résistance à l'action cytotoxique du TNF- α pouvaient comprendre des mécanismes concernant la cellule tumorale *per se*, tels que mutations ou inactivations de *TP53/p53* ou activation de NF- κ B. C'est ainsi que nous avons ensuite testé l'association entre le TNF- α et ces molécules capables de restaurer p53.

2. Matériel et méthodes

a. Origine des prélèvements

Pour cette étude, nous avons inclus 8 patients opérés à l'IGR de sarcomes rétro-péritonéaux (Dr Bonvalot) après accord de notre comité d'éthique. Tous les prélèvements ont été analysés par un pathologiste (Dr Terrier) avant le prélèvement pour confirmer le diagnostic.

b. Technique de détection de la mort cellulaire *in situ* et sa localisation

Les prélèvements obtenus de façon extemporanée étaient inclus dans de l'agarose à 6%. Des coupes de 200 μ m étaient ensuite effectuées sur le bloc avec un Microtome Leica. Les coupes étaient ensuite incubées dans du RPMI avec 10% FCS \pm 50 ng/ml de TNF- α pendant 90 min à 37°C et 5% CO₂. Les coupes étaient ensuite rincées et maintenues dans les mêmes conditions en présence de milieu frais sans TNF- α pendant 72 h. Puis les coupes étaient à nouveau rincées dans du PBS et fixées

par immersion dans du méthanol à -20°C pendant 10 min. La réaction TUNEL était ensuite effectuée en utilisant le Kit de détection de la mort cellulaire *in situ* (Roche) en suivant les recommandations du fabricant. Ensuite, les coupes étaient incubées toute la nuit à +4°C avec un anticorps de souris anti-CD3 1 conjugué avec un fluorochrome (Alexa 488) et ensuite pendant 1 h avec de la TO-PRO3. Les coupes étaient enfin montées sur des lames de verres avec une goutte de fluoromount-G. Les lames étaient ensuite lues grâce à un microscope confocal de marque Zeiss (LSM 510) avec un objectif 20X/0.75 Plan-Apochromat. Les longueurs d'onde utilisées étaient 488 nm pour l'Alexa 488, 543 nm pour la réaction TUNEL et 633 nm pour la TO-PRO3. Les images étaient acquises en utilisant les filtres d'émission BP505-530, BP560-615 et LP 650 respectivement. Le logiciel utilisé pour l'acquisition des données était le LSM Image Examiner de chez Zeiss. Le compte des cellules positives a été fait grâce au logiciel ImageJ et a permis de déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques endothéliales ou tumorales.

c. Lignées cellulaires

La lignée de rhabdomyosarcome (KYM-1) a été fournie par Dr. T. Meager (National Institute for Biological Standards and Control, Grande Bretagne), la lignée de fibrosarcome (HT1080) par le Dr. L. Maggiorella (IGR, Villejuif, France). Les lignées de liposarcome (T449, T778 and T1000) par le Dr. F. Pedetour (Université de Nice, Nice, France); les lignées de MFH (MFH152, MFH100, MFH95) et de leiomyosarcome (LMS148) par le Pr. A. Aurias (Institut Curie, Paris, France).

d. Séquençage de *TP53*

Le séquençage de *TP53* a été effectué dans laboratoire de recherche translationnelle de l'Institut Gustave Roussy (Dr Lacroix). Le DNA des lignées cellulaires était extrait des culots cellulaires grâce au kit QIAamp Blood Tissue de chez Qiagen en respectant les directives du fabricant. La recherche de mutations de *TP53* a été réalisée par séquençage direct après amplification par PCR des 9 amplicons couvrant les exons 2 à 11 correspondant à la séquence codante complète et en incluant au moins 20 bdp dans les introns flaquants. Le DNA purifié a été séquencé en utilisant le kit de séquençage BigDye®. L'analyse c'est faite sur l'analyseur de DNA 48-capillary 3730 DNA Analyzer® dans les deux sens. Toutes les mutations détectées

étaient contrôlées par au moins une amplification indépendante. La lecture de la séquence a été réalisée grâce au logiciel SeqScape® (Applied Biosystems).

e. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

L'EMSA pour l'analyse de la liaison de NF- κ B à l'ADN en présence de TNF- α et de Nutlin-3a a été réalisée dans l'unité INSERM U1016, Institut Cochin (Katy Billot et Véronique Baud). 15 μ g d'extraits nucléaires ont été incubés en présence de l'oligonucléotide HIV-LTR radiomarké. Les échantillons étaient ensuite séparés sur un gel PAGE non dénaturant et les signaux étaient détectés par autoradiographie.

f. RT-PCR quantitative des gènes impliqués dans l'apoptose

La RT-PCR quantitative a été réalisée dans l'unité INSERM U 576, Hôpital de L'Archet, Nice (Aude Malavialle). L'ARN total a été extrait après 16h d'incubation avec du Trizol (Sigma-Aldrich) en suivant les recommandations du fabricant. La reverse transcription a été réalisée en utilisant le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Ambion). Pour la quantification de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose, la RT-PCR a été réalisée en utilisant le Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen) ainsi que le système 7900HT Fast Real-time PCR (Applied Biosystems). La plaque comportant les gènes d'intérêt en rapport avec l'apoptose a été établie par la plateforme PETC dans les unités INSERM U576 et INSERM U876. Le niveau d'expression relative des 91 gènes en rapport avec l'apoptose a été normalisée en les comparant à 4 gènes domestiques (GADPH, β -actin, HPRT et PPIA). Une valeur seuil a été déterminée (Ct) pour les gènes domestiques et pour chaque échantillon, un delta de Ct (Δ Ct) était ensuite calculé entre le gène d'intérêt et les gènes domestiques. L'expression relative d'ARNm était ensuite calculée entre la valeur moyenne pour le gène d'intérêt en situation contrôle et en présence Nutlin-3a ou Nutlin-3a + TNF- α . Ce résultat était exprimé en variation d'expression par rapport au contrôle. Les valeurs représentent la moyenne de deux mesures séparées et sont représentatives de deux expériences indépendantes.

g. Analyse statistique

Les données sont exprimées en moyenne \pm déviation standard. Les données étaient analysées en utilisant le test T de Student pour valeurs appariées ou non

appariées selon les cas. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

3. Résultats

Nos expériences *ex vivo* dans des conditions expérimentales proches de celles que l'on a au cours d'une ILP, nous ont permis de démontrer que le TNF- α induisait une apoptose aussi bien au niveau de la cellule endothéliale que de la cellule tumorale. Dans les 9 lignées tumorales issues de sarcomes humains avec des statuts *TP53* et *MDM2* différents que nous avons étudiées, le statut de *TP53* ou l'activité de p53 influence la mort cellulaire induite par TNF- α . De plus, la transfection d'un vecteur codant pour un short hairpin RNA ciblant p53 dans une lignée *TP53^{wt}* entraîne la suppression de la mort induite par TNF- α dans cette lignée. L'utilisation de CP-31398 dans nos lignées mutées pour p53 a permis de restaurer une activité p53. Utilisée en association avec le TNF- α , elle a eu un effet synergique sur la mort cellulaire. L'effet de la Nutlin-3a sur les lignées de liposarcome a été de restaurer là aussi une activité transcriptionnelle pour p53 mais sans augmenter de l'expression de son ARN messager étudié en RT-PCR. En association avec le TNF- α , la Nutlin-3a a potentialisé la mort cellulaire dans 2 des 3 lignées étudiées (T449 et T1000). Parmi les facteurs potentiels pouvant expliquer cette potentialisation, nous avons trouvé que la liaison de NF- κ B à l'ADN était inhibée par l'adjonction de la Nutlin-3a au TNF- α et que dans la lignée qui n'était pas potentialisée par l'association, on observait une liaison constitutive de NF- κ B à l'ADN, avant tout traitement, liaison qui était dissociée en présence de Nutlin-3a. Enfin, nous avons observé que les lignées avec potentialisation lors de l'association exprimaient de façon différentielle certains gènes en relation avec l'apoptose par rapport à la lignée qui ne montrait pas ce phénomène de potentialisation lors de l'association thérapeutique. Les gènes dont l'expression était augmentée étaient RIPK2, TP53BP2 et GADD45 en ceux dont l'expression était diminuée étaient TGF- β 1 et FAIM. Les niveaux d'ARNm de tous ces gènes étaient stables par rapport à l'absence de traitement dans la lignée non potentialisée (T778).

4. Discussion

Nous avons donc démontré dans ce travail, que la mort était induite par le TNF- α aussi bien au niveau de la cellule endothéliale que de la cellule tumorale. De ce fait, la résistance au TNF- α , observée chez certains sarcomes, pourrait dépendre du statut

de p53, et la manipulation de celui-ci pourrait rétablir une sensibilité à la mort induite par TNF- α . De plus, nous avons démontré que l'association du TNF- α avec des drogues rétablissant l'activité de p53 entraînait une potentialisation de cette mort induite. Parmi les mécanismes responsables de cette potentialisation, NF- κ B semble pouvoir jouer un rôle, d'autant que son interrelation avec TNF- α est fondamentale. En effet, le rôle protecteur de NF- κ B dans la mort induite par TNF- α laisse penser que son inhibition pourrait potentialiser celle-ci. C'est dans ce contexte que se situe l'inhibition de la liaison de NF- κ B à l'ADN en présence de Nutlin-3a que nous avons observée et qui pourrait expliquer la potentialisation. Par contraste, la fixation constitutionnelle de NF- κ B à l'ADN dans la lignée T778 peut rendre compte de l'absence de potentialisation observée dans cette lignée lorsque Nutlin-3a + TNF- α sont combinés. Ainsi, l'action potentialisatrice de la Nutlin-3a semble passer par deux voies: une activation de p53 et une inhibition de NF- κ B. Enfin, certains gènes pro- (RIPK2, TP53BP2 et GADD45) et anti-apoptotiques (TGF- β 1 et FAIM) étaient différentiellement régulés dans les lignées qui présentaient une synergie quand l'association était utilisée. D'autres travaux sont donc nécessaires pour déterminer les mécanismes moléculaires associés à la potentialisation de la mort induite par l'association TNF- α et Nutlin-3a afin d'obtenir de meilleurs résultats chez l'homme.

En conclusion, différents facteurs tels que p53 et NF- κ B peuvent expliquer les variations de sensibilité retrouvées dans les différentes lignées. La manipulation simultanée de ces différentes voies en clinique humaine pourrait permettre de surmonter la résistance avec en fin de compte, une meilleure efficacité des traitements, une action plus constante et enfin une réduction des doses de chaque drogue prise individuellement conduisant à une réduction de la toxicité. Ces données sont importantes en clinique humaine où l'utilisation du TNF- α quoique très efficace est limitée par sa toxicité à forte doses et son efficacité inconstante. Ces approches pourraient donc permettre d'utiliser cette cytokine autrement qu'en perfusion isolée et donc une utilisation plus large dans les sarcomes du tronc ainsi que dans d'autres formes de cancers plus fréquents que les sarcomes.

Attenuation of Soft-Tissue Sarcomas Resistance to the Cytotoxic Action of TNF- α by Restoring p53 Function

Jane Muret^{1&2}, Izabela Stasik*¹, Meriem Hasmim*¹, Abdelali Jalil¹, Aude Mallavialle³, Arash Nanbakhsh¹, Ludovic Lacroix⁴, Katy Billot^{5,6,7}, Véronique Baud^{5,6,7}, Jérôme Thiery¹, Philippe Vielh⁴, Philippe Terrier⁸, Lyubomir Vassilev⁹, Axel Lecesne¹⁰, Sylvie Bonvalot¹¹, Salem Chouaib¹.

¹Unité INSERM U753, ²Département d'Anesthésie, ⁴Laboratoire de Recherche Translationnelle, ⁸Département de Pathologie, ¹⁰Département de Médecine, ¹¹Département de Chirurgie, Institut de Cancérologie Gustave Roussy (IGR), 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France.

³Unité INSERM U576, Groupe Hospitalier Archet, 151 Route de St Antoine de Ginestière, BP 3079, 06202 Nice Cedex 3, France.

⁵Unité INSERM U1016, Institut Cochin, 123, Boulevard de Port-Royal 75014 Paris, France

⁶CNRS, UMR8104, Paris, France

⁷Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁹Discovery Oncology, Roche Research Center, Hoffmann-La Roche Inc., 340 Kingsland Street, Nutley, NJ 07110, USA.

These authors contributed equally to this work

Corresponding author

Jane Muret, Département d'Anesthésie
Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif cedex
Tel : +33 1 42 11 40 18
Fax : +33 1 42 11 52 09
e-mail address : muret@igr.fr

Financial Support

This research was supported by grants to J.M. from Conticanet, Fondation de Recherche Gustave Roussy and Association pour la Recherche sur le Cancer and to V.B. from Agence Nationale pour la Recherche.

Introduction

Sarcomas are rare, poorly understood cancers, refractory to standard therapies [1, 2]. In this context, isolated limb perfusion (ILP), a highly specialized surgical technique that allows higher drug concentrations to be delivered loco-regionally, thus limiting treatment toxicity, can be used to treat unresectable soft tissue sarcomas (STS) of extremities avoiding limb amputation. During ILP, the treatment agents are circulated through the vasculature of the extremity using an extracorporeal pump oxygenator bypass circuit [3]. The combination of TNF- α and melphalan through ILP has been widely used to treat STS with impressive clinical responses [4, 5].

While the effect of melphalan, as a DNA-damaging alkylating agent, is clearly established, the effect of TNF- α remains controversial even though a TNF- α selective anti-vascular mechanism has been established [6]. Indeed, radiological studies demonstrated the selective disappearance of tumour hypervascularized areas after treatment with TNF- α [7]. Moreover, the tumour vascular disruption correlates *in vivo* with the induction of endothelial cell apoptosis [8] and *in vitro* with the specific suppression of α V β 3-mediated endothelial cell adhesion [9]. More recently, it has been demonstrated that VE-cadherin is a target of TNF- α , leading to the alteration of vascular integrity and tumour viability [10]. It has also been demonstrated that TNF- α increases intratumoural vessel permeability and reduces interstitial pressure, facilitating drug penetration in tumours [11]. These data suggest that the potent antitumour activity of ILP with TNF- α and melphalan is due to a dual targeting effect: first, TNF- α increases the permeability of tumour vessels and then melphalan reaches the tumour cells and induces cell death. However, a more complex process, in which TNF- α directly affects tumour cells, has also been postulated [12, 13].

TNF- α has been demonstrated to be either anti-proliferative, growth enhancing, or ineffective on transformed cell lines [14] as well as in early clinical trials when administered

systemically [15]. In addition to this wide variation in sensitivity of tumour cells, the therapeutic value of TNF- α in the treatment of cancer has been limited by toxicity at high doses [3]. Even if the locoregional administration of TNF- α by ILP is able to partially attenuate its systemic toxic side effects, the resistance of some tumour cells to the cytotoxic action of TNF- α remains a barrier to its effective application [16]. Therefore, understanding the molecular and biochemical mechanisms of tumour cell resistance to the cytotoxic action of TNF- α may ultimately provide new approaches to enhance the therapeutic effectiveness of TNF- α against human malignancies [17].

In this regard, the dependence of TNF- α -induced cell death on *TP53* status was reported *in vitro* [18, 19] and *in vivo* in sarcoma patients treated with TNF- α and melphalan [20]. It should be noted that *TP53* is mutated in more than 20% or non functional in up to 60% of STSs (IARC *TP53* mutation database, R15 release, Nov. 2010) [21]. Moreover, a recent study on 143 various STSs showed that the p53/p14 pathway was altered in all analysed tumours [22]. Furthermore, it is well established that p53 may retain its wild-type configuration while being functionally repressed through epistatic mechanisms, most frequently via over-expression of MDM2 protein and *MDM2* gene amplification (*MDM2^{Ampl}*). Importantly, *TP53* mutations or inactivations were found to correlate with a poorer outcome in sarcoma patients [23].

It has been reported that pharmacological and/or genetic restoration of the wild-type p53 pathway induces tumour regression *in vitro* and *in vivo* [24]. Recently, the use of small molecules able to restore the wild-type conformation of mutant p53 protein, as well as blocking the MDM2-p53 interaction, has been well documented. Indeed, the conformational changes, observed in the case of missense mutation of p53, are reversible at least to some extent. Thus, CP-31398, a styrylquinazoline, can rescue some mutant p53 to a wild-type conformation and therefore increase the steady-state wild-type p53 to high levels equivalent to those observed following DNA damage [25, 26]. Nutlins are imidazoline derivatives that specifically bind and

dissociate MDM2 from p53, thereby rescuing p53 from degradation [27]. Thus, such molecules have been reported to efficiently re-activate p53, resulting in cell-cycle arrest and apoptosis [28, 29].

In the present study, we demonstrate that TNF- α induces cell death not only in tumour vasculature but also in sarcoma tumour cells harboring wild type p53, and that resistance to TNF- α could be linked to lack of p53 function in this type of tumour. Furthermore, we demonstrate that combining TNF- α with drugs that restore the p53 pathway enhances global apoptotic effects. These findings suggest that this combination therapy approach could be used to treat highly resistant sarcoma tumours.

Methods

Ethics statement

The Institutional Review Board of the Gustave Roussy Institute (Commission Scientifique des Essais Thérapeutiques) specifically approved the study and all patients included in the study signed an informed consent.

Antibodies and Reagents

Mouse anti-CD31 monoclonal antibody conjugated with Alexa Fluor 488 was purchased from BD Pharmingen; mouse anti-p53 (DO-1), anti-TNFR1 and anti-Noxa antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca, USA); anti-p21 and anti-MDM2 from Calbiochem (Darmstadt, Germany); rabbit anti-Puma and anti-Bax polyclonal antibodies from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); and GAPDH mouse monoclonal antibody from Millipore (Billerica, MA, USA). Human recombinant TNF- α (Beromun) was obtained from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany). Nutlin-3a was kindly provided by Dr L. Vassilev (Hoffman La Roche, Nutley, USA) and CP-31398 by Dr L. Kopelovich (NIH/NCI, Bethesda, USA). TO-PRO3 was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

***In situ* cell death detection in fresh STS human tumours**

Pieces of fresh sarcoma tumours were obtained after the surgical treatment of eight patients with resectable STS of the retroperitoneum. Tumours were immediately embedded in 6% low-melting point agarose (Sigma, St. Louis, MO, USA). 200 μ m thick slices were cut at room temperature with Leica VT 1000S Microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The slices were incubated in culture medium (RPMI containing 10% FCS) with or without 50 ng/ml of TNF- α for 90 min at 37°C and 5% CO₂, then washed and maintained in the same

conditions for 72h in fresh culture medium without TNF- α . Successively, cultured slices were washed in PBS and fixed by immersion in cold methanol for 10 min at -20°C. TUNEL reaction was performed using *in situ* Cell Death Detection Kit (Roche, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Next, the slices were incubated overnight at 4°C with Mouse anti-CD31 antibody conjugated with Alexa Fluor 488 and subsequently for 1h with TO-PRO3. Slices were finally mounted on glass slides using fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, UK). Stacks of confocal slices were collected with a LSM 510 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using 20X/0.75 Plan-Apochromat objective. The excitation wavelengths were 488 nm for Alexa 488, 543 nm for the TUNEL positive nuclei revealed by the Cell Death Detection Kit, and 633 nm for TO-PRO3. Images were acquired using BP505-530, BP560-615 and LP 650 emission filters respectively. Z-projection of stacks was done using LSM Image Examiner software (Zeiss, Le Pecq, France). Cell counting was done by ImageJ software using the cell counter plugin and the percentage of apoptotic endothelial and tumour cells was determined.

Cell lines

Rhabdomyosarcoma cell line (KYM-1) [30] was kindly provided by Dr. T. Meager (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom), fibrosarcoma cell line (HT1080) [31] by Dr. L. Maggiorella (IGR, Villejuf, France). Liposarcoma cell lines (T449, T778 and T1000) [32, 33] were provided by Dr. F. Pedetour (Nice University, Nice, France); malignant fibrous histiocytomas (MFH152, MFH100, MFH95) [34] and leiomyosarcoma (LMS148) [35] cell lines were provided by Dr. A. Aurias (Institut Curie, Paris, France).

Cell culture and treatments

HT1080 cells were grown in DMEM (4,5 g/ml glucose) with 10% FCS, and the remaining cell lines in RPMI supplemented with 10% FBS and 1% sodium pyruvate (Gibco, Villebon sur Yvette, France). To study TNF- α effects, cells were seeded at 25% confluency, and one day later they were either treated with 50 ng/ml TNF- α alone or in combination with 7.5 μ g/ml CP-31398 or 5 μ M Nutlin-3a for the indicated times. For cell irradiation, we administered 15 Gy using the MXR-225/22 X-ray machine (Comet AG, Flamett, Switzerland) at a dose rate of 1 Gy/min.

***TP53* sequencing**

DNA from cell lines was extracted from cell pellets with QIAamp Blood Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Resequencing of *TP53* gene was performed by Sanger sequencing based on PCR product and did not include generation of new data as the reference sequence used for primer design and for alignment was already published and available in RefSeq database as NM_000546.4 for *TP53* (tumor protein p53; Other Aliases: FLJ92943, LFS1, TRP53, p53). PCR amplification of 9 amplicons covering exons 2 to 11 (corresponding to the whole coding sequence), including at least 20 bases in flanking introns was performed. Detailed protocol and primer sequences are available on demand. Purified DNA was sequenced using BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequencing reactions were analyzed on 48-capillary 3730 DNA Analyzer® in both sense and antisense directions. All mutations detected were controlled with independent amplification at least one time. Sequence reading and alignment were performed with SeqScape® software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Apoptosis detection

Cell death was assessed by 3,3-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆) and propidium iodide labeling (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) after 72h treatment with TNF- α alone or in combination with CP-31398 or Nutlin-3a. The samples were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer and data were processed using CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA).

Western blot analysis

Western blot analyses were performed using specific monoclonal or polyclonal antibodies according to standard protocols. Briefly, washed cells were re-suspended in lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF and a protease inhibitor mixture (Complete Protease Inhibitor Mixture, Roche Molecular Biochemicals, Foster City, CA, USA). Equivalent protein extracts (30 or 50 μ g) were resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA, USA), and incubated overnight with appropriate primary antibodies at 4°C. The labeling was visualized using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and by enhanced chemiluminescence (ECL Western blotting Kit, Amersham Biosciences, Vélizy, France).

Flow cytometry

Cells were harvested using EDTA 1mM, washed twice with PBS, and incubated with anti-TNFR1 or isotype control antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, USA) for 30 min. at 4°C, followed by incubation with phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse antibody (Beckman Coulter, Villepinte, France). The samples were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer and data were processed using CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA).

Transfections

HT1080 transfection was performed using Lipofectamine2000 Transfection Reagent (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France), according to the manufacturer's instructions. Expression vectors encoding shRNA designed for specific silencing of p53 or luciferase were purchased from InvivoGen. Stably transfected HT1080 clones were selected with 500 µg/ml Zeocin (InvivoGen, Toulouse, France).

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

For analysis of NF-κB DNA binding activity, 15 µg of nuclear extracts were incubated with the radioactive labelled HIV-LTR tandem κB oligonucleotide as κB probe [36]. The samples were separated on a non-denaturing PAGE gel and signals were detected by autoradiography.

Real-time quantitative PCR analysis

For apoptotic gene expression analysis, total RNA was extracted after 16h of treatment using Trizol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following manufacturer's instructions, and reverse transcription was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Ambion, Foster City, CA, USA). For quantification of apoptosis related genes, real time PCR (RT-PCR) was performed using Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) and the 7900HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Apoptosis dedicated arrays were elaborated by the PETC platform of INSERM U576 and INSERM U876. The relative expression level of 91 apoptosis-related genes was normalized using four different house-keeping genes (GADPH, β-actin, HPRt and PPIA). For each sample, cycle threshold (Ct) values for the housekeeping genes were determined for normalization purposes, and delta Ct (Δ Ct) between the mean of

target-gene values and housekeeping-genes values was calculated. Relative expression level of target gene mRNA between control cells and Nutlin-3a or Nutlin-3a + TNF- α -treated cells was calculated and expressed as fold change over control. Values represent the mean of duplicates and are representative of two independent experiments.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of values obtained in at least three independent experiments. Differences between samples were analyzed with Student t test. Differences reaching a p value of 0.05 were considered significant. All calculations were performed using the 14.0 SPSS software package (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

TNF- α induces apoptosis of sarcoma tumour cells during ex vivo ILP

Although it has been postulated that TNF- α works via its selective antivasular mechanisms, its contribution to the antitumour effect of ILP is still to be elucidated. In order to determine the antitumour effects of TNF- α , an *ex vivo* tumour culture assay, recapitulating conditions that might occur *in vivo* during ILP, was performed. Slices from eight retroperitoneal sarcomas prepared immediately after surgery (well differentiated liposarcoma, n=4; undifferentiated sarcoma, n=2; and leiomyosarcoma, n=2) were treated with TNF- α for 90 min, washed and then maintained in fresh medium without TNF- α for 72h before TUNEL assay and subsequent labelling with anti-CD31 antibody and TO-PRO3. Double staining of endothelial cells with anti-CD31 antibody (green) and TUNEL (red) showed co-localization of both colours (yellow), indicating that TNF- α induces apoptosis of endothelial cells. Moreover, co-localization of nuclear staining (TO-PRO3, blue) and TUNEL (red), resulting in purple, also indicates that TNF- α induces apoptosis of tumour cells. Untreated slices showed no or few TUNEL-positive nuclei, excluding the possibility that spontaneous apoptosis was induced by our experimental conditions (Fig. 1A). Further quantification of the TUNEL-positive cells also revealed that TNF- α induces apoptosis of endothelial cells in most patients ($69.6 \pm 9\%$) whereas for tumour cells, patients could be subdivided into three groups: patients with low apoptosis rate (10 to 17%, n=2), patients with moderate apoptosis rate (57 to 66%, n=3), and patients with high apoptosis rate (85 to 95%, n=3), suggesting that sarcoma tumour cells are differentially sensitive to TNF- α -induced apoptosis (Fig. 1B).

Mutation status of TP53 and impact on TNF- α induced cell death in sarcoma cell lines

Among a selection of nine different sarcoma cell lines, the sequencing of full-length p53 cDNAs revealed that five cell lines (KYM-1, HT1080, T449, T778 and T1000) had wild type

TP53 gene ($TP53^{wt}$). In MFH100 and MFH152 cells, $TP53$ had respectively a homozygous 524 G>A (R175H) and 503 A>C (H168P) missense mutation ($TP53^{Mut}$). In MFH95 and LMS148 cells, a $TP53$ deletion was observed since no amplification of TP53 exons 2 to 11 could be obtained ($TP53^{Null}$). Moreover, Western blot analysis showed that T449, T778 and T1000 cells over-express MDM2 while MFH100, MFH152, MFH95 and LMS148 cells displayed non-functional p53 pathway based on the absence of p53 increase following irradiation (Fig. 2A).

As $TP53$ status might modulate TNF- α -induced cell death efficiency, we analysed TNF- α -induced apoptosis on our panel of nine soft tissue sarcoma cell lines by 3,3-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆) and propidium iodide (PI) labeling after 72h of TNF- α treatment. $TP53^{wt}/MDM2^{wt}$ cell lines (KYM-1 and HT1080) displayed high levels of apoptotic cells after TNF- α treatment (40% and 82% respectively) (Fig.2B). $TP53^{wt}/MDM2^{AmpI}$ cell lines (T449, T778, T1000) and $TP53^{Mut}$ (MFH152) were the most resistant to TNF- α -induced cell death (0.7% to 3%). In MFH100, the other $TP53^{Mut}$, an apoptosis rate of 13 % was noted which was not significantly different from the one observed in LMS148. Interestingly, TNF- α -induced cell death was also observed in one of the $TP53^{Null}$ cell lines (LMS148) but at a lower level (19%) than in $TP53^{wt}/MDM2^{wt}$ cell lines, suggesting that in $TP53^{Mut}$ or $TP53^{Null}$ cell lines, a p53-independent pathway may be available, thus explaining observed minor TNF- α -induced cell death. To verify if the resistance to TNF- α was not due to a low expression level of the TNF receptor type 1 (TNF-R1), we assessed the surface expression of TNF-R1 by flow cytometry (Fig.2C). Most of the cell lines expressed high levels of TNF-R1 (51% to 97%), regardless of p53 status, showing that resistance of STS cell lines to TNF- α -induced apoptosis was not due to the absence or low expression of TNF-R1. Taken together, these results demonstrate a high correlation between p53 pathway status ($TP53^{wt}$ versus $TP53^{Mut}$ or $TP53^{wt}/MDM2^{AmpI}$) and sensitivity to TNF- α -induced apoptosis.

Silencing of p53 in TP53^{wt}/MDM2^{wt} cell line inhibits TNF- α induced cell death

In order to confirm the role of p53 in TNF- α -induced apoptosis of STS, we knocked down p53 in the TP53^{wt}/MDM2^{wt} TNF- α sensitive HT1080 cell line by stable transfection of a vector encoding a short hairpin RNA (shRNA) targeting p53 (shRNA-p53) or luciferase mRNA as a control (shRNA-luc) (Fig. 3A). Silencing of p53 resulted in the abrogation of TNF- α -induced apoptosis (29% and 36% apoptosis respectively in non-transfected and control cells versus 3% in shRNA-p53 cells, $p < 0,05$) (Fig. 3B). Moreover, the inhibition of TNF- α -induced apoptosis in shRNA-p53 transfected cells was not due to the decrease of TNF-R1 expression (Fig. 3C). These data further demonstrate the role of p53 in TNF- α -induced cell death.

CP-31398 sensitizes TP53^{Mut} sarcoma cell lines to TNF- α induced cell death

The small molecule CP-31398 was reported to stabilize the wild-type-associated epitope (mAb1620) of the p53 DNA-binding domain, thus conferring a wild-type conformation to mutant p53 and rescuing p53 functions [37]. Therefore, we asked whether sarcoma cell lines treatment with CP-31398 would enhance p53 protein expression and its transcriptional activity. Western blot analysis showed an increase in p53 protein level in MFH100 and MFH152 TP53^{Mut} cell lines after 24h CP-31398 treatment (Fig. 4A). Furthermore, CP-31398 treatment increased expression of the p53 targets NOXA and BAX. These results illustrate the efficacy of CP-31398 in restoring p53 functional activity in our p53-mutated STS cell lines. In order to investigate whether CP-31398 can restore the sensitivity of TP53^{Mut} cell lines to TNF- α -induced cell death, we incubated MFH152 and MFH100 cells with 50 ng/ml TNF- α and/or CP-31398 (Fig. 4B). Results show that CP-31398 alone had a slight apoptotic effect. However, CP-31398 pre-treatment followed by 72h TNF- α had a synergistic effect on apoptosis induction in both TP53^{Mut} cell lines (28% and 43% respectively for MFH152 and MFH100). These results

show that in $TP53^{Mut}$ cell lines, restoration of wild-type p53 activity can enhance susceptibility to TNF- α induced cell death.

Nutlin-3a sensitizes $TP53^{wt}/MDM2^{Amp1}$ sarcoma cell lines to TNF- α cytotoxic action

We then examined the effect of the MDM-2 inhibitor Nutlin-3a on TNF- α induced cell death. Nutlin-3a is a small-molecule antagonist of MDM2 that binds in the p53-binding pocket, preventing p53 degradation and thus restoring its transcriptional activity [27] and leading to cycle cell arrest and apoptosis. $TP53^{wt}/MDM2^{Amp1}$ sarcoma cell lines (T449, T778 and T1000) were incubated with Nutlin-3a for 16h. Western blot analysis showed an increase of p53 protein level leading to p21 expression and an increase of BAX expression, suggesting a restoration of p53 transcriptional activity after treatment (Fig 5A). Similar results were also obtained by quantitative RT-PCR analysis, where the increase in p53 protein level was associated with an increase of BAX mRNA expression (Fig. 5B). However, the observed increase in p53 protein was not accompanied by an increase of the p53 mRNA (Fig. 5B), presumably due to post-transcriptional regulation by Nutlin-3a.

We then tested the effect of Nutlin-3a treatment alone or in combination with TNF- α on cell viability, as recent studies suggested synergistic effects of Nutlins with other chemotherapies [33]. 72h treatment with Nutlin-3a induced cell death in T449 and T778 cell lines (33% and 41.5 % respectively) but had only minor effects on T1000 cells (11%) (Fig. 5C). Incubation of cells with both TNF- α and Nutlin-3a for 72h resulted in potentiation of TNF- α -induced cell death in T449 and T1000 cell lines (with a respective cell death increase to 54.7% and 32% compared to Nutlin-3a alone) (Fig. 5C). However, this potentiation was not observed in T778 cells displaying maximal cell death in the presence of Nutlin-3a.

Inhibition of TNF- α -induced NF- κ B activity and differential apoptotic gene regulation in the presence of Nutlin-3a

It is well established that NF- κ B plays a major role in TNF- α -mediated survival [38]. Moreover, the relationship between p53, TNF- α and NF- κ B has been analyzed in MCF-7 breast cancer cells. In this model, TNF- α was able to induce transcription of p21 and accumulate inactive p53, but inhibition of the NF- κ B pathway abrogated p21 transcription [39]. Therefore, we investigated whether combination of Nutlin-3a and TNF- α in sarcoma cells interferes with the NF- κ B-activity, that might explain the observed potentiation of TNF- α -induced cell death in the presence of Nutlin-3a. For this purpose, we analyzed NF- κ B-DNA binding activity by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) in T1000, T449 and T778 cells. TNF- α treatment induced NF- κ B binding activity in T1000 and T449 compared to that seen in untreated cells or cells treated with Nutlin-3a alone (Fig 6A). Importantly, NF- κ B DNA binding was markedly decreased when Nutlin-3a and TNF- α were combined (Fig. 6A). Remarkably, in the T778 cell line, significant constitutive binding of NF- κ B to DNA was observed, which was inhibited in the presence of Nutlin-3a. This constitutive binding may explain the particular sensitivity of this cell line to Nutlin-3a and thus the absence of amplification of the effect with TNF- α . Furthermore, in order to understand the mechanisms involved in the attenuation of cell lines resistance to TNF- α , we analysed the expression level of 94 genes potentially involved in the regulation of apoptosis in T449 and T1000 versus T778 cells using real-time PCR. No significant difference was observed in the expression of most genes tested between these two types of cell lines (data not shown). However in T449 and T1000 cells, TNF- α combined with Nutlin-3a significantly increased the mRNA levels of RIPK2, TP53BP2 and GADD45 (Fig. 6B), which are involved in the inhibition of cell-cycle progression and apoptosis promotion. TNF- α combined with Nutlin-3a also significantly decreased the mRNA levels of the anti-apoptotic genes TGF- β 1 and FAIM. The mRNA levels of all these genes were unchanged in the T778 cell line.

Discussion

TNF- α combined with melphalan has become the standard treatment for advanced limb sarcoma with a good benefit/risk ratio [4] and a remarkable response rate in human patients with heavily pre-treated disease. Clinical information gained from radiological studies and pathological biopsies showed that TNF- α targeted the tumour vasculature and had no visible direct effect on tumour cells [40], although direct selective cytotoxic activity against tumour cells has been described *in vitro* [17], with wide variation of tumour cell sensitivity. In the course of these studies, we asked whether in the context of ILP, in addition to the vascular effect of TNF- α , tumour cell killing could also play a role. Our data indicate that TNF- α was able to induce *ex vivo* apoptosis of sarcoma tumour cells.

It should be noted that one of the hallmarks of STS is their pronounced resistance to apoptosis, resulting in cell survival or absence of cell damage even when confronted to multiple stress stimuli [2]. Indeed, in our *in situ* cell death detection experiments, two out of eight STS tumours appeared to be completely resistant to TNF- α effects and three others displayed partial tumor resistance. Accumulating evidence indicates that p53 dysregulation is very common in STS and that p53 mutations correlate with increased resistance to current therapeutic strategies [23]. Since a relationship between *TP53* status and tumour sensitivity to TNF- α was previously reported in a human breast cancer model [18, 19], and given that drugs restoring p53 function are now available, we investigated the impact of p53 in the context of resistance to TNF- α in STS cell lines. We demonstrated that STS tumour resistance to TNF- α -induced-cell death was also associated with p53 inactivation (by point mutation or MDM2 amplification) and that p53 silencing in the *TP53^{wt}* STS cell line inhibits sensitivity to TNF- α -cytotoxicity. However, a role for a p53-independent pathway could not be ruled out since some *TP53^{Null}* or *TP53^{Mut}* cell lines also displayed some TNF- α -induced apoptosis. Recent studies have indeed shown that physical

and functional interactions of p53 with various members of the Bcl-2 family provide the basis for this alternate pathway [41].

It is well known that the conformation of the DNA-binding domain of p53 is flexible and that conformational changes in mutant p53 are reversible. Thus, restoration of p53 wild-type function to the highly accumulated mutant p53 in tumour cells may possibly result in a considerable therapeutic response [24]. In this regard, we investigated the effect of CP-31398, a small molecule known to rescue p53 functions. In this report, we provide evidence that this compound was able to attenuate STS resistance to TNF- α . An improvement of TNF- α killing efficiency can thus be obtained when used in association with p53 re-activating agent in the context of p53 mutation.

Moreover, the recent use of MDM2 inhibitors of the Nutlin group has been reported to be a promising new therapeutic strategy for human tumors retaining wild-type p53 status. Nutlin-3a is a highly selective inhibitor of the MDM2-p53 interaction by competitive binding. Consequently, it potently stabilizes and activates wild-type, but not mutant p53 protein in tumour cells in contrast to chemotherapeutics whose mechanism of action, at least in part, relies on genotoxic activation of p53. Importantly, there is evidence that Nutlins, while being toxic to cancer cells, do not induce cell death or apoptosis in normal non-malignant cells and tissues [27, 42]. In our study, Nutlin-3a effectively restored the p53 pathway in the *TP53^{wt}/MDM2^{Amp1}* liposarcoma cell lines tested. More importantly, the combination of Nutlin-3a and TNF- α could reverse the observed resistance of *TP53^{wt}/MDM2^{Amp1}* sarcoma cell lines to TNF- α .

It has been reported that in p53-mutated cell lines, NF- κ B was induced at higher levels following TNF- α treatment [43] and that TNF- α -induced apoptosis in these cells was modulated by mutated p53 as well as by the NF- κ B induction [44]. Moreover, it is well known that NF- κ B has a protective action against TNF- α -induced cell death, suggesting that NF- κ B inhibition may potentiate TNF- α -induced apoptosis [45]. In this regard, Nutlin-3a was shown to

suppress TNF- α -induced NF- κ B reporter activation, and to inhibit transactivation of NF- κ B target genes [46]. Here we show that TNF- α -induced NF- κ B-DNA binding is differentially modulated in *TP53^{wt}/MDM2^{Amp}* sarcoma cell lines, demonstrating a sensitization effect with the combined treatment of TNF- α and Nutlin-3a. In addition, our data highlight that some pro- (RIPK2, TP53BP2 and GADD45) and anti-apoptotic genes (TGF- β 1 and FAIM) display a different pattern of transcript induction and repression in sensitized cell lines when the combination of Nutlin-3a and TNF- α is used. Further studies are thus needed to determine the molecular mechanisms associated with the synergistic pro-apoptotic effect of TNF- α combined with Nutlin-3a, and to determine whether NF- κ B-DNA binding repression by Nutlin-3a is involved in the observed potentiation of apoptosis when both TNF- α and Nutlin-3a are used. Indeed, this may have important implications since the use of both CP-31398 and Nutlin-3a, which act on various pathways, may be useful in overcoming drug resistance and thus result in a more efficient therapeutic response.

In conclusion, our data indicate that restoring p53 activity with CP-31398 or Nutlin-3a in, respectively, *TP53^{Mut}* or *TP53^{wt}/MDM2^{Amp}* cell lines restores sensitivity to TNF- α . This is of importance in the clinical setting where the use of TNF- α administered locally and in combination with other drugs that restore the p53 pathway may contribute to improved efficacy of such therapy. These findings thus provide a new strategy for treating highly refractory STS, in which p53 is frequently mutated or inactivated.

Acknowledgements

We thank A. Aurias (Genetics and Biology of Cancers, Institut Curie, Paris, France), F. Pedeutour (Laboratory of Solid Tumour Genetics, University Hospital, Nice, France), L. Maggiorella (Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France) and T. Meager (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom) for the generous gift of the cell lines.

References

1. Grimer R, Athanasou N, Gerrand C, Judson I, Lewis I et al. (2010) UK Guidelines for the Management of Bone Sarcomas. *Sarcoma* 2010: 317462.
2. Casali PG, Blay J (2010) Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21: 198-203.
3. Lejeune FJ, Liénard D, Matter M, Rüegg C (2006) Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* 6: 6.
4. Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Klausner JM, Kroon BB, Schlag PM et al. (1996) Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann Surg* 224: 756-764.
5. Bonvalot S, Laplanche A, Lejeune F, Stoeckle E, Le Péchoux C et al. (2005) Limb salvage with isolated perfusion for soft tissue sarcoma: could less TNF-alpha be better? *Ann Oncol* 16: 1061-1068.
6. Renard N, Nooijen PT, Schalkwijk L, De Waal RM, Eggermont AM et al. (1995) VWF release and platelet aggregation in human melanoma after perfusion with TNF alpha. *J Pathol* 176: 279-287.
7. Eggermont AM (1998) TNF alpha in isolated perfusion systems: success in the limb, developments for the liver credits, debits and future perspectives. *Anticancer Res* 18: 3899-3905.
8. Nooijen PT, Manusama ER, Eggermont AM, Schalkwijk L, Stavast J et al. (1996) Synergistic effects of TNF-alpha and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. *Br J Cancer* 74: 1908-1915.
9. Rüegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P (1998) Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nat Med* 4: 408-414.
10. Menon C, Ghartey A, Canter R, Feldman M, Fraker DL (2006) Tumor necrosis factor-alpha damages tumor blood vessel integrity by targeting VE-cadherin. *Ann Surg* 244: 781-791.
11. de Wilt JH, ten Hagen TL, de Boeck G, van Tiel ST, de Bruijn EA (2000) Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. *Br J Cancer* 82: 1000-1003.
12. Plaat BE, Molenaar WM, Mastik MF, Koudstaal J, van den Berg E et al. (1999) Hyperthermic isolated limb perfusion with tumor necrosis factor-alpha and melphalan in patients with locally advanced soft tissue sarcomas: treatment response and clinical outcome related to changes in proliferation and apoptosis. *Clin Cancer Res* 5: 1650-1657.

13. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA (1985) Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943-945.
14. Balkwill F 2009 Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 361-371.
15. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei E (1988) Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J Clin Oncol* 6: 344-350.
16. Lejeune F, Liénard D, Eggermont A, Schraffordt Koops H, Rosenkaimer F et al. (1994) Rationale for using TNF alpha and chemotherapy in regional therapy of melanoma. *J Cell Biochem* 56: 52-61.
17. Beyaert R, Fiers W (1994) Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity: What we do understand and what we do not. *FEBS Letters* 340: 9-16.
18. Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Amor-Gueret M, Feunteun J et al. (1997) Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 15: 2817-2826.
19. Ameyar M, Shatrov V, Bouquet C, Capoulade C, Cai Z et al. (1999) Adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene sensitizes TNF resistant MCF7 derivatives to the cytotoxic effect of this cytokine: relationship with c-myc and Rb. *Oncogene* 18: 5464-5472.
20. Muret J, Yacoub M, Terrier P, Drusch F, Laplanche A et al. (2008) p53 status correlates with histopathological response in patients with soft tissue sarcomas treated using isolated limb perfusion with TNF-alpha and melphalan. *Ann Oncol* 19: 793-800.
21. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV et al. (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28: 622-629.
22. Pérot G, Chibon F, Montero A, Lagarde P, de Thé H et al. (2010) Constant p53 pathway inactivation in a large series of soft tissue sarcomas with complex genetics. *Am J Pathol* 177: 2080-2090.
23. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D et al. (1994) Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54: 794-799.
24. Wang W, El-Deiry WS (2008) Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol* 20: 90-96.
25. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286: 2507-2510.
26. Wang W, Takimoto R, Rastinejad F, El-Deiry WS (2003) Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol Cell Biol* 23: 2171-2181.

27. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F et al. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303: 844-848.
28. Vassilev LT (2007) MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* 13: 23-31.
29. Van Maerken T, Ferdinande L, Taideman J, Lambertz I, Yigit N et al. (2009) Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst* 101: 1562-1574.
30. Sekiguchi M, Shiroko Y, Suzuki T, Imada M, Miyahara M et al. (1985) Characterization of a human rhabdomyosarcoma cell strain in tissue culture. *Biomed Pharmacother* 39: 372-380.
31. Lee G, Chae H, Kim H (2011) Monoamine carboxylate transporters are involved in BI-1-associated cancer metastasis in HT1080 colon fibrosarcoma cells. *Int J Oncol* 39: 209-216.
32. Müller CR, Paulsen EB, Noordhuis P, Pedeutour F, Saeter G et al. (2007) Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A. *Int J Cancer* 121: 199-205.
33. Ohnstad HO, Paulsen EB, Noordhuis P, Berg M, Lothe RA et al. (2011) MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines. *BMC Cancer* 11: 211:1-11.
34. Chibon F, Mariani O, Derré J, Malinge S, Coindre JM et al. (2002) A subgroup of malignant fibrous histiocytoomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 139: 24-29.
35. Pérot G, Derré J, Coindre J, Tirode F, Lucchesi C et al. (2009) Strong Smooth Muscle Differentiation Is Dependent on Myocardin Gene Amplification in Most Human Retroperitoneal Leiomyosarcomas. *Cancer Research* 69: 2269 -2278.
36. Jacque E, Tchenio T, Piton G, Romeo P, Baud V (2005) RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102: 14635-14640.
37. Takimoto R, Wang W, Dicker DT, Rastinejad F, Lyssikatos J (2002) The mutant p53-conformation modifying drug, CP-31398, can induce apoptosis of human cancer cells and can stabilize wild-type p53 protein. *Cancer Biol Ther* 1: 47-55.
38. Beg AA, Baltimore D (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274: 782-784.
39. Drané P, Leblanc V, Miro-Mur F, Saffroy R, Debuire B (2002) Accumulation of an inactive form of p53 protein in cells treated with TNF alpha. *Cell Death Differ* 9: 527-537.
40. Menon C, Iyer M, Prabakaran I, Canter RJ, Lehr SC (2003) TNF-alpha downregulates vascular endothelial Flk-1 expression in human melanoma xenograft model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H317-329.

41. Speidel D (2010) Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol* 20: 14-24.
42. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M et al. (2005) MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* 106: 3150-3159.
43. Scian MJ, Stagliano KER, Anderson MAE, Hassan S, Bowman M et al. (2005) Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol* 25: 10097-10110.
44. Weisz L, Damalas A, Liontos M, Karakaidos P, Fontemaggi G et al. (2007) Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* 67: 2396-2401.
45. Bezzi M, Hasmmim M, Bieler G, Dormond O, Rüegg C (2003) Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death: evidence for the suppression of sustained activation of focal adhesion kinase and protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* 278: 43603-43614.
46. Dey A, Wong ET, Bist P, Tergaonkar V, Lane DP (2007) Nutlin-3 inhibits the NFkappaB pathway in a p53-dependent manner: implications in lung cancer therapy. *Cell Cycle* 6: 2178-2185.

Figure 1

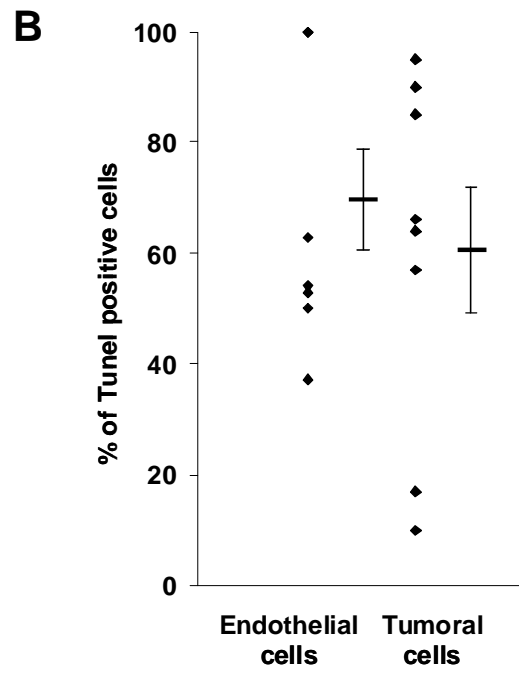
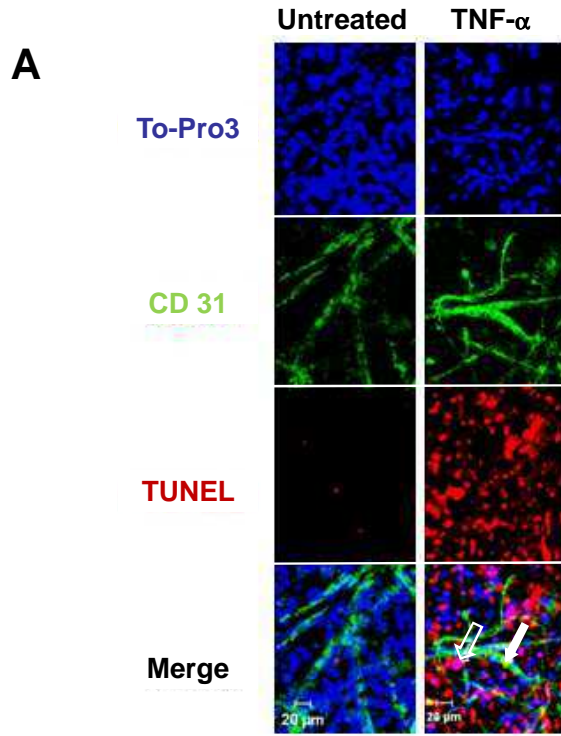


Fig. 1. TNF- α induces apoptosis of sarcoma cells. *A*, confocal microscopy analysis of *in situ* cell death experiments. Slices from fresh tumors maintained in culture with or without TNF- α were processed for TO-PRO3 staining (blue), Alexa Fluor 488 conjugated mouse anti-CD31 antibody (green), and TUNEL assay (red). Untreated slices are represented on the left panel and TNF- α -treated slices on the right. Apoptotic tumor cells appear purple (empty arrow) in the merged images at the bottom. Apoptotic endothelial cells that have undergone apoptosis appear yellow (solid arrow). *B*, quantification of TUNEL-positive cells. Apoptotic cells were counted among more than 500 cells for each tumour. Results are expressed in percentage of TUNEL-positive cells. Results are expressed as mean \pm SEM.

Figure 2

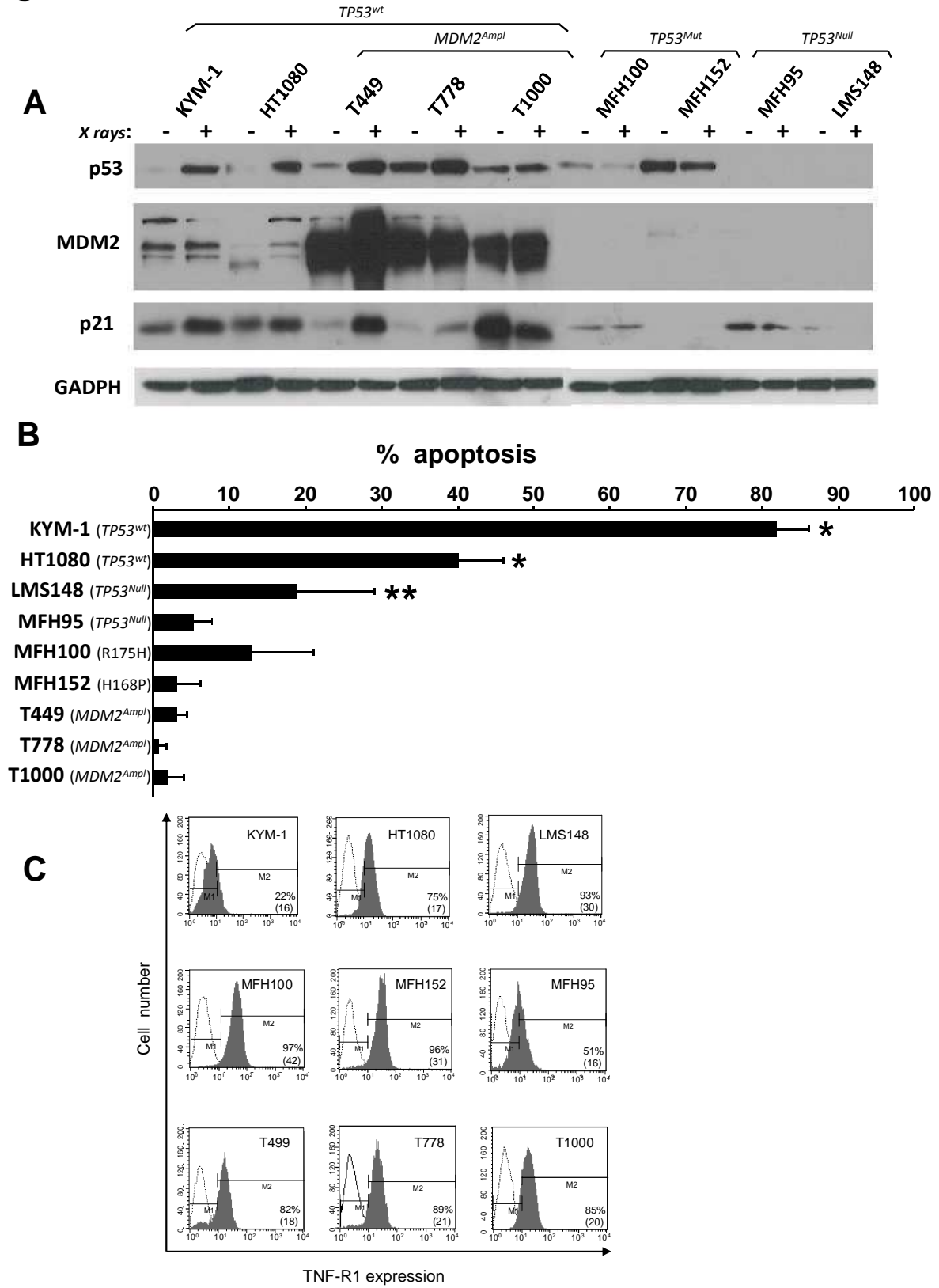
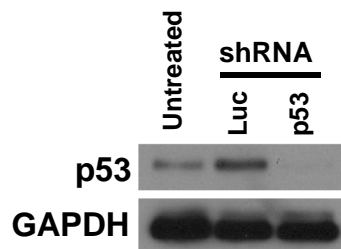


Fig. 2. TNF- α induced cell death in nine sarcoma cell lines with different p53 status. *A*, Western blot analysis of p53, MDM2 and p21 expression in *TP53^{wt}/MDM2^{wt}* (KYM-1 and HT1080), *TP53^{wt}/MDM2^{Ampl}* (T449, T778 and T1000), *TP53^{Mut}* (MFH100 and MFH152) and *TP53^{Null}* (MFH95 and LMS148) cell lines studied after irradiation. Lysates were prepared 2h after exposure to 15 Gy. *B*, impact of TNF- α on cell survival assessed by DiOC₆/PI method after 72h treatment. The percentage of specific apoptosis is shown as an increase of apoptotic cells (early and late apoptosis) in comparison to untreated cells. Results from four experiments are shown. *p<0.05 *versus* all cell lines. **p<0.05 *versus* all cell lines but MFH100. *C*, cell surface expression of TNF receptor type 1 detected by flow cytometry following staining with TNFR1-specific monoclonal antibody (filled histograms) and isotype-matched control (open histograms). Percentages of positive cells and of mean fluorescence intensity are indicated; representative results from three experiments are shown.

Figure 3

A



B

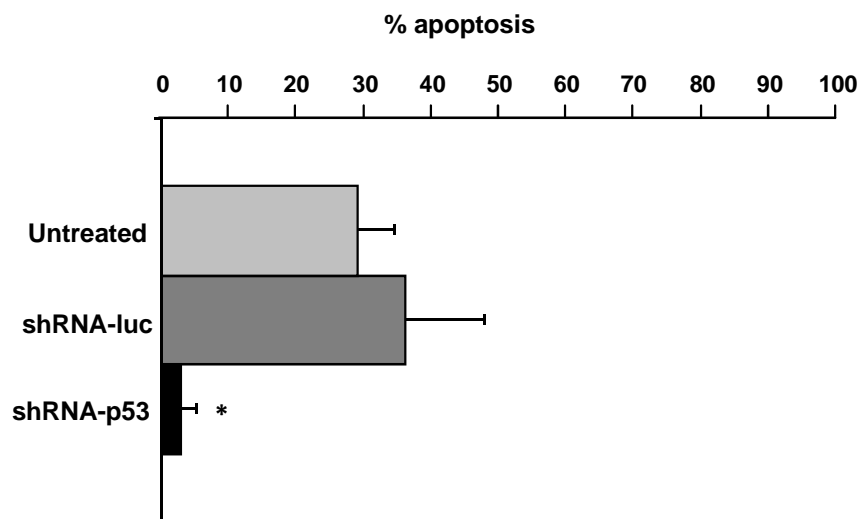
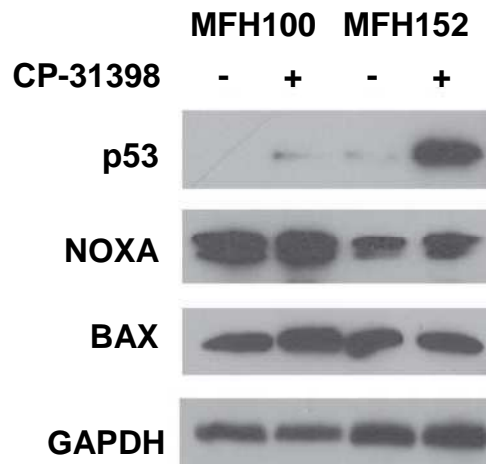


Fig. 3. Effect of $TP53^{wt}/MDM2^{wt}$ p53 silencing on TNF- α -induced cell death. *A*, expression of p53 in not transfected and transfected cells (shRNA) with expression vectors encoding shRNA specific for either luciferase (shRNA-luc) or p53 (shRNA-p53). *B*, apoptosis induction after 72h TNF- α treatment in not transfected and transfected (shRNA) cells. Representative results of induced apoptosis from two experiments are shown. * $p < 0.05$ versus untreated cells.

Figure 4

A



B

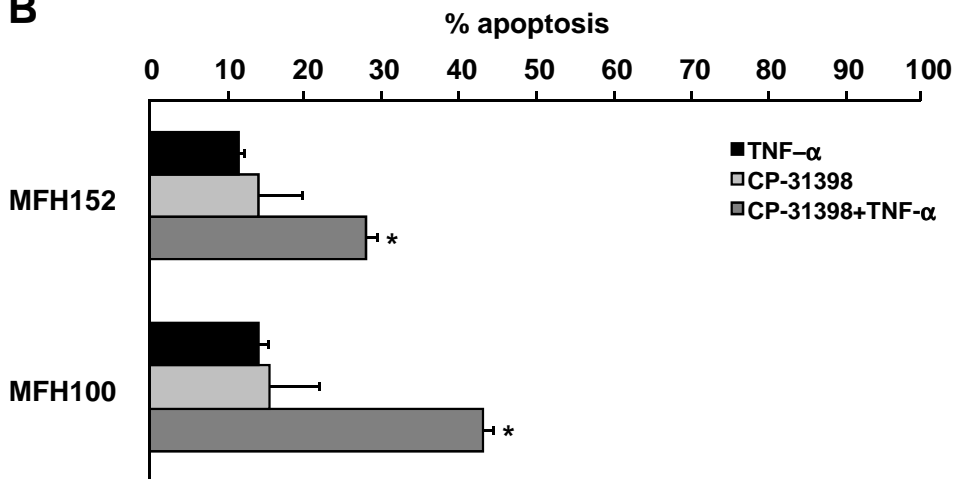
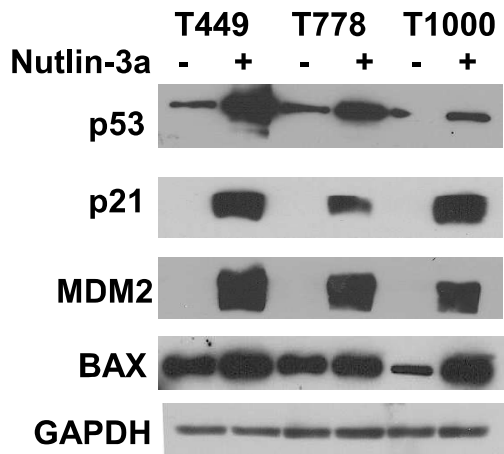


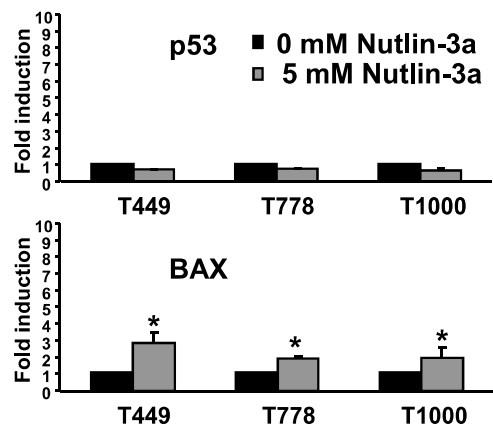
Fig. 4. Restoration of p53 function with CP-31398 sensitizes sarcoma cells to TNF- α -induced apoptosis. *A*, Western blot analysis of p53 target gene expression in *TP53^{Mut}* cell lines (MFH100 and MFH152) after 24h treatment with CP-31398. *B*, apoptosis induction after 96h of culture. Cells were treated either with CP-31398 alone (24h), TNF- α alone (72h) or both sequentially (24h with CP followed by 72h with TNF- α). Apoptosis was measured after 96h by DiOC₆/PI labeling; results from three independent experiments are shown. * $p < 0.05$ versus CP-31398 or TNF- α treated cells.

Figure 5

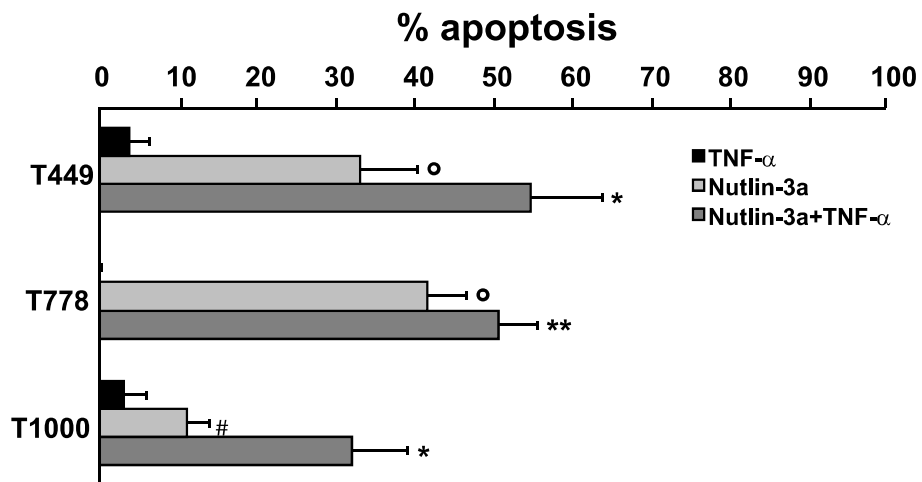
A



B

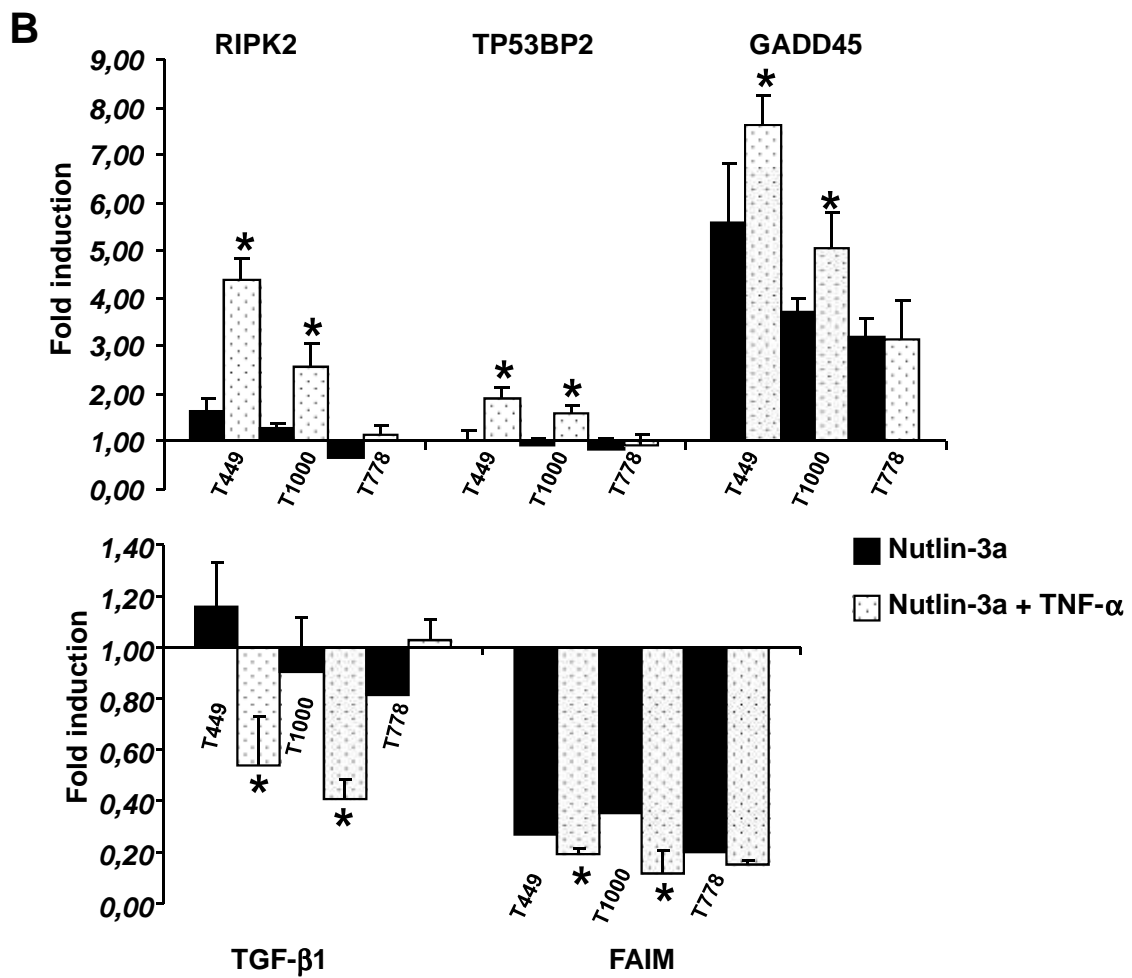
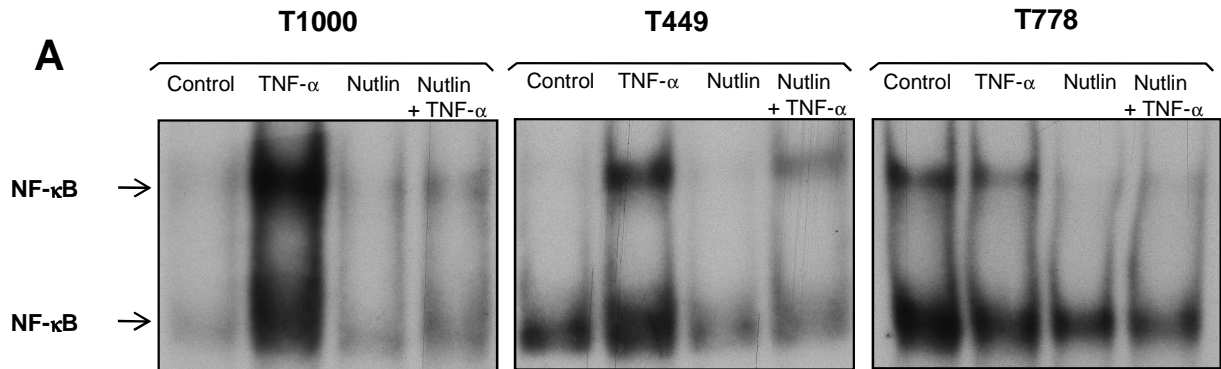


C



*Fig. 5. Restoration of p53 pathways by Nutlin-3a in TP53^{wt}/MDM2^{Ampl} cells. A, induction of p53 target genes in TP53^{wt}/MDM2^{Ampl} (T449, T778 and T1000) cell lines after 16h treatment with Nutlin-3a detected by Western blotting. B, expression of p53 and BAX transcripts after 16h treatment with Nutlin-3a detected by RT-PCR. The results are shown as fold induction relative to cells treated with medium. * $p < 0,05$ versus untreated cells. C, Apoptosis induction after Nutlin-3a or/and TNF- α treatment for 72h in TP53^{wt}/MDM2^{Ampl} cell lines. Apoptosis was detected by DiOC₆/PI assay. Results from three independent experiments are shown. * $p < 0,05$ versus T449 or T1000 with TNF- α or Nutlin-3a treatment. • $p < 0.05$ versus T1000 with Nutlin-3a treatment. ** $p < 0.05$ versus T778 with TNF- α treatment. # $p < 0.05$ versus T1000 with TNF- α treatment.*

Figure 6



*Fig. 6. Differential NF- κ B-DNA-binding and apoptotic gene expression are involved in the potentiating effect of TNF- α and Nutlin-3a treatment. A, NF- κ B DNA binding activity after treatment of the TP53^{Wt}/MDM2^{Ampl} cell lines with TNF- α or/and Nutlin-3a. Nuclear extracts from monolayers of T449, T778 and T1000 cells, untreated or treated with either TNF- α , or Nutlin-3a or both for 72h, were analyzed for NF- κ B activity by EMSA. B, differently regulated apoptotic genes in TP53^{Wt}/MDM2^{Ampl} cell lines treated with the combination of TNF- α and Nutlin-3a compared to Nutlin-3a-only treated cells. T449, T778 and T1000 cell lines were treated 16h with 50 ng/ml TNF- α and/or 5 μ mol Nutlin-3a. Total RNA was extracted and analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as mean \pm SD from two independent experiments performed in duplicate. * p <0.05 in TNF- α + Nutlin-3a treated cells as compared to Nutlin-3a alone.*

PERSPECTIVES

TP53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment inactivé dans les tumeurs humaines ²⁰². Contrairement aux autres gènes suppresseurs de tumeur, une unique mutation faux sens peut inactiver *TP53* et s'accompagne de la perte de l'allèle sauvage. Les mutations de p53 résultent le plus souvent de la perte de la liaison à l'ADN, ce qui implique que cette liaison et la transcription des gènes cibles qui en résulte constituent des fonctions déterminantes dans la suppression tumorale induite par p53. Outre l'inactivation des fonctions normales de p53, les mutations de *TP53* peuvent aussi générer un « gain de fonction » ²⁰³. Ces fonctions peuvent comprendre par exemple, une liaison non spécifique à l'ADN et la transactivation de gènes tels que *MDR1*, *MYC* ou *VEGF* qui favorisent la croissance tumorale. Enfin, *TP53* sauvage peut aussi être inactivé de plusieurs façons : hyper-expression de son antagoniste MDM2, perte de p14 qui est un inhibiteur de MDM2 ou expression de la protéine virale E6 qui induit la dégradation de p53. En clinique humaine, le statut de p53 a été associé au pronostic, à la progression et à la réponse thérapeutique des tumeurs ⁷⁰. En effet, les tumeurs ayant une p53 sauvage, sont habituellement plus sensibles à la radiothérapie et à la chimiothérapie. De plus, notre laboratoire avait démontré l'existence d'un lien entre le statut de p53 et une meilleure susceptibilité des cellules tumorales à la lyse spécifique induite par les cellules T cytotoxiques ^{204,205}. Enfin, les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, caractérisés par la présence d'un seul allèle de *TP53* fonctionnel, représentent une démonstration évidente de l'importance de ce facteur dans l'initiation des tumeurs humaines puisque ces patients ont une incidence de cancer de 50% à l'âge de 30 ans alors que ce pourcentage se retrouve vers 60-67 ans chez des sujets normaux ²⁰⁶. Des travaux chez la souris ont démontré que lorsqu'on augmente expérimentalement le nombre de copies du gène *TP53* normal, on constate une augmentation de la réponse aux lésions de l'ADN, et les

souris ainsi traitées sont significativement protégées de la survenue de cancers comparativement aux souris contrôles ⁵⁴. Selon ces données, la restauration d'une activité p53 sauvage semble être un des buts les plus attractifs dans la recherche d'une thérapie anticancéreuse efficace.

En effet, depuis de nombreuses années, de nombreux travaux ont cherché à restaurer une activité p53 sauvage. Au départ, des essais de thérapie génique avec utilisation de transfert de gène par un adénovirus qui introduisait une copie fonctionnelle de *TP53* dans les tumeurs par injection directe au niveau de la tumeur, se sont développés. Cette approche a montré une certaine efficacité à tuer un fort pourcentage de cellules cancéreuses mais a aboutit aussi à une toxicité significative par « effet bystander » (mortalité des cellules normales situés à proximité de la tumeur du fait de signaux de mort provenant des cellules tumorales). De plus, se posait le problème de la difficulté à infecter chaque cellule tumorale avec le virus ainsi que l'absence de stabilité pour la protéine p53 nouvellement synthétisée.

Plus récemment, on a identifié des petites molécules capables d'activer la p53 endogène. Ces molécules ont été utilisées dans les tumeurs qui conservaient un gène *TP53* sauvage. La plupart des travaux se sont concentrés sur la neutralisation de MDM2, le régulateur négatif physiologique de p53, grâce à l'utilisation des Nutlins découvertes par Vassilev ²⁰⁷. Les benzodiazépines et les composés basés sur les spiro-oxindole ont aussi comme cible l'interaction p53-MDM2. Aussi certaines molécules ciblant MDMX, un autre inhibiteur physiologique de p53 ont été développées. Enfin, étant donné la grande proportion de mutations de *TP53* dans les tumeurs humaines, la restauration des fonctions de p53 dans ce contexte pourrait représenter une stratégie très efficace pour l'élimination des cellules tumorales. Une petite molécule ciblant p53 mutée dans les cellules tumorales ne devrait pas affecter

p53 sauvage dans les cellules normales. Mais cette approche c'est révélée difficile car il y a de nombreuses sortes de mutations responsables de différentes altérations structurelles. Néanmoins, comme 95% des mutations se produisent au niveau du domaine de liaison à l'ADN et entraînent ainsi une déstabilisation de la structure, l'utilisation de petites molécules qui se lieraient spécifiquement au domaine de liaison à l'ADN et qui stabiliseraient p53 dans sa conformation biologiquement active, pourraient restaurer les fonctions sauvages de p53 indépendamment du type exact de la mutation. CP-31398, WR1065, PRIMA-1 ou MIRA-1 ont été testés avec succès dans cette approche *in vitro* et chez la souris ⁶⁰. Néanmoins, une meilleure connaissance de leur mode de fonctionnement s'impose avant leur développement clinique. Aussi, les nouvelles techniques d'étude ultra structurelles ont permis de mettre en évidence une poche de liaison au sein d'une version de p53 contenant la mutation en 220 (Tyr→Cys) et des molécules telles que PhiKan083 ou SCH529074 s'insérant dans cette poche de liaison et stabilisant le domaine central muté dans la conformation sauvage ont été identifiées Les premiers résultats précliniques semblent encourageants. Plus récemment, p53 mutée et accumulée au sein des tumeurs a été utilisée comme cible pour l'immunothérapie alors que p53 sauvage qui est exprimée à des niveaux faibles, échappait à la réponse immunitaire induite. En effet, en utilisant p53 comme cible vaccinale, on a observé *ex vivo*, une expansion de lymphocytes T p53 spécifiques pouvant se dégranuler et une production d'interféron gamma conduisant à lyse de lignées cellulaires sur exprimant p53 ²⁰⁸. Ces travaux démontrent que p53 pourrait être un candidat potentiel pour une immunothérapie anti-cancéreuse.

Toutes les études cliniques prospectives ou rétrospectives, publiées depuis le début des années 90 ont démontré que l'ILP avec TNF- α et melphalan était efficace dans le traitement des STS localement avancés des membres avec des taux de

réponse complète histologique entre 10 et 30 % qui n'ont jamais été atteints par les autres traitements disponibles. Notre étude a apporté une réponse à la controverse concernant le rôle potentiel de l'ILP dans la mort cellulaire tumorale induite. La compréhension des phénomènes conduisant à la résistance à ce traitement est donc fondamentale pour ces patients qui sont le plus souvent en récurrence et chez qui les possibilités thérapeutiques sont faibles. Nos résultats démontrant d'une part, le rôle de p53 dans la réponse au traitement par TNF- α et, d'autre part la capacité de petites molécules, connues pour restaurer l'activité de p53, à sensibiliser des cellules TNF- α résistantes à l'action de cette dernière, pourraient donc permettre à l'avenir d'optimiser le traitement par ILP avec TNF- α et melphalan. En effet, la population hétérogène des STS n'encourage pas à standardiser la prise en charge thérapeutique mais au contraire à la recherche de facteurs génétiques ou moléculaires expliquant la résistance ou la sensibilité à tel ou tel autre traitement. La prise en charge « à la carte » de ces variations ou anomalies, comme par exemple dans le cas de mutations ou d'inactivations de p53, pourraient ainsi contribuer à améliorer l'efficacité des traitements proposés. D'autres travaux expérimentaux sont donc nécessaires pour confirmer d'une part, nos résultats, et pour approfondir d'autre part, nos connaissances sur les mécanismes moléculaires expliquant les phénomènes observés. Ainsi, la place de NF- κ B dans la sensibilisation au traitement par TNF- α nous semble un axe intéressant qui, s'il était confirmé, pourrait laisser envisager une stratégie visant à potentialiser d'un côté la mort cellulaire et à inhiber de l'autre côté, la voie de NF- κ B.

Plus de 30 ans après sa découverte, p53 suscite encore des espoirs et des interrogations. Avec encore près de 10000 publications par an répertoriés dans Pub

Med, et dans le nouveau contexte de traitement « à la carte » des tumeurs humaines, il reste un des enjeux majeurs de la lutte contre la maladie cancéreuse.

En conclusion, l'utilisation conjointe de traitements visant à restaurer la voie de p53 avec le TNF- α qui, malgré les controverses, reste efficace dans le traitement des sarcomes des tissus mous, pourrait à l'avenir être employée dans de plus larges indications et représenter une alternative dans la prise en charge de tumeurs présentant un taux élevé de mutations ou d'inactivations de p53. C'est dans ce contexte que se situent nos travaux cliniques visant à traiter des patients atteints de cancers du col de l'utérus ou du rectum en récurrence locale²⁰⁹ et chez qui l'amélioration de l'efficacité des perfusions isolées avec TNF- α et melphalan constituerait une formidable avancée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Casali PG, Blay J-Y. Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2010;21 Suppl 5:v198-203.
2. Genevay M, Gengler C, Guillou L. [Detection of chromosomal abnormalities in soft tissue sarcomas: which sarcomas? Which abnormalities? How? Why?]. *Bull Cancer.* 2007;94(9):781-792.
3. Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e20294.
4. Fletcher C, Unni K, Mertens F. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. Dans: *World Health Organization Classification of Tumours.* IARC Press: Lyon. 2002.
5. Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J Clin.* 2004;54(2):94-109.
6. Italiano A, Mathoulin-Pelissier S, Cesne AL, et al. Trends in survival for patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Cancer.* 2011;117(5):1049-1054.
7. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *Int. J. Cancer.* 1984;33(1):37-42.
8. Pedeutour F, Maire G, Sirvent N. [From cytogenetics to cytogenomics of adipose tissue tumors: 2. Malignant adipose tissue tumors]. *Bull Cancer.* 2004;91(4):317-323.
9. Coindre J-M, Pédeutour F, Aurias A. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Arch.* 2010;456(2):167-179.
10. Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat. Med.* 2007;13(6):748-753.
11. Letson GD, Muro-Cacho CA. Genetic and molecular abnormalities in tumors of the bone and soft tissues. *Cancer Control.* 2001;8(3):239-251.
12. Idbaih A, Coindre J-M, Derré J, et al. Myxoid malignant fibrous histiocytoma and pleomorphic liposarcoma share very similar genomic imbalances. *Lab. Invest.* 2005;85(2):176-181.
13. Derré J, Lagacé R, Nicolas A, et al. Leiomyosarcomas and most malignant fibrous histiocytomas share very similar comparative genomic hybridization imbalances: an analysis of a series of 27 leiomyosarcomas. *Lab. Invest.* 2001;81(2):211-215.
14. Chibon F, Mariani O, Derré J, et al. A subgroup of malignant fibrous histiocytomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2002;139(1):24-29.
15. Chibon F, Mariani O, Mairal A, et al. The use of clustering software for the classification of comparative genomic hybridization data. an analysis of 109 malignant fibrous histiocytomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2003;141(1):75-78.

16. Chibon F, Mairal A, Fréneaux P, et al. The RB1 gene is the target of chromosome 13 deletions in malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Res.* 2000;60(22):6339-6345.
17. Gibault L, Pérot G, Chibon F, et al. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *J. Pathol.* 2011;223(1):64-71.
18. Mariani O, Brennetot C, Coindre J-M, et al. JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. *Cancer Cell.* 2007;11(4):361-374.
19. Badorff C, Seeger FH, Zeiher AM, Dimmeler S. Glycogen synthase kinase 3beta inhibits myocardin-dependent transcription and hypertrophy induction through site-specific phosphorylation. *Circ. Res.* 2005;97(7):645-654.
20. Pérot G, Chibon F, Montero A, et al. Constant p53 pathway inactivation in a large series of soft tissue sarcomas with complex genetics. *Am. J. Pathol.* 2010;177(4):2080-2090.
21. Chibon F, Lagarde P, Salas S, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat. Med.* 2010;16(7):781-787.
22. Borden EC, Baker LH, Bell RS, et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin. Cancer Res.* 2003;9(6):1941-1956.
23. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972;26(4):239-257.
24. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
25. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 1999;59(7 Suppl):1701s-1706s.
26. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996;85(6):803-815.
27. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 1997;16(10):2794-2804.
28. Gallenne T, Gautier F, Oliver L, et al. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *J. Cell Biol.* 2009;185(2):279-290.
29. Hainaut P. [TP53 tumor suppressor gene: 20 years (and ten thousand mutations) later]. *Bull Cancer.* 2000;87(1):11-18.
30. Toledo F, Bluteau O, Simeonova I. [The activation of p53 in tumors: a promising strategy against cancer]. *Med Sci (Paris).* 2007;23(6-7):565-567.

31. Benchimol S. p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001;8(11):1049-1051.
32. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer.* 2006;6(12):909-923.
33. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(8):594-604.
34. Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288(5468):1053-1058.
35. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.* 2001;7(3):683-694.
36. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* 2009;9(10):691-700.
37. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer.* 2001;1(1):68-76.
38. Wang W, El-Deiry WS. Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(1):90-96.
39. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol.* 2002;14(1):86-91.
40. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature.* 1995;378(6553):203-206.
41. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* 1995;378(6553):206-208.
42. Caelles C, Helmborg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature.* 1994;370(6486):220-223.
43. Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 2010;20(1):14-24.
44. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature.* 2009;458(7242):1127-1130.
45. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(9):647-656.
46. Belyi VA, Levine AJ. One billion years of p53/p63/p73 evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106(42):17609-17610.
47. Bénard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe J. TP53 family members and human cancers. *Human Mutation.* 2003;21(3):182-191.

48. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*. 2001;277(1-2):15-30.
49. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Agboola J, et al. The biological, clinical and prognostic implications of p53 transcriptional pathways in breast cancers. *J. Pathol.* 2010;220(4):419-434.
50. Muller PAJ, Caswell PT, Doyle B, et al. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell*. 2009;139(7):1327-1341.
51. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(5):1874-1887.
52. Laurie NA, Donovan SL, Shih C-S, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature*. 2006;444(7115):61-66.
53. Bénard J, Ahomadégbé J-C. [p53 status and response to chemotherapy]. *Bull Cancer*. 2002;89(12):1007-1010.
54. García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, et al. « Super p53 » mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.* 2002;21(22):6225-6235.
55. Cheek CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP. Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(1):25-37.
56. Jia H. Controversial Chinese gene-therapy drug entering unfamiliar territory. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(4):269-270.
57. Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2007;13(1):23-31.
58. Volanakis EJ, Sherr CJ. Developmental strategies for evasion of Arf tumor suppression. *Cell Cycle.* 2010;9(1):14-15.
59. Selivanova G. Therapeutic targeting of p53 by small molecules. *Semin. Cancer Biol.* 2010;20(1):46-56.
60. Mandinova A, Lee SW. The p53 pathway as a target in cancer therapeutics: obstacles and promise. *Sci Transl Med.* 2011;3(64):64rv1.
61. Wiman KG. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene.* 2010;29(30):4245-4252.
62. Brown CR, Hong-Brown LQ, Welch WJ. Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *J. Clin. Invest.* 1997;99(6):1432-1444.
63. Wang W, Takimoto R, Rastinejad F, El-Deiry WS. Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(6):2171-2181.

64. Tang X, Zhu Y, Han L, et al. CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 2007;117(12):3753-3764.
65. Bykov VJN, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis.* 2002;23(12):2011-2018.
66. Lambert JMR, Moshfegh A, Hainaut P, Wiman KG, Bykov VJN. Mutant p53 reactivation by PRIMA-1MET induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. *Oncogene.* 2010;29(9):1329-1338.
67. Garbett NC, Graves DE. Extending nature's leads: the anticancer agent ellipticine. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2004;4(2):149-172.
68. Shi LM, Fan Y, Myers TG, et al. Mining the NCI anticancer drug discovery databases: genetic function approximation for the QSAR study of anticancer ellipticine analogues. *J Chem Inf Comput Sci.* 1998;38(2):189-199.
69. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, et al. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* 1994;54(3):794-799.
70. Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007;26(15):2157-2165.
71. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975;72(9):3666-3670.
72. Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW, Wallace RB. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature.* 1985;313(6005):803-806.
73. Tang P, Hung M-C, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry.* 1996;35(25):8216-8225.
74. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature.* 1997;385(6618):729-733.
75. Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(2):570-575.
76. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* 1993;74(5):845-853.
77. Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 1994;6(3):407-413.
78. Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001;33(1):19-32.

79. Bemelmans MH, van Tits LJ, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit. Rev. Immunol.* 1996;16(1):1-11.
80. Chan FK-M. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine.* 2007;37(2):101-107.
81. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, et al. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science.* 2000;288(5475):2351-2354.
82. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science.* 1999;283(5401):543-546.
83. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 1996;84(2):299-308.
84. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996;271(9):4961-4965.
85. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 1996;87(3):565-576.
86. Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, et al. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity.* 1997;7(5):715-725.
87. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, et al. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* 1998;8(3):297-303.
88. Devin A, Cook A, Lin Y, et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity.* 2000;12(4):419-429.
89. Goeddel DV. Signal transduction by tumor necrosis factor: the Parker B. Francis Lectureship. *Chest.* 1999;116(1 Suppl):69S-73S.
90. Franzoso G, Zazzeroni F, Papa S. JNK: a killer on a transcriptional leash. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):13-15.
91. Gulbins E, Grassmé H. Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002;1585(2-3):139-145.
92. De Nadai C, Sestili P, Cantoni O, et al. Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(10):5480-5485.
93. Barnhart BC, Peter ME. The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell.* 2003;114(2):148-150.

94. Schütze S, Machleidt T, Adam D, et al. Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J. Biol. Chem.* 1999;274(15):10203-10212.
95. Legler DF, Micheau O, Doucey M-A, Tschopp J, Bron C. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity.* 2003;18(5):655-664.
96. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 2004;16(1):3-9.
97. Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, et al. Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor- α knockout mice. *Eur. J. Immunol.* 2000;30(7):1957-1966.
98. BURNET M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J.* 1957;1(5023):841-847.
99. Havell EA, Fiers W, North RJ. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J. Exp. Med.* 1988;167(3):1067-1085.
100. Thomas L. Discussion. Dans: *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*. H. S. Lawrence. Hoeber-Harper, New-York; 1959:529-533.
101. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat. Med.* 1999;5(7):828-831.
102. Suganuma M, Okabe S, Marino MW, et al. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res.* 1999;59(18):4516-4518.
103. Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, et al. Expression of both TNF- α receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene.* 2004;23(10):1902-1910.
104. Knight B, Yeoh GC, Husk KL, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *J. Exp. Med.* 2000;192(12):1809-1818.
105. Roberts RA, Kimber I. Cytokines in non-genotoxic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1999;20(8):1397-1401.
106. Orosz P, Echtenacher B, Falk W, et al. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 1993;177(5):1391-1398.
107. Malik ST, Naylor MS, East N, Oliff A, Balkwill FR. Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur. J. Cancer.* 1990;26(10):1031-1034.

108. Qin Z, Krüger-Krasagakes S, Kunzendorf U, et al. Expression of tumor necrosis factor by different tumor cell lines results either in tumor suppression or augmented metastasis. *J. Exp. Med.* 1993;178(1):355-360.
109. Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol.* 2003;4(9):565-573.
110. Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J. Clin. Invest.* 1993;91(5):2194-2206.
111. Vinante F, Rigo A, Tecchio C, et al. Serum levels of p55 and p75 soluble TNF receptors in adult acute leukaemia at diagnosis: correlation with clinical and biological features and outcome. *Br. J. Haematol.* 1998;102(4):1025-1034.
112. Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, et al. Prognostic significance of TNF alpha and its p55 soluble receptor in malignant lymphomas. *Leukemia.* 1997;11 Suppl 3:441-443.
113. Foa R, Massaia M, Cardona S, et al. Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood.* 1990;76(2):393-400.
114. Hermann GG, Zeuthan J, Geertsen PF, Claesson MH. In vitro production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 by mononuclear blood cells of patients with renal cell carcinoma undergoing rIL-2 treatment. Relation between clinical response and TNF-alpha production. *Cytokine.* 1992;4(2):144-150.
115. Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell.* 1989;58(5):923-931.
116. Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, et al. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene.* 1997;15(23):2817-2826.
117. Ameyar M, Shatrov V, Bouquet C, et al. Adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene sensitizes TNF resistant MCF7 derivatives to the cytotoxic effect of this cytokine: relationship with c-myc and Rb. *Oncogene.* 1999;18(39):5464-5472.
118. Ameyar-Zazoua M, Larochette N, Dorothée G, et al. Wild-type p53 induced sensitization of mutant p53 TNF-resistant cells: role of caspase-8 and mitochondria. *Cancer Gene Ther.* 2002;9(3):219-227.
119. Lanni JS, Lowe SW, Licitra EJ, Liu JO, Jacks T. p53-independent apoptosis induced by paclitaxel through an indirect mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(18):9679-9683.
120. Weisz L, Damalas A, Lontos M, et al. Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(6):2396-2401.

121. Drané P, Leblanc V, Miro-Mur F, et al. Accumulation of an inactive form of p53 protein in cells treated with TNF alpha. *Cell Death Differ.* 2002;9(5):527-537.
122. Javelaud D, Wietzerbin J, Delattre O, Besançon F. Induction of p21Waf1/Cip1 by TNFalpha requires NF-kappaB activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene.* 2000;19(1):61-68.
123. Tselepis C, Perry I, Dawson C, et al. Tumour necrosis factor-alpha in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene.* 2002;21(39):6071-6081.
124. Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, et al. Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Res.* 1993;53(8):1939-1944.
125. Gaiotti D, Chung J, Iglesias M, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a ras-dependent pathway. *Mol. Carcinog.* 2000;27(2):97-109.
126. Maeda M, Watanabe N, Okamoto T, Tsuji N, Niitsu Y. Endogenous tumor necrosis factor functions as a resistant factor against adriamycin. *Int. J. Cancer.* 1994;58(3):376-379.
127. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2000;60(1):184-190.
128. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, et al. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 1987;329(6140):630-632.
129. Yoshida S, Ono M, Shono T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(7):4015-4023.
130. Cheng N, Chen J. Tumor necrosis factor-alpha induction of endothelial ephrin A1 expression is mediated by a p38 MAPK- and SAPK/JNK-dependent but nuclear factor-kappa B-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2001;276(17):13771-13777.
131. De Cesaris P, Starace D, Starace G, et al. Activation of Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway by tumor necrosis factor alpha leads to intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Biol. Chem.* 1999;274(41):28978-28982.
132. Bussolino F, Camussi G, Baglioni C. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 alpha. *J. Biol. Chem.* 1988;263(24):11856-11861.

133. Leek RD, Landers R, Fox SB, et al. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer*. 1998;77(12):2246-2251.
134. Battegay EJ, Raines EW, Colbert T, Ross R. TNF-alpha stimulation of fibroblast proliferation. Dependence on platelet-derived growth factor (PDGF) secretion and alteration of PDGF receptor expression. *J. Immunol*. 1995;154(11):6040-6047.
135. Leber TM, Balkwill FR. Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br. J. Cancer*. 1998;78(6):724-732.
136. Rosen EM, Goldberg ID, Liu D, et al. Tumor necrosis factor stimulates epithelial tumor cell motility. *Cancer Res*. 1991;51(19):5315-5321.
137. Kawai N, Tsuji S, Tsujii M, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates invasion of Src-activated intestinal cells. *Gastroenterology*. 2002;122(2):331-339.
138. Rüegg C, Yilmaz A, Bieler G, et al. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nat. Med*. 1998;4(4):408-414.
139. Mocellin S, Provenzano M, Rossi CR, et al. Induction of endothelial nitric oxide synthase expression by melanoma sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-driven cytotoxicity. *Clin. Cancer Res*. 2004;10(20):6879-6886.
140. Matschurat S, Knies UE, Person V, et al. Regulation of EMAP II by hypoxia. *Am. J. Pathol*. 2003;162(1):93-103.
141. Lassau N, Lamuraglia M, Vanel D, et al. Doppler US with perfusion software and contrast medium injection in the early evaluation of isolated limb perfusion of limb sarcomas: prospective study of 49 cases. *Ann. Oncol*. 2005;16(7):1054-1060.
142. Renard N, Liénard D, Lespagnard L, et al. Early endothelium activation and polymorphonuclear cell invasion precede specific necrosis of human melanoma and sarcoma treated by intravascular high-dose tumour necrosis factor alpha (rTNF alpha). *Int. J. Cancer*. 1994;57(5):656-663.
143. Kristensen CA, Nozue M, Boucher Y, Jain RK. Reduction of interstitial fluid pressure after TNF-alpha treatment of three human melanoma xenografts. *Br. J. Cancer*. 1996;74(4):533-536.
144. Folli S, Pèlegri A, Chalandon Y, et al. Tumor-necrosis factor can enhance radio-antibody uptake in human colon carcinoma xenografts by increasing vascular permeability. *Int. J. Cancer*. 1993;53(5):829-836.
145. de Wilt JH, ten Hagen TL, de Boeck G, et al. Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. *Br. J. Cancer*. 2000;82(5):1000-1003.
146. de Wilt JH, Soma G, ten Hagen TL, et al. Synergistic antitumour effect of TNF-SAM2 with melphalan and doxorubicin in isolated limb perfusion in rats. *Anticancer Res*. 2000;20(5B):3491-3496.

147. van der Veen AH, de Wilt JH, Eggermont AM, et al. TNF-alpha augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF-alpha-based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects. *Br. J. Cancer.* 2000;82(4):973-980.
148. Yilmaz A, Bieler G, Spertini O, Lejeune FJ, Rüegg C. Pulse treatment of human vascular endothelial cells with high doses of tumor necrosis factor and interferon-gamma results in simultaneous synergistic and reversible effects on proliferation and morphology. *Int. J. Cancer.* 1998;77(4):592-599.
149. Mocellin S, Nitti D. TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front. Biosci.* 2008;13:2774-2783.
150. Feldman ER, Creagan ET, Schaid DJ, Ahmann DL. Phase II trial of recombinant tumor necrosis factor in disseminated malignant melanoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 1992;15(3):256-259.
151. Kemeny N, Childs B, Larchian W, Rosado K, Kelsen D. A phase II trial of recombinant tumor necrosis factor in patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer.* 1990;66(4):659-663.
152. Jones AL, O'Brien ME, Lorentzos A, et al. A randomised phase II study of carmustine alone or in combination with tumour necrosis factor in patients with advanced melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1992;30(1):73-76.
153. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA, et al. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J. Clin. Oncol.* 1988;6(2):344-350.
154. Spriggs DR, Sherman ML, Michie H, et al. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a 24-hour intravenous infusion. A phase I and pharmacologic study. *J. Natl. Cancer Inst.* 1988;80(13):1039-1044.
155. Lejeune FJ, Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer.* 2006;93(8):E90-100.
156. Kuroda K, Miyata K, Shikama H, et al. Novel muteins of human tumor necrosis factor with potent antitumor activity and less lethal toxicity in mice. *Int. J. Cancer.* 1995;63(1):152-157.
157. Ameloot P, Brouckaert P. Production and characterization of receptor-specific TNF muteins. *Methods Mol. Med.* 2004;98:33-46.
158. ten Hagen TLM, Seynhaeve ALB, van Tiel ST, Ruiters DJ, Eggermont AMM. Pegylated liposomal tumor necrosis factor-alpha results in reduced toxicity and synergistic antitumor activity after systemic administration in combination with liposomal doxorubicin (Doxil) in soft tissue sarcoma-bearing rats. *Int. J. Cancer.* 2002;97(1):115-120.
159. Kamada H, Tsutsumi Y, Yamamoto Y, et al. Antitumor activity of tumor necrosis factor-alpha conjugated with polyvinylpyrrolidone on solid tumors in mice. *Cancer Res.* 2000;60(22):6416-6420.

160. Azria D, Larbouret C, Garambois V, et al. Potentiation of ionising radiation by targeting tumour necrosis factor alpha using a bispecific antibody in human pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* 2003;89(10):1987-1994.
161. Larbouret C, Robert B, Linard C, et al. Radiocurability by targeting tumor necrosis factor-alpha using a bispecific antibody in carcinoembryonic antigen transgenic mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007;69(4):1231-1237.
162. Azria D, Dorvillius M, Gourgou S, et al. Enhancement of radiation therapy by tumor necrosis factor alpha in human colon cancer using a bispecific antibody. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003;55(5):1363-1373.
163. Borsi L, Balza E, Carnemolla B, et al. Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels. *Blood.* 2003;102(13):4384-4392.
164. Rosenblum MG, Cheung L, Murray JL, Bartholomew R. Antibody-mediated delivery of tumor necrosis factor (TNF-alpha): improvement of cytotoxicity and reduction of cellular resistance. *Cancer Commun.* 1991;3(1):21-27.
165. Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, et al. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* 2004;11(3):169-183.
166. Farma JM, Puhmann M, Soriano PA, et al. Direct evidence for rapid and selective induction of tumor neovascular permeability by tumor necrosis factor and a novel derivative, colloidal gold bound tumor necrosis factor. *Int. J. Cancer.* 2007;120(11):2474-2480.
167. Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, et al. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(24):6139-6149.
168. Senzer N, Mani S, Rosemurgy A, et al. TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene: a phase I study in patients with solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(4):592-601.
169. McLoughlin JM, McCarty TM, Cunningham C, et al. TNFerade, an adenovector carrying the transgene for human tumor necrosis factor alpha, for patients with advanced solid tumors: surgical experience and long-term follow-up. *Ann. Surg. Oncol.* 2005;12(10):825-830.
170. Mundt AJ, Vijayakumar S, Nemunaitis J, et al. A Phase I trial of TNFerade biologic in patients with soft tissue sarcoma in the extremities. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(17):5747-5753.
171. Pilati P, Rossi CR, Mocellin S. Strategies to enhance the anticancer potential of TNF. *Front. Biosci.* 2008;13:3181-3193.
172. Sacchi A, Gasparri A, Gallo-Stampino C, et al. Synergistic antitumor activity of cisplatin, paclitaxel, and gemcitabine with tumor vasculature-targeted tumor necrosis factor-alpha. *Clin. Cancer Res.* 2006;12(1):175-182.

173. Bartsch HH, Pfizenmaier K, Schroeder M, Nagel GA. Intralesional application of recombinant human tumor necrosis factor alpha induces local tumor regression in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1989;25(2):287-291.
174. R ath U, Kaufmann M, Schmid H, et al. Effect of intraperitoneal recombinant human tumour necrosis factor alpha on malignant ascites. *Eur. J. Cancer.* 1991;27(2):121-125.
175. Creech O Jr, Krementz ET, Ryan RF, Winblad JN. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Ann. Surg.* 1958;148(4):616-632.
176. Stotter A. Comparison of amputation with limb-sparing operations for adult soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann. Surg.* 1992;216(5):615-616.
177. Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ, Renard N, Lejeune FJ. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 1992;10(1):52-60.
178. Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Liénard D, et al. Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma and melphalan for nonresectable extremity soft tissue sarcomas: a multicenter trial. *J. Clin. Oncol.* 1996;14(10):2653-2665.
179. Manusama ER, Nooijen PT, Stavast J, et al. Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha with melphalan in isolated limb perfusion in the rat. *Br J Surg.* 1996;83(4):551-555.
180. Bonvalot S, Laplanche A, Lejeune F, et al. Limb salvage with isolated perfusion for soft tissue sarcoma: could less TNF-alpha be better? *Ann. Oncol.* 2005;16(7):1061-1068.
181. Bonvalot S, Rimareix F, Causeret S, et al. Hyperthermic isolated limb perfusion in locally advanced soft tissue sarcoma and progressive desmoid-type fibromatosis with TNF 1 mg and melphalan (T1-M HILP) is safe and efficient. *Ann. Surg. Oncol.* 2009;16(12):3350-3357.
182. Plaat BE, Molenaar WM, Mastik MF, et al. Hyperthermic isolated limb perfusion with tumor necrosis factor-alpha and melphalan in patients with locally advanced soft tissue sarcomas: treatment response and clinical outcome related to changes in proliferation and apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 1999;5(7):1650-1657.
183. van Horssen R, Rens JAP, Brunstein F, et al. Intratumoural expression of TNF-R1 and EMAP-II in relation to response of patients treated with TNF-based isolated limb perfusion. *Int. J. Cancer.* 2006;119(6):1481-1490.
184. Lans TE, ten Hagen TLM, van Horssen R, et al. Improved antitumor response to isolated limb perfusion with tumor necrosis factor after upregulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II in soft tissue sarcoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2002;9(8):812-819.

185. Thiery J, Echchakir H, Dorothée G, et al. Role of p53 in the sensitization of tumor cells to apoptotic cell death. *Mol. Immunol.* 2002;38(12-13):977-980.
186. Pass HI, Mew DJ, Kranda KC, et al. Isolated lung perfusion with tumor necrosis factor for pulmonary metastases. *Ann. Thorac. Surg.* 1996;61(6):1609-1617.
187. Walther MM, Jennings SB, Choyke PL, et al. Isolated perfusion of the kidney with tumor necrosis factor for localized renal-cell carcinoma. *World J Urol.* 1996;14 Suppl 1:S2-7.
188. Christoforidis D, Martinet O, Lejeune FJ, Mosimann F. Isolated liver perfusion for non-resectable liver tumours: a review. *Eur J Surg Oncol.* 2002;28(8):875-890.
189. Lindnér P, Fjälling M, Hafström L, et al. Isolated hepatic perfusion with extracorporeal oxygenation using hyperthermia, tumour necrosis factor alpha and melphalan. *Eur J Surg Oncol.* 1999;25(2):179-185.
190. Alexander HR, Brown CK, Bartlett DL, et al. Augmented capillary leak during isolated hepatic perfusion (IHP) occurs via tumor necrosis factor-independent mechanisms. *Clin. Cancer Res.* 1998;4(10):2357-2362.
191. Alexander HR Jr, Bartlett DL, Libutti SK, et al. Isolated hepatic perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for unresectable cancers confined to the liver. *J. Clin. Oncol.* 1998;16(4):1479-1489.
192. Alexander HR Jr, Libutti SK, Bartlett DL, et al. Hepatic vascular isolation and perfusion for patients with progressive unresectable liver metastases from colorectal carcinoma refractory to previous systemic and regional chemotherapy. *Cancer.* 2002;95(4):730-736.
193. Bonvalot S, Muret J, Debaere T, et al. High response rates with isolated pelvic perfusion (IPP) with a pneumatic anti-shock garments (PASG) and low-dose TNF- α for locally advanced pelvic sarcomas and carcinomas: A phase II unicenter trial. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts).* 2008;26(15_suppl):10586.
194. Blay J-Y. A decade of tyrosine kinase inhibitor therapy: Historical and current perspectives on targeted therapy for GIST. *Cancer Treat. Rev.* 2011;37(5):373-384.
195. Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Klausner JM, et al. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann. Surg.* 1996;224(6):756-764; discussion 764-765.
196. Dey A, Wong ET, Bist P, Tergaonkar V, Lane DP. Nutlin-3 inhibits the NF κ B pathway in a p53-dependent manner: implications in lung cancer therapy. *Cell Cycle.* 2007;6(17):2178-2185.
197. Nooijen PT, Manusama ER, Eggermont AM, et al. Synergistic effects of TNF- α and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study. *Br. J. Cancer.* 1996;74(12):1908-1915.

198. Menon C, Ghartey A, Canter R, Feldman M, Fraker DL. Tumor necrosis factor-alpha damages tumor blood vessel integrity by targeting VE-cadherin. *Ann. Surg.* 2006;244(5):781-791.
199. Lejeune FJ, Liénard D, Matter M, Rüegg C. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun.* 2006;6:6.
200. Muret J, Yacoub M, Terrier P, et al. p53 status correlates with histopathological response in patients with soft tissue sarcomas treated using isolated limb perfusion with TNF-alpha and melphalan. *Ann. Oncol.* 2008;19(4):793-800.
201. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 2007;28(6):622-629.
202. Soussi T, Bérout C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer.* 2001;1(3):233-240.
203. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* 2000;60(24):6788-6793.
204. Thiery J, Abouzahr S, Dorothee G, et al. p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *J. Immunol.* 2005;174(2):871-878.
205. Thiery J, Dorothee G, Haddada H, et al. Potentiation of a tumor cell susceptibility to autologous CTL killing by restoration of wild-type p53 function. *J. Immunol.* 2003;170(12):5919-5926.
206. Weill J-C, Radman M. How good is our genome? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2004;359(1441):95-98.
207. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004;303(5659):844-848.
208. Song G-Y, Srivastava T, Ishizaki H, et al. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Expressing Wild-Type Human p53 Induces Specific Antitumor CTL Expansion. *Cancer Invest.* 2011;29(8):501-510.
209. Bonvalot S, Muret J, Debaere T. [Pelvic perfusion for locally advanced tumors]. *Bull Cancer.* 2009;96(1):103-109.