



**HAL**  
open science

# Pharmacologie moléculaire du sunitinib et du vandetanib, deux inhibiteurs d'activité kinase, dans le cancer médullaire de la thyroïde

Sophie Broutin

► **To cite this version:**

Sophie Broutin. Pharmacologie moléculaire du sunitinib et du vandetanib, deux inhibiteurs d'activité kinase, dans le cancer médullaire de la thyroïde. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA11T053. tel-00829093

**HAL Id: tel-00829093**

**<https://theses.hal.science/tel-00829093>**

Submitted on 2 Jun 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-SUD 11  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

# THESE

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

Spécialité : Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement

par

**Sophie BROUTIN**

Le 27 Septembre 2011

---

**PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE DU  
SUNITINIB ET DU VANDETANIB, DEUX  
INHIBITEURS D'ACTIVITE KINASE, DANS LE  
CANCER MEDULLAIRE DE LA THYROIDE.**

---

Directeur de thèse : **Professeur Jean-Michel BIDART**

## JURY

Professeur Dominique PORQUET  
Professeur Stéphane CULINE  
Docteur Ivan BIECHE  
Professeur Martin SCHLUMBERGER  
Professeur Massimo SANTORO  
Docteur Anderson RYAN  
Professeur Jean-Michel BIDART

*Président*  
*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Examinateur*  
*Examinateur*  
*Examinateur*  
*Directeur de thèse*

## REMERCIEMENTS

---

### **A Monsieur le Doyen Dominique Porquet,**

Je vous remercie d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je suis sensible à l'honneur que vous me faites. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

### **A Monsieur le Professeur Stéphane Culine,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de l'intérêt que vous avez porté à cette thèse. Soyez assuré de mon profond respect.

### **A Monsieur le Docteur Ivan Bièche,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Votre lecture attentive et vos critiques m'ont permis d'améliorer le manuscrit. Je souhaite vous remercier sincèrement de l'intérêt que vous avez porté à cette thèse et du temps que vous m'avez accordé.

### **To Professor Massimo Santoro,**

I deeply thank you to have accepted to be a member of my PhD jury. It's a great honor for me. I would like to express my sincere gratitude for taking intense academic interest in this study.

### **To Doctor Anderson J. Ryan,**

I deeply thank you to have accepted to be a member of my PhD jury. I'm indebted to you for our collaboration and I gratefully thank you for providing valuable suggestions that improved the quality of this study.

**A Monsieur le Professeur Martin Schlumberger,**

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je tiens à vous faire part de ma gratitude et à vous témoigner toute ma reconnaissance pour votre implication depuis 2005 dans mon parcours scientifique et professionnel. Vos conseils, vos critiques et votre soutien m'ont toujours été très précieux. J'aurai beaucoup de plaisir à continuer à travailler avec vous.

**A Monsieur le Professeur Jean-Michel Bidart,**

Je vous remercie d'avoir accepté, depuis 2005, de m'encadrer dans les différents projets scientifiques que nous avons depuis menés à bien (Master 2, thèse de doctorat en pharmacie, DUERCC et bien sûr thèse de Sciences). Je tiens à vous remercier pour toute la confiance que vous m'avez témoignée et l'autonomie que vous m'avez accordée tout au long de ces années. Je vous remercie également d'avoir partagé avec moi votre savoir et vos très nombreuses connaissances, scientifiques ou non. Je vous suis particulièrement reconnaissante pour tout ce que vous faites pour moi, pour mon avenir, et j'espère être toujours digne de la confiance que vous m'accordez.

*Ce travail de thèse a été une expérience particulièrement enrichissante tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je tiens à remercier ici toutes les personnes croisées au cours de ces années et qui m'ont aidée.*

En particulier,

Je remercie le **Dr Corinne Dupuy** et les membres présents et passés de son équipe de recherche : **Alain, Jacques, Monique, Bernard Caillou, Nabahet, Rabii, Urbain, Myriem, Amélie, Rodrigo, Fanny, Jérémy, Odile, Françoise, Aurore**, et « mes » stagiaires **Wiem** et **Morgane**.

*Merci Corinne de m'avoir accueillie dans ton équipe. Merci à tous pour votre soutien et les conseils précieux que vous m'avez apportés au cours de ces années. Merci de l'amitié que vous me portez.*

Je remercie le **Dr Patricia Kannouche**, le **Dr Filippo Rosselli** et le **Pr Jean Feunteun**, directeurs successifs de l'unité de recherche CNRS UMR8200 (ex-FRE2939) et tous les membres, actuels et passés, de l'unité.

*Je vous remercie de m'avoir acceptée au sein de l'unité.*

J'ai une pensée toute particulière pour **Anne, Dorine, Morwenna, Gisèle, Françoise, Marine, Bastien, Christelle, Françoise, Sophie, Betty,...**

*Merci pour les moments agréables passés avec vous, l'aide et le soutien que vous m'avez apportés.*

Je remercie le laboratoire de Recherche Translationnelle de l'Institut Gustave-Roussy.

**A monsieur le Dr Ludovic Lacroix**

*Merci pour ton aide précieuse, ta disponibilité et ta gentillesse naturelle. C'est un réel plaisir de travailler avec toi.*

**A Patrick, Nelly, Isabelle, Laurent, Charlotte... et bien sûr Ludo.**

*Merci pour l'aide que vous m'avez apportée, l'amitié que vous me témoignez et tous les bons moments partagés.*

Je remercie le département de Biologie et Pathologie médicales de l'Institut Gustave-Roussy, en particulier Madame **Evelyne Martin**, Messieurs **André Brunier** et **Lionel Fougeat**, tous les techniciens de biochimie et d'hématologie (**Nicolas, Julien, Vanessa, Karen, Leslie, Mathieu...**), l'équipe de la réception des prélèvements, **Virginie, Françoise**, Madame le Dr **Véronique Saada**, sans oublier Madame **Véronique Letourneur**.

*Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée et votre bienveillance.*

Je remercie les membres des différentes plateformes de l'Institut Gustave-Roussy avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer, en particulier **Thomas Robert, Bastien Job, Hugues Ripoché, Philippe Dessen, Catherine Richon, Cédric Orear, Vladimir Lazar** de l'UGF, **Ingrid Leguerney** et **Valérie Rouffiac** du LIPA, **Benoit Petit** de l'animalerie.

Je remercie le Service de Médecine Nucléaire et de Carcinologie endocrinienne de l'Institut Gustave-Roussy : cliniciens, infirmières, secrétaires et patients.

Je remercie le Monsieur le **Professeur Hervé Galons**, et les Mesdemoiselles les Docteurs **Fabienne Gug** et **Nassima Oumata**, pour leur aide précieuse dans ce projet.

*J'espère que nous aurons l'occasion de collaborer à nouveau ensemble.*

Je remercie le département de transfert de l'Institut Curie, et tout particulièrement Mesdames **Bérengère Marty-Prouvost, Caroline Hégot** et **Leanne de-Koning**.

*Merci pour votre accueil chaleureux et votre aide précieuse dans ce travail.*

Je remercie le **Dr Angelo Paci** ainsi que tous les membres, et associés, du Service Interdépartemental de Pharmacologie et d'Analyse du Médicament, de l'Institut Gustave-Roussy : **Justine, Lionel, Atmane, Hervé, Laurence, Alain, Audrey...** sans oublier internes, externes et stagiaires.

*Je suis très heureuse d'avoir pu rejoindre le SIPAM il y a deux ans. Travailler et apprendre avec vous est pour moi un grand plaisir. J'espère pouvoir continuer cette aventure encore quelques années !*

Je remercie mes collègues de la faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry, en particulier Madame le **Professeur Myriam Taverna**.

*Merci pour la confiance que vous m'avez accordée.*

Je remercie très chaleureusement les membres, passés et présents, de l'unité INSERM U981. Ma présence, certes rare, au +12 témoigne de l'amitié que je vous porte. Je vous remercie de m'avoir accueillie à bras ouverts et de m'avoir toujours fait une place. Je suis très heureuse d'avoir partagé avec vous tous ces bons moments. J'ai une pensée pour chacun d'entre vous, et en particulier pour **Ludo, Fred, Luc, Samar, Virginie, Delphine, Elsa, Ken, Cat, Nader, Angélique, Nico, Florence, Lise, Nyam, Nico, Anne**, sans oublier **Estelle, Laurence, Caro, et David**.

Je remercie également mes autres collègues IGRIens, tout particulièrement **Caroline, Séverine, Séraphin, Michaël, Vanessa, Olivier...**, issus d'horizons variés et dont je suis heureuse d'avoir croisé le chemin.

**A Alix, Florence, Gaëlle et Virginie.** *Merci pour tout.*

**A Ludo, Nyam & Nader.** *Votre amitié m'est très précieuse.*

**A mes amis**, de longue date et toujours présents.

**A ma Famille** (*parents, sœur & co., René, Anne, Babet...*)

Je vous remercie d'avoir accepté mes choix, et de m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de ce parcours.

# SOMMAIRE

---

<b>SOMMAIRE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>7</b>
<b>RESUME EN FRANÇAIS</b>	<b>8</b>
<b>RESUME EN ANGLAIS</b>	<b>9</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>10</b>
<b>CHAPITRE 1 : LE CANCER MEDULLAIRE DE LA THYROÏDE, UN MODELE D'ETUDE DES THERAPIES MOLECULAIRES CIBLEES</b>	<b>11</b>
<b>1. Généralités sur le CMT</b>	<b>11</b>
1.1 Données d'épidémiologie	11
1.2 Physiopathologie	11
1.2.1 Physiologie des cellules C	11
1.2.1.1 Histologie et ontologie de la thyroïde	11
1.2.1.2 Principaux marqueurs sécrétés par les cellules C	13
1.2.2 Pathologies tumorales des cellules C	16
1.2.2.1 De l'hyperplasie au CMT métastatique	16
1.2.2.2 Les formes cliniques de CMT	18
1.2.2.3 Marqueurs tumoraux sériques du CMT	19
1.3 Oncogenèse et voies de signalisation	22
1.3.1 Le proto-oncogène RET	22
1.3.2 Autres anomalies génétiques	31
<b>2. Prise en charge thérapeutique des CMT</b>	<b>34</b>
2.1 La chirurgie, le gold standard	34
2.2 La radiothérapie externe	35
2.3 Les chimiothérapies conventionnelles	35
2.4 Place des thérapies innovantes dans la prise en charge du CMT	36
<b>3. Modèles d'étude du CMT</b>	<b>38</b>
3.1 Lignées cellulaires : modèles <i>in vitro</i>	38
3.1.1 Lignées humaines	38
3.1.2 Lignées animales	40
3.1.3 Constructions cellulaires	40
3.2 Modèles animaux : modèles <i>in vivo</i>	40
3.2.1 Souris immunodéficientes xénotreffées	41
3.2.2 Souris génétiquement modifiées	42
3.2.3 Autres modèles	42
3.3 Prélèvements de patients	43

<b>CHAPITRE 2 : INHIBITEURS D'ACTIVITE KINASE, UNE NOUVELLE CLASSE THERAPEUTIQUE EN CANCEROLOGIE</b>	<b>44</b>
<b>1. Protéines kinase, des cibles moléculaires majeures en cancérologie</b>	<b>44</b>
1.1 Evolution de la notion de cible thérapeutique en cancérologie	44
1.2 Protéines à activité kinase et cancer	46
1.2.1 Le kinome	46
1.2.2 Structure-activité des récepteurs à activité tyrosine kinase	48
1.2.3 Protéines à activité kinase et cancer	49
1.2.3.1 Protéines à activité kinase et oncogénèse	49
1.2.3.2 Protéines à activité kinase et angiogénèse	49
1.2.3.3 Addiction oncogénique	51
<b>2. Thérapeutiques moléculaires ciblées en cancérologie, place des inhibiteurs d'activité kinase</b>	<b>52</b>
2.1 Les différentes stratégies thérapeutiques	52
2.1.1 Anticorps monoclonaux thérapeutiques	52
2.1.2 Molécules de synthèse organique	53
2.1.3 Autres stratégies	55
2.2 Problématiques de l'utilisation des ITK	55
<b>3. Place des inhibiteurs d'activité tyrosine kinase dans la prise en charge thérapeutique du cancer médullaire de la thyroïde</b>	<b>57</b>
3.1 Développement des ITK dans le CMT	57
3.1.1 RET, cible principale	57
3.1.2 Le VEGFR-2 (KDR) et l'angiogénèse	58
3.1.3 L'EGFR	59
3.2 Deux exemples : le sunitinib et le vandetanib	59
3.2.1 Relation structure-activité	59
3.2.2 Développement clinique du sunitinib et du vandetanib	61
3.2.3 Toxicités induites par le sunitinib et le vandetanib	62
<b>CHAPITRE 3 : PROBLEMATIQUE &amp; OBJECTIFS</b>	<b>64</b>
<b>CHAPITRE 4 : RESULTATS &amp; DISCUSSION</b>	<b>66</b>
<b>1. Signature moléculaire de la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase : étude des modifications des voies de signalisation en réponse au traitement</b>	<b>66</b>
1.1 Introduction	66
1.1.1 Intérêts de l'étude des voies de signalisation	66
1.1.2 La technologie Reverse-Phase Protein Array	68
1.1.3 Objectifs du travail	69
1.2 Etude par Reverse Phase Protein Array des modifications des voies de signalisation induites par le vandetanib dans un modèle humain de CMT	70
1.3 Etude des voies de signalisation modifiées en réponse au sunitinib dans des modèles de CMT	71
1.3.1 Identification des principales voies de signalisation impliquées dans la réponse au sunitinib par Reverse Phase Protein Array	71
1.3.2 Validation par western blot des principales voies de signalisation impliquées dans la réponse au sunitinib	73
1.4 Etude de la voie des MAPK chez les patients atteints de CMT	73
1.5 Etude de la forme clivée de PARP en réponse au sunitinib et au vandetanib	75
1.6 Discussion	77



<b>2. Identification de nouveaux biomarqueurs de réponse aux inhibiteurs d'activité tyrosine kinase</b>	<b>80</b>
2.1 Introduction	80
2.1.1 Les biomarqueurs en cancérologie	80
2.1.2 Identification de biomarqueurs par transcriptomique à haut-débit	82
2.1.3 Objectifs du travail	84
2.2 Identification de biomarqueurs potentiels de réponse au sunitinib dans des modèles de cancer médullaire de la thyroïde	84
2.3 Identification de biomarqueurs solubles potentiels de réponse au vandetanib	85
2.3.1 Le vandetanib modifie également l'expression de genes impliqués dans l'invasion cellulaire et le pouvoir métastatique	85
2.3.2 Biomarqueurs potentiels de réponse au vandetanib	89
2.4 La TN-C, un biomarqueur de réponse au sunitinib et au vandetanib dans le cancer médullaire de la thyroïde	92
2.5 Discussion	95
<b>3. Suivi et évaluation de la réponse aux inhibiteurs d'activité kinase chez les patients atteints de CMT</b>	<b>101</b>
3.1 Introduction	101
3.1.1 Suivi et évaluation de la réponse en cancérologie	101
3.1.2 Objectifs du travail	104
3.2 Etude Pharmacocinétique / Pharmacodynamique	104
3.2.1 Mise au point du dosage du vandetanib par LC-MS/MS	105
3.2.2 Suivi des concentrations sériques de vandetanib au cours du temps	106
3.2.3 Corrélation entre les taux sériques de vandetanib et la toxicité	107
3.2.4 Corrélation entre les taux sériques de vandetanib et l'efficacité	108
3.3 Intérêt de nouveaux biomarqueurs sériques	109
3.3.1 Association entre taux sérique des biomarqueurs avant traitement et survie globale	110
3.3.2 Pharmacodynamie des biomarqueurs potentiels après traitement par le vandetanib	111
3.4 Evaluation de la perfusion tumorale par imagerie fonctionnelle	112
3.5 Discussion	114
 <b>CHAPITRE 5 : CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES</b>	 <b>118</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>124</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>132</b>

## ABBREVIATIONS

---

<b>ACE</b> : antigène carcino-embryonnaire	<b>NEM-2A</b> : néoplasie endocrinienne multiple de type 2A
<b>ACTH</b> : adrénocorticotrophine	<b>NEM-2B</b> : néoplasie endocrinienne multiple de type 2B
<b>ACTH</b> : adrénocorticotrophine	<b>PCT</b> : procalcitonine
<b>AGT</b> : angiotensinogène	<b>PDGF</b> : platelet-derived growth factor
<b>APUD</b> : amine precursor uptake decarboxylase	<b>PDGF-R</b> : récepteur au PDGF
<b>ARNm</b> : acides ribonucléiques messagers	<b>PKC</b> : protéine kinase C
<b>ATP</b> : adenosine tri-phosphate	<b>PLAU</b> : urokinase
<b>CALCA</b> : gène codant pour la calcitonine	<b>RECIST</b> : Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
<b>CD44</b> : cluster differentiation 44	<b>RET</b> : REarranged during Transfection
<b>CDK</b> : Cyclin dependent kinase	<b>RTK</b> : récepteur à activité TK
<b>CgA</b> : chromogranine A	<b>RT-PCR</b> : Reverse transcription – Polymerase Chain Reaction
<b>CGH</b> : Hybridation génomique comparative	<b>SPARC</b> : secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
<b>CMT</b> : cancer médullaire de la thyroïde	<b>TGF-<math>\beta</math>2</b> : transforming growth factor, beta 2
<b>CMTF</b> : CMT familial	<b>TK</b> : tyrosine kinase
<b>CRH</b> : corticotropin-releasing hormone	<b>TN-C</b> : tenascin-C
<b>CT</b> : calcitonine	<b>TNNI2</b> : Troponine I de type 2
<b>FGA</b> : Fibrinogène alpha	<b>TNNT3</b> : Troponine T de type 3
<b>FGG</b> : Fibrinogène gamma	<b>TSH</b> : thyroid stimulating hormone
<b>FST</b> : follistatine	<b>TT</b> : Thyroid Tumor
<b>GDNF</b> : Glial cell-derived neurotrophic factor	<b>VEGF</b> : vascular endothelial growth factor
<b>GIST</b> : tumeur gastro-intestinale stromale	<b>VEGF-R</b> : récepteur au VEGF
<b>GST</b> : gène suppresseur de tumeur	<b>VIM</b> : vimentine
<b>HCC</b> : hyperplasie des cellules C	<b>VIP</b> : peptide intestinal vasoactif
<b>IL-8</b> : interleukine-8	<b>VIPR2</b> : vasoactive intestinal peptide receptor 2
<b>ITK</b> : inhibiteur TK	
<b>KO</b> : knock-out	
<b>LMC</b> : leucémie myéloïde chronique	
<b>LOH</b> : Loss of heterozygoty	
<b><math>M_r</math></b> : masse moléculaire relative	

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1 :</b>	Cellules C au sein d'un follicule thyroïdien.	12
<b>Figure 2 :</b>	Représentation schématique de l'épissage alternatif du gène <i>CALCA</i> codant la calcitonine, la katacalcine et le peptide CGRP.	14
<b>Figure 3 :</b>	Corrélation entre concentration sérique de calcitonine et progression de la maladie.	20
<b>Figure 4 :</b>	Structure et activité du récepteur RET.	23
<b>Figure 5 :</b>	Principales voies de signalisation activées par le récepteur RET et principales fonctions cellulaires mises en jeu.	25
<b>Figure 6 :</b>	Résumé des principales mutations germinales dans le proto-oncogène <i>RET</i> , et corrélation au phénotype clinique.	29
<b>Figure 7 :</b>	Cartographie des principales mutations dans le domaine kinase de RET à l'origine des formes de CMT.	30
<b>Figure 8 :</b>	Principaux mécanismes impliqués dans l'oncogenèse.	45
<b>Figure 9 :</b>	Principe du processus de phosphorylation/déphosphorylation dans la transduction du signal.	47
<b>Figure 10 :</b>	Mécanisme d'activation des protéines à activité kinase.	48
<b>Figure 11 :</b>	Principaux éléments cellulaires et moléculaires impliqués dans l'environnement tumoral.	50
<b>Figure 12 :</b>	Mécanisme d'action des inhibiteurs compétitifs de l'ATP.	53
<b>Figure 13 :</b>	Dendrogramme des protéines kinases et exemple de profils d'activité kinase d'inhibiteurs plus ou moins sélectifs.	54
<b>Figure 14 :</b>	Structures chimiques du sunitinib et du vandetanib.	59
<b>Figure 15 :</b>	Structure du complexe vandetanib-domaine kinase de RET.	60
<b>Figure 16 :</b>	Evolution de la compréhension des réseaux de signalisation intracellulaire mis en jeu lors de l'oncogenèse.	67
<b>Figure 17 :</b>	Représentation schématique du principe de la RPPA.	69
<b>Figure 18 :</b>	Profils d'expression des principales protéines de la signalisation en réponse au sunitinib, obtenus par RPPA dans des modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de cancer médullaire de la thyroïde.	72
<b>Figure 19 :</b>	Inhibition de l'activation de RET, AKT et p44/42 dans les cellules TT en fonction de la dose de sunitinib.	73
<b>Figure 20 :</b>	Immunomarquage de phospho-p44/42 dans des tumeurs de cancer médullaire de la thyroïde.	74
<b>Figure 21 :</b>	Profils d'expression de PARP clivé dans les cellules TT en réponse au vandetanib. RRPA : gauche ; western-blot : droite.	76
<b>Figure 22 :</b>	Profils d'expression de PARP clivé dans les cellules TT, en réponse au sunitinib, obtenus par RRPA.	76
<b>Figure 23 :</b>	Origine des biomarqueurs sanguins.	81
<b>Figure 24 :</b>	Représentation schématique de l'utilisation des biomarqueurs à chaque stade de l'évolution de la maladie cancéreuse.	81

<b>Figure 25 :</b>	Principe des puces à ADN.	83
<b>Figure 26 :</b>	Diagrammes de Venn des gènes régulés <i>in vitro</i> par le vandetanib (250 nM) après 1, 3 et 6 jours de traitement.	86
<b>Figure 27 :</b>	Pourcentage d'expression génique du gène codant la vimentine <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	90
<b>Figure 28 :</b>	Pourcentage d'expression génique du gène codant la calcitonine <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	91
<b>Figure 29 :</b>	Concentration de calcitonine, rapportée à la quantité de protéines totales, mesurée dans le surnageant de culture de cellules TT, après traitement par vandetanib.	91
<b>Figure 30 :</b>	Expression protéique de la tenascin-C dans les cellules TT déterminée par immunomarquage sur cytospin.	92
<b>Figure 31 :</b>	Immunomarquage de la tenascin-C dans des xénogreffes de cellules TT et dans des tumeurs de cancer médullaire de la thyroïde.	93
<b>Figure 32 :</b>	Expression protéique de la tenascin-C <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	94
<b>Figure 33 :</b>	Taux sérique de Tenascin-C chez des patients atteints de CMT et des donneurs sains.	94
<b>Figure 34 :</b>	Schéma d'une courbe modélisée décrivant l'évolution de l'intensité du signal en fonction du temps après injection d'un produit de contraste, et définition des indices de perfusion.	103
<b>Figure 35 :</b>	Taux médian de vandetanib au cours du temps dans la série de 28 patients traités par 300 mg/j de vandetanib.	106
<b>Figure 36 :</b>	Concentration maximale de vandetanib dans la série de 28 patients traités par 300 mg/j de vandetanib.	107
<b>Figure 37 :</b>	Taux sérique de vandetanib chez les patients regroupés selon leur réponse tumorale définie par les critères RECIST.	108
<b>Figure 38 :</b>	Survie globale des patients atteints de CMT, en fonction de leur concentration basale d'IL-8 (méthode de Kaplan-Meier).	110
<b>Figure 39 :</b>	Evolution des taux relatifs d'IL-8 et de TGF- $\beta$ 2 dans le temps chez les 28 patients traités par vandetanib.	111
<b>Figure 40 :</b>	Evaluation de la perfusion tumorale par ultrasons dans un modèle de souris xénogreffées et traitées par placebo ou sunitinib (60mg/kg/j).	113

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1 :</b> Cancer médullaire de la thyroïde, données cliniques et génétiques.	<b>31</b>
<b>Tableau 2 :</b> Principaux inhibiteurs d'activité tyrosine kinase évalués dans le traitement du cancer médullaire de la thyroïde.	<b>58</b>
<b>Tableau 3 :</b> Spectre d'activité kinase du sunitinib et du vandetanib.	<b>60</b>
<b>Tableau 4 :</b> Immunomarquage de phospho-p44/42 (P-p44/42) des 34 cas de CMT en fonction du statut mutationnel de RET.	<b>75</b>
<b>Tableau 5 :</b> Nombre de gènes dont l'expression est modifiée par le vandetanib (250 nM) dans les cellules TT.	<b>85</b>
<b>Tableau 6 :</b> Processus biologiques relatifs au contrôle de la prolifération et de la division cellulaire modifiés <i>in vitro</i> par le vandetanib (250 nM).	<b>86</b>
<b>Tableau 7 :</b> Principaux gènes dont l'expression est diminuée, <i>in vitro</i> , en réponse à un traitement par le vandetanib (250 nM).	<b>87</b>
<b>Tableau 8 :</b> Nombre de gènes dont l'expression est modifiée, <i>in vivo</i> , par le vandetanib (50 mg/kg/j).	<b>88</b>
<b>Tableau 9 :</b> Gènes dont l'expression est diminuée, <i>in vivo</i> , par un traitement par le vandetanib (50 mg/kg/j), parmi les principaux gènes identifiés <i>in vitro</i> .	<b>89</b>
<b>Tableau 10 :</b> Expression génique des principaux gènes sous-exprimés, <i>in vitro</i> , en réponse au sunitinib (250 nM) et au vandetanib (250 nM).	<b>90</b>

## RESUME en français

---

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT), qui représente 5 à 8% des cancers de la thyroïde, est issu de la transformation maligne des cellules C du parenchyme thyroïdien. Ce cancer, sporadique dans 70 à 80% des cas et familial pour les 20 à 30% restants, est essentiellement lié à des anomalies du proto-oncogène *RET*, codant un récepteur à activité tyrosine kinase. La fréquence élevée des mutations activatrices de *RET* ont permis d'identifier ce récepteur comme une cible thérapeutique majeure. Si la chirurgie est le traitement de référence pour les formes localisées, les formes localement avancées ou métastatiques, de pronostic plus péjoratif étaient avant le développement des thérapies moléculaires ciblées, dans une impasse thérapeutique. La meilleure compréhension de la biologie des tumeurs a permis le développement de ces thérapies plus rationnelles et plus spécifiques, en particulier des inhibiteurs d'activité tyrosine kinase (ITK). L'optimisation de leur utilisation en clinique nécessite de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été à la fois cognitifs et cliniques, visant à améliorer la compréhension de la réponse moléculaire à deux ITKs, le sunitinib et le vandetanib, dans le CMT, et à identifier de nouveaux biomarqueurs de suivi thérapeutique. Dans un premier temps, nous avons montré les effets antiprolifératifs, antitumoraux et antiangiogéniques du sunitinib et du vandetanib dans un modèle de CMT muté *RET*<sup>C634W</sup>, mettant en évidence des profils d'activité proches entre les deux inhibiteurs. Puis, les principales voies de signalisation mises en jeu lors de la réponse à ces ITKs ont été explorées par Reverse-Phase Protein Array (RPPA). Par une approche transcriptomique haut-débit menée sur des modèles précliniques, les principales fonctions cellulaires impliquées dans la réponse au sunitinib et au vandetanib ont été identifiées. Le rôle de gènes participant à l'invasion tissulaire et au pouvoir métastatique a été mis en évidence. De nouveaux biomarqueurs potentiels de réponse au vandetanib et au sunitinib, tels que l'IL-8 et le TGF-β2 dont les taux sériques sont significativement plus élevés chez les patients atteints de CMT, ont été identifiés. Enfin, l'intérêt de trois approches méthodologiques dans le suivi de la réponse antitumorale chez les patients a été évalué. Ainsi, le développement d'une méthode de dosage du vandetanib par spectrométrie de masse a permis de suggérer un lien entre des taux sériques élevés et l'apparition de toxicités sévères. L'évaluation de biomarqueurs dans le sérum de patients traités par le vandetanib a souligné l'intérêt de l'IL-8 comme marqueur pronostic potentiel dans cette pathologie. Enfin les résultats préliminaires, évaluant la réponse au sunitinib par échographie doppler sur un modèle préclinique de souris xénogreffées, ont confirmé l'intérêt de l'imagerie fonctionnelle dans ce domaine.

## RESUME en anglais

---

Medullary thyroid carcinoma (MTC) accounts for 5-8% of all thyroid cancers and occurs as either a sporadic form or in a familial context (25% of cases). Mutations which activate the *RET* proto-oncogene, encoding a tyrosine kinase receptor, are responsible for familial forms and are also detected in one-third of sporadic tumors. MTC patients with local disease may be cured after initial surgery, but persistent or recurrent disease occurs in half of cases, and distant metastases are the major cause of tumor related death. Up to now there is no effective systemic treatment and new therapeutic strategies are needed for locally advanced or metastatic MTC patients. The constitutive activation of RET is crucial in MTC pathogenesis and led to the development of small compounds targeting its tyrosine kinase activity (TKI). Gaining an understanding of how cancer cells respond to drugs is challenging to improve clinical use of these new therapeutic agents. In this context, we aimed to characterize molecular mechanisms of action of sunitinib and vandetanib, two TKIs currently evaluated in MTC patients. Our results, in *in vitro* as well as *in vivo* MTC models based on the RET<sup>C634W</sup> TT cell line, demonstrate that sunitinib and vandetanib has similar antiproliferative, antitumoral and antiangiogenic properties. Using the Reverse Phase Protein Array (RPPA) large-scale technology, we identified major signalling pathways inhibited after TKIs' treatment. Expression microarrays allowed us to investigate signaling pathways modified after sunitinib and vandetanib treatment and to show that TKIs' treatment induced major changes in the expression of genes involved in tissue invasion and metastasis. We identified encoding secreted proteins as candidate soluble biomarkers of response and, among them, we demonstrated that metastatic MTC patients presented increased serum levels of IL-8 and TGF- $\beta$ 2. Three modalities for determining early responses to targeted agents in MTC patients were evaluated. First, a sensitive mass spectrometry assay was developed for the quantitation of vandetanib, and applied in MTC patients, showing a potential relationship between toxic side-effects and vandetanib serum levels and suggesting that therapeutic drug monitoring may be a useful tool for MTC patients' follow-up. Then, candidate biomarkers were investigated in MTC patients underlying the potential use of IL-8 as prognostic marker. Finally, using doppler imaging in xenografted mice model, we confirmed the utility of imaging techniques in clinical evaluation of TKI's response.

## AVANT-PROPOS

---

La prise en charge personnalisée des patients est l'un des enjeux majeurs en cancérologie. La meilleure compréhension de la biologie des tumeurs et de leur environnement a permis de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, les thérapies dites moléculaires ciblées, dont l'optimisation de l'utilisation en clinique nécessite de mieux comprendre les mécanismes d'action. Dans ce contexte ce travail de thèse a eu pour objectif de caractériser la réponse pharmacologique moléculaire du sunitinib et du vandetanib, deux inhibiteurs d'activité tyrosine kinase, dans un modèle de cancer médullaire de la thyroïde et d'identifier des biomarqueurs de suivi de la réponse thérapeutique à ces médicaments.

Ce travail a été réalisé dans l'équipe du Dr Corine Dupuy, au sein de l'unité de recherche CNRS UMR 8200 dirigée par le Dr Patricia Kannouche. Il a donné lieu à la rédaction de trois articles scientifiques dont un a été publié dans la revue internationale à comité de lecture *Clinical Cancer Research* en avril 2011 et deux sont soumis pour publication :

**Article 1 :** **Changes in signaling pathways induced by vandetanib in a human medullary thyroid carcinoma model as detected by Reverse Phase Protein Arrays.** Sophie Broutin, Frédéric Commo, Leanne De Koning, Bérengère Marty, Ludovic Lacroix, Monique Talbot, Bernard Caillou, Anderson J Ryan, Corinne Dupuy, Martin Schlumberger, Jean-Michel Bidart. *Article soumis à Biochemical Pharmacology.*

**Article 2 :** **Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in Medullary Thyroid Carcinoma in preclinical models.** Broutin S, Ameer N, Lacroix L, Robert T, Petit B, Oumata N, Talbot M, Caillou B, Schlumberger M, Dupuy C, Bidart JM. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 1;17(7):2044-54.

**Article 3 :** **Quantitation of vandetanib in human serum and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Alain Deroussent, Sophie Broutin, Jean-Michel Bidart, Gilles Vassal, Anderson Ryan, Martin Schlumberger, Angelo Paci. *Article soumis à Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis.*



---

## **CHAPITRE 1**

### **LE CANCER MEDULLAIRE DE LA THYROÏDE, UN MODELE D'ETUDE DES THERAPIES MOLECULAIRES CIBLEES**

---

# CHAPITRE 1 : LE CANCER MEDULLAIRE DE LA THYROÏDE, UN MODELE D'ETUDE DES THERAPIES MOLECULAIRES CIBLEES

---

## 1. Généralités sur le cancer médullaire de la thyroïde

### 1.1 Données d'épidémiologie

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est un cancer relativement rare qui représente 5 à 8% des cancers de la thyroïde, (Ball, 2000; Gagel RF., 2002; Schlumberger M., 2003) eux-mêmes ne comptant que pour 1% de l'ensemble des cas de cancer (Richards, 2010). La relative rareté des nouveaux cas de CMT rend difficile l'étude de cette maladie (Roman, et al., 2006) et peu de données épidémiologiques sont disponibles. Globalement, les taux d'incidence du CMT n'ont pas changé de façon significative depuis la fin des années 70 et restent très faibles, notamment autour de 0.3/100 000 en France (Davies and Welch, 2006; Netea-Maier, et al., 2008). L'incidence du CMT en pathologie nodulaire thyroïdienne se situe quant à elle entre 1 et 2% (Niccoli-Sire and Conte-Devolx, 2007). Il est important de souligner que, s'il est peu fréquent, le CMT est toutefois responsable de 15% des décès dus à un cancer de la thyroïde (Roman, et al., 2006; Vriens, et al., 2009).

### 1.2 Physiopathologie

#### 1.2.1 Physiologie des cellules C

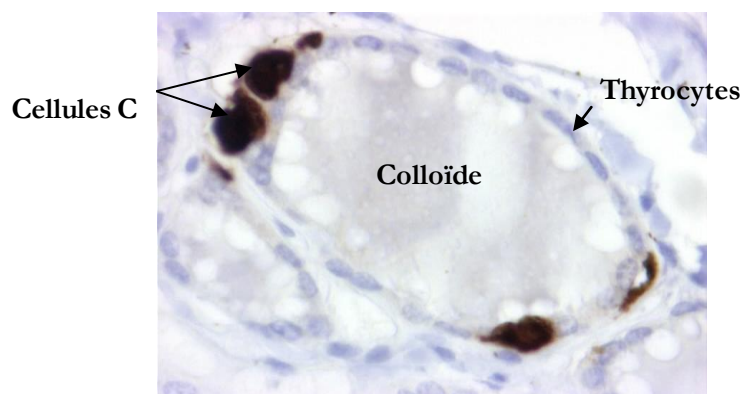
##### 1.2.1.1 Histologie et ontologie de la thyroïde

- Histologie

La thyroïde est une glande endocrine constituée de deux types cellulaires, les cellules vésiculaires, majoritaires au sein du parenchyme thyroïdien (>99.9%) et les cellules C. Les cellules vésiculaires, encore appelées cellules folliculaires (*follicular cells* en anglais) ou thyrocytes sont organisées en follicules thyroïdiens, unité structurale et fonctionnelle de la thyroïde, formés d'une monocouche de cellules délimitant une cavité centrale contenant la colloïde. Les thyrocytes assurent la

production des hormones thyroïdiennes impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions touchant le métabolisme, la croissance et le développement (Leclère J., 2001).

Des cellules non folliculaires ont également été distinguées au sein du parenchyme thyroïdien. Ces cellules, identifiées pour la première fois par Barber en 1876 chez le chien (Barber, 1876), ont par la suite été décrites chez d'autres mammifères et dénommées par différents termes, notamment cellules parafolliculaires (Nonidez, 1932), cellules interfolliculaires (Bailiff, 1937), ou plus récemment cellules C (Pearse, 1966) en lien avec leur fonction de sécrétion de la calcitonine (Hazard, 1977) (Fig. 1). L'identification des cellules C chez l'homme a été particulièrement difficile du fait de leur rareté au sein du parenchyme thyroïdien. Leur mise en évidence par des méthodes de coloration classique n'est pas évidente et il a fallu le développement des techniques d'immunomarquage, notamment de la calcitonine, pour précisément les identifier (Hazard, 1977).



**Figure 1 :** Cellules C au sein d'un follicule thyroïdien, identifiées par l'immunomarquage de la calcitonine. Cas d'une hyperplasie des cellules C. Photographie du Dr Bernard Caillou.

Les cellules C ne représentent que 0.1% du parenchyme thyroïdien et sont retrouvées principalement de façon isolée ou par groupe de trois. Elles sont localisées dans le follicule thyroïdien entre la membrane basale et les thyrocytes, principalement au niveau du tiers-moyen et du tiers-supérieur de chaque lobe thyroïdien (Hazard, 1977; Schlumberger M., 2003). De forme polygonale, leur diamètre peut atteindre jusqu'à 40 $\mu$ m (Hazard, 1977). Il est important de noter que leur rareté et leur dissémination au sein de la thyroïde rend très difficile leur isolement et leur mise en culture primaire.

- Ontologie

Contrairement aux thyrocytes qui ont une origine endodermique, il est admis que les cellules C ont une origine neuro-ectodermique. Elles migrent ainsi durant la vie embryonnaire depuis la crête neurale jusqu'à la thyroïde chez l'homme, le long du corps ultimobranchial (Pearse and Carvalheira, 1967). Cette origine embryologique a été proposée par Pearse dès 1966 (Pearse, 1966), qui soulignait par ailleurs une origine commune des cellules C avec d'autres cellules neuroectodermiques<sup>1</sup> regroupées sous le nom de système APUD (*Amine Precursor Uptake Decarboxylase*) (Pearse, 1969). Ces cellules, participant au système endocrinien diffus, partagent ainsi des caractéristiques cytochimiques, physiologiques, et ultrastructurelles. Ces cellules endocriniennes sont en particulier capables de sécréter des hormones de faible masse moléculaire, sous forme d'amines biogènes après captation, stockage et décarboxylation des amines et de leurs précurseurs (Pearse, 1969).

### 1.2.1.2 Principaux marqueurs sécrétés par les cellules C

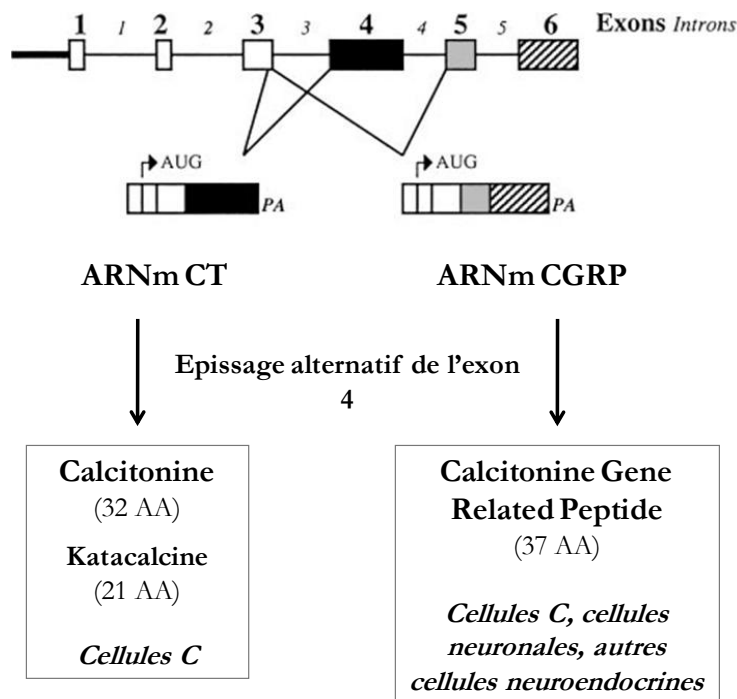
Comme toute cellule du système APUD, les cellules C sont donc caractérisées par la sécrétion d'hormones et d'amines biogènes. Parmi ces différents polypeptides, ne seront détaillés dans ce paragraphe que la calcitonine, principal marqueur des cellules C, la katakalcine, et le CGRP (DeGroot L.J., 1989).

- La calcitonine

La calcitonine (CT) est une hormone peptidique monocaténaire comportant 32 acides aminés (*Mr* 34 kDa), synthétisée à partir d'un précurseur après clivage et amidation, et dont l'existence a été évoquée pour la première fois en 1961 par Copp (Copp and Cameron, 1961). L'origine thyroïdienne de la CT a été démontrée par les travaux de Foster (Foster, et al., 1964) et de Hirsch (Hirsch, et al., 1964). Le lien direct entre CT et cellule C a été établi par Pearse en 1966 (Pearse, 1966). Le gène  $\alpha$  de la CT (*CALCA* ou *Calc 1*), situé sur le bras court du chromosome 11, est constitué par 6 exons et 5 introns. *CALCA* code un transcript primaire dont l'épissage alternatif tissu-dépendant aboutit à la formation de deux précurseurs : le précurseur de la CT (la préprocalcitonine) exprimé en abondance et préférentiellement dans les cellules C et le précurseur du CGRP 1 (*Calcitonin Gene Related Peptide 1*), exprimé dans la thyroïde, le tissu nerveux central et périphérique et d'autres cellules neuroendocrines (Fig. 2) (Amara, et al., 1982; DeGroot L.J.,

<sup>1</sup> Cellules neuroectodermiques : cellules pancréatiques, cellules antéhypophysaires mélanocorticotropes, cellules argentaffines, entérochromaffines et argyrophiles du tube digestif, cellules de la médullosurrénale.

1989; Jonas, et al., 1985; Rosenfeld, et al., 1984; Rosenfeld, et al., 1983). Les facteurs qui contrôlent ce processus d'expression tissu spécifique sont encore mal connus. Le précurseur de la CT, la préprocalcitonine, donne naissance après maturation post-traductionnelle à la procalcitonine, qui elle-même conduit à la production de 3 peptides : un peptide N-terminal (aminopro-CT), la calcitonine mature (CT) et la katacalcine (ou PDN-21) à l'extrémité C-terminale (DeGroot L.J., 1989).



**Figure 2** : Représentation schématique de l'épissage alternatif du gène *CALCA* codant la calcitonine, la katacalcine et le peptide CGRP (Messina, et al., 2003). AA, acide aminé.

Il existe un deuxième gène de la calcitonine, le gène  $\beta$  (*CALCB* ou *Calc 2*), situé sur le bras long du chromosome 11 et de structure proche du gène  $\alpha$  (90% d'homologie). Exprimé dans divers tissus humains normaux, il conduit uniquement à la synthèse de CGRP 2 (Leclère J., 2001).

Le premier rôle physiologique et le mieux connu à ce jour de la CT est l'inhibition de la résorption osseuse par les ostéoclastes (Chambers and Magnus, 1982). La CT agit également sur l'augmentation de la production de vitamine D3 au niveau du tube proximal des reins. Sa sécrétion est directement proportionnelle à la calcémie et est induite en réponse à des taux élevés de calcium. L'action biologique majeure de la CT serait la protection du squelette pendant les

périodes de stress calcique telles que la croissance, la grossesse et la lactation (DeGroot L.J., 1989). En thérapeutique, la CT est utilisée dans le traitement des troubles osseux caractérisés par une résorption osseuse augmentée dont la maladie de Paget, l'ostéoporose et l'hypercalcémie secondaire (Findlay and Sexton, 2004).

La CT est détectée et mesurée à l'aide de différentes techniques. Dans un premier temps, la détection de la calcitonine a été réalisée par immunofluorescence et immunohistochimie sur coupes tissulaires (Hargis, et al., 1966). Son marquage est intracellulaire, granulaire, d'intensité et de répartition variable. Ces techniques sont particulièrement importantes pour identifier de façon formelle les cellules C au sein du parenchyme thyroïdien. Depuis 1988, la mesure des taux sériques de la CT mature est réalisée par une technique immunométrique, sensible et spécifique, à l'aide de deux anticorps monoclonaux spécifiques de la forme mature de la CT (Motte, et al., 1988). Les concentrations basales de calcitonine sérique ainsi mesurées sont inférieures à 10 pg/ml dans la population normale. Ces taux sont par ailleurs inférieurs chez les femmes, sauf pendant la grossesse et la lactation, et diminuent avec l'âge (Guliana JM. , 1992). Une faible corrélation a également été montrée avec l'indice de masse corporelle et le tabagisme. Des taux élevés de calcitonine sont mesurés chez les sujets présentant une pathologie des cellules C ou dans d'autres contextes pathologiques comme nous le détaillerons par la suite (Costante, et al., 2009).

- La katalcalcine et le CGRP

La katalcalcine est le peptide C-terminal du précurseur de la calcitonine. Elle est co-sécrétée dans les mêmes proportions que la CT à partir des mêmes granules. Ses effets chez l'homme ne sont pas clairement définis mais elle participerait également à la diminution des taux circulants de calcium. Le CGRP est un vasodilatateur puissant qui modulerait la pression sanguine localement. Par ailleurs il jouerait un rôle de neuromodulateur au niveau du système nerveux central (DeGroot L.J., 1989).

## 1.2.2 Pathologies tumorales des cellules C

### 1.2.2.1 De l'hyperplasie au CMT métastatique

Schématiquement, les cellules C sont à l'origine de deux types de tumeur : les hyperplasies, considérées comme des tumeurs bénignes, et le cancer médullaire de la thyroïde (CMT), tumeur maligne.

- Hyperplasie des cellules C

L'hyperplasie est une augmentation anormale du nombre de cellules qui conservent leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Dans le cas particulier des cellules C, les critères définissant l'hyperplasie ont évolué depuis les années 70, (Albores-Saavedra and Krueger, 2001; Guyetant, et al., 2003; LiVolsi, et al., 1973). Le nombre de cellules C au sein du parenchyme thyroïdien étant très faible, il est difficile d'associer une limite quantitative stricte à la notion d'hyperplasie, et ceci d'autant plus que le nombre physiologique des cellules C varie au cours de l'âge et en fonction du sexe. Ainsi les cellules C sont plus nombreuses chez les nouveau-nés et les enfants que chez les adultes, et chez les hommes adultes comparativement aux femmes. Enfin, le nombre de cellules C réaugmente chez les sujets âgés (Albores-Saavedra and Krueger, 2001). Dans la population générale la prévalence de l'hyperplasie des cellules C (HCC) est comprise entre 20 et 30%. On distingue plusieurs types d'hyperplasie selon qu'elle se développe dans un contexte soit physiologique ou réactif, comme l'hyperstimulation chronique par la TSH ou l'hypercalcémie, soit pathologique non tumoral (thyroïdite auto-immune) ou tumoral (tumeur folliculaire) (Albores-Saavedra and Krueger, 2001). Enfin on peut souligner que, quelque que soit le contexte, en cas d'hyperplasie le nombre de cellules C reste minoritaire comparativement aux thyrocytes.

- Cancer Médullaire de la Thyroïde

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT) est une tumeur maligne de la thyroïde qui se développe à partir des cellules C. En 1959, le CMT a été clairement isolé des autres cancers thyroïdiens, notamment des cancers anaplasiques, sur la présence d'une substance amyloïde au sein de son stroma (Hazard, et al., 1959). L'implication spécifique des cellules C, et non des thyrocytes, a été suggéré par la suite par Williams (Williams, 1966) puis confirmée par de nombreux travaux (Melvin and Tashjian, 1968; Meyer, 1968; Meyer and Abdel-Bari, 1968).

Le cancer médullaire de la thyroïde est d'apparition sporadique dans 70 à 80% des cas et se développe dans un contexte familial pour les 20 à 30% restants (Ball, 2000; Gagel RF., 2002; Leboulleux, et al., 2004; Schlumberger M., 2003). Dans ce cas, la transmission est autosomique et dominante avec une pénétrance élevée et une expressivité clinique variable. Il est important de souligner que ce pourcentage de formes héréditaires est particulièrement élevé, notamment en regard des autres types de cancer. Le lien entre hyperplasie des cellules C (HCC) et cancer médullaire de la thyroïde (CMT) n'est pas clair. Ainsi si l'HCC est retrouvée dans les formes sporadiques de CMT dans les mêmes proportions que dans la population générale, elle précède virtuellement tous les cas de CMT héréditaire. L'HCC, rarement retrouvée de façon concomitante avec un CMT, est donc la première anomalie des cellules C observée et peut être considérée comme un stade pré-néoplasique des formes héréditaires (Leboulleux, et al., 2004; Wolfe, et al., 1973).

Différents stades de CMT sont décrits et reflètent l'évolution naturelle de la maladie. On distingue ainsi les microcancers (tumeur < 1cm), les formes localisées, les formes localement avancées avec envahissement ganglionnaire, les formes métastatiques avec envahissement d'autres organes, et les formes récurrentes qui signent une rechute (Sobin L.H., 2009). Le CMT est un carcinome qui métastase de façon fréquente au niveau loco-régional et à distance de la thyroïde. Les métastases au niveau des ganglions cervicaux lymphatiques surviennent dans 20 à 30% des cas de CMT de moins d'1 cm de diamètre, chez 50% des patients avec un CMT de diamètre entre 1 et 4 cm et dans plus de 90% des cas de tumeur > à 4 cm (Leclère J., 2001). Les métastases à distances siègent préférentiellement au niveau du foie, des poumons, des os et du cerveau et sont retrouvées lors du diagnostic chez 7 à 23% des patients (Ball, 2000; Barbet, et al., 2005; Gagel RF., 2002; Schlumberger, et al., 2008). On peut d'ores et déjà noter que la prise en charge thérapeutique et les espérances de vie varient en fonction de chaque stade de la maladie, avec des pronostics particulièrement péjoratifs pour les formes métastatiques (de Groot, et al., 2006). En effet, la survie des patients est fortement diminuée en cas de maladie métastatique. Ainsi, les taux de survie après la découverte de métastases à distance sont de 51% à 1 an, 26% à 5 ans et seulement 10% à 10 ans. Comparativement, le taux de survie à 10 ans pour les formes localisées de CMT est de l'ordre de 65% (Leclère J., 2001).



### 1.2.2.2 Les formes cliniques de CMT

Au niveau clinique, différentes expressions de la maladie sont distinguées en lien avec l'origine sporadique ou héréditaire du CMT.

- Formes sporadiques de CMT

Le CMT d'origine sporadique peut survenir à tout âge avec un pic d'incidence entre 40 et 60 ans. Les patients présentent habituellement un nodule palpable. Des métastases loco-régionales sont retrouvées dans 50% des cas et les métastases à distance sont présentes pour 10 à 20% des patients au diagnostic (Pacini, et al., 2010). Le CMT sporadique est généralement unifocal et l'hyperplasie des cellules C peut être présente au même titre que dans la population générale (Hedinger C., 1988; Leboulleux, et al., 2004; Rosai J., 1992). Enfin, aucune autre pathologie ne lui est associée de façon systématique.

- Formes familiales de CMT (NEM2A, NEM2B et CMTF)

Dans le cadre des CMT familiaux, trois formes cliniques sont distinguées : les syndromes de Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 2A (NEM-2A) et 2B (NEM-2B), et le CMT isolé familial (CMTF). Les CMT héréditaires, qui dérivent d'une hyperplasie des cellules C, se présentent le plus souvent sous la forme de tumeurs multicentriques et bilatérales (Leboulleux, et al., 2004). La NEM-2A est la forme la plus fréquente (60% des cas de CMT héréditaire), associant un CMT d'apparition précoce (autour de 20-30 ans), un phéochromocytome (10 à 50% des cas, généralement après 10 ans) et une hyperparathyroïdie (10 à 25% des cas, généralement autour de 30 ans) (Leboulleux, et al., 2002). Chez ces patients, la prévalence du CMT est spécifique de l'âge en lien avec la sensibilité de la méthode de détection. Ainsi, si cette forme clinique de CMT est rarement observée chez les enfants de moins de 10 ans, la pénétrance atteint près de 25% à 13 ans, et environ 70% à 70 ans (Gagel, et al., 1982; Pacini, et al., 2010). Il est important de souligner que la probabilité qu'un enfant porteur de l'anomalie génique développe un jour un CMT est de plus de 90%. Le dépistage génétique chez les enfants de moins de 5 ans a permis de réduire ce risque de 50% chez les descendants au premier degré (Kloos, et al., 2009).

Le syndrome NEM-2B est plus rare (5% des cas de CMT héréditaire) et se traduit au niveau clinique par un CMT d'apparition très précoce (<10 ans), un phéochromocytome, une ganglioneuromatose et des dysmorphies des muscles et du squelette (syndrome marfanoïde). La NEM-2B est la forme de CMT héréditaire la plus agressive et de très mauvais pronostic (Pacini, et al., 2010). Enfin la forme CMTF (35% des cas de CMT héréditaire) est caractérisée par un

CMT pur, sans pathologie endocrinienne associée et survient en général plus tardivement autour de 40 à 60 ans.

### 1.2.2.3 Marqueurs tumoraux sériques du CMT

Un marqueur tumoral est défini comme une anomalie quantitative ou qualitative, indicative ou caractéristique d'un cancer ou de certaines de ses propriétés. L'intérêt de ces indicateurs est multiple, tant au niveau du dépistage, du diagnostic, du pronostic, du choix du traitement et du suivi thérapeutique. L'importance et la place de ces marqueurs feront l'objet de la deuxième partie du chapitre 4 de ce travail.

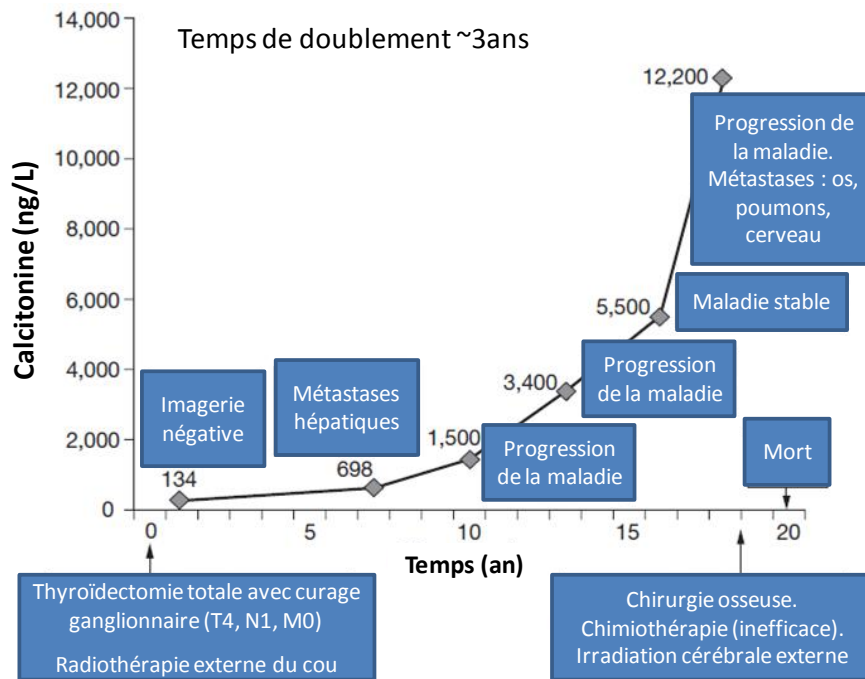
Le cancer médullaire de la thyroïde peut être aussi caractérisé par l'expression d'autres types de marqueurs biologiques de nature diverse (génétique, protéique,...). Ne seront présentés dans ce paragraphe que les marqueurs protéiques circulants, utilisés ou évalués dans le diagnostic et le suivi de la maladie.

- Calcitonine

La calcitonine (CT), sécrétée de façon physiologique par les cellules C parafolliculaires (*cf.* §. 1.2.1.2), est également produite dans un contexte de pathologie des cellules C, en particulier en cas de CMT (Tubiana, *et al.*, 1968; Williams, 1966). Des taux élevés de calcitonine sont observés chez les patients dès le début de la maladie, avec des concentrations sériques les plus élevées pour les masses tumorales les plus importantes. Même s'il existe des exceptions et que les taux de CT et la masse tumorale ne sont pas toujours corrélés, la CT est aujourd'hui le marqueur de référence dans le CMT, servant à la fois au dépistage, au diagnostic, au pronostic et au suivi de la maladie (Costante, *et al.*, 2009; Leboulleux, *et al.*, 2004).

En effet, la détection de la CT par technique immunohistochimique sur coupes tissulaires est particulièrement importante pour identifier de façon formelle les cellules C et poser le diagnostic de CMT. Le suivi des taux sériques circulants de CT par technique immunométrique, avec ou sans stimulation par la pentagastrine, est essentiel dans la prise en charge des patients (Costante, *et al.*, 2009). En termes de dépistage, l'intérêt de ce dosage a été démontré pour les formes héréditaires de CMT. En cas de CMT sporadique, si le dosage du taux de calcitonine chez les patients présentant des nodules thyroïdiens a permis d'améliorer de façon incontestable la détection de petites tumeurs, son impact en termes de gain de survie n'a pas été clairement établi et à ce jour aucune recommandation n'a été émise quant à son intérêt en routine. A l'opposé, la valeur pronostique du taux de calcitonine pré et postopératoires chez les patients dont le

diagnostic de CMT a été posé est majeure, et permet en particulier de détecter une maladie résiduelle et/ou métastatique. Le suivi au long cours des patients est quant à lui guidé par la mesure du temps de doublement de la calcitonine dont la valeur est directement corrélée à la survie des patients (Barbet, et al., 2005; Costante, et al., 2009; Laure Giraudet, et al., 2008) (Fig. 3).



**Figure 3** : Corrélation entre concentration sérique de calcitonine et progression de la maladie (Costante, et al., 2009). La survie des patients atteints de CMT est fortement corrélée au temps de doublement des taux de calcitonine sérique.

Le suivi du taux sérique de calcitonine présente toutefois quelques limites. En effet, s'il n'existe que peu de données concernant la demi-vie de la CT, celles publiées par Fugazzola montrent que la demi-vie de la CT est diphasique et dépendante de sa concentration (entre ~15 et ~40 min à des concentrations physiologiques ; entre ~3 et ~30 h à des concentrations élevées) (Algeciras-Schimmich, et al., 2009; Fugazzola, et al., 1994). Par ailleurs, il est important de souligner que les taux circulants de CT peuvent être également augmentés en cas de pathologies tumorales autres que le CMT, en particulier en cas de tumeurs carcinoïdes, tumeurs neuroendocrines digestives et pancréatiques, ou bien encore de cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (Baudin, et al., 1999; Leboulleux, et al., 1999). Une sécrétion excessive de calcitonine peut également s'observer

dans les cancers du sein et de la prostate, et dans les myélomes (Becker, et al., 2004; Hillyard, et al., 1976). De plus, une augmentation de CT, généralement modérée, peut survenir en dehors d'un contexte carcinologique, en particulier en cas de prise aiguë d'alcool ou contraceptifs oraux, de grossesse, de traitement par l'oméprazole (Hadjadj, et al., 1997), de thyroïdites chroniques (Barbot, et al., 1994; Niccoli, et al., 1995), et de pathologies bénignes (insuffisance rénale chronique et hémodialysés (Lissak, et al., 1998; Niccoli, et al., 1995), hyperparathyroïdie, maladie osseuse de Paget, pathologies hépatiques (Ponder BAJ., 1995)). Enfin, des formes circulantes de haute masse moléculaire sont également retrouvées avec des taux élevés dans certaines situations pathologiques telles que la pancréatite aiguë, les infections, les processus inflammatoires et les brûlures (Findlay and Sexton, 2004).

Le principal marqueur biologique de diagnostic et de suivi du CMT, la CT, présente donc tout de même quelques limites en termes de sensibilité, de spécificité, et de cinétique, justifiant la recherche de nouveaux biomarqueurs.

- Antigène Carcino-Embryonnaire

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE), produit et sécrété par les cellules C tumorales, est aussi un marqueur protéique majeur dans le CMT. Cette glycoprotéine (*Mr* 180-200 kDa) est également très souvent exprimée dans de nombreux cancers d'histologie variée (poumon, sein, ovaire, digestif...) (Malamitsi, et al., 2002). Comme la CT, l'ACE peut également être détecté par immunohistochimie sur coupe tissulaire. L'ACE est par ailleurs dosé par méthode immunoenzymatique et sa valeur est considérée comme pathologique quand supérieure à 5 ng/mL (Fletcher, 1986). L'évaluation des concentrations sériques d'ACE est utilisée durant le suivi des patients en parallèle à la mesure du taux sérique de calcitonine, des taux élevés ou des augmentations rapides (temps de doublement court) signant la progression de la maladie (Mendelsohn, et al., 1984; Wells, et al., 1978).

- Procalcitonine, katacalcine et CGRP

La procalcitonine (PCT), la katacalcine et le CGRP, sécrétés également de façon physiologique par les cellules C, ont été évalués dans le CMT comme marqueur biologique tumoral.

La PCT, précurseur de la CT, présente deux avantages par rapport à cette dernière. Sa demi-vie est indépendante de sa concentration et clairement définie *in vivo* entre 20h et 24h, et sa stabilité *in vitro* dans le sérum ou le plasma est excellente (Algeciras-Schimnich, et al., 2009). Cependant, à ce jour, malgré quelques travaux qui tendent à montrer un intérêt potentiel de la PCT ou du ratio

PCT/CT, sa place dans le diagnostic et le suivi du CMT n'a pas été clairement démontré (Algeciras-Schimmich, et al., 2009; Walter, et al., 2010). Le CGRP et la katacalcine sont également produits en cas de CMT (Steenbergh, et al., 1984) mais le suivi de leur concentration n'a jamais montré d'intérêt chez les patients atteints d'une maladie des cellules C (Ball, 2000; Leboulleux, et al., 2004).

- Autres marqueurs

Le CMT sécrète également d'autres peptides, présents ou non de façon physiologique, tels que la chromogranine A (CgA), l'adrénocorticotrophine (ACTH), la somatostatine, la pro-opiomélanocortine, la corticotropin-releasing hormone (CRH), le peptide intestinal vasoactif (VIP), la neurotensine, des prostaglandines, des kinines, et la sérotonine. Ces peptides sont notamment impliqués dans les effets secondaires associés au CMT, dont la diarrhée et le syndrome de Cushing. A ce jour, aucun de ces marqueurs ne s'est avéré comparable à la CT en termes de sensibilité et ils ne sont que peu utilisés en clinique (Leboulleux, et al., 2004).

En pratique médicale, la calcitonine reste le marqueur de choix pour la prise en charge des patients atteints de cancer médullaire de la thyroïde.

### 1.3 Oncogénèse et voies de signalisation

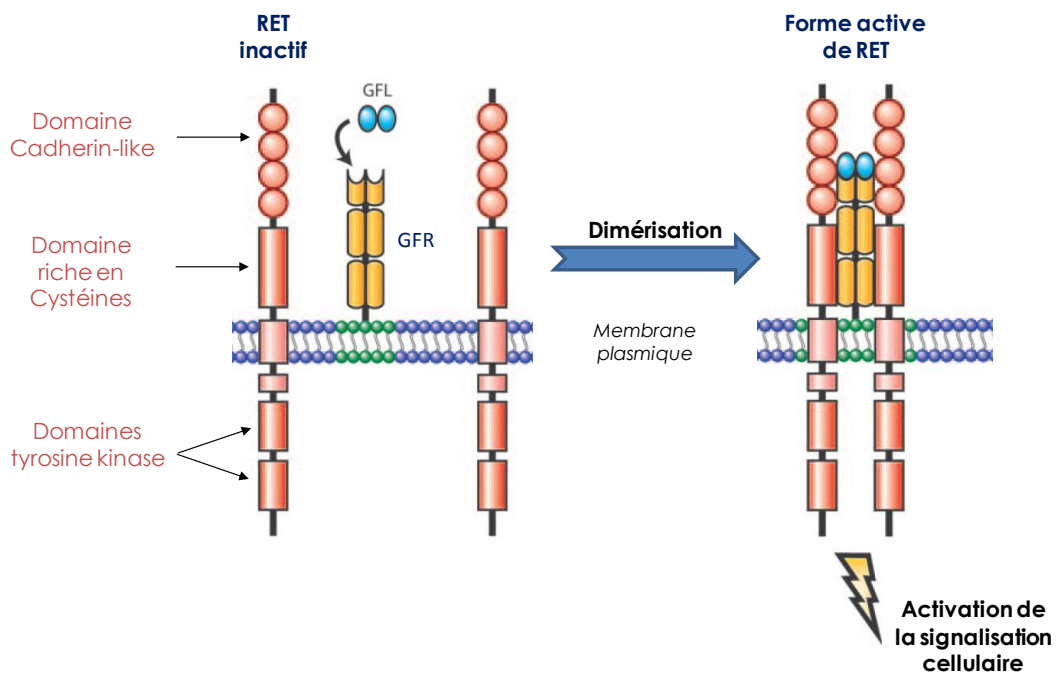
De façon schématique, le développement tumoral est lié à l'accumulation d'anomalies du génome conduisant à une prolifération cellulaire anarchique (Hanahan and Weinberg, 2011). Dans le cas du CMT, différentes anomalies ont été identifiées, dont la principale correspond à des mutations activatrices du proto-oncogène *RET*.

#### 1.3.1 Le proto-oncogène *RET*

- Du gène au récepteur

Le proto-oncogène *RET* (REarranged during Transfection) a été identifié pour la première fois en 1985 par Takahashi (Takahashi, et al., 1985) (Fig. 4). Ce gène, localisé sur le bras court du chromosome 10 (*10q11.2*) et constitué de 21 exons, code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. L'épissage alternatif de la région 3' est à l'origine de trois isoformes qui comportent respectivement 9 (*RET9*), 43 (*RET43*) et 51 (*RET51*) acides aminés dans la partie C-

terminale. Les protéines RET9 et RET51 sont les principales isoformes retrouvées *in vivo* (Takahashi, 2001).



**Figure 4 : Structure et activité du récepteur à activité tyrosine kinase, RET** (de Groot, et al., 2006).  
*GFL : ligand de la famille du GDNF. GFR : récepteur des ligands de la famille du GDNF. GDNF : Glial cell-derived neurotrophic factor.*

Le récepteur RET est une glycoprotéine transmembranaire dont la forme mature présente une *Mr* de 170 kDa. Il est formé dans la région extracellulaire d'un domaine « cadherin-like » et d'un domaine riche en cystéines jouxtant la membrane plasmique. La partie « cadherin-like » est constituée de quatre domaines d'adhésion cellulaire, dépendants du calcium, qui induisent et stabilisent les changements de conformation nécessaires aux interactions avec les ligands et les co-récepteurs. Le domaine riche en cystéines assure quant à lui la formation de dimères de RET, nécessaires à son activation. Dans la région intracellulaire, deux domaines d'activité tyrosine kinase (TK1 et TK2) ont été identifiés. Ils sont impliqués dans l'activation des cascades de signalisation intracellulaire (de Groot, et al., 2006; Drosten and Putzer, 2006; Takahashi, 2001). De façon physiologique, RET est principalement exprimé dans les cellules « précurseurs » de la crête neurale et du tractus urogénital. Il est essentiel au développement précoce des systèmes nerveux sympathiques, parasympathiques et entériques et est impliqué dans la formation des reins et la spermatogenèse (de Groot, et al., 2006; Drosten and Putzer, 2006).

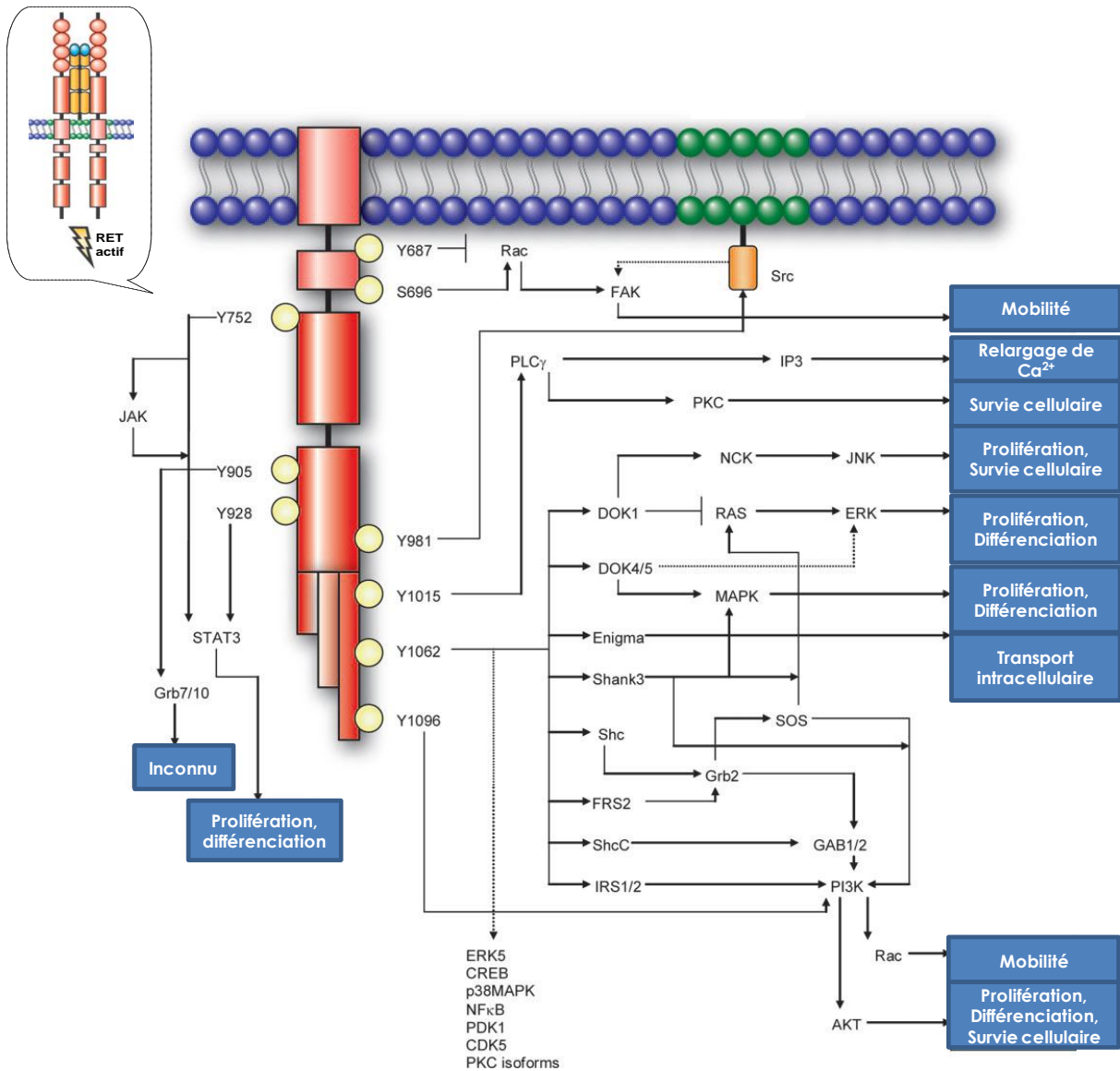
- Les voies de signalisation médiées par le récepteur RET

Un certain nombre de fonctions cellulaires sont stimulées suite à l'activation du récepteur RET et de ses voies de signalisation situées en aval. Physiologiquement, RET agit *via* son association à un des corécepteurs de la famille des récepteurs aux facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales, après fixation d'un des ligands de la famille du GDNF<sup>2</sup> (GDNF, neurturin, artemin ou persephin). La dimérisation du complexe {RET-corécepteur-ligand} assure le rapprochement intra-cytoplasmique des domaines kinase des deux récepteurs RET permettant l'autophosphorylation de différents résidus Tyrosine (Y). Ces domaines ainsi activés sont alors capables, à leur tour, de phosphoryler et donc d'activer des protéines adaptatrices, point de départ de l'activation en cascade des voies de signalisation intracellulaire (**Fig. 4**).

Différents travaux ont permis d'identifier au moins 18 sites de phosphorylation dans les domaines kinase de RET, et de relier certains de ces résidus à des voies de signalisation préférentielles ([de Groot, et al., 2006](#)) (**Fig. 5**). En particulier, la phosphorylation des tyrosines Y752 et Y928 active la voie STAT3 ; celle de Y981 active Src, impliquée dans la survie neuronale ; et celle de Y1015 initie la voie de la PKC *via* le recrutement de la phospholipase C- $\gamma$ . La tyrosine Y1062 est cruciale dans l'activation de voies majeures de signalisation *via* le recrutement de diverses protéines adaptatrices (ShcC, FRS2, DOK, Enigma...). Sont en particulier activées les voies PI3K/AKT, impliquées dans la prolifération, la différenciation, la survie et la mobilité cellulaire, et RAS/ERK et MAPK, impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Y1062 intervient également dans l'activation d'autres voies telles que p38MAPK et NF $\kappa$ B ([Pacifico and Leonardi, 2010](#)).

---

<sup>2</sup> En anglais, Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF).



**Figure 5** : Principales voies de signalisation activées par le récepteur RET et principales fonctions cellulaire mises en jeu. Y : résidu tyrosine, site de liaison aux différents éléments de la signalisation (de Groot, et al., 2006).

- RET et CMT

Des anomalies génétiques localisées au niveau du proto-oncogène RET, comme des réarrangement géniques, ou des mutations ponctuelles somatiques et germinales, sont associées au développement de différentes pathologies qu'elles soient tumorales (neuroblastome, carcinome papillaire de la thyroïde, cancer médullaire de la thyroïde, cancer thyroïdien à cellule de Hürthle, tumeurs neuroendocrines) (Grieco, et al., 1990; Ikeda, et al., 1990; Santoro, et al., 1990; Takahashi, et al., 1991) ou non tumorales (maladie de Hirschsprung) (Romeo, et al., 1994). Dans ce paragraphe seront présentés les liens entre le proto-oncogène RET et le cancer médullaire de la thyroïde (CMT).



▪ **Implications de *RET* dans le développement du CMT**

Le proto-oncogène *RET* est jusqu'à présent le seul oncogène clairement impliqué dans le développement tumoral du CMT, principalement *via* des mutations activatrices mais également *via* des amplifications géniques.

En 1987, l'anomalie génétique à l'origine du syndrome NEM-2A a été localisée sur le chromosome 10 (Mathew, et al., 1987a). Des mutations germinales du proto-oncogène *RET* ont par la suite été identifiées et incriminées dès 1993 dans les différentes formes cliniques de CMT héréditaire, NEM-2A, NEM-2B et CMTF (Carlson, et al., 1994; Donis-Keller, et al., 1993; Eng, et al., 1994; Hofstra, et al., 1994; Mulligan, et al., 1993).

Ces mutations, principalement localisées dans les exons codant la partie extracellulaire riche en cystéines et les domaines intracellulaires portant l'activité kinase, sont responsables de l'activation constitutive et non régulée du récepteur *RET* et de ses voies de signalisation. Les mutations de la région riche en cystéines conduisent à l'activation de *RET* par formation d'homodimères *via* des ponts disulfures (Asai, et al., 1995; Santoro, et al., 1995). Les mutations siégeant dans les domaines d'activité kinase sont quant à elles à l'origine d'une forme monomérique de *RET* constitutivement active, en lien avec une probable modification de la spécificité du substrat (Borrello, et al., 1995; Iwashita, et al., 1996; Santoro, et al., 1995).

L'implication de ces mutations dans l'activation constitutive du récepteur *RET* et leur rôle dans le développement du CMT ont été démontrés dans de nombreux travaux (Asai, et al., 1995; Borrello, et al., 1995; Ito, et al., 1997; Iwashita, et al., 1996; Iwashita, et al., 1999; Iwashita, et al., 2000; Pasini, et al., 1997; Rossel, et al., 1997; Santoro, et al., 1995). En particulier, le pouvoir transformant des différentes mutations de *RET*, affectant les domaines intra et extracellulaires du récepteur, a été mis en évidence sur des cellules NIH3T3 (Drosten, et al., 2004; Rossel, et al., 1997; Santoro, et al., 1995), et le développement d'hyperplasies des cellules C et de CMT a été observé sur des modèles de souris transgéniques exprimant différents variants de *RET* (Kawai, et al., 2000; Michiels, et al., 1997; Schlumberger M., 2003).

Ces mutations activatrices sont retrouvées dans presque 100% des cas de CMT héréditaires mais également dans 30 à 50% des formes sporadiques ce qui est considérable, notamment en comparaison aux autres étiologies de cancer (Eng, et al., 1994; Hofstra, et al., 1994; Schlumberger, et al., 2008).

Il est intéressant de noter que d'autres anomalies génétiques liées à *RET* ont également été impliquées dans le CMT. En particulier, la trisomie du chromosome 10, siège du proto-oncogène

*RET*, avec l'amplification de l'allèle *RET* muté ou la perte de l'allèle *RET* sauvage ont été décrits comme un autre mécanisme mis en jeu dans les tumeurs de patients NEM-2 (Huang, et al., 2000; Koch, et al., 2001).

Enfin, un autre mode d'activation du récepteur *RET* dans l'oncogenèse serait lié à un fonctionnement de type récepteur à dépendance. Il s'agit de récepteurs qui, en absence de ligand, induisent un signal actif de mort cellulaire. Un état de dépendance de la cellule vis-à-vis de son ligand est ainsi généré, la perte de relation entre le récepteur et son ligand conduisant au suicide de la cellule. Melhen et al. ont montré qu'en l'absence de ligand, mais toujours en présence de corécepteur, *RET* induit la mort cellulaire. Ce mécanisme pourrait permettre au couple *RET*-*GDNF* de réguler la qualité du guidage neuronale (Bordeaux, et al., 2000; Mehlen and Bredesen, 2000).

En conclusion, la fréquence particulièrement élevée des mutations activatrices de *RET* et l'implication de cette protéine dans l'oncogenèse du CMT ont permis d'identifier ce récepteur comme une cible thérapeutique majeure.

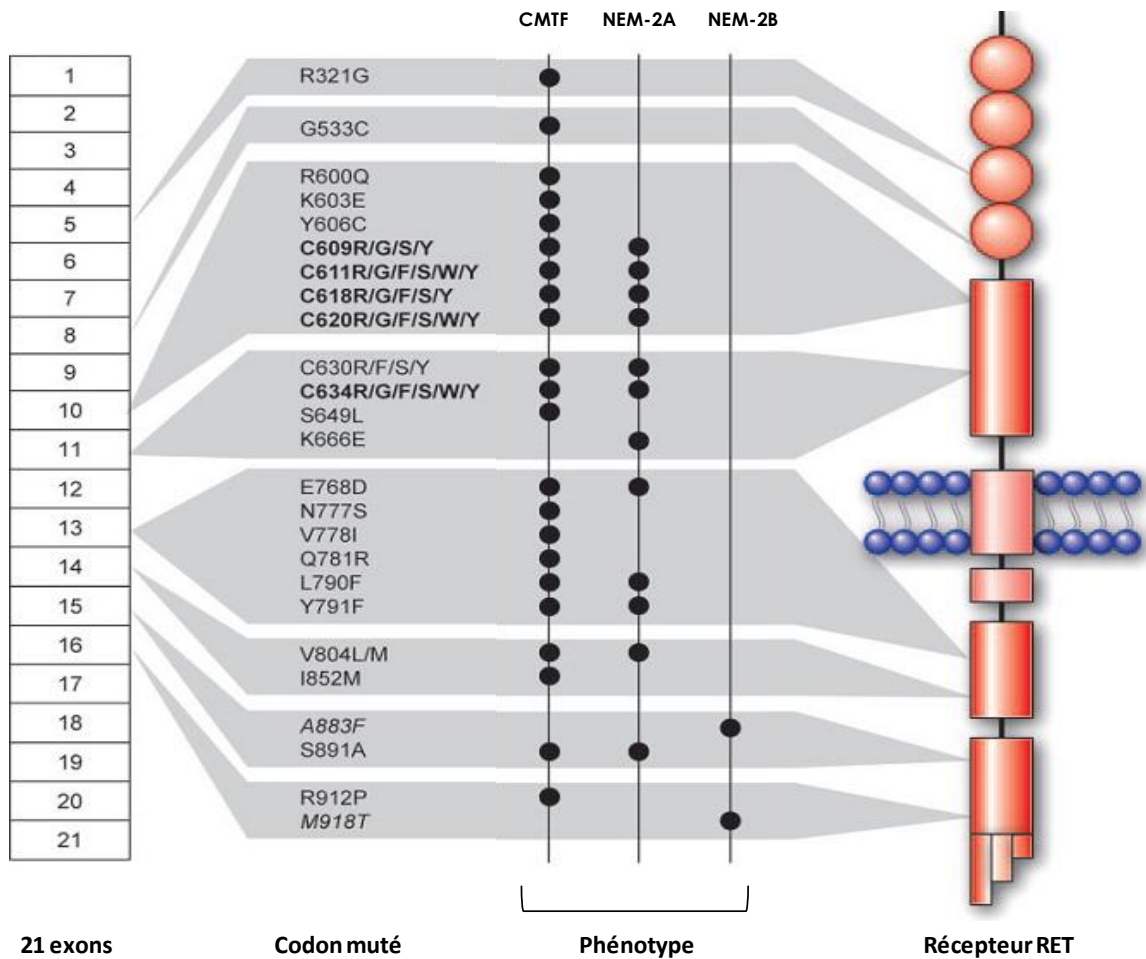
#### ▪ Corrélations génotype-phénotype

De façon intéressante, une corrélation étroite entre génotype et phénotype a été démontrée dans le CMT. En effet à chaque forme clinique sont associées de façon préférentielle des mutations activatrices du proto-oncogène *RET*, dont le pouvoir transformant et l'expression clinique sont variables (**Fig. 6**). Les mutations à l'origine de la forme NEM-2A affectent principalement le domaine extracellulaire riche en cystéines, et siègent en majorité au niveau du codon 634 (exon 11), ou des codons 609, 611, 618, 620 (exon 10). Chacune de ces mutations transforme un résidu cystéine en un autre acide aminé, entraînant une dimérisation constitutive du récepteur *RET*. La mutation la plus fréquente associée à ce syndrome touche dans 80% des cas le codon 634. A elle seule, la mutation *RET*<sup>C634R</sup> (Cystéine → Arginine) représente 50% des mutations NEM-2A (Schlumberger M., 2003).

Dans près de la moitié des formes de CMTF, les mutations sont également localisées au niveau des codons 609, 611, 618, 620 (exon 10). D'autres mutations affectant cette fois-ci la partie intracellulaire du récepteur ont été identifiées au niveau des exons 13, 14 et 15 (codons 768, 804 et 891) (**Fig. 6 & Fig. 7**). Enfin, quelques mutations ont été décrites au niveau de l'exon 11 (codons 630, 634, 649 et 666) (Pacini, et al., 2010; Schlumberger M., 2003; Takahashi, 2001).

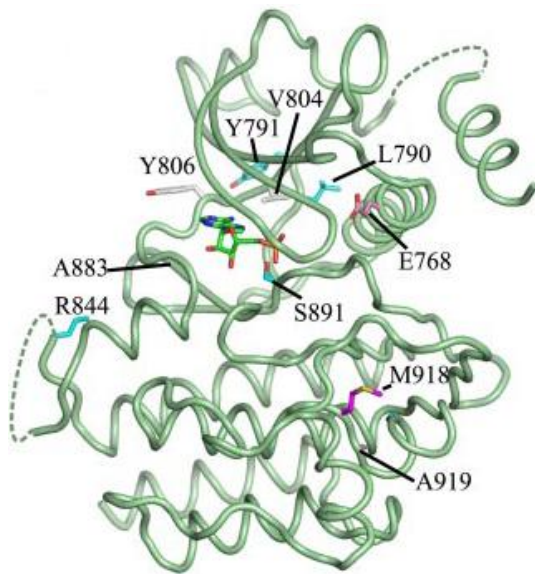
La forme NEM-2B est caractérisée par une mutation présente dans 95% des cas au niveau du codon 918 (exon 16) avec le remplacement d'une méthionine par une thréonine. Cette mutation induit une altération au niveau de la poche de reconnaissance du substrat du domaine catalytique. D'autres mutations affectant le domaine intracellulaire ont été identifiées dans les exons 15 (codon 883) et 16 mais ne comptent que pour moins de 4% (Schlumberger M., 2003; Takahashi, 2001) (Fig. 6 & Fig. 7). Des doubles mutations germinales, localisées au niveau des codons 804 et 806 ont également été décrites chez des patients NEM-2B (Takahashi, 2001).

Des mutations somatiques de *RET*, dont la plus fréquente est la mutation M918T, ont été retrouvées, exclusivement au niveau de la tumeur, dans 40 à 50% des cas (de Groot, et al., 2006). Ces mutations somatiques ne sont pas distribuées de manière homogène au niveau de la tumeur ni des métastases, suggérant que la maladie est polyclonale ou que la mutation se développe au cours de la progression tumorale (Eng, et al., 1994). Il est important de souligner qu'environ 5% des patients avec apparemment un CMT sporadique ont en réalité une mutation germinale de *RET* et font donc partie des formes héréditaires de CMT. Enfin, on peut noter que des mutations somatiques de *RET* ont été identifiées dans 10 à 20% des phéochromocytomes sporadiques mais dans aucune tumeur sporadique des parathyroïdes (Pacini, et al., 2010).



**Figure 6** : Résumé des principales mutations germinales dans le proto-oncogène *RET* et corrélation au phénotype clinique (de Groot, et al., 2006).

Le lien entre génotype et phénotype chez les patients atteints de CMT a été exploré de façon encore plus précise, associant à certains résidus tyrosine des capacités transformantes variables des protéines mutantes RET associées aux différents syndromes NEM-2A et NEM-2B. Ainsi la tyrosine 905 et les tyrosines 864 et 952 sont respectivement nécessaires à l'activation de RET dans les NEM-2A et NEM-2B (Takahashi, 2001). La double mutation affectant les codons 804 et 806 confère quant à elle des propriétés transformantes 8 à 13 fois supérieures à une simple mutation de chacun de ces codons (Iwashita, et al., 2000). Enfin, certaines mutations germinales ne sont associées au CMT qu'à l'état homozygote, suggérant des capacités transformantes plus faibles (de Groot, et al., 2006). A noter que peu de données ont été publiées sur le lien entre mutations spécifiques de *RET* et voies de signalisation de RET.



**Figure 7 :** Cartographie des principales mutations dans le domaine kinase de RET, à l'origine des formes de CMT.

*En vert*, ossature du domaine kinase de RET (en pointillé, liaisons à l'hélice N-ter et le domaine kinase).

*En magenta*, atomes de carbone des chaînes latérales pour la mutation M918T, variant prédominant dans les formes NEM-2B ; *en rose* pour les mutations E768D/A919P ; *en blanc* pour les mutations V804M/Y806C ; et *en cyan* pour les mutations L790F, Y791F, S891A, et R844L (Knowles, et al., 2006).

Sur le plan clinique, le risque de phéochromocytome est de 50% chez les patients porteurs d'une mutation au niveau du codon 634 et de 8% si l'anomalie touche l'exon 10. De plus, les manifestations cliniques de CMT apparaissent plus tardivement et de façon moins agressive pour les patients présentant une mutation *RET* au niveau du codon 634 que pour ceux avec une mutation dans les exons 13, 14 et 15 (Schlumberger M., 2003) (Tableau 1). De façon plus globale, les mutations entraînant une forte activation de RET, telle que la mutation du codon 918, ont été associées à des formes plus agressives de CMT et celles à l'origine d'une plus faible activation donnent des formes cliniques d'appariation plus tardive et d'expression plus indolente (Jasim, et al., 2010). En s'appuyant sur ces données, l'Association Américaine de la Thyroïde (*American Thyroid Association, ATA*) vient de publier une classification des risques liés au CMT, définie selon le génotype de *RET* (Kloos, et al., 2009). Ce système devrait servir à adapter les traitements à chaque patient, en fonction du risque associé. Enfin il est important de souligner que certaines mutations, telle que les variants V804 et Y806, confèrent au récepteur RET une résistance à certains traitements ciblés, comme nous le verrons par la suite (Carlomagno, et al., 2009; Carlomagno, et al., 2004).

	CMTF	NEM2A	NEM2B	CMT sporadique
Type de mutation de RET	Germinale	Germinale	Germinale	Somatique
Exons de RET mutés	10, 13, 14, 15	10, 11	16	11, 13, 15, 16
CMT	100%	100%	100%	100%
Age de survenue clinique (années)	<20 - >50	<20	<10	>40
Tumeur multicentrique	100%	100%	100%	rare
Tumeur bilatérale	100%	100%	100%	rare
Hyperplasie des cellules C	100%	100%	100%	0%
Phéochromocytome	0%	20 - 50%	20 - 50%	0%
Hyperplasie des parathyroïdes	0%	10 - 25%	rare	0%

**Tableau 1** : Données cliniques et génétiques du CMT (Schlumberger M., 2003).

### 1.3.2 Autres anomalies génétiques

Si l'implication du proto-oncogène *RET* a clairement été établie dans l'oncogenèse du CMT, il ne peut à lui seul expliquer l'ensemble des cas cliniques. En effet, il est admis que c'est l'accumulation d'altérations du génome (activation ou surexpression d'oncogènes / inhibition ou répression de gènes suppresseurs de tumeur) qui serait responsable du développement tumoral. D'autres anomalies génétiques ont donc été recherchées mais à ce jour, peu d'éléments ont pu être impliqués avec certitude dans le développement du CMT.

- Anomalies géniques

Concernant les anomalies géniques impliquées dans le CMT, peu de travaux ont été publiés dans ce domaine. Des recherches de mutations d'oncogènes, fortement impliqués dans d'autres cancers, ont été réalisées dans notre laboratoire sur une série de 25 CMT<sup>3</sup>. Aucune des principales mutations activatrices connues au niveau des gènes BRAF, EGFR, PIK3CA et JAK2 n'a été identifiée dans ces tumeurs (Ameur, et al., 2009).

<sup>3</sup> Série incluant 14 cas héréditaires et 11 cas sporadiques dont 3 porteurs d'une mutation de *RET*.

Un travail récent, portant sur les CMT sporadiques, a cependant mis en évidence la présence de mutations de deux des trois oncogène RAS (H-RAS et K-RAS) dans près de 70% des cas de CMT *RET* « sauvage » et dans seulement 25 % des cas de CMT porteurs d'une mutation *RET*, suggérant ainsi des voies alternatives d'oncogenèse dans les formes sporadiques (Moura, et al., 2011). L'implication de ces mutations dans le développement tumoral du CMT reste à démontrer. De façon intéressante, des surexpressions du VEGF, de ses récepteurs, le VEGFR-1 et 2, et de l'EGFR ont été récemment décrites dans des tumeurs et des modèles précliniques de CMT (Capp, et al., 2010; Gorla, et al., 2009). Ces surexpressions, en particulier de VEGFR-2 et d'EGFR, ont par ailleurs été reliées au pouvoir métastatique chez les patients, identifiant ainsi ces récepteurs comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le CMT (Rodriguez-Antona, et al., 2010).

Enfin, peu de données ont été publiées sur les mutations entraînant une perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur (GST). Des travaux réalisés sur les rongeurs ont mis en évidence le rôle de certaines mutations de GST (pRb - retinoblastoma protein, p53 - tumor protein p53 et PTEN - phosphatidylinositol- 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dualspecificity protein phosphatase) et de gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p27<sup>Kip1</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor) et p18<sup>INK4c</sup> (cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C) dans la prédisposition au développement du CMT (Bai, et al., 2006; Joshi, et al., 2007; van Veelen, et al., 2009).

- Anomalies chromosomiques

Des anomalies chromosomiques pouvant intervenir dans l'oncogenèse du CMT ont également été recherchées. Des pertes du bras court du chromosome 1 ont été décrites dès 1987 chez des patients atteints de NEM-2 (Mathew, et al., 1987b). En 1993, Mulligan et al., ont observé sur une série de 58 tumeurs de NEM-2, des pertes alléliques (*Loss of heterozygosity*, LOH en anglais) au niveau des chromosomes 1p, 3p, 3q, 11p, 13q, 17p et 22q (Mulligan, et al., 1993). En 2001, Frisk et al., ont retrouvé sur une série de 24 CMT mutés *RET*<sup>918</sup> des LOH au niveau des régions 3q et 13q et ont également mis en évidence des gains de chromosomes au niveau des régions 19q, 19p, 11c-q12 (Frisk, et al., 2001). Ces résultats ont été confirmés par Marsh et al. sur une série de 37 CMT et la principale lignée humaine de CMT (*lignée TT*) avec des délétions en 1p, 3q26.3-q27, 4, 9q13-q22, 13q, et 22q et une polysomie du chromosome 19 (Marsh, et al., 2003). Plus récemment, les travaux de Ye et al., suggèrent l'implication de gènes suppresseur de tumeur dans

l'oncogénèse du CMT, mettant en évidence 76 LOH par CGH haute résolution sur une série de 30 CMT<sup>4</sup> (Ye, et al., 2008).

L'analyse génomique des différents stades de la maladie du stade « normal » aux stades HCC puis CMT, développés dans un modèle de souris transgéniques RET<sup>634</sup> et menés dans notre laboratoire, ont permis d'identifier des pertes des chromosomes murins 1, 4 et 5 au cours du développement tumoral. Il est important de souligner que le chromosome 4 de la souris est syngénique avec le chromosome 1 de l'homme, confirmant les résultats obtenus chez l'homme et l'implication de cette anomalie dans le développement tumoral du CMT. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le chromosome 1 humain porte le gène P18 et d'autres gènes de CDK (cyclin dépendent tumor), renforçant le rôle probable de p18<sup>INK4c</sup> et de gènes suppresseurs de tumeur dans l'oncogénèse du CMT et sa progression tumorale (Ameur et al., *en préparation*).

Enfin, des pertes d'hétérozygotie ont été observées dans un certain nombre de tumeurs sporadiques de CMT au niveau du gène suppresseur de tumeur von-Hippel-Lindau (VHL) dont la protéine induit l'expression du facteur de transcription HIF impliqué dans l'angiogénèse *via* la production de VEGF (Koch, et al., 2006).

En conclusion, si le CMT est une pathologie cancéreuse rare, la fréquence particulièrement élevée des mutations activatrices du proto-oncogène *RET* définit cette tumeur comme une pathologie homogène et identifie le récepteur tyrosine kinase associé, comme une cible thérapeutique potentielle majeure. Le CMT apparaît donc comme un bon modèle d'étude des thérapies moléculaires ciblées.

---

<sup>4</sup> Série incluant 10 sporadiques RET wt ; 10 sporadiques RET muté ; 10 héréditaires RET muté.



## 2. Prise en charge thérapeutique des CMT

Comme nous l'avons présenté précédemment, le CMT se développe dans un contexte héréditaire dans 20 à 30% des cas. La prise en charge thérapeutique dans ce contexte familial débute avec la recherche de mutation au niveau du proto-oncogène *RET* chez les sujets apparentés au cas index diagnostiqué. La société savante américaine ATA (Kloos, et al., 2009) a récemment publié des recommandations relatives au diagnostic et à la prise en charge thérapeutique des sujets porteurs d'une anomalie du gène *RET*, qui ne seront pas discutées dans ce manuscrit. Les principales options thérapeutiques proposées après diagnostic de la maladie *in situ* pour les formes sporadiques et familiales seront détaillées dans les paragraphes suivants.

### 2.1 La chirurgie, le gold standard

Tout d'abord il est important de noter qu'avant toute chirurgie il est nécessaire de réaliser une évaluation de l'étendue de la maladie et de définir la présence d'éventuelles co-morbidités (hyperparathyroïdisme, phéochromocytome) (Pacini, et al., 2010).

Le traitement de référence de première intention des CMT sporadiques et héréditaires est la chirurgie avec thyroïdectomie totale et curage ganglionnaire cervical. En effet, la distribution des cellules C au sein du parenchyme thyroïdien est diffuse et des tumeurs bilatérales sont observées dans 30% des cas sporadiques et ~100% des formes héréditaires. Le curage ganglionnaire est quant à lui recommandé dès la première chirurgie en raison d'une fréquence élevée des métastases loco-régionales (Schlumberger M., 2003). Une reprise chirurgicale est possible en cas d'exérèse primaire partielle et de récurrence de la maladie. Plusieurs études ont montré que la survie des patients porteurs d'un CMT était dépendante de la qualité du geste chirurgical (Pacini, et al., 2010). Globalement, le taux de survie à 10 ans après chirurgie est de 69% (Schlumberger, et al., 2008). Cependant ce taux de survie varie en fonction de l'âge, de la taille de la tumeur et du stade clinique de la maladie, soulignant l'importance d'un diagnostic précoce de la maladie. Enfin si les formes localisées peuvent être guéries par chirurgie, les formes localement avancées ou métastatiques nécessitent d'autres traitements associés.

## 2.2 La radiothérapie externe

La radiothérapie externe du cou et du médiastin est réalisée chez les patients présentant des taux élevés de calcitonine après chirurgie. Si elle peut diminuer le risque de récurrence, l'impact de la radiothérapie reste toutefois limité en termes de survie globale (Brierley, et al., 1996; Pellegriti, et al., 2003).

## 2.3 Les chimiothérapies conventionnelles

Les métastases à distance, présentes dans 7 à 23% des cas dès le diagnostic de CMT, et les formes récurrentes de CMT, détectées dans 35 à 65% des patients avec des taux de calcitonine élevés dans les 10 ans suivant la chirurgie, ne peuvent être guéries par la chirurgie. Différents protocoles de chimiothérapies conventionnelles ont été évalués chez ces patients au cours de ces 25 dernières années mais n'ont pas fait la preuve de leur efficacité (Droz, et al., 1990; Nocera, et al., 2000; Shimaoka, et al., 1985; Wu, et al., 1994). Les patients bénéficiaient alors de traitements palliatifs visant à améliorer leur qualité de vie mais pas leur survie (Schlumberger, et al., 2008). Des chimiothérapies plus récentes, telles que les taxanes, la gemcitabine et l'irinotécan ont également fait l'objet de quelques évaluations qui, jusqu'à présent, n'ont pas mis en évidence une efficacité clinique malgré quelques résultats précliniques intéressants (Dadan, et al., 2001; Kaczirek, et al., 2004; Koga, et al., 2010; Kraeber-Bodere, et al., 2002; Matuszczyk, et al., 2010; Strock, et al., 2006).

Les faibles taux de réponse et les réponses partielles et de courte durée associés à ces chimiothérapies dites conventionnelles, soulignent la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, en particulier pour les patients en phase métastatique. Il est important de noter que la progression naturellement lente du CMT tend à privilégier l'émergence de traitements assurant une survie sans progression longue et une bonne qualité de vie. (Schlumberger, et al., 2008).

## 2.4 Place des thérapies innovantes dans la prise en charge du CMT

La meilleure compréhension de la biologie des tumeurs, tant au niveau de la tumeur que de son environnement, a permis le développement de nouvelles thérapies plus rationnelles et plus spécifiques, en particulier des molécules de synthèse telles que les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase (ITK). Ainsi de nombreux ITKs à spectre large, ciblant RET et des récepteurs de l'angiogenèse dont VEGFR-2, sont en cours de développement, en particulier le vandetanib, le sunitinib et le cabozantinib (xl-184) dont les premiers résultats précliniques et cliniques sont prometteurs (Drosten and Putzer, 2006; Durante, et al., 2011; Schlumberger, et al., 2008; Sebolt-Leopold and English, 2006). L'inhibition de l'angiogenèse, une cible majeure en cancérologie, pourrait participer à l'efficacité clinique de ces traitements en jouant sur les cellules endothéliales (Bunone, et al., 1999; Capp, et al., 2010; Petrangolini, et al., 2006; Rodriguez-Antona, et al., 2010). Très peu d'inhibiteurs spécifiques de l'angiogenèse ont été évalués en clinique dans le CMT. Notons tout de même que le Pazopanib (Votrient®), ciblant VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\alpha/\beta$ , et c-kit est en cours d'évaluation dans un essai de phase II (Bible, et al., 2010; Sherman, 2010) (Annexe 1). La voie de l'EGFR, identifiée comme potentiellement impliquée dans le développement du CMT, est également ciblée en clinique (Annexe 1).

Quelques anticorps ont fait l'objet d'un développement clinique. On notera en particulier l'anticorps anti-ACE couplé à l'Y90 (Yttrium), l'anticorps bispécifique dirigé contre l'ACE et l'acide diéthylentriaminopentacétique (ADTP) et d'un anticorps anti-ADTP couple à de l'iode 131 dont les effets se sont avérés modestes (Chatal, et al., 2006; Schlumberger, et al., 2008; Sharkey, et al., 2005). Enfin, des associations entre cette radioimmunothérapie (RIT) et des stratégies antiangiogéniques ont également été testées en préclinique montrant une augmentation de l'efficacité de la RIT suite au prétraitement par le bévécizumab (Kraeber-Bodere, et al., 2010; Salaun, et al., 2010). D'autres thérapies ciblées ont fait l'objet d'études précliniques et participent actuellement à des essais cliniques seuls ou en association, en particulier le bortezomib, inhibiteur du protéasome, le 17AAG ou tanespimycine, un inhibiteur de la protéine HSP90, le vorinostat ou acide suberoylanilide hydroxamique et le panobinostat ou LBH589, deux inhibiteurs des histones deacétylases, ou bien encore le temsirolimus et l'everolimus, des inhibiteurs de mTOR (Alfano, et al., 2010; Grozinsky-Glasberg, et al., 2010; Mitsiades, et al., 2006; Ning, et al., 2008; Sherman, 2010) (Annexe 1).

La place de l'immunothérapie dans la prise en charge thérapeutique du CMT est limitée. L'interféron  $\alpha$  et les analogues de la somatostatine (Octréotide – Sandostatine®) n'améliorent les

diarrhées associées à la maladie que de façon inconstante et transitoire. L'interféron  $\alpha$  2a ou l'IL-2 n'ont pas montré d'efficacité clinique (Schlumberger M., 2003). L'immunothérapie à base de cellules dendritiques n'a pas encore démontré son intérêt et est toujours en cours d'évaluation. (Modigliani, et al., 1992; Schott, 2006). La thérapie génique dans le CMT a suscité de nombreux espoirs mais son développement en clinique est inexistant. Quelques stratégies ont tout de même montré, en préclinique, des résultats prometteurs. Parmi celles-ci citons les dominants négatifs transférés par adénovirus (Drosten, et al., 2003), et l'acide tetraiodothyroacétique (Tetrac) et les nanoparticules de Tetrac (Yalcin, et al., 2010).

En conclusion, si la chirurgie reste le traitement de référence pour les formes localisées, les formes localement avancées ou métastatiques, de pronostic péjoratif, étaient avant le développement des thérapies moléculaires ciblées dans une impasse thérapeutique. De façon générale, on constate que parmi ces nouveaux traitements anticancéreux, les TTKs à spectre large, ciblant RET et des récepteurs de l'angiogenèse, sont les plus prometteurs en clinique. Par ailleurs, on observe que de plus en plus d'essais évaluent des associations thérapeutiques de thérapies moléculaires entre elles et/ou avec des chimiothérapies conventionnelles (**Annexe 1**). L'ensemble de ces nouveaux traitements et de ces associations puisent leur rationnel dans des études précliniques, développées sur des modèles cellulaires et animaux.

### 3. Modèles d'étude du cancer médullaire de la thyroïde

L'évaluation préclinique de toute nouvelle molécule à visée thérapeutique est un pré-requis indispensable et obligatoire avant toute administration chez l'homme. Des tests visant à définir l'activité de ces molécules sont réalisés à l'aide de différents modèles, en particulier des modèles de nature cellulaire ou basé sur des organismes animaux. Bien qu'imparfaits ces modèles sont des outils essentiels pour caractériser et sélectionner les composés les plus à même d'être développés en clinique. Ce paragraphe présentera les principaux modèles d'étude précliniques utilisés dans le CMT.

#### 3.1 Lignées cellulaires : modèles *in vitro*

Les lignées cellulaires sont des modèles utilisés en routine dans toute recherche biologique, en particulier dans l'évaluation de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Preuve en est le projet IVCLSP (*In vitro* Cell Line Screening Project) initié à la fin des années 80 par le National Cancer Institute (NCI) et qui teste près de 3000 molécules par an sur un panel de 60 lignées cellulaires humaines (NCI-60) représentatives des principaux types de cancer<sup>5</sup>. Dans le cas du CMT, à la différence des autres cancers, peu de modèles cellulaires sont disponibles et les travaux de recherche préclinique s'appuient principalement sur la lignée humaine TT. Par ailleurs il est important de rappeler qu'il n'existe aucun modèle *in vitro* de cellules C non tumorales, du fait de la très faible proportion de ce type cellulaire au sein du parenchyme thyroïdien.

##### 3.1.1 Lignées humaines

Quelques lignées humaines de CMT ont été établies à partir de tumeur de patients dès le début des années 80. Leur nombre reste limité et seule deux lignées (TT et MZ-CRC-1) sont utilisées en pratique courante.

- Lignée TT

La lignée TT (*Thyroid Tumor*) est la principale lignée utilisée comme modèle cellulaire dans le CMT. Elle a été établie en 1978 à partir d'un prélèvement de tumeur réalisé par ponction sur une femme de 77 ans. A la différence des premières lignées humaines de CMT, la lignée TT est

---

<sup>5</sup> Pour plus d'informations, voir le site internet <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>

caractérisée par une immortalité associée à la sécrétion continue et conservée dans le temps des principaux marqueurs protéiques de cette pathologie, la calcitonine et l'antigène carcinoembryonnaire. Morphologiquement les cellules TT sont fusiformes et de petite taille. Elles ont un temps de doublement particulièrement élevé (~3,5 jours) et prolifèrent avec une forte densité. La description princeps de cette lignée indique que les propriétés malignes sont maintenues dans le temps avec notamment la capacité de ces cellules à former des tumeurs après injection *s.c.* ou *i.m.* dans des souris immunodéficientes. Au niveau génétique, l'analyse chromosomique a révélé un caryotype aneuploïdique (37 à 44 chromosomes) avec plusieurs marqueurs chromosomiques (Andreoli M., 1981; Leong SS., 1981). L'étude plus récente des anomalies du nombre de copies de gènes par CGH array a mis en évidence des pertes (1p, 3p12-p21, 3q26.3-q27, 4p15.3-p16, 8p, 9p, 9q13-q22, 11q22-qter, X) et des gains (1q, 8q, 11q12-q14, 12p, 20) chromosomiques, largement identiques à ceux retrouvés dans les tumeurs humaines, renforçant son intérêt comme modèle d'étude du CMT (*cf.* §1.3.2) (Marsh, et al., 2003). Une mutation activatrice, caractéristique de la forme clinique NEM-2A et localisée dans le proto-oncogène *RET* au niveau du codon 634,  $RET^{C634W}$  (cystéine → tryptophane), a été identifiée en 1995. Cette mutation est hétérozygote et les deux allèles (normal et muté) sont exprimés (Carlomagno, et al., 1995).

Cette lignée a servi de modèle dans de nombreux travaux pour étudier les caractéristiques biochimiques et physiopathologiques du CMT. Elle a notamment permis de mieux définir le rôle de *RET* dans la transformation et la différenciation cellulaire et est communément utilisée pour l'évaluation préclinique de molécules à visée thérapeutique (Akeno-Stuart, et al., 2007; Grozinsky-Glasberg, et al., 2010; Rapa, et al., 2011; Strock, et al., 2006; Strock, et al., 2003; Verbeek, et al., 2011; Vitagliano, et al., 2010).

- Autres lignées humaines

Sept autres lignées humaines de CMT ont été établies (MTC-SK, SINJ, RO-H85-1, RO-D81-1, HMCa, MTC-SK, MZ-CRC-1) et sont partiellement décrites dans la littérature (Cooley, et al., 1995; Knuth, 1987; Pfragner, et al., 1990). En particulier, la lignée MZ-CRC-1 a été établie à partir d'un épanchement pleural malin chez une patiente métastatique de 43 ans, dont la nature héréditaire ou sporadique de la tumeur n'est pas connue. Caractérisée par une mutation activatrice du proto-oncogène *RET*,  $RET^{M891T}$  (méthionine → thréonine), relative à forme clinique NEM-2B, cette lignée a été utilisée dans quelques travaux précliniques pour l'étude des

voies de signalisation intracellulaire (Arthan, et al., 2010; Gorla, et al., 2009; Zhu, et al., 2010) et pour l'évaluation de nouveaux médicaments (Morisi, et al., 2007; Vitagliano, et al., 2010).

### 3.1.2 Lignées animales

L'intérêt actuel des lignées tumorales non humaines est limité et a été fortement diminué avec l'importance grandissante des lignées tumorales dérivées de tumeurs humaines. On peut toutefois noter que dans le cas du CMT, plusieurs lignées d'origine animale (rat et souris) sont décrites dans la littérature et disponibles en partie à l'ATCC<sup>6</sup> (Cooley, et al., 1995). Ces modèles, qui peuvent être considérés comme mineurs notamment en regard des modèles cellulaires humains disponibles, n'ont pas fait l'objet de publications dans le cadre d'évaluation préclinique thérapeutique depuis plus de 10 ans.

### 3.1.3 Constructions cellulaires

Des constructions cellulaires de cellules fibroblastiques NIH3T3 exprimant différents variants géniques du proto-oncogène *RET* ont été développées dès 1985 par Borello et al. Ces modèles ont permis de démontrer le pouvoir transformant des différents mutants *RET* et le rôle clé du récepteur RET dans l'oncogenèse du CMT (Borello, et al., 1995; Colombo-Benkmann, et al., 2008; Iwashita, et al., 1996; Iwashita, et al., 1999; Iwashita, et al., 2000). Ils ont également servi à l'évaluation préclinique de l'activité inhibitrice de nouveaux composés (Akeno-Stuart, et al., 2007; Carlomagno, et al., 2006; Carlomagno, et al., 2002; Cuccuru, et al., 2004).

L'intérêt majeur de ces constructions est de pouvoir étudier les différents variants géniques de *RET* et de palier ainsi au faible nombre de lignées tumorales humaines disponibles qui ne permettent d'étudier que deux des nombreuses mutations décrites dans le CMT.

## 3.2 Modèles animaux : modèles *in vivo*

Si les modèles cellulaires sont des outils précliniques essentiels, ils ne permettent cependant pas d'accéder aux informations relatives aux interactions entre les cellules tumorales et son environnement, ni d'étudier les caractéristiques pharmacocinétiques des drogues (absorption,

---

<sup>6</sup> American Type Cell Collection

distribution, métabolisme et élimination). Dans ce contexte, les modèles animaux, en particulier les souris, sont devenus des outils de choix.

### 3.2.1 Souris immunodéficientes xéno greffées

La souris immunodéficiente xéno greffée est le modèle *in vivo* le plus utilisé dans les études de développement de nouvelles molécules. Deux types de greffes sont distinguées selon leur localisation : les xéno greffes orthotopiques, c'est à dire à l'emplacement anatomique habituel (dans le cas du CMT, la thyroïde) et les xéno greffes ectotopiques, par exemple l'injection *s.c.* dans le flanc. Les xéno greffes orthotopiques au niveau de la thyroïde sont particulièrement délicates à réaliser en raison du petit volume de cet organe chez la souris. A ce jour, un seul modèle de xéno greffe orthotopique de CMT et un seul modèle orthotopique relatif au cancer anaplasique de la thyroïde, dont la capacité de prolifération est extrêmement élevée, ont été décrits (Kim, et al., 2005; Kim, et al., 2006; Kim, et al., 2007; Lausson, et al., 1996). Les modèles de xéno greffes ectotopiques ont démontré au cours des 25-30 dernières années leur intérêt dans le développement préclinique en tant qu'indicateur de la probable activité clinique des candidats médicaments. Outre l'effet directement mesurable sur la croissance tumorale et la survie, ces modèles permettent d'étudier la formulation galénique et les voies d'administration, le schéma d'administration (dose et fréquence) et d'accéder à des paramètres biologiques (angiogenèse), pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Néanmoins, il faut souligner que ces expérimentations *in vivo* sont chronophages, ont un coût important, soulèvent des questions éthiques autour des protocoles et ne peuvent pas toujours être mises en place (stratégie antiangiogéniques, immunothérapie). Par ailleurs, il est important de noter que l'activité observée *in vivo* sur un histotype donné ne prédit pas toujours l'activité clinique dans le même type de tumeur (Kelland, 2004).

Dans le cas du CMT le modèle de xéno greffes de lignées cellulaires humaines en *s.c.* dans le flanc de souris immunodéprimées est largement utilisé en particulier pour évaluer l'activité et l'efficacité de nouvelles molécules. Enfin, un modèle de xéno greffe établie à partir d'un fragment de tumeur sporadique de patient mutée RET<sup>C634R</sup> a récemment été décrit dans la littérature (Johanson, et al., 2007). Ce type de modèle apparaît particulièrement intéressant pour palier au faible nombre de modèles cellulaires humains et accéder ainsi à la diversité génotypique et phénotypique du CMT.



### 3.2.2 Souris génétiquement modifiées

Depuis une quinzaine d'années, un nouveau type de modèle *in vivo* a été développé dans le CMT. Il s'agit de souris génétiquement modifiées (transgéniques ou knock-out, KO) qui reproduisent les différentes étapes du développement *in situ* de la maladie observé chez l'homme. Ces modèles, comme les constructions cellulaires NIH3T3, ont permis dans un premier temps de définir précisément la part fonctionnelle d'éléments géniques dans le développement et la progression de la maladie. Ces souris génétiquement modifiées contribuent donc à comprendre les régulations moléculaires mises en jeu lors de l'oncogenèse. Par ailleurs, elles servent à identifier de nouvelles cibles moléculaires pour de nouveaux traitements et à tester l'efficacité/l'activité de nouvelles molécules à visée thérapeutique (Arbeit and Hirose, 1999). Une dizaine de modèles de CMT a ainsi été développée, pour la plupart d'origine murine et porteurs de mutations au niveau du proto-oncogène *RET*. En particulier le premier modèle murin germlinal muté  $RET^{C634R}$  a été établi dans notre unité par Michiels et al., en 1997 (Michiels, et al., 1997). D'autres modèles murins exprimant des mutations du proto-oncogène *RET* au niveau des codons 634 et 918 ont été décrits (Acton, et al., 2000; Kawai, et al., 2000; Reynolds, et al., 2001; Smith-Hicks, et al., 2000). D'autres altérations moléculaires, ne touchant pas *RET*, ont également été impliquées dans le développement du CMT, en particulier des surexpressions des gènes *c-mos*, *v-Ha-Ras*, de l'antigène SV40, des antigènes ST et MT du polyomavirus ou bien encore des mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur Rb (rétinoblastome) (Baetscher, et al., 1991; Felici, et al., 1999; Johnston, et al., 1998; Schulz, et al., 1992). Enfin, il est à souligner qu'un seul modèle d'inactivation de gène a été décrit à ce jour. Il s'agit d'un modèle de souris KO pour le récepteur à la prolactine, qui développent des hyperplasies des cellules C et des CMT dans environ 40% des cas (Kedzia, et al., 2005).

### 3.2.3 Autres modèles

Parmi les autres modèles d'étude du cancer médullaire de la thyroïde, nous citerons uniquement celui de la drosophile. La drosophile a permis d'élucider les mécanismes fondamentaux de signalisation cellulaire et de développement de l'organisme et des pathologies. Ce modèle est également utilisé pour identifier des molécules d'intérêt thérapeutique. Il ne permet cependant pas de mimer les séquences humaines d'accumulation d'anomalies géniques impliquées dans la progression de la maladie. Par ailleurs de nombreux tissus humains (os, peau, thyroïde) ne sont

pas retrouvés chez la drosophile. Enfin l'existence de différences en termes d'immunité est à souligner (Das and Cagan, 2010).

Un modèle de NEM-2 chez la drosophile a été établi en 2005 (Read, et al., 2005). Les protéines RET de l'homme et de la drosophile partagent le même domaine extracellulaire et présentent une homologie de structure de 52% du domaine intracellulaire. L'introduction des mutations analogues de RET chez la drosophile et leur expression au niveau de l'œil confère un phénotype rouge de l'œil directement observable. Les études réalisées sur ce modèle ont permis d'approfondir les connaissances dans le domaine de la biologie du cancer (Das and Cagan, 2010). Ce modèle a également servi à l'étude d'un candidat médicament le vandetanib, un inhibiteur d'activité tyrosine kinase, sur les différentes mutations de RET (Vidal, et al., 2005).

### 3.3 Prélèvements de patients

Les différents modèles *in vitro* et *in vivo* présentés précédemment, s'ils sont particulièrement importants, ne représentent pas strictement la pathologie cancéreuse humaine et l'accès à des tissus humains apparaît essentiel. En effet, les prélèvements issus de patients ont un intérêt majeur en recherche, assurant un accès à la diversité d'expression de la pathologie et une représentativité plus forte du modèle vis à vis de la maladie. La nature des prélèvements utilisés peut être à la fois tissulaire (tumeur fraîche, bloc de tumeurs inclus, TMA) et sérique. Leur utilisation est diverse, servant pour l'établissement de modèles (culture cellulaire, greffe de tumeurs), pour des études génétiques (séquençage, quantification de transcrits) ou protéiques (immunohistochimie, dosages de biomarqueurs circulants). Ces prélèvements s'intègrent dans la recherche dite translationnelle, à l'interface entre recherche préclinique et recherche clinique, qui participe au transfert des connaissances de la recherche cognitive vers son application chez le patient et des observations faites chez le malade vers la recherche cognitive.

En conclusion, l'ensemble de ces modèles d'étude, cellulaires, animaux et humains sont donc essentiels en recherche, utilisables pour l'étude des mécanismes de l'oncogenèse et également à l'évaluation de nouvelles molécules à visée thérapeutiques, telles que les inhibiteurs d'activité kinase.

---

## **CHAPITRE 2**

### **INHIBITEURS D'ACTIVITE KINASE, UNE NOUVELLE CLASSE THERAPEUTIQUE EN CANCEROLOGIE**

---

## CHAPITRE 2 : INHIBITEURS D'ACTIVITE KINASE, UNE NOUVELLE CLASSE THERAPEUTIQUE EN CANCEROLOGIE

---

### 1. Protéines à activité kinase, des cibles moléculaires majeures en cancérologie

#### 1.1 Evolution de la notion de cible thérapeutique en cancérologie

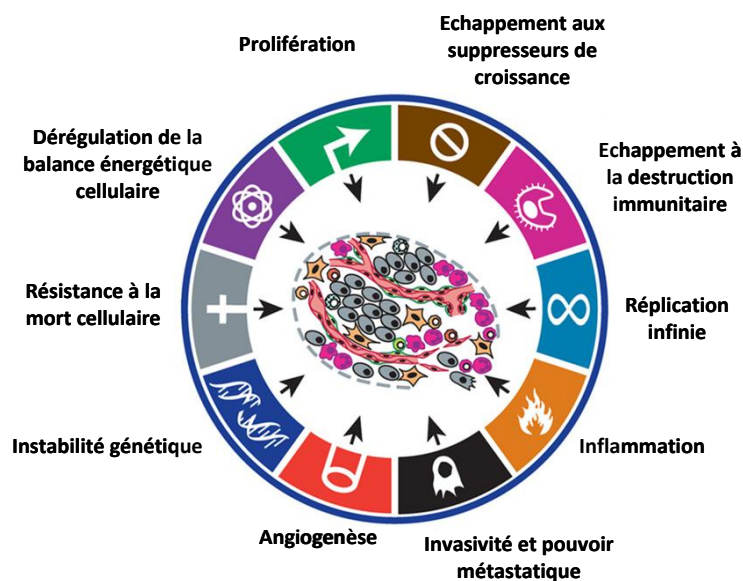
La notion de cible en cancérologie, comme pour toute autre pathologie, a toujours existé. La présence de la tumeur a ainsi été la première cible, dont le geste thérapeutique associé a été en premier lieu la chirurgie. Puis, l'identification des capacités de prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses a conduit au développement de nouveaux traitements, les chimiothérapies cytotoxiques dites conventionnelles, ciblant cette propriété. Les notions de cible et de thérapie ciblée en cancérologie ont naturellement évolués au cours du temps, bénéficiant de la compréhension de la biologie des tumeurs et des mécanismes moléculaires de l'oncogenèse, en particulier liée à des avancées technologiques majeures.

En effet, les progrès réalisés ces 30 dernières années ont permis de montrer que le cancer est une maladie liée à des modifications dynamiques du génome à travers la découverte et l'implication dans le développement tumoral des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeur et des gènes de réparation de l'ADN (Hanahan and Weinberg, 2011). Les proto-oncogènes, découverts par Stehelin en 1976, sont des gènes qui acquièrent un pouvoir transformant suite à des modifications qualitative ou quantitative pour devenir des oncogènes (Stehelin, et al., 1976). Les mécanismes d'activation de ces gènes sont multiples tels que l'intégration virale, la mutation ponctuelle, la microdélétion, le réarrangement structural, l'amplification génique, et la dérégulation d'ARN messenger codant pour une oncoprotéine. Les proto-oncogènes sont impliqués à l'état normal dans les fonctions de prolifération, de différenciation, de sénescence, de mort cellulaire ou encore au cours du développement. Parmi les différentes classes d'oncoprotéines on retrouve des facteurs de croissance, des récepteurs de facteurs de croissance, des protéines membranaires liant le GTP, des protéine-kinases, des protéines à activité nucléaire qui contrôlent la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ADN

Les gènes suppresseurs de tumeur sont à l'inverse des gènes capables d'inhiber la croissance cellulaire lorsqu'ils sont exprimés, *via* leur capacité à réguler négativement le cycle cellulaire et à induire l'apoptose. Les altérations moléculaires à l'origine de leur perte de fonction sont variées telles que des mutations ponctuelles, des délétions, des insertions, des surexpressions de microARN ou des anomalies de méthylation des promoteurs inhibant la transcription. C'est donc leur perte d'expression qui est associée au développement tumoral (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Enfin, les gènes de réparation de l'ADN, qu'on ne détaillera pas dans ce manuscrit, interviennent quand à eux indirectement dans le processus d'oncogénèse.

La meilleure compréhension des anomalies moléculaires impliquées dans l'oncogénèse a permis à Hanahan & Weinberg, dès 2000, de regrouper ces anomalies au sein de mécanismes fondamentaux communs aux différents types de cancers, répertoriés sous le nom de « Hallmarks of cancer » (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011) (Fig. 8).



**Figure 8** : Principaux mécanismes impliqués dans l'oncogénèse, « Hallmarks of Cancer » (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'identification des altérations clés inhérentes au phénotype tumoral a par la suite servi de support pour la recherche et la sélection de cibles pertinentes en oncologie, à l'origine du développement de nouveaux traitements, les thérapies moléculaires ciblées. L'identification de ces cibles a véritablement bouleversé la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer (Vignot S., 2008). Schématiquement les cibles en cancérologie peuvent être isolées et

classées selon différents critères : leur nature (protéique, lipidique, nucléique), leur localisation (intra ou extracellulaire) ou bien encore leur mécanisme d'action (phosphorylation, réplication, apoptose, angiogenèse, métabolisme...). Parmi les cibles cellulaires, des récepteurs membranaires, des cibles cytoplasmiques (protéines de voies de signalisation) et des cibles nucléaires (facteurs de transcription) ont été identifiés. Les cibles de l'environnement tumoral quant à elles gravitent principalement autour du phénomène de l'angiogenèse, élément majeur pour la survie de la tumeur, son développement et sa dissémination. De nouvelles cibles extracellulaires ont également été identifiées, en particulier les métalloprotéases de la matrice extracellulaire, enzymes impliqués dans le remodelage de cette matrice et favorisant la dissémination d'embolus de cellules cancéreuses (Vignot S., 2008).

Il est important de souligner que parmi la trentaine de gènes suppresseurs de tumeur et la centaine d'oncogènes dominants identifiés, les protéines kinases et en particulier celles à activité tyrosine kinase font parties des protéines les plus représentées (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

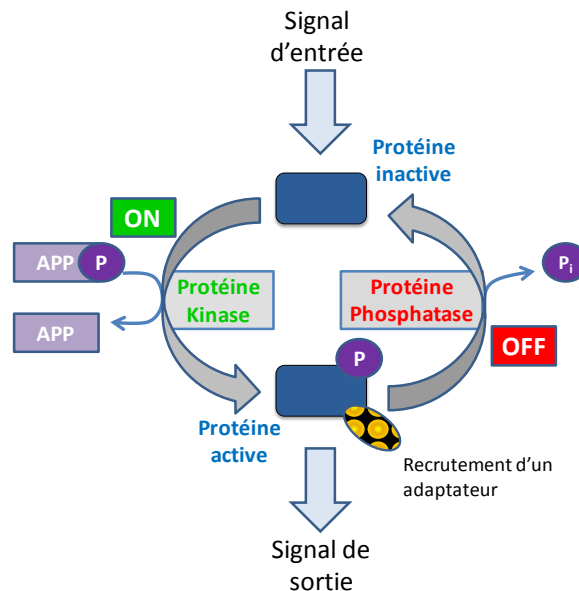
## 1.2 Protéines à activité kinase et cancer

### 1.2.1 Le kinome

A l'image du génome qui représente l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce, le kinome, défini par Manning et al. en 2002, regroupe l'ensemble des protéines à activité kinase, des enzymes capables de phosphoryler divers substrats (Manning, et al., 2002). C'est en 1954 que cette activité de phosphorylation a été décrite pour la première fois (Burnett and Kennedy, 1954), et depuis, l'étude de ce mécanisme et de ses fonctions a été un élément majeur qui a fait l'objet de nombreux travaux de recherche.

La phosphorylation consiste en un transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP. L'ajout de ce groupement modifie la conformation, la stabilité du substrat cible et ses interactions avec d'autres partenaires. Ce phénomène, transitoire et réversible grâce aux phosphatases, joue le rôle d'un commutateur extrêmement rapide et efficace modulant ainsi l'activité des substrats. Ces derniers sont principalement des protéines, en particulier des enzymes, des récepteurs, des protéines de la signalisation, des canaux ioniques, des facteurs de transcription, et plus rarement des lipides (exemple, PIP2 phosphorylé par PI3K), des sucres ou

des nucléotides (Arena, et al., 2005; Vignot S., 2008). Les protéines à activité kinase, et plus globalement les phénomènes de phosphorylation et déphosphorylation, sont impliquées dans la transduction de signaux cellulaires initiés par de nombreux neurotransmetteurs, hormones et facteurs de croissance, qui contrôlent divers processus tels que le métabolisme, la transcription, la progression du cycle cellulaire, la mobilité cellulaire *via* le réarrangement du cytosquelette, l'apoptose et la différenciation (Fig. 9). Ces enzymes ont également un rôle dans la communication intercellulaire pendant le développement, les réponses physiologiques, l'homéostasie, et dans le fonctionnement des systèmes nerveux et immunitaires (Manning, et al., 2002). Il n'est donc pas surprenant que des activations/inhibitions aberrantes de ces protéines kinases soient fortement corrélées au développement de pathologies et en particulier de cancers comme nous le verrons par la suite.

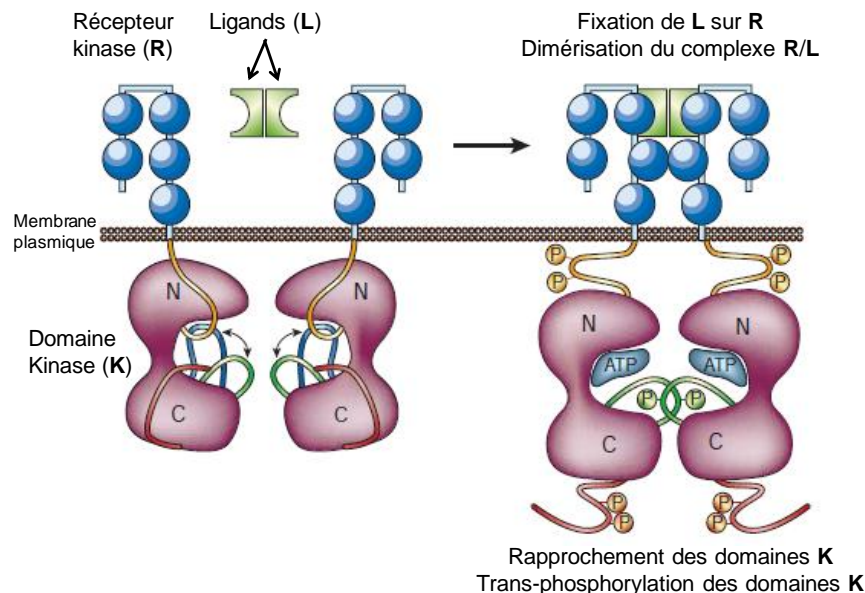


**Figure 9 :** Principe du processus de phosphorylation/déphosphorylation dans la transduction du signal. (Arena, et al., 2005).

En 2002, Manning et al. dressent le portrait quasi exhaustif du kinome en s'appuyant sur l'ensemble des données connues du génome humain, en particulier obtenues *via* son séquençage (Manning, et al., 2002). Ainsi 518 gènes codant des kinases, représentant une fraction significative du génome ont été identifiés. Ce nombre, particulièrement important, met en avant la place centrale de cette famille et est à rapprocher des plus de 30% du protéome humain qui est phosphorylé par ces enzymes (Cohen, 2001; Eglen and Reisine, 2009). Schématiquement, deux grandes familles de protéines kinases sont distinguées selon la nature du résidu phosphorylé : les Sérine/Thréonine kinases et les Tyrosine kinases (TK) famille dont s'intéresse plus particulièrement ce manuscrit (Eglen and Reisine, 2009). Ces dernières peuvent être subdivisées en deux groupes, les protéines cytoplasmiques et les récepteurs membranaires (RTK).

### 1.2.2 Structure-activité des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité TK (RTK) présentent une homologie de structure forte. Ils sont constitués d'une partie extracellulaire, qui permet la liaison du ligand, d'un domaine transmembranaire, et d'une partie intracellulaire formée d'au moins deux domaines : un domaine catalytique (domaine d'activité kinase), qui fixe une molécule d'ATP, lie et phosphoryle la cible, et un domaine de régulation allostérique qui module l'activité catalytique (Eglen and Reisine, 2009). A l'état physiologique, l'activation d'un RTK met en jeu la fixation d'un ligand qui induit la dimérisation (homo ou hétérodimérisation) du récepteur, rapprochant les structures kinases qui s'activent, par perte de l'auto-inhibition, et assurent l'autophosphorylation de résidus tyrosine des domaines intracytoplasmiques. Ces résidus, principalement localisés en dehors du site catalytique, assurent le recrutement de protéines intermédiaires de la signalisation, *via* la liaison à des domaines SH2 (Src Homology 2) ou des domaines de liaison phosphotyrosine (PTB, *phosphotyrosine binding domains* en anglais) qui, à leur tour, sont activées par phosphorylation *via* les domaines kinases activés des récepteurs. Ainsi une cascade d'activation se met en place assurant la transmission intracellulaire de signaux vers le noyau (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Schlessinger, 2000) (Fig. 10).



**Figure 10 : Mécanisme d'activation des protéines à activité kinase (Blume-Jensen and Hunter, 2001).**  
**Gauche** : en l'absence de stimulation, le récepteur est dans une conformation qui réprime l'activité kinase.  
**Droite** : en présence de ligand, le complexe ligand-récepteur se dimérise. La conformation du récepteur s'active, permettant ainsi l'autophosphorylation du domaine kinase. *Bleu* : conformation empêchant la fixation du substrat. *Vert* : conformation permettant la fixation du substrat. *Orange* : région juxtamembranaire. *Rouge* : région C-terminale.



### 1.2.3 Protéines à activité kinase et cancer

#### 1.2.3.1 Protéines à activité kinase et oncogénèse

Les protéines à activité TK sont donc des régulateurs majeurs des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans des fonctions essentielles de survie et de développement, dont l'activité est normalement hautement contrôlée et régulée par des mécanismes d'autocontrôle assurant l'inhibition des domaines catalytiques. Toute dérégulation de l'activité kinase, le plus souvent en lien avec une exacerbation de la fonction physiologique, engendre donc une perturbation de la signalisation qui est à l'origine du développement tumoral (Vignot S., 2008).

De façon générale, les capacités transformantes des cellules peuvent être imputées à une augmentation de l'activité kinase, soit liée à des altérations intrinsèques de la kinase, soit liée à des altérations qualitatives et quantitatives des voies de signalisation en amont. Quatre mécanismes ont été identifiés et impliqués dans cette perte de régulation des signaux et l'activation oncogénique des récepteurs TK : la transduction rétrovirale d'un proto-oncogène codant une protéine TK ; les réarrangements du génome tels que des translocations chromosomiques générant des protéines de fusion oncogénique portant un domaine d'activité TK ; les mutations de type gain de fonction siégeant dans les domaines TK ; les surexpressions de protéine TK liées à une amplification génique (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

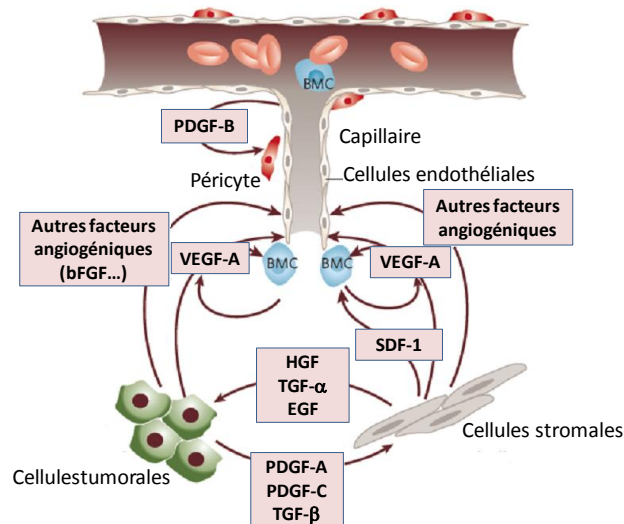
Un des paradigmes de ces mécanismes est la translocation chromosomique  $t(9;22)^7$  qui conduit au gène de fusion *Bcr/Abl*, codant une protéine cytosolique à activité kinase (Bcr/Abelson), impliquée dans le développement tumoral de la leucémie myéloïde chronique (LMC). Parmi les autres exemples représentatifs citons les mutations activatrices ciblant le récepteur HER-1 (EGFR) liés au développement de divers cancers dont le cancer colorectal, et la surexpression du récepteur HER-2, par amplification génique, impliquée dans certaines formes de cancers du sein.

#### 1.2.3.2 Protéines à activité kinase et angiogénèse

Si l'angiogénèse n'est pas à l'origine du développement des cancers, elle a clairement été identifiée comme un élément clé de la croissance tumorale qui participe également à la dissémination de la maladie (Ferrara and Kerbel, 2005; Folkman and Klagsbrun, 1987). Ce processus physiologique, qui conduit à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire existant, est un mécanisme multi-étapes (quiescence, activation, résolution), qui met en jeu de nombreux

<sup>7</sup> Chromosome Philadelphie

acteurs moléculaire agissant en particulier par l'intermédiaire de récepteurs à activité tyrosine kinase localisés à la surface des cellules endothéliales vasculaires (Carmeliet and Jain, 2011). Lors de la maladie cancéreuse, l'angiogenèse est exacerbée, assurant l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires à la prolifération et assurant la dissémination des cellules cancéreuses (Fig. 11).



**Figure 11:** Principaux éléments cellulaires et moléculaires impliqués dans l'environnement tumoral (Ferrara and Kerbel, 2005).

Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire<sup>8</sup> VEGF-A et VEGF-B sont des facteurs pro-angiogéniques essentiels dans la progression tumorale. Ils sont impliqués dans la formation de néo-vaisseaux et la perméabilité capillaire, et exercent leur action par des récepteurs à activité TK : VEGFR-1, VEGFR-2 (ou KDR) et VEGFR-3. A ce jour, l'implication du VEGF-A et du récepteur VEGFR-2 est la mieux caractérisée dans l'angiogénèse tumorale. Des surexpressions de l'ARNm de *VEGF-A* et de sa protéine sont notamment décrites dans de nombreuses tumeurs, en réponse à l'hypoxie ou à l'expression d'oncogènes (Ferrara and Kerbel, 2005). D'autres molécules jouent un rôle important dans le développement et la différenciation des vaisseaux. Le PDGF-β (platelet-derived growth factor-beta) est notamment impliqué dans le recrutement des péricytes exprimant le récepteur TK au PDGF (PDGF-R) et la maturation de la microvascularisation (Ferrara and Kerbel, 2005). Les angiopoïétines (ANG), qui agissent *via* leur récepteur Tie-2, ont été impliquées dans le processus tumoral, avec des effets dépendant du

<sup>8</sup> Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) en anglais.

contexte. Si l'angiopoïétine ANG-1 stimule la croissance tumorale, elle inhibe également l'extravasation cellulaire. L'angiopoïétine ANG-2 quant à elle, stimule l'angiogenèse et induit le recrutement de monocytes pro-angiogéniques (Carmeliet and Jain, 2011). Les chémokines, en particulier SDF-1 $\alpha$  ou CXCL12, participent également à la régulation de l'angiogenèse, en recrutant des cellules immunes pro-angiogéniques et des cellules endothéliales progéniteur exprimant son récepteur CXCR4. Enfin, plus récemment, la voie de signalisation activée par le récepteur NOTCH, et mettant en jeu les ligands DDL4 et JAGGED1, a été impliquée dans la néovascularisation (Carmeliet and Jain, 2011).

### 1.2.3.3 Addiction oncogénique

L'identification et l'implication d'oncogènes dans le développement tumoral a conduit au concept d'addiction oncogénique traduisant la dépendance des cellules tumorales vis à vis de certaines de ces anomalies moléculaires (Weinstein, 2002; Weinstein and Joe, 2006). Les preuves de ce concept ont été apportées par trois systèmes que sont : les modèles de cancers humains sur souris génétiquement modifiées, les études cellulaires des mécanismes d'oncogenèse et les essais cliniques mettant en jeu des agents thérapeutiques ciblés (Weinstein and Joe, 2006). Le phénotype des cellules cancéreuses, qui accumulent au cours du temps des modifications génétiques et épigénétiques, reposerait donc plus particulièrement sur une ou plusieurs altérations clés dont l'identification apparaît essentielle pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses efficaces. Ces altérations, qualifiées de « talon d'Achille » du cancer par Weinstein, codent ainsi pour des protéines identifiées comme des cibles moléculaires thérapeutiques de choix (Gazdar, et al., 2004; Weinstein, 2002; Weinstein and Joe, 2006).

Dans le cadre du CMT, le développement tumoral a clairement été lié à une addiction oncogénique vis à vis du proto-oncogène *RET* dont les mutations activatrices conduisent à l'activation constitutive et incontrôlée du récepteur à activité tyrosine kinase codé. Les protéines qui ont un rôle clé dans l'oncogenèse et l'angiogenèse, en particulier les récepteurs à activité kinases et leurs ligands, ont donc été identifiés comme des cibles moléculaires potentielles pour le développement de nouveaux traitements, les thérapies dites moléculaires ciblées.

## 2. Thérapeutiques moléculaires ciblées en cancérologie, place des inhibiteurs d'activité kinase

Les thérapies moléculaires ciblées font référence à des stratégies thérapeutiques dirigées contre des cibles moléculaires impliquées dans le processus de transformation néoplasique. Différentes stratégies ont été développées, dont les plus avancées sont les anticorps monoclonaux et les molécules de synthèse, en particulier les inhibiteurs d'activité kinase.

### 2.1 Les différentes stratégies thérapeutiques

Avant de détailler les différentes stratégies thérapeutiques, il est important de souligner que l'identification d'une cible moléculaire impliquée dans le processus tumoral est nécessaire comme point de départ d'une thérapie ciblée mais n'est pas suffisante. En effet, cette cible doit être également « druggable », c'est à dire que les propriétés chimiques de la biomolécule cible doivent notamment permettre une liaison du candidat médicament avec une affinité suffisante. Les cibles thérapeutiques potentielles sont donc à l'intersection entre le génome « druggable » et les gènes clés de l'oncogenèse (Hopkins and Groom, 2002; Perot, et al., 2010). Les protéines à activité TK, en particulier les récepteurs TK, répondent à ces caractéristiques de cible « druggable ». Elles ont conduit au développement de molécules ayant pour but de bloquer leur activation en ciblant soit l'interaction ligand/récepteur, par exemple grâce à un anticorps monoclonal, soit la cascade de signalisation intracellulaire, par exemple grâce à un inhibiteur tyrosine kinase de synthèse.

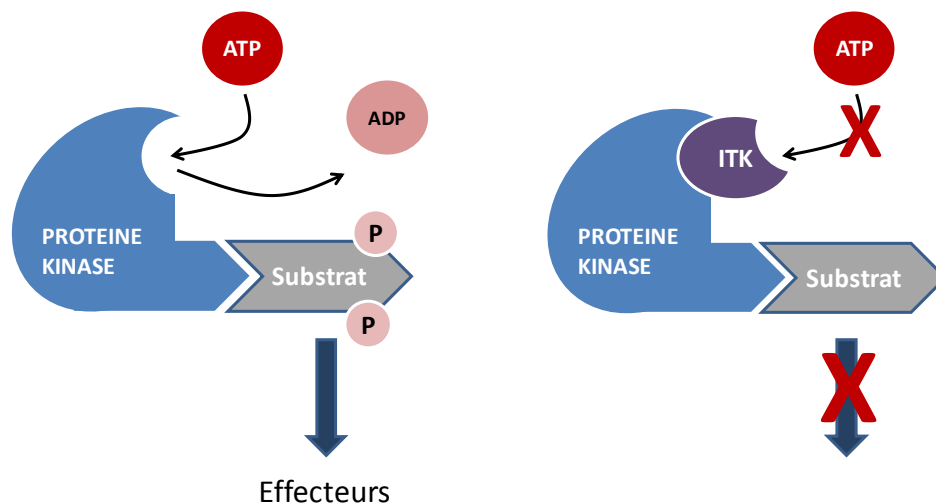
#### 2.1.1 Anticorps monoclonaux thérapeutiques

Les anticorps thérapeutiques, molécules de haute masse moléculaire ou macromolécules, vont agir exclusivement au niveau extracellulaire. Ils permettent de bloquer l'interaction ligand/récepteur par encombrement stérique en s'associant soit au ligand soit au récepteur. Ces molécules présentent l'avantage d'être hautement spécifiques de leur cible et trouvent un intérêt thérapeutique en cas de surexpression du ligand ou du récepteur sauvage. La preuve de leur efficacité et de leur utilité a été démontrée dans plusieurs types de cancers en particulier dans les formes de cancer du sein surexprimant le récepteur HER-2 (Herceptine®, Trastuzumab) ou le cancer colorectal exprimant EGFR (Erbix®, Cetuximab) (Baselga, 2001a; Baselga, 2001b; Tokuda, et al., 2001). Les anticorps thérapeutiques sont également des traitements de choix en tant qu'antiangiogéniques, ciblant en particulier le VEGF (Avastin®, Bevacizumab). Les

principaux inconvénients de ces traitements sont liés à l'immunogénicité induite par ces macromolécules et leur modalité d'administration par voie injectable.

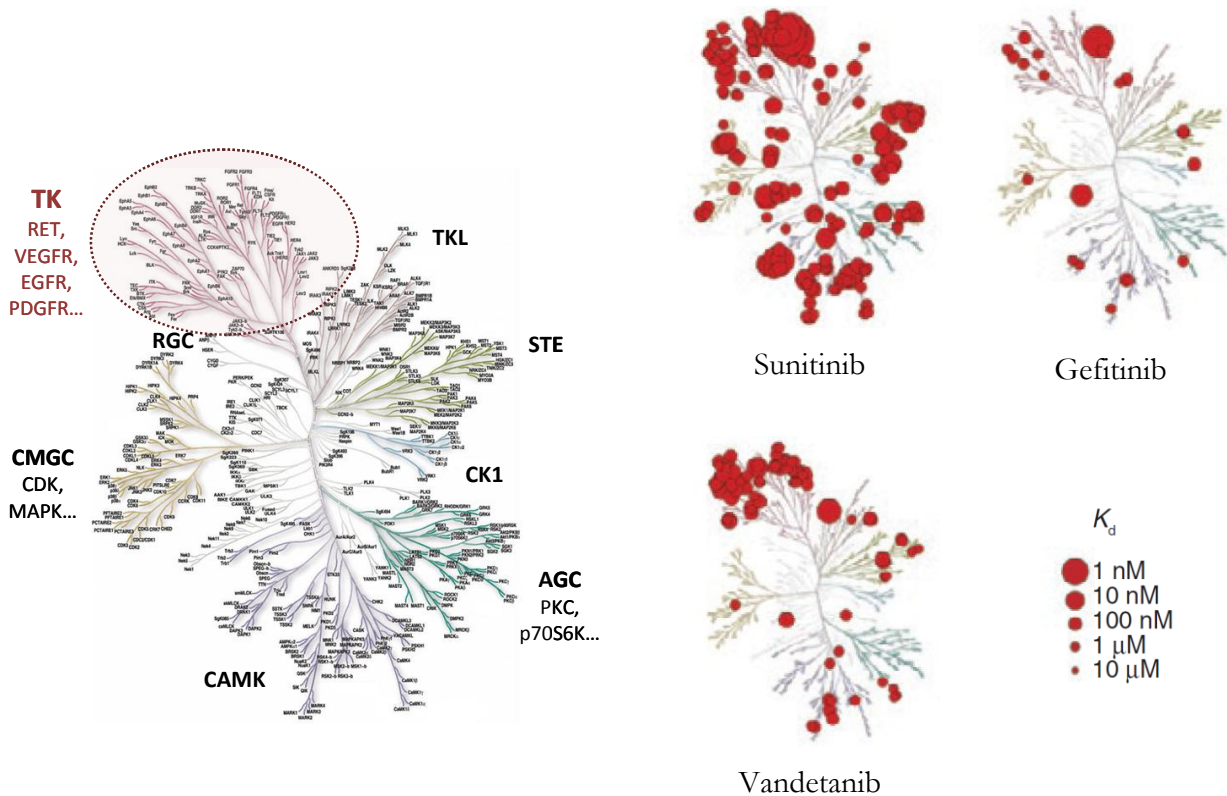
### 2.1.2 Molécules de synthèse organique

Le deuxième grand axe de thérapie moléculaire ciblée est celui des molécules de synthèse organique, principalement représentées par les petites molécules inhibitrices de l'activité kinase, en particulier de l'activité tyrosine kinase (TK). Il s'agit d'inhibiteurs réversibles et compétitifs de la fixation d'une molécule d'ATP qui, en prenant la place de l'ATP dans la poche d'activité kinase, vont empêcher la phosphorylation des adaptateurs protéiques et donc l'activation de la cascade de signalisation intracellulaire (**Fig. 12**).



**Figure 12 : Mécanisme d'action des inhibiteurs compétitifs de l'ATP.** Exemple d'un inhibiteur d'activité tyrosine kinase, ITK.

De faible masse moléculaire et le plus souvent liposoluble, les ITKs sont administrés par voie orale. Au niveau cellulaire, ils passent facilement la membrane cytoplasmique pour agir dans le domaine intracellulaire. Ces mimétiques de l'ATP sont moins spécifiques que les anticorps monoclonaux, ne ciblant pas une protéine donnée mais un mécanisme particulier, celui de la phosphorylation. En effet, le site de fixation de l'ATP étant une structure fortement conservée entre les différentes protéines, les ITKs vont agir sur un panel de cibles à activité TK avec des affinités plus ou moins importantes permettant de définir pour chaque ITK un spectre d'activité kinase spécifique (**Fig. 13**).



**Figure 13 :** Dendrogramme<sup>9</sup> des protéines kinases (gauche) et exemple de profils d'activité kinase d'inhibiteurs plus ou moins sélectifs (droite) (Karaman, et al., 2008; Manning, et al., 2002). TK : tyrosine kinase ; TKL : tyrosine kinase like ; STE : homologs of yeast sterile 7, sterile 11 ; CK1 : casein kinase 1 ; AGC : ; CAMK : calcium/calmodulin dependant protein kinase ; CMGC : containing CDK, MAPK, GSK3 families; RGC : receptor guanylate cyclase.

Le paradigme de ces nouveaux médicaments est l'imatinib (Glivec®), utilisé avec succès dans la leucémie myéloïde chronique (LMC). Depuis, un très grand nombre d'ITKs ont été développés dont une partie a fait la preuve de son efficacité en clinique. Notons en particulier l'imatinib ciblant cKIT dans les tumeurs gastro-intestinales stromales (GIST), le gefitinib et l'erlotinib deux inhibiteurs d'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules ou bien encore le sunitinib, inhibiteur multikinase doté de propriétés antiangiogéniques, dans les GIST et les cancers du rein. Des ITKs de seconde génération sont en cours de développement, bénéficiant de meilleures connaissances des mécanismes d'action de ces traitements et des phénomènes de résistance liés aux premiers ITKs. Il s'agit par exemple d'inhibiteurs non réversibles (EK-569, CI-1033, HKI-272 ciblant EGFR), d'inhibiteurs actifs vis à vis de formes mutées de récepteurs ou bien encore de composés actifs sur des variants de mutations résistants aux ITKs de 1<sup>ère</sup> génération (exemple, dasatinib dans la LMC).

<sup>9</sup> Diagramme utilisé pour illustrer l'arrangement de groupes générés par un regroupement hiérarchique.

De nouveaux inhibiteurs, non compétitifs de l'ATP sont également à l'étude (Vignot S., 2008). Les ITKs ont donc une place majeure dans les thérapies moléculaires ciblées actuellement utilisées en clinique et en cours de développement.

### 2.1.3 Autres stratégies

Parmi l'ensemble des thérapies moléculaires ciblées, d'autres stratégies ont été développées telles que le VEGF-trap (Aflibercept), les inhibiteurs de la transduction du signal autres que les ITK (exemple, inhibiteurs de mTOR – Temsirolimus), les inhibiteurs du cycle cellulaire (exemple, inhibiteurs de CDK), les ARN interférences, ou bien encore la thérapie génique (Vignot S., 2008).

## 2.2 Problématiques liées à l'utilisation des ITK

Grâce à leur efficacité clinique démontrée et leurs modalités d'utilisation, ces nouvelles thérapies anticancéreuses ont, de part leurs mécanismes d'action, révolutionné la prise en charge thérapeutique de nombreux patients atteints de cancer. La qualité de vie des patients traités a été considérablement améliorée en lien avec une administration orale de ces molécules permettant un traitement à domicile, et des toxicités réduites liées à un meilleur ciblage des cellules cancéreuses. Cependant, il est important de souligner que ces traitements doivent être administrés au long cours, pour répondre à la caractéristique d'addiction oncogénique des cancers traités et que les toxicités induites par les ITKs ne sont pas négligeables, en particulier celles liées à un traitement de longue durée, dont l'importance et la portée restent à définir. Par ailleurs, comme pour les chimiothérapies dites conventionnelles, des patients non répondeurs, des phénomènes de résistance et d'échappement au traitement ont été décrits avec les ITKs, soulevant la question de la sélection des patients à traiter par ces inhibiteurs et les modalités d'évaluation précoce de la réponse afin de pouvoir proposer une alternative thérapeutique en cas d'échec.

A ce jour, les critères de prescription des thérapies moléculaires ciblées restent globalement imprécis. En effet la prescription des ITKs n'est conditionnée à l'expression de la cible moléculaire incriminée dans le développement tumoral que dans certaines pathologies (chromosome Philadelphie pour le Glivec® ; expression d'EGFR pour le Tarceva®). Par ailleurs, d'autres critères (cliniques, histologiques, moléculaires) devraient être pris en compte pour mieux

prédire et améliorer la réponse clinique. L'identification et la validation de critères « théradiagnostique »<sup>10</sup>, permettant de poser précisément le diagnostic sur lequel reposera le choix thérapeutique, et de facteurs prédictifs de la réponse est un enjeu majeur pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients. Les modalités d'évaluation de la réponse aux thérapies moléculaires ciblées, et plus particulièrement aux ITKs, doivent être améliorées. A ce jour, les critères RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors, en anglais) publiés en 2000 et mis à jour en 2009 (Eisenhauer, et al., 2009; Therasse, et al., 2000), qui reposent sur la mesure et le suivi de la taille de lésions cibles, sont en vigueur. Cependant, contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, les ITKs n'entraînent pas toujours et, en tous les cas pas précocement, de diminution du volume tumoral. L'évaluation de la réponse chez les patients traités par un ITK nécessite donc de développer de nouveaux critères. Les principaux axes de recherche dans ce domaine reposent sur les biomarqueurs protéiques circulants et l'imagerie fonctionnelle (Vignot S., 2008).

Les inhibiteurs d'activités tyrosine kinase, nouvelle classe thérapeutique majeure en oncologie, ont donc connu un développement clinique extrêmement rapide lié à leurs résultats prometteurs mais sur un rationnel au final peu étayé, laissant apparaître un certain nombre d'interrogations autour de leur utilisation et nécessitant le développement d'études précliniques pour mieux comprendre et utiliser ces traitements d'avenir.

---

<sup>10</sup> Critère diagnostique permettant de mieux guider le choix thérapeutique. Par exemple, la surexpression du récepteur HER-2 dans certaines formes de cancer du sein conduit au traitement de ces patientes par le Trastuzumab.



### 3. Place des inhibiteurs d'activité tyrosine kinase dans la prise en charge thérapeutique du cancer médullaire de la thyroïde

Nous illustrerons ici la place des inhibiteurs d'activité tyrosine kinase (ITK) dans le cancer médullaire de la thyroïde (CMT), en prenant comme exemple le sunitinib et le vandetanib, deux inhibiteurs à spectre large. Ces deux molécules font l'objet des travaux de recherche de ce travail dont les résultats seront présentés dans le chapitre 4.

#### 3.1 Développement des inhibiteurs d'activité tyrosine kinase dans le cancer médullaire de la thyroïde

Les patients atteints d'un CMT métastatique ou localement avancé étaient jusqu'à l'arrivée des thérapies moléculaires ciblées dans une impasse thérapeutique. La meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogenèse du CMT a été le rationnel du développement de ces nouveaux traitements. Ainsi, les principales cibles identifiées dans le CMT sont le récepteur à activité tyrosine kinase RET et de façon plus large, l'angiogenèse. Différentes stratégies thérapeutiques ont été envisagées pour cibler ces anomalies, en particulier des inhibiteurs d'activité kinase (Drosten and Putzer, 2006; Schlumberger, et al., 2008; Sebolt-Leopold and English, 2006). Les inhibiteurs d'activité kinase actuellement évalués dans le CMT sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, développés pour bloquer les voies de signalisation médiées par des récepteurs à activité tyrosine kinase, principalement les récepteurs RET, VEGFR et EGFR.

##### 3.1.1 RET, cible principale

Le récepteur RET est à ce jour la principale cible moléculaire identifiée dans l'oncogenèse du CMT. De nombreux ITKs sont en cours de développement, en particulier le vandetanib, le sunitinib et le xl-184 dont les premiers résultats cliniques et précliniques sont prometteurs (Tableau 2).

Molécule	Nom générique <i>Nom commercial</i>	Principales cibles		Références
<b>ZD6474</b> (AstraZeneca)	Vandetanib	RET VEGFR-2	VEGFR-3 EGFR	(Herbst, et al., 2007)
<b>SU11248</b> (Pfizer)	Sunitinib <i>Sutent®</i>	RET VEGFR-2 PDGFR-β	Flt-3 KIT FGFR-1	(Chow and Eckhardt, 2007)
<b>XL-184</b> (BMS)	Cabozantinib	RET VEGFR-1 VEGFR-2	c-MET FLT-3 KIT	(Kurzrock, et al., 2011)
<b>BAY-43 9006</b> (Bayer)	Sorafenib <i>Nexavar®</i>	RET VEGFR-1 VEGFR-2 VEGFR-3 PDGFR-β	FLT-3 KIT FGFR1 RAF BRAF P38 MAPK	(Wilhelm, et al., 2006)
<b>AMG 706</b> (Amgen)	Motesanib	RET VEGFR-1 VEGFR-2 VEGFR-3	PDGFR-β FLT-3 KIT	(Polverino, et al., 2006)
<b>E7080</b> (Tsukuba)	/	VEGFR-2 FGFRs	PDGFRs KIT	(Matsui, et al., 2008)
<b>AG-013736</b> (Pfizer)	Axitinib	VEGFR-1 VEGFR-2	VEGFR-3	(Verbeek, et al., 2011)
<b>GW786034</b> (GSK)	Pazopanib <i>Votrient®</i>	VEGFR-1 VEGFR-2 VEGFR-3	PDGFR-α PDGFR-β KIT	(Sherman, 2010)

**Tableau 2 : Principaux inhibiteurs d'activité tyrosine kinase évalués dans le traitement du cancer médullaire de la thyroïde (Schlumberger, et al., 2008).**

Il est intéressant de constater que l'ensemble de ces ITKs sont caractérisés par un spectre d'activité large, avec une activité vis-à-vis de RET mais également des récepteurs de l'angiogenèse (VEGFR, PDFGR). L'importance de chaque cible dans l'effet thérapeutique observé n'est à ce jour pas clairement définie.

### 3.1.2 Le VEGFR-2 (KDR) et l'angiogenèse

Le VEGFR-2 a également été identifié comme une cible moléculaire potentielle dans le CMT (Capp, et al., 2010; Rodriguez-Antona, et al., 2010). De façon plus générale, l'angiogenèse et ses récepteurs sont des cibles majeures en cancérologie. On constate que les inhibiteurs d'activité kinase actuellement testés dans cette pathologie ont, pour la plupart d'entre eux, une action anti-VEGFR-2 qui pourrait participer à l'efficacité clinique de ces traitements en jouant sur les cellules endothéliales (Schlumberger, et al., 2008). Par ailleurs, plusieurs ITKs antiangiogéniques, ne ciblant pas RET, sont également évalués en clinique (Tableau 2).

### 3.1.3 L'EGFR

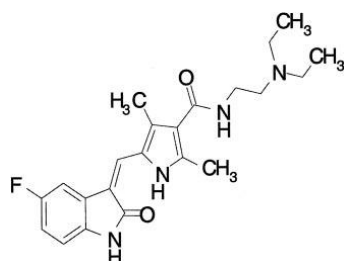
Des travaux *in vitro*, démontrant l'activité d'inhibiteurs de l'EGFR, tel que le gefitinib, dans des modèles de CMT, suggèrent que ce récepteur est impliqué dans le développement du CMT et pourrait constituer une autre cible thérapeutique (Vitagliano, et al., 2010). A ce jour, peu de données cliniques sont disponibles. Un essai de phase II est actuellement en cours d'évaluation dans les cancers thyroïdiens métastatiques ne répondant pas à l'iode radioactif (Gorla, et al., 2009) (Annexe 1).

## 3.2 Deux exemples, le sunitinib et le vandetanib

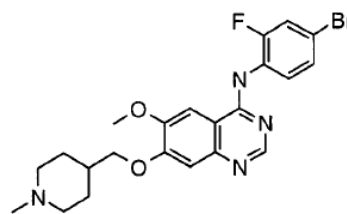
### 3.2.1 Relations structure – activité

- Structure

Le sunitinib et le vandetanib, bien que partageant la même fonction, présentent une structure chimique distincte (Fig. 14). Le sunitinib ou SU11248 ou (N-[2-(diéthylamino)éthyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)méthyl]-2,4-diméthyl-1H-pyrrole-3-carboxamide) appartient à la famille des indolinones. Le vandetanib ou ZD6474 ou [N-(4-bromo-2-fluorophényl)-6-méthoxy-7-[(1-méthylpiperidin-4-yl)méthoxy]quinazolin-4-amine] quant à lui est dérivé de la famille des anilinoquinazolines (Hennequin, et al., 2002; Hennequin, et al., 1999; Sun, et al., 2003). Ces molécules, comme les autres ITKs, présentent une faible masse moléculaire et, grâce à leur liposolubilité, passent facilement les membranes pour agir dans le compartiment intracellulaire.



**Sunitinib**  
Mr = 532.56 kDa

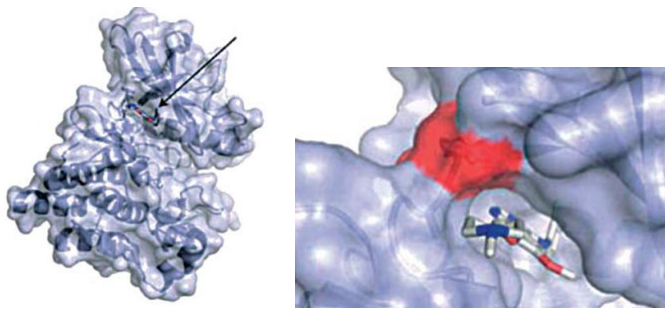


**Vandetanib**  
Mr = 475.36 ka

**Figure 14** : Structures chimiques du sunitinib (gauche) et du vandetanib (droite).

- Spectre d'activité

Le vandetanib et le sunitinib sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, venant se loger dans les « poches ATP » des différentes protéines kinases. La structure cristallographique du complexe ITK-RET a été décrite, en particulier pour le vandetanib, mettant en évidence l'insertion de cette molécule dans la poche ATP du domaine kinase du récepteur (Carlomagno, et al., 2009; Knowles, et al., 2006) (Fig. 15). Si en théorie le sunitinib et le vandetanib sont susceptibles de prendre la place de l'ATP de toutes les protéines à activité kinase, ils se fixent en réalité avec une affinité variable, définissant pour chacun un spectre d'activité kinase spécifique (Tableau 3). Il est important de souligner que ces spectres sont définis *a priori*, à l'aide de récepteurs purifiés ou de constructions cellulaires et ne permettent pas de décrire de façon exhaustive l'étendue des cibles de ces inhibiteurs. Par ailleurs, on constate que le sunitinib et le vandetanib ont une double activité, à la fois antiangiogénique en agissant sur des récepteurs de l'angiogenèse (VEGFR, PDGFR) et antioncogénique *via* leur action sur des protéines oncogéniques (RET, Kit, EGFR). On peut noter à ce sujet que le sunitinib et le vandetanib ont été sélectionnés et développés dans un premier temps pour leurs propriétés antiangiogéniques, en particulier *via* le ciblage du récepteur 2 au VEGF (KDR). Enfin, il est important de souligner que la part de chaque récepteur dans l'activité de ces inhibiteurs n'est pas clairement déterminée et que l'inhibition d'autres protéines kinases, non identifiées à ce jour, pourrait également participer aux effets observés.



**Figure 15 :** Structure du complexe vandetanib-domaine kinase de RET. Le vandetanib se lie à la poche ATP entre les lobes C et N. En particulier, la tyrosine 806 (rouge) interagit avec la chaîne aliphatique de la Lysine740 (Carlomagno,EndoRelCancer,09).

Protéine Kinase	CI <sub>50</sub> (nM)	
	Sunitinib	Vandetanib
VEGFR-2 (KDR)	10	40
<b>PDGFR-α</b>	ND	ND
<b>PDGFR-β</b>	10	>1 000
<b>KIT</b>	10-100	>20 000
VEGFR-3 (Flt-4)	ND	110
<b>RET</b>	100	130
<b>Flt-3</b>	250	ND
<b>EGFR</b>	ND	500
VEGFR-1 (Flt-1)	ND	>1 000

**Tableau 3 :** Spectre d'activité kinase du sunitinib et du vandetanib (Carlomagno, et al., 2002; Mendel, et al., 2003; Ryan and Wedge, 2005; Wedge, et al., 2002). CI<sub>50</sub>, concentration inhibitrice 50.

### 3.2.2 Développement clinique du vandetanib et du sunitinib

Le développement clinique du vandetanib et du sunitinib est en plein essor, et ces deux médicaments sont commercialisés dans différentes indications. Le sunitinib (Sutent®) a une AMM<sup>11</sup> européenne depuis 2006 dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) malignes non résecables et/ou métastatiques, après échec d'un traitement par le mésylate d'imatinib dû à une résistance ou à une intolérance, et dans le traitement des cancers du rein avancés et/ou métastatiques après échec d'un traitement à base d'interféron alpha ou d'interleukine 2. Dans ces indications, le sunitinib est prescrit à la posologie de 50 mg/j en prise orale, pendant 4 semaines suivies d'une interruption de 2 semaines. Le développement clinique du sunitinib dans le CMT est moins avancé. Plusieurs essais de phase II chez les patients métastatiques ont toutefois déjà été menés (Bugalho, et al., 2009; Carr, et al., 2010; Cohen, et al., 2008; Kelleher and McDermott, 2008; Ravaud, et al., 2010). A ce jour, 3 essais de phase II avec le sunitinib chez les patients atteints de CMT sont encours (**Annexe 1**). Il est intéressant de noter que, malgré ce développement clinique, les données précliniques publiées du sunitinib dans le CMT sont rares. Ces données montrent l'inhibition de la phosphorylation du récepteur RET par le sunitinib, en particulier dans le modèle de cancer papillaire de la thyroïde, caractérisé par la translocation activatrice RET/PTC (Kim, et al., 2006; Tomoda, et al., 2008).

Le vandetanib (Zactima®) a récemment obtenu une AMM aux Etats-Unis dans le traitement du CMT avancé (avril 2011). La procédure d'obtention d'AMM européenne est en cours et le médicament bénéficie en France depuis septembre 2010 d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative dans cette indication. Ce développement clinique fait suite aux bons résultats observés lors des essais de phase II et III chez les patients atteints de CMT métastatique ou localement avancé. L'étude de phase II a dans un premier temps mis en évidence des réponses partielles objectives durables et un contrôle de la maladie chez les patients traités avec cet inhibiteur (Wells, et al., 2010). Les résultats de l'essai de phase III (étude ZETA) ont montré un prolongement significatif de la survie sans progression chez les patients traités par le vandetanib. Le risque de progression de la maladie a ainsi été réduit de 54%. La survie globale n'a pas pu être analysée à ce jour. Le vandetanib a également permis d'améliorer les critères secondaires de jugement tels que la réponse objective, la médiane de durée de la réponse objective et une diminution des taux de calcitonine et d'ACE (Wells, et al., 2010). A ce jour, 5 essais de phase II évaluant le vandetanib dans le CMT sont en cours d'étude (**Annexe 1**).

---

<sup>11</sup> Autorisation de mise sur le marché.

Le spectre d'activité kinase large de ces 2 inhibiteurs, et en particulier leurs propriétés antiangiogéniques, expliquent leur utilisation pléiotropique dans d'autres étiologies de cancer. Les travaux précliniques, menés avec ces ITKs dans de nombreux modèles de cancers solides, posent le rationnel pour leur passage en clinique (Brave, et al., 2011; Cabebe, et al., 2011; Natale, et al., 2011; Sarkar, et al., 2010). A ce jour, le vandetanib est évalué dans plus de 80 essais dans des pathologies autres que le CMT, en particulier dans le cancer du poumon, du sein et du colon<sup>12</sup>. Il en est de même pour le sunitinib impliqué dans un peu plus de 360 essais dont 227 de phase II, en particulier dans les cancers du rein, du sein et du poumon. Ce nombre d'essais important met en avant le développement clinique extrêmement rapide de ces nouveaux anticancéreux au cours de ces 10 dernières années.

### 3.2.3 Toxicités induites par le sunitinib et le vandetanib

De part leur mécanisme d'action plus ciblé sur les anomalies moléculaires de l'oncogenèse, les thérapies ciblées, et en particulier des inhibiteurs d'activité kinase, sont susceptibles d'induire moins de toxicités que les chimiothérapies dites conventionnelles. Si ces nouveaux anticancéreux présentent effectivement moins de toxicités aiguës, décelées dans les phases précoces du développement clinique, ils ne sont cependant pas dénués de toxicités sévères (grade 3 et 4), en particulier au long cours, qui nécessitent l'interruption temporaire ou définitive du traitement.

La majorité des effets secondaires liés au vandetanib et identifiés lors de l'étude de phase II chez 30 patients atteints de CMT, ont été la diarrhée (70%), les rashes cutanés (67%), la fatigue (63%) et des nausées (63%), principalement de grade 1 et 2. Quelques interruptions de traitement ont également été décrites ainsi que de fréquentes diminutions de posologie. Un des principaux effets secondaires de grade 3 a été un allongement du QTc<sup>13</sup>. Enfin des augmentations de pression supérieures à 30 mmHg ont été décrites chez 75% des patients (Wells, et al., 2010). Les résultats préliminaires de l'étude de phase III menée chez les patients atteints de CMT (étude ZETA) ont mis en évidence un profil de toxicité plus important du vandetanib. Ainsi, plus de 35% des patients ont dû recevoir une dose plus faible d'inhibiteur, 47% ont dû interrompre leur traitement et des décès attribués à des effets secondaires du traitement ont été rapportés. Des effets secondaires de grade 3-4 ont été observés à des fréquences plus élevée qu'attendu, dans près de 55% des cas. Enfin, des allongements du QTc sont apparus chez 8% des patients traités par le vandetanib (FDA, 2 December 2010). Il est important de souligner que ce profil de toxicité

<sup>12</sup> Consultation du site <http://clinicaltrials.gov/> en date du 10 juin 2011.

<sup>13</sup> Intervalle QT (mesure du temps entre le début de l'onde Q et la fin de l'onde T dans un cycle électrique cardiaque) corrigé par la fréquence cardiaque.

cumulée du vandetanib est susceptible de limiter l'utilisation de cet inhibiteur chez les patients. De façon intéressante, l'étude de phase II évaluant l'activité clinique du vandetanib chez des patients atteints de CMT à la posologie de 100 mg/j, rapporte des toxicités moins importantes qu'à la posologie de 300 mg/j. Ces effets secondaires étaient principalement de grade 1-2. Par ailleurs seuls deux patients ont dû interrompre momentanément le traitement et un seul patient a présenté un allongement réversible du QTc (Robinson, et al., 2010).

Concernant le sunitinib, les principaux effets secondaires observés au cours des essais de phase I et II ont été l'asthénie, la diarrhée, les vomissements, l'hypertension, la thrombopénie, une neutropénie, une toxicité cutanée, et un syndrome mains-pied (Demetri, et al., 2006; Faivre, et al., 2006; Faivre, et al., 2009; Motzer and Bukowski, 2006). On note également qu'une diminution de posologie, secondaire à l'apparition d'une toxicité sévères (grade 3-4) a été nécessaire chez près de 50 % des patients. D'autres effets secondaires ont été identifiés en dehors des essais cliniques, notamment chez les patients traités au long cours avec cet inhibiteur. Ainsi l'hypothyroïdie induite par le sunitinib, décrite pour la première fois par Wolter et al. (Wolter, et al., 2007), a été confirmée par la suite par de nombreux groupes (Desai, et al., 2006; Mannavola, et al., 2007; Rini, et al., 2007; Wong, et al., 2007). Cette hypothyroïdie a notamment été retrouvée chez 50 à 80 % des patients traités par le sunitinib. Les mécanismes potentiels pouvant expliquer ce phénomène pourraient être une diminution de la vascularisation de la thyroïde, une atrophie de la glande, une thyroïdite secondaire, une diminution de la synthèse des hormones thyroïdiennes, une inhibition de la captation d'iode, une déplétion de la réserve fonctionnelle (Torino, et al., 2009). Plus récemment, une cardiotoxicité a également été décrite comme effet secondaire du traitement par sunitinib. Des insuffisances cardiaques ont ainsi été retrouvés chez près de 3% des patients (Khakoo, et al., 2008). Enfin des données récentes suggèrent un effet hypoglycémique du sunitinib devant être surveillé notamment chez les patients diabétiques (Agostino, et al., 2010; Lee, et al., 2011).

En conclusion, le vandetanib et le sunitinib sont 2 ITKs à spectre kinase large qui montrent des résultats prometteurs chez les patients atteints de CMT mais pour lesquels la caractérisation moléculaire de la réponse et les modalités d'utilisation et d'évaluation clinique restent à approfondir.

---

## **CHAPITRE 3**

### **PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS**

---



---

## CHAPITRE 3 : PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS

---

La médecine personnalisée, dont le but est de donner la bonne molécule, à la bonne dose, au bon patient, et au bon moment, est actuellement l'un des enjeux majeurs en cancérologie. Ainsi, depuis une dizaine d'années, à l'approche thérapeutique « one size fits all », se substitue progressivement une approche plus personnalisée basée sur les caractéristiques biologiques spécifiques de la tumeur et du patient. Depuis 30 ans, les progrès constants réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogenèse sont à l'origine de ce tournant dans la prise en charge thérapeutique des patients. La caractérisation moléculaire des tumeurs, tant au niveau génomique, transcriptomique, protéomique et plus récemment métabolomique, a bénéficié des avancées technologiques récentes, en particulier des technologies haut-débit (*CGH-array* ; *puces d'expression génique* ; *Reverse-Phase Protein Array* ; *puces phosphokinome...*) et a mis en évidence la diversité des cancers. En effet, des individus atteints d'un même type de cancer, défini selon l'organe cible et des caractéristiques histologiques comparables, présentent le plus souvent des cancers biologiquement et moléculairement différents auxquels les pronostics et les réponses thérapeutiques associés peuvent être extrêmement variables. Cette meilleure compréhension des bases moléculaires des cancers a également permis d'identifier des cibles biologiques servant au développement de traitements plus spécifiques, les thérapies moléculaires ciblées. La médecine personnalisée repose donc sur l'amélioration des connaissances cognitives de l'oncogenèse et nécessite en pratique la découverte et le développement de nouveaux biomarqueurs. Il s'agit de paramètres moléculaires, biochimiques ou cellulaires qui peuvent servir en clinique d'indicateur pour dépister précocement la maladie, réaliser un diagnostic précis, établir un pronostic, déterminer le traitement le plus adapté, prévoir la réponse, et suivre la réponse et l'évolution du patient au traitement afin de l'adapter.

Notre équipe de recherche, dont l'expertise relève en partie de la caractérisation des altérations moléculaires des tumeurs neuroendocrines, s'inscrit dans cette démarche de médecine personnalisée. Ainsi, un travail récent<sup>14</sup> nous a permis de caractériser les mécanismes oncogéniques des formes *RET* muté et *RET* sauvage des cancers médullaires de la thyroïde (CMT). Les résultats des profils d'expression génique, obtenus par analyse transcriptomique haut-débit, ont mis en évidence parmi les CMT *RET* sauvage, un sous-groupe de tumeurs partageant

---

<sup>14</sup> Thèse de N. Aneur, Analyse génomique des cancers médullaires de la thyroïde appliquée à l'étude comparative de l'oncogenèse humaine et murine. Soutenue le 30 janvier 2008.

un profil moléculaire avec les formes *RET* mutées agressives et un autre sous-groupe, plus proche des formes *RET* mutées plus indolentes, suggérant des voies d'oncogenèse partagées entre ces différentes formes de la maladie (Ameur, et al., 2009).

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité de ces études. Ils ont portés sur l'étude moléculaire de la pharmacologie du sunitinib et du vandetanib, dans des modèles de CMT. Le développement clinique rapide de ces thérapies ciblées repose sur un rationnel préclinique limité et l'optimisation de leur utilisation en clinique nécessite de mieux comprendre leur mécanisme d'action. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été à la fois cognitifs et cliniques, visant à améliorer la compréhension de la réponse moléculaire à ces deux inhibiteurs d'activité tyrosine kinase dans le cancer médullaire de la thyroïde, et ainsi identifier de nouveaux biomarqueurs.

Les résultats obtenus s'articulent autour de trois axes :

- dans un premier temps, nous avons étudié, par Reverse Phase Protein Array (RPPA) et dans des modèles précliniques, les changements induits par le vandetanib et le sunitinib sur des protéines impliquées dans les principales voies de signalisation cellulaire,
- dans un deuxième temps, par une approche transcriptomique haut-débit menée sur des modèles précliniques, nous avons caractérisé les principales fonctions cellulaires impliquées dans la réponse au vandetanib et au sunitinib et identifié de nouveaux biomarqueurs potentiels de réponse,
- dans un troisième temps, nous avons étudié l'intérêt de 3 approches dans le suivi et l'évaluation de la réponse chez des patients atteints de CMT et traités par inhibiteur d'activité tyrosine kinase. Pour cela nous avons réalisé : le développement d'une méthode de dosage du vandetanib pour étudier les relations pharmacocinétique - pharmacodynamique chez les patients traités par cet inhibiteur ; l'évaluation de biomarqueurs dans le sérum de patients traités par le vandetanib ; l'évaluation de l'imagerie fonctionnelle par échographie doppler dans un modèle expérimental (souris xénogreffées) dans le suivi de la réponse au sunitinib.

---

## **CHAPITRE 4**

### **RESULTATS & DISCUSSION**

---

---

## CHAPITRE 4 : RESULTATS & DISCUSSION

---

### 1. Signature moléculaire de la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase : étude des modifications des voies de signalisation en réponse au traitement.

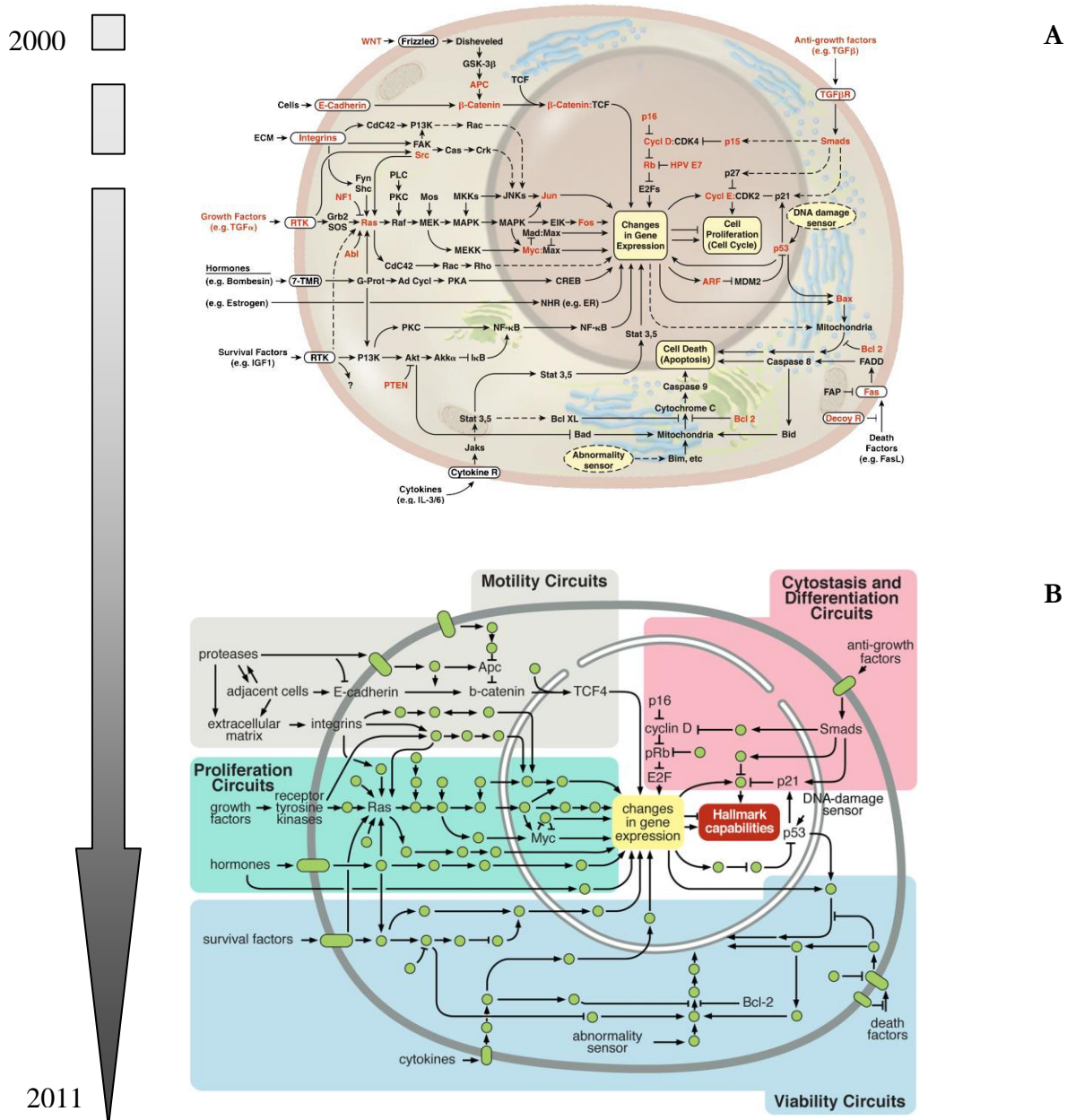
#### 1.1 Introduction

##### 1.1.1 Intérêts de l'étude des voies de signalisation

Comme nous l'avons présenté précédemment, le développement tumoral est caractérisé par l'acquisition de capacités fonctionnelles dont la mise en œuvre repose sur la dérégulation des réseaux de signalisation intracellulaire (**Fig. 16**) ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)). Schématiquement, la communication intracellulaire met en jeu de nombreuses molécules, organisées en voies de signalisation à la fois distinctes et interconnectées, assurant la transmission des signaux résultant, entre autres, de l'activation de récepteurs membranaires. Les connaissances acquises dans ce domaine ont permis de mettre en évidence la multiplicité et la complexité extrême de ces réseaux de communication, et de mieux comprendre leurs rôles dans le développement et la progression tumorale ([Hanahan and Weinberg, 2011](#)).

La transmission des signaux est réalisée majoritairement par des phénomènes de phosphorylation (activation) et déphosphorylation (inactivation) impliquant des kinases et des phosphatases. La phosphorylation par les protéines kinases est un des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle le mieux caractérisé et le plus fréquent. Elle intervient dans un très grand nombre de processus cellulaires et en particulier dans les mécanismes de signalisation. La phosphorylation induit des modifications structurales et fonctionnelles de la protéine cible, conduisant à une augmentation ou une inhibition de l'activité enzymatique, un changement de la localisation cellulaire, ou bien encore des associations avec d'autres protéines. La connaissance des circuits de signalisation, des molécules clés et des principales voies mises en jeu, est essentielle pour optimiser la prise en charge des patients, grâce à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et la sélection des traitements les plus adaptés ([Akkiprik, et al., 2006](#); [Parikh and Peppelenbosch, 2010](#)). En effet, la manière la plus efficace d'identifier les patients susceptibles de

répondre à un traitement donné serait de définir, avant toute administration, quelles voies de signalisation sont réellement activées dans la tumeur de chaque patient, et en parallèle, de connaître pour chaque traitement quelles sont les voies de signalisation ciblées (Wulfkuhle, et al., 2006). L'établissement d'une cartographie protéique fonctionnelle de la signature moléculaire de chaque tumeur et de la réponse à chaque traitement apparaît donc comme un enjeu majeur. Dans ce contexte, le développement de nouvelles méthodes permettant de mieux identifier ces protéines et leur état d'activation est essentiel (Parikh and Peppelenbosch, 2010).



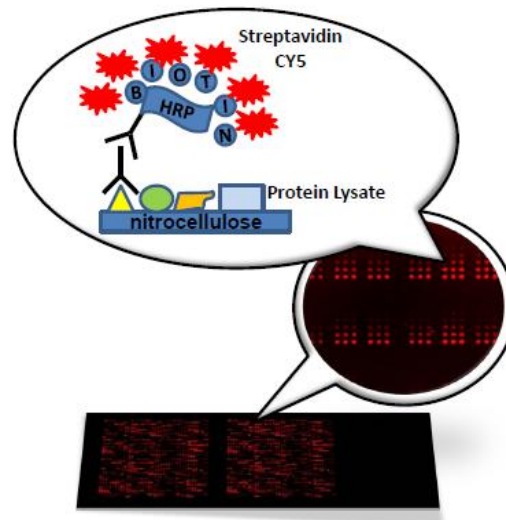
**Figure 16 :** Evolution de la compréhension des réseaux de signalisation intracellulaire mis en jeu lors de l'oncogenèse. **A-** principaux circuits identifiés en 2000. **B-** définition de sous-circuits de signalisation identifiés en lien avec les capacités fonctionnelles acquises par les cellules cancéreuses (*Hallmarks of cancer*) (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

### 1.1.2 La technologie Reverse-Phase Protein Array

L'analyse du protéome, ensemble des protéines exprimées dans un échantillon biologique à un instant donné, complémentaire des données d'expression du génome, permet notamment d'étudier les perturbations des voies de signalisation dans une tumeur et complète ainsi le décryptage moléculaire des mécanismes de l'oncogenèse (Akkiprik, et al., 2006; Gilibert, et al., 2010; Parikh and Peppelenbosch, 2010). En effet, parmi les molécules impliquées dans les réseaux de signalisation, les protéines, et en particulier les protéines membranaires et cytosoliques à activité kinase, jouent un rôle clé dans la transduction des signaux.

A ce jour, parmi les techniques d'étude du protéome, on distingue les approches par spectrométrie de masse, qui ne présupposent pas une connaissance biologique initiale et sont donc sans *a priori*, des autres approches qui, à l'inverse, nécessitent une sélection préalable des protéines à tester. Les approches non basées sur la spectrométrie de masse utilisent classiquement les techniques basées sur l'immuno-enzymologie (ELISA), le western-immunoblotting et l'immunohistochimie (IHC). Ces techniques ne permettent pas une analyse du protéome à grande échelle et/ou d'un grand nombre d'échantillons simultanément. C'est pourquoi, de nouvelles techniques d'analyse protéique basées sur l'utilisation d'anticorps ont été développées : les tissus microarrays (TMA) et les protein-arrays, dont la Reverse Phase Protein Array (RPPA) (Gilibert, et al., 2010; Walther and Sklar, 2011).

La RPPA est une technologie récente à haut-débit (Paweletz, et al., 2001), développée pour étudier l'expression de protéines et de leurs dérivés, en particulier phosphorylés, dans de petits échantillons (Berg, et al., 2010). La RPPA est un outil à fort potentiel à la fois en recherche fondamentale et en recherche clinique (Haab, 2003) dont le principe est celui d'un dot-blotting miniaturisé. Les échantillons biologiques sont déposés en petite quantité (~1 ng) à l'aide d'un robot sur une lame de verre recouverte d'une membrane de nitrocellulose. Dans un deuxième temps, l'hybridation avec un anticorps spécifique est réalisée pour détecter et quantifier le niveau d'expression d'une protéine donnée sur chacune des lames (**Fig. 17**). Cette technologie, qui permet d'étudier et de comparer plus de 1000 échantillons protéiques en parallèle, utilise des séries de dilution ainsi que des répliquats de chaque échantillon pour augmenter la robustesse des résultats (Akkiprik, et al., 2006; Gulmann, et al., 2006; Nishizuka, et al., 2003; Templin, et al., 2003; Wulfschlegel, et al., 2006).



**Figure 17 :** Représentation schématique du principe de la RPPA. Les échantillons protéiques (protein lysats) sont déposés directement sur une membrane de nitrocellulose, incubés avec un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt, puis incubés avec des anticorps secondaires marqués (HRP), couplés à un système de détection (Streptavidine Cyanine 5) (d'après L. De Koning, Institut Curie).

La RPPA peut être utilisée sur des échantillons de nature diverse tels que sérum, plasma et autres fluides biologiques mais aussi sur des surnageants de culture cellulaire, lysats tissulaires ou bien encore biopsies tissulaires. Ses applications sont nombreuses : découverte de nouveaux traitements, identification de biomarqueurs ou bien encore établissement de profils d'activité des voies de signalisation cellulaire. La RPPA est aussi un outil puissant pour suivre les changements d'expression de protéines sous forme totale, phosphorylée et clivée, au cours du temps, entre des tissus sains et des tissus cancéreux avant et après traitement, et entre les patients qui bénéficient du traitement et ceux qui ne répondent pas.

### 1.1.3 Objectifs du travail

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre la réponse moléculaire au sunitinib et au vandetanib, deux inhibiteurs d'activité tyrosine kinase utilisés dans le cancer médullaire de la thyroïde (CMT). Pour cela, en utilisant une méthode basée sur la Reverse-Phase Protein Array (RPPA), nous avons étudié le niveau d'expression et l'état d'activation d'un certain nombre de protéines impliquées dans les principales voies de signalisation lors de la réponse à ces ITKs dans des modèles précliniques de CMT. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article, soumis à *Biochemical Pharmacology*, et de travaux complémentaires.

## 1.2 Etude par Reverse Phase Protein Array des modifications des voies de signalisation induites par le vandetanib, dans un modèle humain de cancer humain de la thyroïde

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant et sera discuté dans la discussion §1.6 (p.77) :

**Changes in signaling pathways induced by vandetanib in a human medullary thyroid carcinoma model as detected by Reverse Phase Protein Arrays.** Sophie Broutin, Frédéric Commo, Leanne De Koning, Bérengère Marty, Ludovic Lacroix, Monique Talbot, Bernard Caillou, Anderson J Ryan, Corinne Dupuy, Martin Schlumberger, Jean-Michel Bidart. *Article soumis à Biochemical Pharmacology.*

Ce travail avait pour objectif d'étudier les modifications d'activation des principales voies de signalisation en réponse au vandetanib, dans un modèle humain de cancer médullaire de la thyroïde (CMT). Dans un premier temps l'activité *in vitro* et *in vivo* du vandetanib a été caractérisée dans la lignée cellulaire TT, mutée RET<sup>C634W</sup>. Nos résultats mettent en évidence l'activité antiproliférative, antitumorale et antiangiogénique du vandetanib dans ce modèle. Puis, l'effet du vandetanib sur le niveau d'expression de phosphoprotéines clés activées dans le CMT a été évalué par Reverse Phase Protein Array (RPPA). Les études cinétiques menées *in vitro* et *in vivo* montrent que les voies MAPK (Ras/Mek1-2/p44-42) et AKT sont les principales voies inhibées en réponse au vandetanib. Il a été montré que les voies de signalisation STAT3, mTOR et NFκB sont activées dans le CMT. Nos résultats mettent en évidence que le vandetanib n'a pas d'action inhibitrice sur ces voies. D'autre part, nous montrons que les résultats de RPPA sont comparables à ceux obtenus en western-blotting et immunohistochimie, suggérant que cette technologie haut-débit peut trouver sa place dans des applications biomédicales. Nos résultats confirment donc l'intérêt de la technologie RPPA pour l'étude à large échelle des modifications des voies de signalisation en réponse à des traitements. Ce travail a permis d'identifier les principales voies de signalisation mises en jeu lors de la réponse au vandetanib. Plusieurs voies de signalisation activées dans les CMT n'étant pas inhibées par le vandetanib, nous suggérons que des associations thérapeutiques entre le vandetanib et des inhibiteurs spécifiques de ces voies, tels que des inhibiteurs de mTOR ou de NFκB, pourraient améliorer la réponse thérapeutique chez les patients atteints de CMT métastatique.



## **Reverse Phase Protein Array demonstrates changes in signaling pathways induced by vandetanib in a human medullary thyroid carcinoma model.**

Sophie Broutin<sup>1</sup>, Frédéric Commo<sup>2</sup>, Leanne De Koning<sup>3</sup>, Bérengère Marty-Prouvost<sup>3</sup>, Ludovic Lacroix<sup>4</sup>, Monique Talbot<sup>1</sup>, Bernard Caillou<sup>4</sup>, Anderson J Ryan<sup>5</sup>, Corinne Dupuy<sup>1</sup>, Martin Schlumberger<sup>1,6</sup>, Jean-Michel Bidart<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>CNRS UMR8200, <sup>2</sup>INSERM U981, <sup>4</sup>Laboratoire de recherche translationnelle and <sup>6</sup>Département de Médecine Nucléaire et de Carcinologie Endocrinienne. Institut de Cancérologie Gustave Roussy and Univ. Paris-Sud, 94805 Villejuif, France.

<sup>3</sup>Département de recherche translationnelle, Institut Curie, Paris, France.

<sup>5</sup>Department of Oncology, University of Oxford, United Kingdom.

Number of text pages: 16

Table 0, figures 5, supplementary data 1

**Running Title** – RPPA Signature of Vandetanib in Medullary Thyroid Carcinoma.

**Key Words** – Vandetanib, Medullary Thyroid Carcinoma, Signaling pathways, RPPA.

### **Footnotes**

This work was supported by grants from Institut Gustave Roussy. S Broutin is a recipient from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

### **Funding and acknowledgments**

M Schlumberger and JM Bidart have declared research grants from the following companies: AstraZeneca, Bayer, Eisai, Exelixis, and Genzyme.

The authors thank Benoit Petit, Caroline Hego and Aurélie Barbet for their precious help.

**Corresponding author:** Pr. Jean-Michel Bidart, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France. *Tel.* +33 (0)1 42 11 40 24. *Email:* [bidart@igr.fr](mailto:bidart@igr.fr)

## Abstract

**Purpose:** Medullary thyroid carcinoma (MTC), a rare tumor due to activating mutations in the proto-oncogene *RET*, requires new therapeutic strategies. Vandetanib, a tyrosine kinase inhibitor that selectively targets RET, VEGFR and EGFR, has been recently approved to treat adult patients with metastatic MTC. The present study has two goals. First, to validate the novel reverse phase protein array method (RPPA) for exploring phosphoproteome in *in vitro* and *in vivo* experimental models of MTC. Second, to investigate changes in signaling pathways induced by vandetanib treatment and to propose potential combination with other kinase inhibitors.

**Experimental design:** The human TT RET<sup>C634W</sup> MTC cell line was used both *in vitro* and *in vivo* to assess the activity of vandetanib. Protein extracts from either *in vitro* TT cell culture or from mice xenografts, treated by increasing concentrations of vandetanib for different periods of time, were probed by a 12 antibodies set representing major signaling pathways using RPPA. Samples were also analyzed by western immunoblotting and immunohistochemistry.

**Results:** We first demonstrated that vandetanib displays antiproliferative and antiangiogenic activities and inhibits RET auto-phosphorylation. MAPK (Ras/Mek1-2/p44-42) and AKT pathways were the two major signaling pathways inhibited by vandetanib. Interestingly, other signaling pathways known to be involved in MTC oncogenesis, such as STAT3 and NFκB, were not inhibited at the phosphoproteome level by vandetanib treatment. Finally, comparable results were obtained in both the *in vitro* and *in vivo* approaches. Western immunoblotting and immunohistochemical observations were in agreement with the results obtained by RPPA.

**Conclusions:** Results confirmed the reliability and the potential utility of RPPA for screening global changes induced in signaling pathways by tyrosine-kinase inhibitors, on human MTC samples. MAPK and AKT were identified as the main pathways involved in vandetanib response in MTC models but our results also suggest alternative routes for controlling the disease.

## 1. Introduction

Medullary thyroid carcinoma (MTC) arises from calcitonin (CT)-producing parafollicular C cells and accounts for 5-8% of all thyroid cancers [1]. MTC occurs as either a sporadic form or in a familial context (25% of cases) including three distinct inherited cancer syndromes: familial MTC, multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A), and MEN2B [2, 3]. MTC patients with local disease may be cured after initial surgery and prognosis is generally favorable if the disease is treated at an early stage [4]. However, persistent or recurrent disease occurs in half of cases and distant metastases are the major cause of tumor related death. Cytotoxic chemotherapy or external radiation therapy are poorly effective and have not been proven to prolong survival [5, 6]. Up to now there is no effective systemic treatment and new therapeutic strategies are needed for locally advanced or metastatic MTC patients [6].

Activating mutations of the *RET* (ie, REarranged during Transfection) proto-oncogene, encoding a tyrosine-kinase receptor (TKR), are responsible for familial forms and are also detected in up to half of the patients with sporadic tumors [3]. Constitutive RET activation contributes to stimulation of several identified pathways such as RAS-ERK, c-JUNK, PI3K/AKT, p38MAPK, SRC, STAT and ERK5 signaling cascades, resulting in C cell growth and differentiation [3, 7, 8]. This led to the development of small compounds targeting the RET tyrosine-kinase activity, some of them being currently used in clinical practice [9, 10].

Vandetanib (AstraZeneca Pharmaceuticals) is a once-daily oral tyrosine kinase inhibitor that selectively targets RET, VEGFR (2 and 3) and EGFR signaling pathways [11-13]. Vandetanib has been shown to inhibit tumor cell proliferation in a broad range of preclinical models [13], including various RET mutant MTC cells [14, 15], fibroblasts expressing RET-derived oncogenes [16], a transplanted mouse model of human MTC [17], and a *Drosophila* model of RET-mediated tumorigenesis [18]. Moreover, vandetanib has been recently approved to treat adult patients with metastatic MTC who are ineligible for surgery and who have progressive or symptomatic disease.

Understanding how cancer cells respond to drugs remains challenging. Among array technologies, the high-density reverse phase protein array (RPPA) allows large scale tumor cell protein analysis. This semi-automated method, based on the spotting of cellular lysates that are then exposed to specific antibodies, proved to be efficient in both quantifying and

profiling protein changes [19, 20]. Further, it has the potential to rapidly determine how tumor cells respond to drugs and, thus, to guide the development of effective therapeutic strategies [21-23]. In the present report, the effects of vandetanib on the phosphorylation status of several major signaling proteins was investigated in *in vitro* and *in vivo* MTC models using RPPA. The MAPK (Ras/Mek1-2/p44-42), and AKT pathways were identified as the two major signaling pathways inhibited by vandetanib.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Compounds**

Vandetanib was provided by AstraZeneca (Pharmaceuticals, Macclesfield, United Kingdom). For *in vitro* experiments, vandetanib stock solutions were made in 100% dimethylsulfoxide (DMSO). Equivalent DMSO concentration (0.1%) served as vehicle control. For *in vivo* experiments, vandetanib was made as a suspension in sterile filtered 1% Tween 80 by gentle mixing with 4-mm borosilicate glass beads overnight.

### **2.2. Cell culture**

The TT cell line (CRL-1803™), derived from a human MTC harboring the RET/C634W mutation, was purchased from ATCC (Manassas, VA). TT cells were cultured in RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 2 mM L-glutamine (Glutamax®, Invitrogen), 100 units/ml penicillin-streptomycin and 0,25 µg/ml amphotericin (Antibiotic-Antimytotic®, Invitrogen).

### **2.3. TT cells xenografts in nude mice**

All animal experiments were carried out according to the French Laws for animal welfare under the supervision of authorized investigators. TT cells ( $5 \cdot 10^6$ ) in 200 µl of serum-free medium containing 50% Matrigel Matrix® (BD Biosciences, Bedford, MA) were injected *s.c.* into the flank of 38 six-week-old athymic nu/nu female mice. Tumor volume was measured using an Aplio® ultrasound scanner (Toshiba, France), equipped with a 14 MHz-probe (PZT, PLT-1204AT, Toshiba). Two weeks after cell injection, tumors reached a mean volume of 87 mm<sup>3</sup> ( $\pm 27$ ) and animals were randomized into 2 groups of 19 mice each: mice

then received (*per os*, once daily (5d/7)) either vandetanib (50 mg/kg/day) or vehicle (1% Tween 80 PBS solution). Tumor volume and body weights were monitored at weekly intervals. Mice were sacrificed 1 day (n=5/group), 4 days (n=5/group) or 46 days (n=9/group) after treatment initiation.

#### **2.4. Cell proliferation assay**

TT cells (4000/well) were seeded in 96-well plates and treated with vehicle or vandetanib over 9 days. Culture media were changed every three days. Cell proliferation was quantified by means of a colorimetric assay based on the reduction of the tetrazolium salt 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1®, Roche Applied Science) to formazan, according to manufacturer's instructions.

#### **2.5. Reverse phase protein array (RPPA)**

RPPA technology was used to explore the phosphorylation status of main signalling proteins after vandetanib treatment, as previously published [20]. This miniaturised dot-blot technology is based on robotic printing of different cell/tissue lysates onto nitrocellulose-coated glass slides. Proteins of interest are thus analyzed on all samples simultaneously using highly specific antibodies. Briefly, equal amounts of lysates were printed in serial dilutions onto nitrocellulose-coated glass slides. Each slide was probed with one out of a 12-antibodies set, specific for oncogenic pathways (MEK/p44-42, PI3K/AKT/mTOR, STAT3, NFκB). Antibodies used in the experiments are described in Supplementary data 1. Twenty-eight protein extracts from *in vitro* (n=24) and *in vivo* (n=4) experiments were profiled. For *in vitro* experiments, TT cells were cultured in the absence or the presence of vandetanib (100, 500 and 1000 nM) for 4, 24 and 72 hours. For *in vivo* experiments, TT xenografts were removed after 1 and 4 days of vandetanib (50 mg/kg/d) or placebo treatment.

#### **2.6. Western blot analysis**

For *in vitro* experiments, TT cells were treated with vehicle or vandetanib (100 and 1000 nM) over 3 days. For *in vivo* analysis, experiments were done with 4 day-treatment xenografts obtained as described above. Immunoblotting experiments were performed as previously described [24]. A rabbit polyclonal anti-RET antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-167, 1:500) (Santa Cruz, CA). Rabbit polyclonal antibodies directed against phospho-RET (3221, 1:750), MEK1-2 (9126, 1:1000), phospho-MEK1-2 (9154, 1:1000), p44/42 MAPK (9102, 1:1000), phospho-p44/42 MAPK (4377, 1:1000), AKT (4691,

1:1000) and phospho-AKT (9271, 1:750) were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA). Anti-GAPD (1: 1250) was a mouse polyclonal antibody from Millipore (Billerica, MA). Blots were incubated with primary antibodies overnight at +4°C. Immune complexes were detected with the West Dura Signal kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

## **2.7. Immunohistochemistry**

For immunohistochemistry experiments, TT xenografts were removed and then formalin-fixed. Four  $\mu\text{m}$  sections were prepared and used for histological examination after standard Hematoxylin and Eosin (H&E) staining or immunohistochemistry labeling with Ki-67 (SP6, 1:150, Neomarkers), CD34 (MEC 14.7, 1:50, Tebu-bio), and phospho-p44/42 MAPK (9102, 1:100, Cell Signaling Technology) antibodies. Microvessel density was quantified by counting the number of CD34-positive cells in three representative areas of  $0.3 \text{ mm}^2$  (x 200). The percentage of Ki-67-positive cells was estimated in one representative area (x 630). Negative controls were performed by omitting the primary antibody. All pictures were acquired on a Leica DM 2000 video camera.

## **2.8. Statistical analysis**

For cell viability and tumor growth studies, data are reported as means  $\pm$  SD or median. Statistical significance ( $p$  value < 0.05) was evaluated by paired Student's  $t$  tests and results were subjected to statistical analysis by using the GraphPad Prism software package, ver. 4.02 (Graph-Pad, San Diego, CA). For RPPA, elimination of background and normalisation between samples were achieved using negative controls (no primary antibody) and Sypro® Ruby slides (total protein stain), respectively. The ratio of the phosphorylated form to the whole form of each protein was calculated and then log transformed. The average of log(ratio) was then estimated by robust linear regression of log(ratio) against dilution factors (in a log scale). This procedure was used, independently, for each biological replicates. For each time-dependent series, results were adjusted on the corresponding dose 0. A two-ways ANOVA analysis was then used to define the significance of time and dose effect of vandetanib treatment exposure.

### 3. Results

#### 3.1. Antiproliferative effect of vandetanib on TT cells.

The effect of vandetanib on MTC was first evaluated *in vitro* on TT cells cultured over 9 days and treated with either vandetanib (100, 500 and 1000 nM) or vehicle as control. A significant antiproliferative effect, as assessed by WST-1 assay, occurred after 3 days of treatment for concentrations above 500 nM and after 6 days above 100 nM ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1A). This antiproliferative activity of vandetanib was correlated to the inhibition of RET kinase activity as shown by western-blotting experiments. Indeed, a dose dependent decrease of RET phosphorylation was observed after 24 hours, and reached a maximum after 3 days of vandetanib treatment (Fig. 1B).

#### 3.2. Antitumoral and antiangiogenic properties of vandetanib on xenografted nude mice.

Then, vandetanib effect was explored *in vivo* on nude mice bearing TT tumor cell xenografts. Mice were treated once daily (5d/7) with either vandetanib (50 mg/kg/day) or placebo for 7 weeks. Vandetanib treatment reduced the body weight gain profile but was not associated with any apparent toxicity and did not affect mortality. Vandetanib significantly inhibited tumor growth as soon as 4 days after initiation of the treatment ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2A). After 46 days of treatment, a 92% difference in tumor volume was observed between the 2 groups. After sacrifice at day 46, vandetanib treated tumors displayed a reduced number of tumor cells (-40%) and a decrease of tumor cell proliferation (-50%), as determined using Ki67 immunostaining (Fig. 2B), and a reduced number of vessels (-45%) (13  $\pm$  4 vs. 7  $\pm$  3), as demonstrated by CD34 immunostaining (Fig. 2B).

#### 3.3. Main cellular pathways involved in vandetanib response using RPPA profiling.

*In vitro* and *in vivo* signaling profile of vandetanib response was then explored by RPPA, allowing parallel analysis of various samples. Kinase activity was evaluated comparing the phosphorylated active form of a protein to its total form. In *in vitro* experiments, MEK1/2 activity was significantly decreased ( $p$  value  $< 0.01$ ) after vandetanib treatment. This inhibition of MEK1/2 activity was both time and concentration dependent and occurred after 24h and from 100 nM. A dramatic decrease was also observed, both *in vitro* and *in vivo*, for p44/42 activity, a downstream protein of MEK1/2, confirming the involvement of the MEK1/2 signaling pathway in the vandetanib response (Fig. 3).

We then examined the phosphorylation status of the AKT protein. A slight decrease in AKT activity was observed *in vitro* after 4 hours and 1 day of vandetanib treatment. Of note, an increase in AKT phosphorylation was observed at day 3. In *in vivo* experiments, a strong inhibition of AKT activity was noted after 4 days of vandetanib treatment (Fig. 3). Interestingly, similar results were observed for the p70S6K protein, a downstream effector of mTOR protein, both *in vitro* and *in vivo* (Fig. 3). Together, these results demonstrated that the PI3K/AKT signaling pathway is also involved in the vandetanib response.

Finally we explored activity of STAT3, and p65 proteins involved in STAT3 and NFκB pathways respectively. Results showed a trend for inhibition of STAT3 signaling while NFκB-p65 was significantly activated after vandetanib treatment (Fig. 3).

### **3.4. Validation of RPPA results by western-blotting and immunostaining.**

To confirm RPPA results, western-blotting and immunostaining experiments were carried out for a number of proteins identified as involved in the vandetanib signaling response. Western-blotting experiments confirmed the strong inhibition of MAPK (Ras/Mek1-2/p44-42) and PI3K/AKT pathways after vandetanib exposure (Fig. 4). Immunohistochemistry performed on TT xenografts after 1 and 4 days of treatment showed that p44/42 is active in the absence of drug and is strongly inhibited by vandetanib (Fig. 5A & 5B).

## **4. Discussion**

In the present study, we showed that, in *in vitro* and in *in vivo* MTC models based on the RET<sup>C634W</sup> TT cell line, vandetanib displays antiproliferative, antitumoral and antiangiogenic properties. *In vitro*, vandetanib strongly reduces proliferation of TT cells in a dose and time-dependent manner. This observation is in line with recent results showing a growth-inhibitory effect of vandetanib on a panel of medullary thyroid carcinoma cell lines, including the TT cells [14, 15]. *In vivo*, we demonstrated that vandetanib (50mg/kg/d) displays a strong antitumor effect on the TT cell xenograft model, as substantiated by the inhibition of tumor growth and the decrease in Ki67 immunostaining, in line with recent data [14]. Other multikinase inhibitors, such as sorafenib, have shown similar antitumor activity in the same model [25, 26]. Interestingly, tumor volume was not reduced by vandetanib but



tumor growth was rapidly stopped. Moreover, vandetanib decreased tumor angiogenesis, as shown by the significant reduction in microvessel density. This effect is likely to be due to the potent inhibition of VEGFR-2 that may contribute to its clinical efficacy.

Using the RPPA technology, we showed that the MAPK (Ras/Mek1-2/p44-42), and PI3K/AKT pathways were the two major signaling pathways, among those analyzed, inhibited by vandetanib. These findings are consistent with previous data involving PI3K/AKT and Ras/MAPK as major downstream RET signaling pathways [3, 7]. They are also in agreement with previous observations showing the inhibition of these proteins after vandetanib treatment in various cancer models, such as breast and lung cancers [14, 27-29]. However, other signaling cascades that have been involved in MTC pathogenesis, such as PLC- $\gamma$ , STAT3, NF $\kappa$ B, p38MAPK, and c-Jun N-terminal kinase, were not inhibited by vandetanib in the present MTC models [3, 7]. Moreover, the NF $\kappa$ B-p65 protein was significantly activated after vandetanib treatment. This observation that might be explained by a positive feedback loop induced by the drug as recently showed for chemotherapy and radiation [30, 31], deserves further investigation as NF $\kappa$ B activation appears to be a major component of the RET, RAS and BRAF pathway [32]. Interestingly bortezomib, a proteasome inhibitor that inhibits the NF $\kappa$ B pathway, exhibits a potent induction of TT cell-death at low concentrations [33]. Further, in our experiments, p70S6K, a downstream target of mTOR, appeared to be slightly modified under vandetanib action. Two recent reports indicate that the mTOR pathway is activated in primary MTC and metastasis and that TT cells proliferation is inhibited by RAD001 [34, 35]. Though inhibition of mTOR results in compensatory AKT activation, a resistance mechanism, combined mTOR and AKT inhibition results in sub-additive growth inhibition [36]. Together, and due to the absence of clinical complete responses with RET inhibitors and the absence of effects in some patients due to primary resistance and the emergence of secondary resistance, these observations open new ways for therapeutic combinations based on the comprehensive identification of molecular events induced by inhibitors [37].

RPPA is now recognized as a useful tool to detect quantitative changes in key molecules and to compare protein expression in large series of samples [38]. A few proteomic technologies have been successfully applied to identify new signaling elements in this rare tumor [39]. In the present study, similar results to those obtained by RPPA were also observed in western blotting and immunohistochemical experiments. Further, comparable results were obtained in our original approach combining both *in vitro* and *in vivo* TT cell experimental

models, reinforcing the reliability of the RPPA method. Together, these results underline the potential feasibility of incorporating RPPA in clinical practice, for testing biological changes associated to therapeutic intervention on fresh biopsies obtained from metastatic patients. Indeed, ensuring that phosphorylated isoforms of kinases are kept intact during pre-analytical phases is a critical step [40] and fresh material is likely to satisfy this challenge. It is noteworthy that the goal of the present study was not to give an exhaustive view of the pathways modified in response to vandetanib. Indeed, as described by others, a major limitation of the RPPA technology is the availability of good quality antibodies, which limits the number of proteins that can be analyzed [41]. Selecting the most appropriate candidates would result from the combination with genomic approaches [24].

In conclusion, RPPA allows a comprehensive identification of molecular events associated to the pharmacological effects of tyrosine kinase inhibitors in a large series of samples. This high-throughput technology proved to be of interest in improving knowledge on molecular mechanisms of action of vandetanib, providing rationale bases for the selection of new therapeutic strategies. Taken together our results show that antiproliferative, antitumoral and antiangiogenic activities of vandetanib on MTC models are likely to be due to MAPK and AKT pathways inhibition. Our results suggesting that combination of vandetanib with NF $\kappa$ B or mTOR inhibitors may be of value to improve therapeutic response deserve further investigations.

## Legends to Figures

**Figure 1.** Vandetanib displays antiproliferative activity in TT cells. **A)** Vandetanib blocks proliferation of TT cells in a dose- and time-dependent manner. TT cells were treated with vehicle or vandetanib over 9 days. Cell growth was measured by WST-1 assay. Bars,  $\pm$ SD. Unpaired t Test (\*\* $p < 0.001$ ). **B)** Vandetanib inhibits RET activation in TT cells in a dose- and time-dependent manner. TT cells were treated with vehicle or vandetanib for 24 and 72 hours. Lysates were immunoblotted with anti-RET, anti-phospho-RET/Y905 (P-RET), anti-GAPD as described in Methods.

**Figure 2.** Vandetanib inhibits TT cells tumor growth and angiogenesis in nude mice. TT xenografted nude mice (19/group) received vandetanib (50 mg/kg/day) or vehicle for 5 days/week for 46 days by oral gavage (day 1 is the treatment starting day). **A)** Tumor diameters were determined by ultrasonographic measures. Data represent the mean of tumor volume. Bars,  $\pm$ SD. Unpaired t Test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ). Mouse weights were slightly reduced with vandetanib but no apparent toxicity was associated. **B)** After 46 days, tumors were examined by conventional H&E (left), Ki67 immunostaining (middle) and CD34 immunostaining (right). Vandetanib reduced the number of tumor cells (-40%), the tumor cells proliferation (-50%) and the number of vessels by 45%. Representative micrographs are shown.

**Figure 3.** Effects of vandetanib on the phosphorylation status of several major signaling proteins as determined by RPPA. *Left* : TT cells were treated with vehicle or vandetanib (100, 500 or 1000 nM) for 4, 24 and 72 hours. *Right* : TT xenografted nude mice received vandetanib (50 mg/kg/day) or vehicle for 1 or 4 days. Bars, SD.

**Figure 4.** Validation of MAPK and PI3K/AKT pathways inhibition by vandetanib using western-blotting experiments. *Left* : TT cells were treated with vehicle or vandetanib (100 or 1000 nM) for 24 and 72 hours. *Right* : TT xenografted nude mice received vandetanib (50 mg/kg/day) or vehicle for 4 days.

**Figure 5.** Validation of MAPK pathways inhibition by vandetanib using immunohistochemistry experiments. **A)** Phospho-p44/42 immunostaining of TT xenografts from mice treated with vandetanib (50 mg/kg/day) or placebo during 1 day. **B)** Phospho-p44/42 immunostaining of TT xenografts from mice treated with vandetanib (50 mg/kg/day) or placebo during 4 days.

## References

1. Leboulleux, S., et al., *Medullary thyroid carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(3): p. 299-310.
2. Kouvaraki, M.A., et al., *RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors*. Thyroid, 2005. **15**(6): p. 531-44.
3. Santoro, M., et al., *Minireview: RET: normal and abnormal functions*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5448-51.
4. Roman, S., R. Lin, and J.A. Sosa, *Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2134-42.
5. Kloos, R.T., et al., *Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association*. Thyroid, 2009. **19**(6): p. 565-612.
6. Schlumberger, M., et al., *New therapeutic approaches to treat medullary thyroid carcinoma*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(1): p. 22-32.
7. de Groot, J.W., et al., *RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors*. Endocr Rev, 2006. **27**(5): p. 535-60.
8. Arighi, E., M.G. Borrello, and H. Sariola, *RET tyrosine kinase signaling in development and cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(4-5): p. 441-67.
9. Sherman, S.I., *Tyrosine kinase inhibitors and the thyroid*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(6): p. 713-22.
10. Wells, S.A., Jr. and M. Santoro, *Targeting the RET pathway in thyroid cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(23): p. 7119-23.
11. Bianco, R., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5069-80.
12. Ciardiello, F., et al., *Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(4): p. 1546-56.
13. Wedge, S.R., et al., *ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration*. Cancer Res, 2002. **62**(16): p. 4645-55.

14. Vitagliano, D., et al., *The tyrosine kinase inhibitor ZD6474 blocks proliferation of RET mutant medullary thyroid carcinoma cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2010. **18**(1): p. 1-11.
15. Verbeek, H.H., et al., *The effects of four different tyrosine kinase inhibitors on medullary and papillary thyroid cancer cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(6): p. E991-5.
16. Carlomagno, F., et al., *ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases*. *Cancer Res*, 2002. **62**(24): p. 7284-90.
17. Johanson, V., et al., *A transplantable human medullary thyroid carcinoma as a model for RET tyrosine kinase-driven tumorigenesis*. *Endocr Relat Cancer*, 2007. **14**(2): p. 433-44.
18. Vidal, M., et al., *ZD6474 suppresses oncogenic RET isoforms in a Drosophila model for type 2 multiple endocrine neoplasia syndromes and papillary thyroid carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3538-41.
19. Mueller, C., L.A. Liotta, and V. Espina, *Reverse phase protein microarrays advance to use in clinical trials*. *Mol Oncol*, 2010. **4**(6): p. 461-81.
20. Marty, B., et al., *Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(6): p. R101.
21. Cleator, S., W. Heller, and R.C. Coombes, *Triple-negative breast cancer: therapeutic options*. *Lancet Oncol*, 2007. **8**(3): p. 235-44.
22. Levin, V.A., et al., *Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(1): p. 179-91.
23. Rodriguez-Pinilla, S.M., et al., *Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(4): p. 474-81.
24. Broutin, S., et al., *Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in medullary thyroid carcinoma in preclinical models*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(7): p. 2044-54.
25. Akeno-Stuart, N., et al., *The RET kinase inhibitor NVP-AST487 blocks growth and calcitonin gene expression through distinct mechanisms in medullary thyroid cancer cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 6956-64.
26. Carlomagno, F., et al., *BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. **98**(5): p. 326-34.

27. Jane, E.P., et al., *Abrogation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling by vandetanib synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis in human glioma cells.* J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(1): p. 327-37.
28. Sarkar, S., et al., *ZD6474, a dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR-2, inhibits MAPK/ERK and AKT/PI3-K and induces apoptosis in breast cancer cells.* Cancer Biol Ther, 2010. **9**(8): p. 592-603.
29. Wu, W., et al., *Targeted therapy of orthotopic human lung cancer by combined vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor signaling blockade.* Mol Cancer Ther, 2007. **6**(2): p. 471-83.
30. Li, Q.Q., et al., *Involvement of NF-kappaB/miR-448 regulatory feedback loop in chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells.* Cell Death Differ, 2011. **18**(1): p. 16-25.
31. Veeraraghavan, J., et al., *Radiation-triggered Tumor Necrosis Factor (TNF) {alpha}-NF{kappa}B Cross-signaling Favors Survival Advantage in Human Neuroblastoma Cells.* J Biol Chem, 2011. **286**(24): p. 21588-600.
32. Pacifico, F. and A. Leonardi, *Role of NF-kappaB in thyroid cancer.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **321**(1): p. 29-35.
33. Mitsiades, C.S., et al., *Antitumor effects of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(10): p. 4013-21.
34. Rapa, I., et al., *Mammalian Target of Rapamycin Pathway Activation Is Associated to RET Mutation Status in Medullary Thyroid Carcinoma.* J Clin Endocrinol Metab, 2011.
35. Tamburrino, A. *Activation of the mTOR pathway in primary medullary thyroid carcinoma and lymph node metastases.* in ASCO meeting. 2011. Chicago: Abstract n°10598.
36. Holland, W.S., et al., *Evaluating rational non-cross-resistant combination therapy in advanced clear cell renal cell carcinoma: combined mTOR and AKT inhibitor therapy.* Cancer Chemother Pharmacol, 2011.
37. Yang, Y., et al., *ZD6474 induces growth arrest and apoptosis of GIST-T1 cells, which is enhanced by concomitant use of sunitinib.* Cancer Sci, 2006. **97**(12): p. 1404-9.
38. Speer, R., et al., *Molecular network analysis using reverse phase protein microarrays for patient tailored therapy.* Adv Exp Med Biol, 2008. **610**: p. 177-86.
39. Gorla, L., et al., *Proteomics study of medullary thyroid carcinomas expressing RET germ-line mutations: identification of new signaling elements.* Mol Carcinog, 2009. **48**(3): p. 220-31.

40. Parikh, K. and M.P. Peppelenbosch, *Kinome profiling of clinical cancer specimens*. *Cancer Res*, 2010. **70**(7): p. 2575-8.
41. Hong, B., et al., *Reverse phase protein array identifies novel anti-invasion mechanisms of YC-1*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **79**(6): p. 842-52.



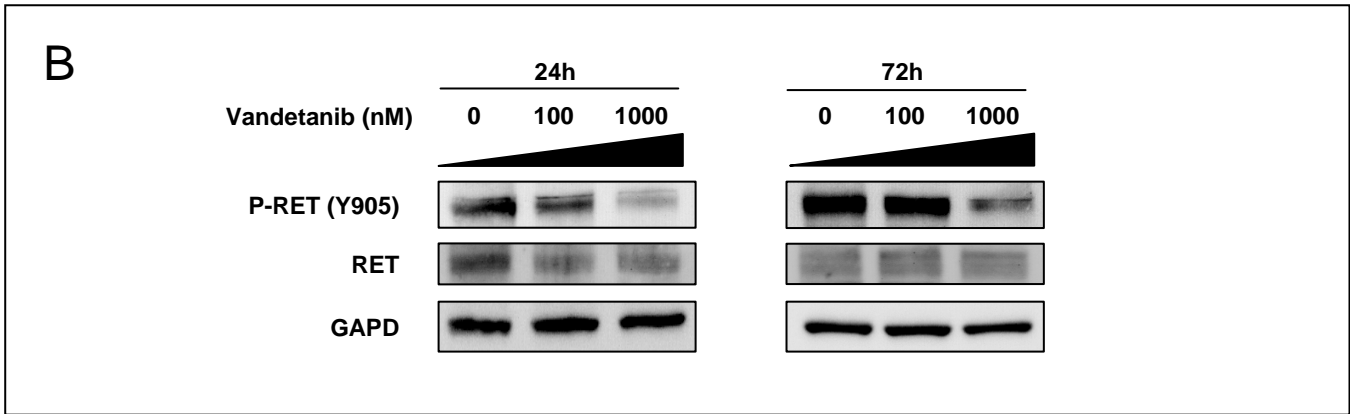
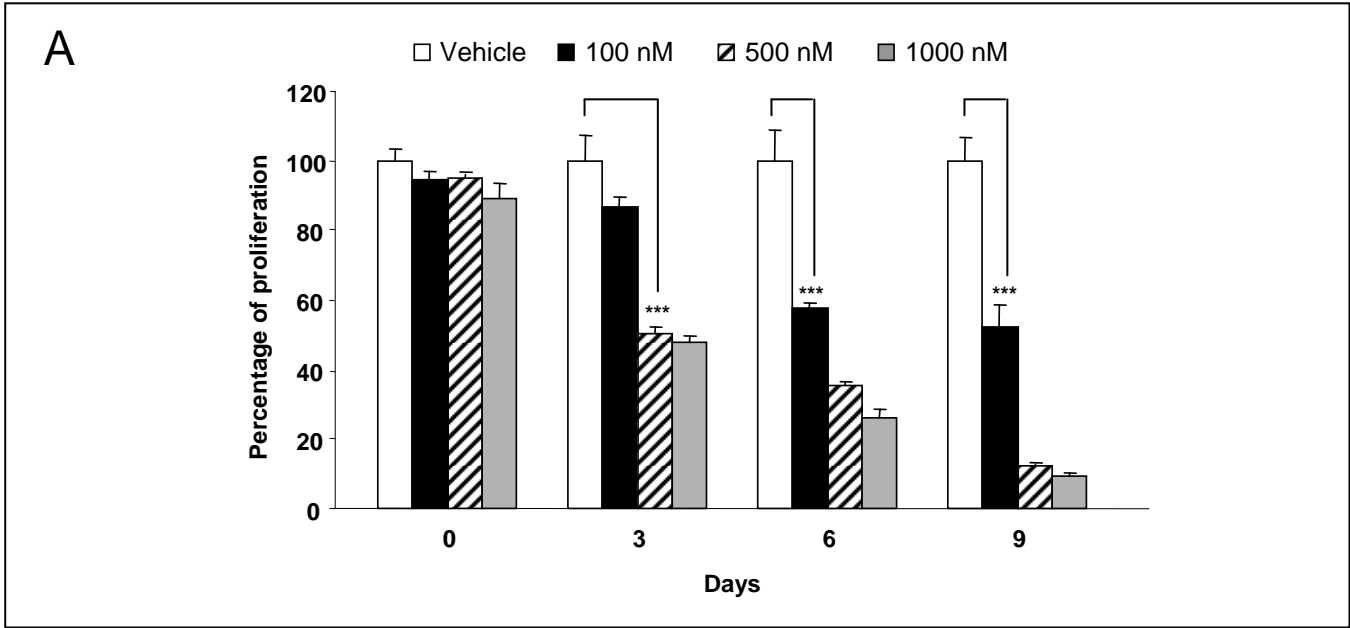


Figure 1\_Broutin

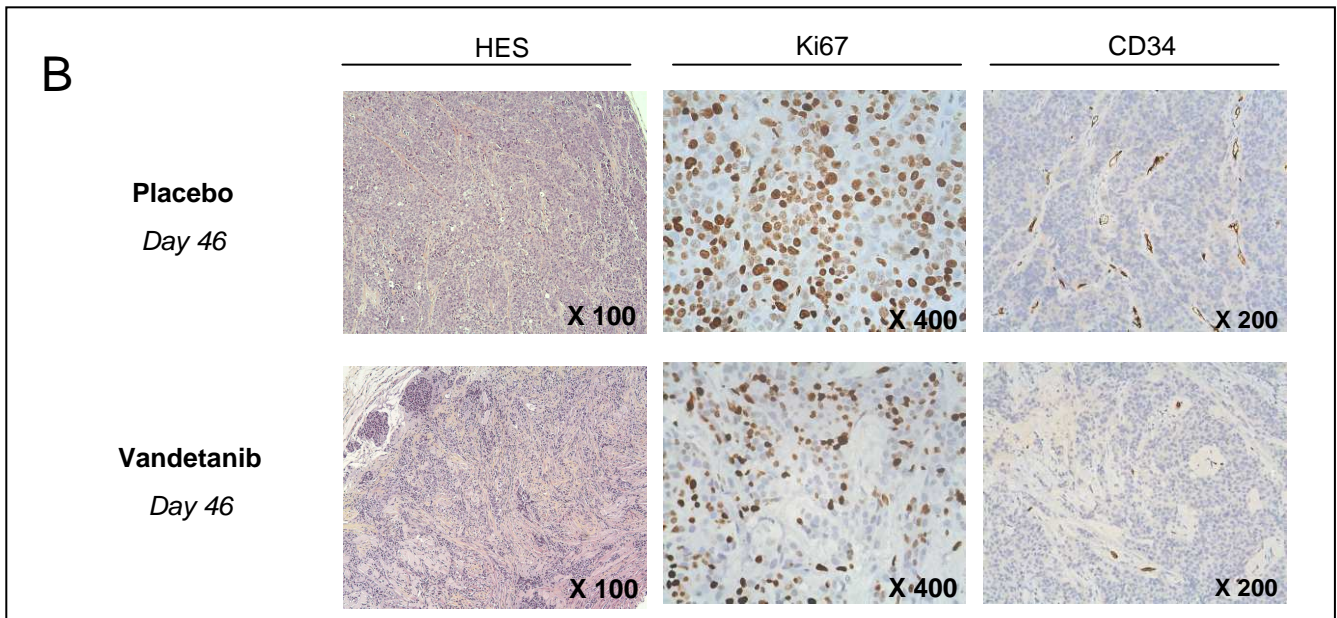
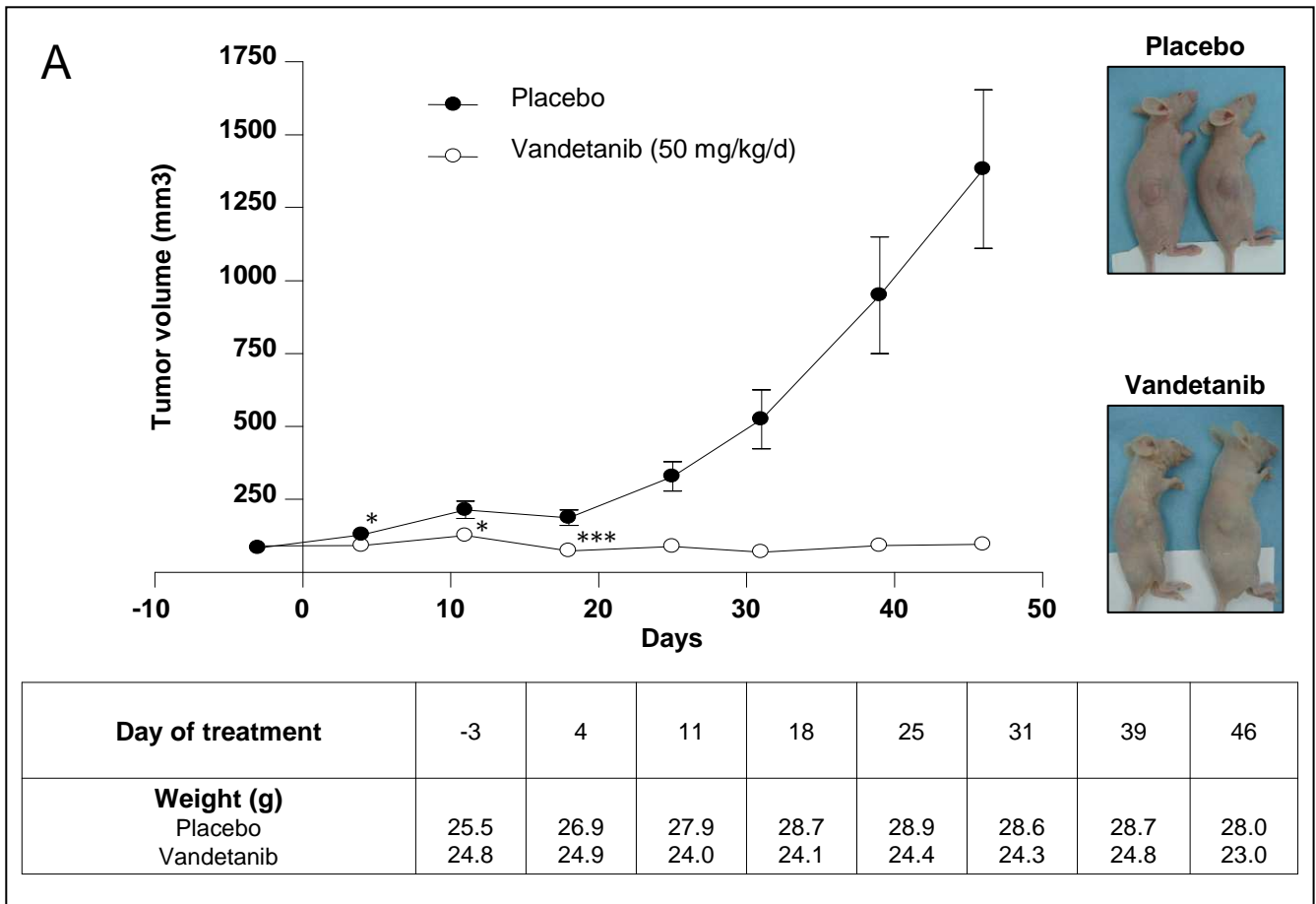


Figure 2\_Broutin

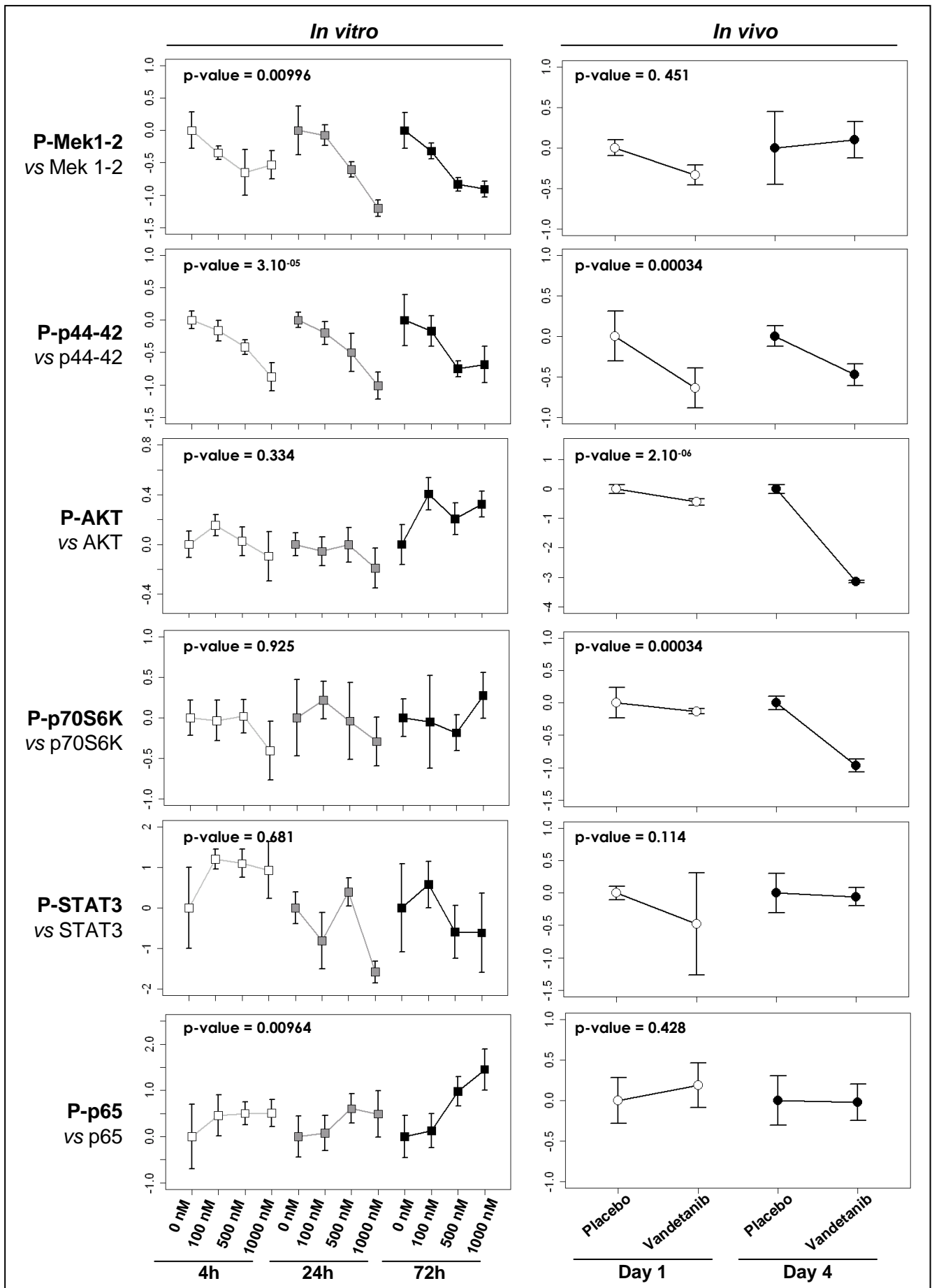


Figure 3\_Brutin

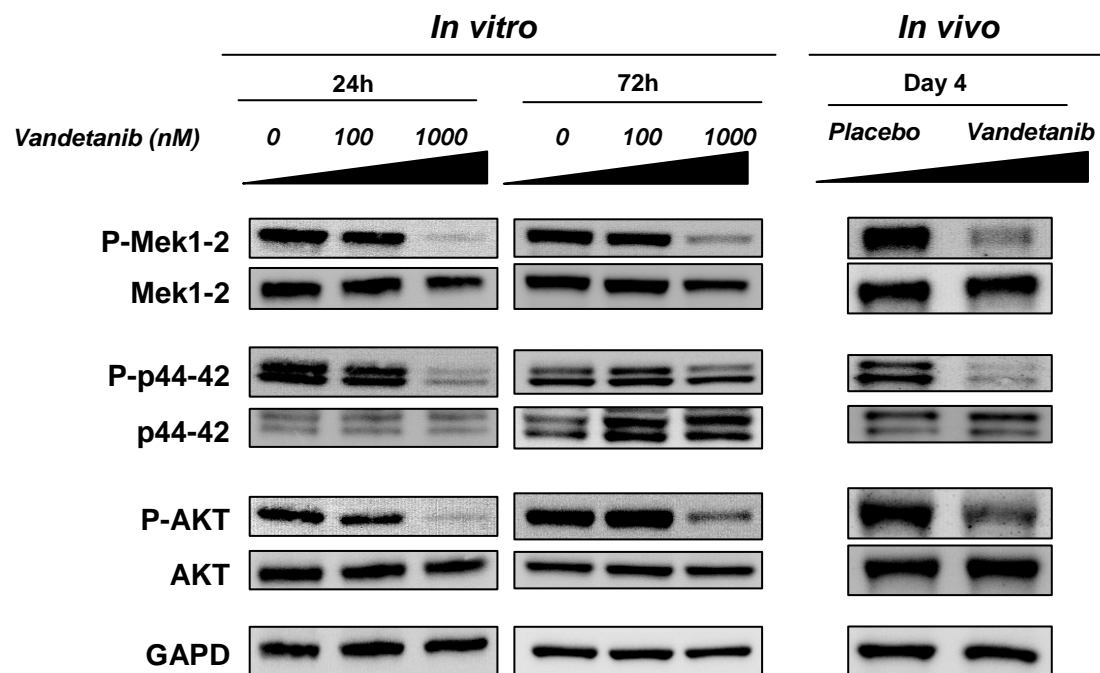


Figure 4\_Broutin

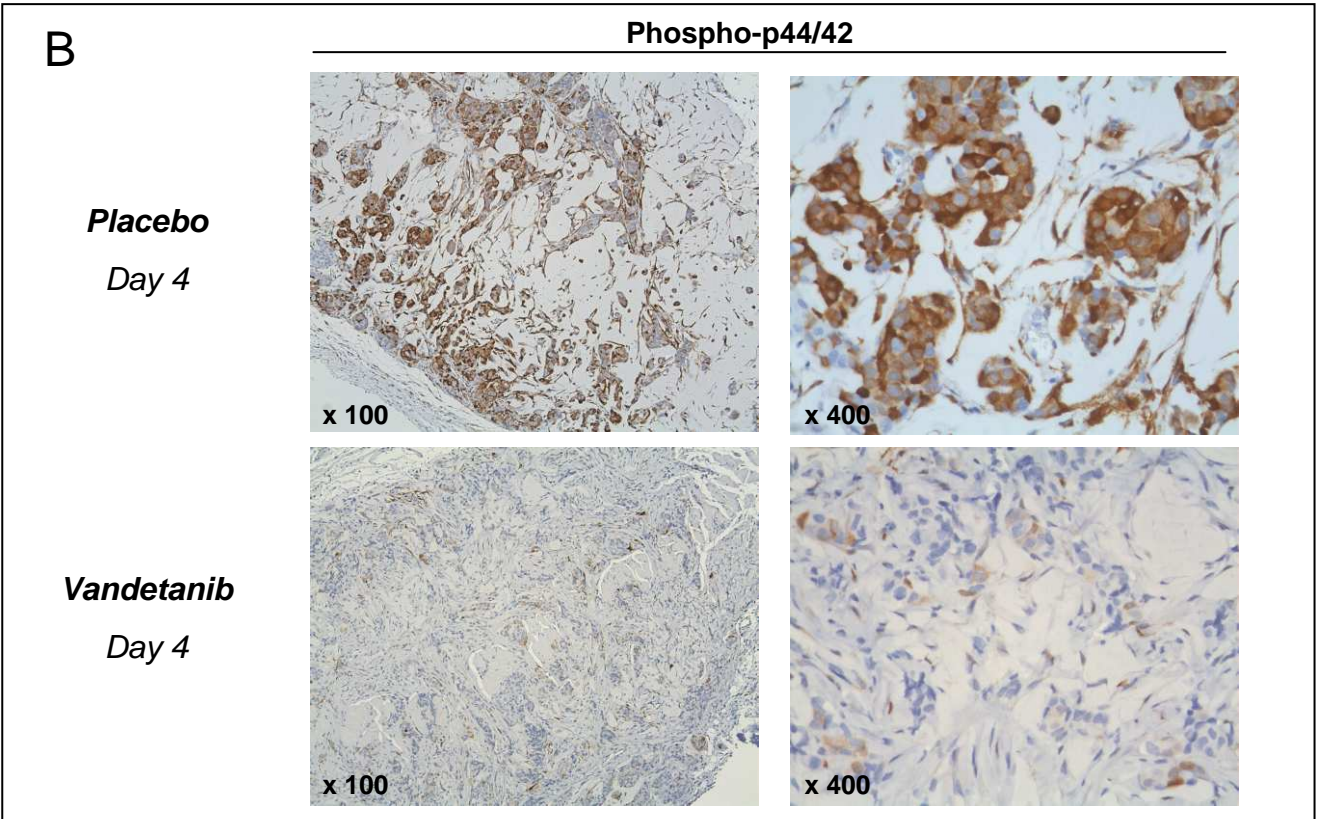
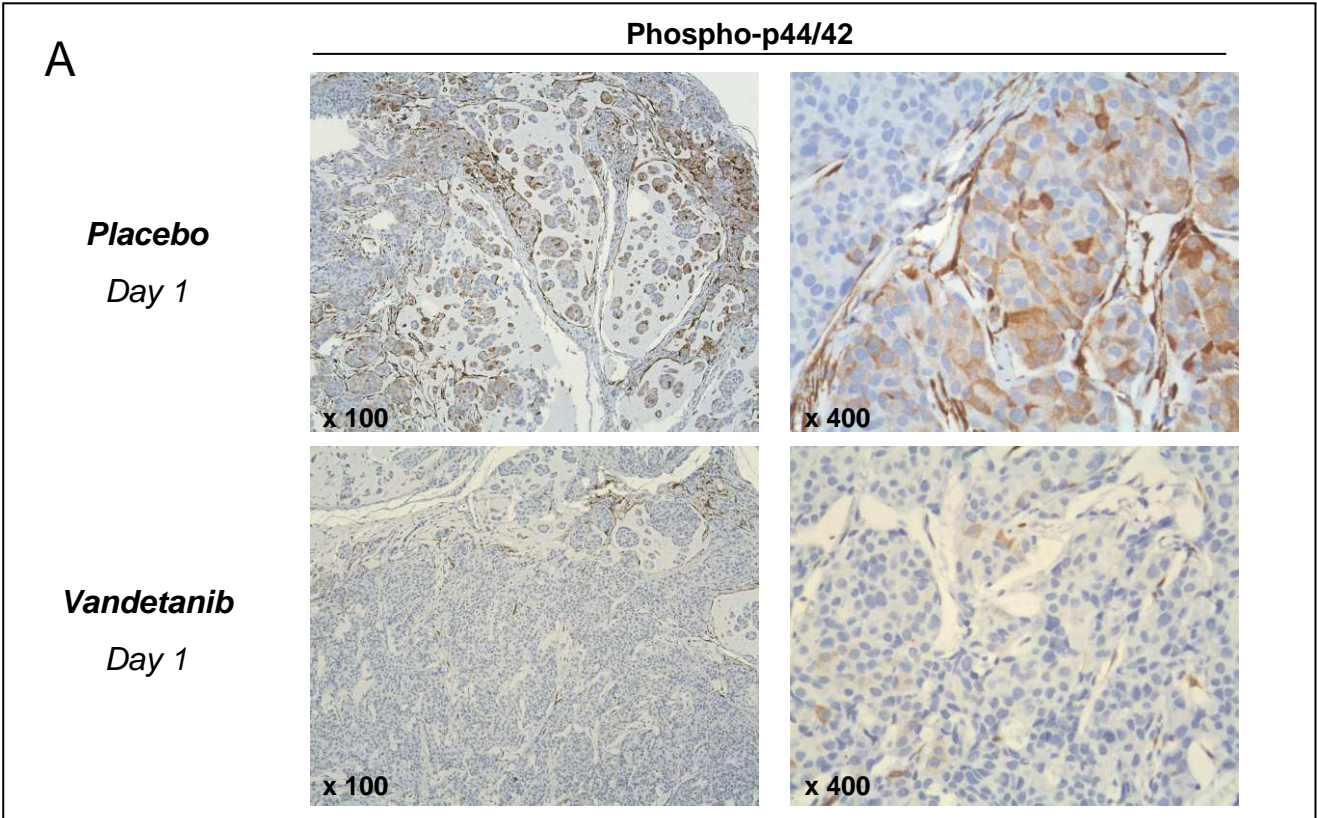


Figure 5\_Broutin

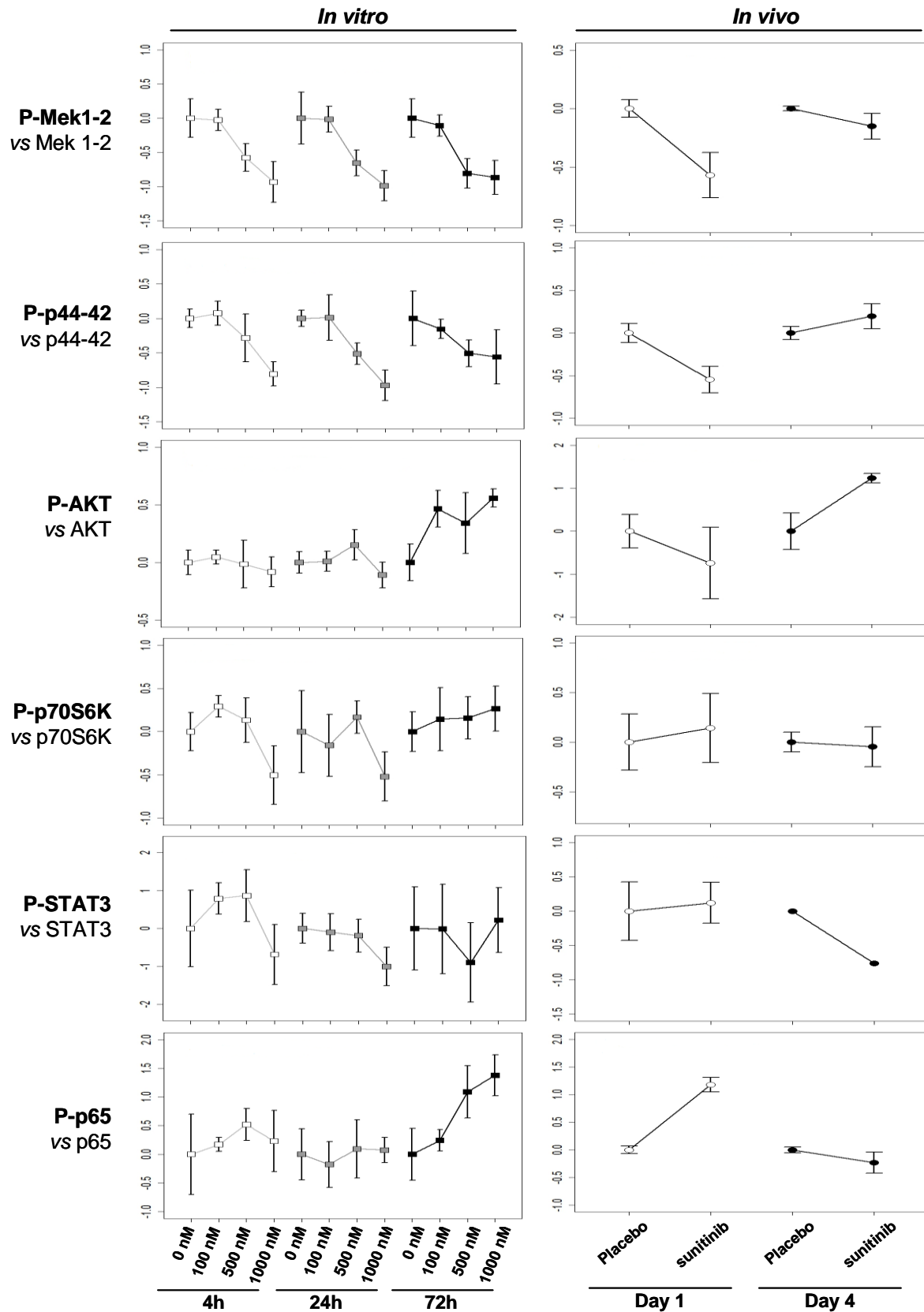
<b>Antibody</b>	<b>Laboratory</b>	<b>Reference</b>	<b>Nature</b>	<b>Dilution</b>
Akt	Cell signaling	9272	Rabbit	1/1000
Phospho Akt (Ser 473)	Cell signaling	4058	Rabbit	1/250
MEK1/2	Cell signaling	9126	Rabbit	1/1000
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Cell signaling	9154	Rabbit	1/1000
p44/42 MAP Kinase	Cell signaling	9102	Rabbit	1/1000
Phospho-p44/42	Cell signaling	4377	Rabbit	1/2000
p65 NFkB	Santa Cruz	sc-372	Rabbit	1/4000
Phospho-p65 NFkB (Ser536)	Cell signaling	3033	Rabbit	1/500
p70S6K	Cell signaling	2708	Rabbit	1/1000
Phospho-p70S6K (Thr389)	Cell signaling	9234	Rabbit	1/250
Stat3	Cell signaling	9132	Rabbit	1/500
Phospho-Stat3 (Ser727)	Cell signaling	9134	Rabbit	1/500

Supplementary data 1\_Broutin

## 1.1 Etude des voies de signalisation modifiées en réponse au sunitinib, dans des modèles de cancer médullaire de la thyroïde

### 1.1.1 Identification des principales voies de signalisation impliquées dans la réponse au sunitinib par Reverse Phase Protein Array

L'analyse des voies de signalisation régulées par le sunitinib, à la fois *in vitro* (cellules TT) et *in vivo* (xénogreffes de cellules TT sur souris nude), a été réalisée par la technologie RPPA, selon les modalités décrites précédemment. Les résultats obtenus montrent, *in vitro* et *in vivo*, une diminution importante et dose dépendante de la phosphorylation des protéines Mek1/2 et p44/42 qui participent à la voie MAPK (**Fig. 18**). Concernant la protéine AKT, le sunitinib induit une légère augmentation de sa phosphorylation *in vitro* après 3 jours de traitement. *In vivo*, les résultats suggèrent également une activation d'AKT après 4 jours de traitement par le sunitinib. Les voies de signalisation STAT3 et mTOR, explorées par les protéines STAT3 et p70S6K respectivement, apparaissent peu modulées par le sunitinib. Enfin p65, protéine impliquée dans la voie NFκB, est activée par le sunitinib, en particulier *in vitro* après 3 jours de traitement (**Fig. 18**).

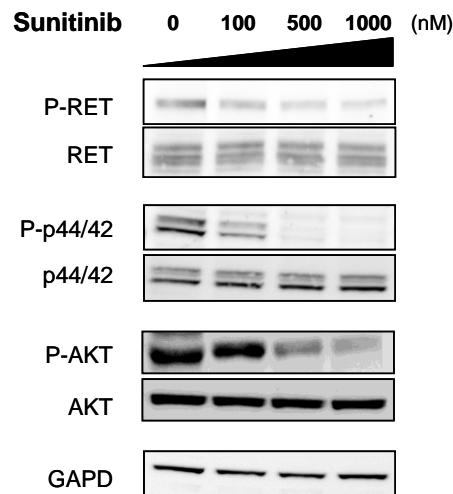


**Figure 18 :** Profils d'expression des principales protéines de la signalisation en réponse au sunitinib, obtenus par RPPA dans des modèles *in vitro* (cellules TT) et *in vivo* (xénogreffes de cellules TT) de cancer médullaire de la thyroïde.



### 1.1.2 Validation par Western Blot des principales voies de signalisation impliquées dans la réponse au sunitinib

Les résultats obtenus par RPPA ont été validés, en analysant plusieurs protéines par western-blotting, comme précédemment décrit. Une diminution de la phosphorylation des protéines RET, p44/42 et AKT, dépendante de la dose, est observée dès 4 heures de traitement par le sunitinib sur lysats protéiques de cellules TT (**Fig. 19**).

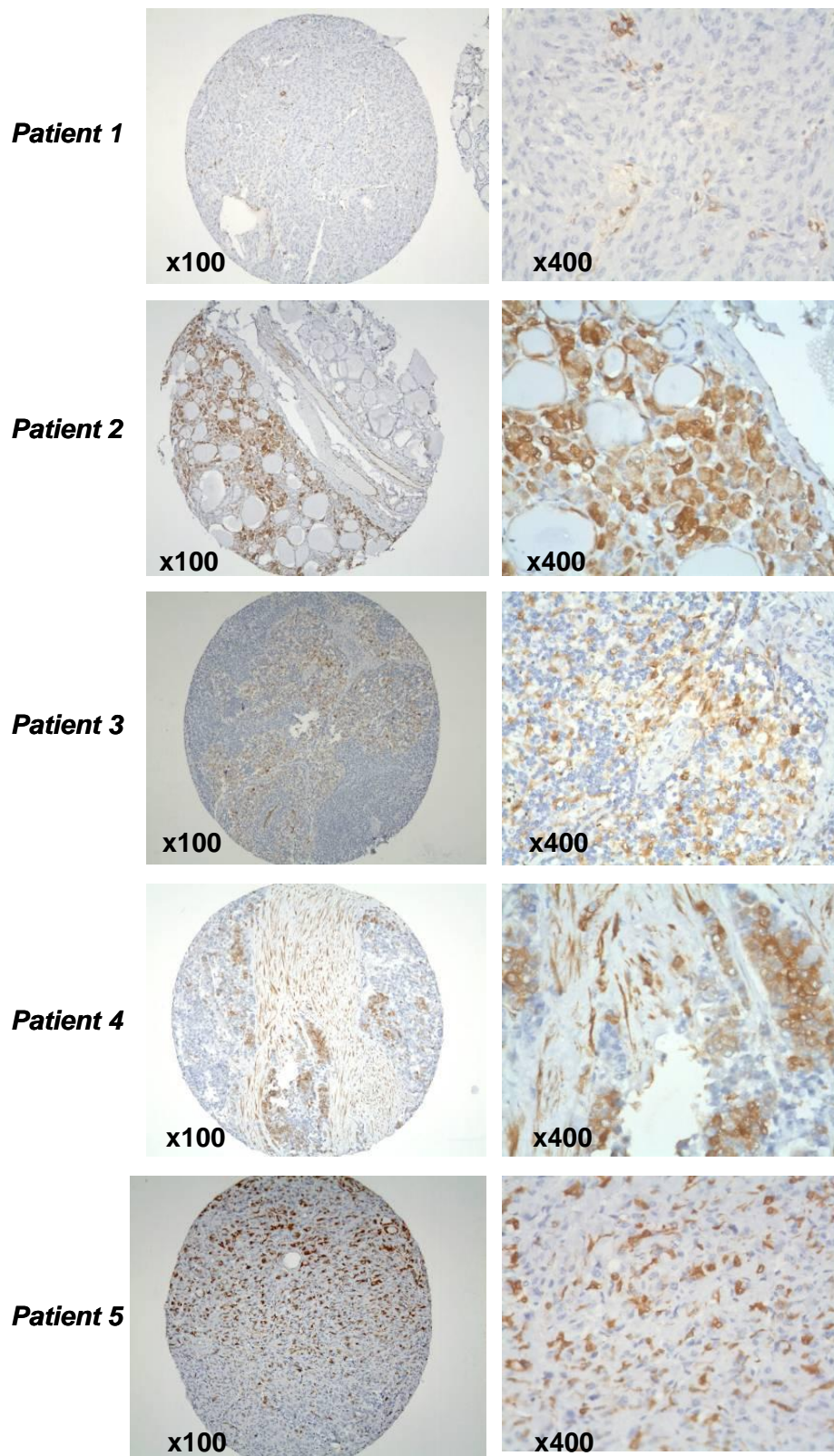


**Figure 19** : Inhibition de l'activation de RET, d'AKT et de p44/42 dans les cellules TT en fonction de la dose de sunitinib. Les cellules ont été traitées par sunitinib ou véhicule pendant 4 heures. Les lysats protéiques ont été incubés avec des anticorps spécifiques anti-RET, anti-phospho-RET/Y905 (P-RET), anti p44/42, anti-phospho-p44/42 (P-p44/42), anti-AKT, anti-phospho-AKT (P-AKT), et anti-GAPD.

## 1.2 Etude de la voie des MAPK chez les patients atteints de CMT

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de la voie MAPK, principale voie inhibée par le sunitinib et le vandetanib, chez les patients atteints de CMT. Pour cela, des marquages immunohistochimiques de phospho-p44/42 (Cell signaling 4377/ 1 :100), l'une des protéines clés de la voie MAPK, ont été réalisés sur trois séries de Tissu-Microarray (TMA) incluant 34 CMT (Ameur, et al., 2009). Les résultats montrent une expression de phospho-p44/42 dans 50% des cas, avec des intensités et des pourcentages de cellules marquées variables selon les cas (**Fig. 20**).

## Phospho-p44/42



**Figure 20** :Immunomarquage de phospho-p44/42 dans des tumeurs de cancer médullaire de la thyroïde. L'immunomarquage de la calcitonine permet d'identifier les cellules C tumorales. Les contrôles négatifs ont été réalisés en absence de l'anticorps primaire.

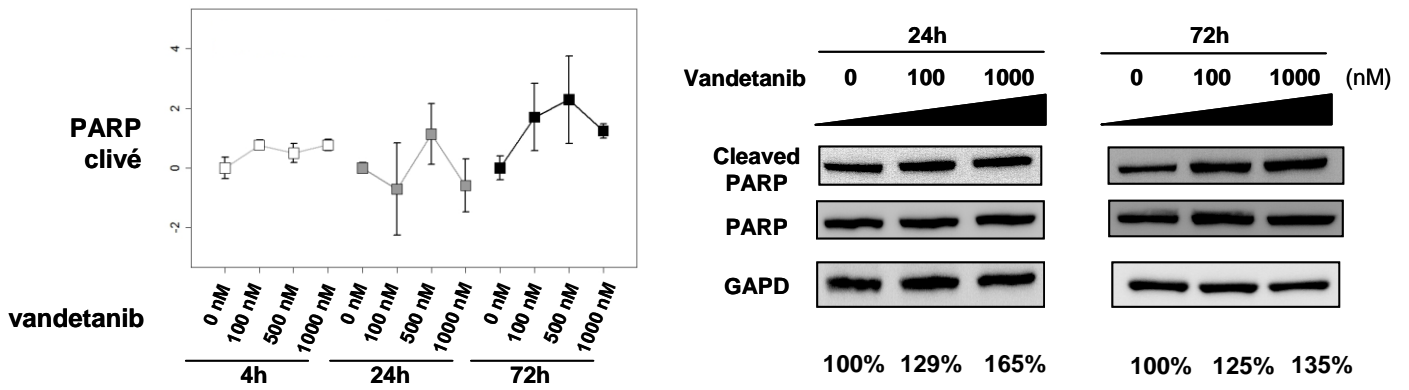
L'activation de phospho-p44/42 en fonction du statut mutationnel de *RET* a ensuite été analysée. Les résultats montrent une activation comparable de la voie MAPK dans les formes sauvages et mutées de *RET*. De façon intéressante, le pourcentage de cas phospho-p44/42 positif tend, de façon non significative, à être plus important dans les formes portant une mutation au niveau du codon 634 (~70%) que dans le codon 918 (40%), suggérant un éventuel lien entre la localisation de la mutation et l'activation préférentielle de certaines voies de signalisation (**Tableau 4**). Ces résultats préliminaires méritent une analyse plus complète, en particulier prenant en compte le pourcentage de cellules marquées et l'intensité du marquage (Rapa, et al., 2011). Enfin le niveau d'expression de phospho-AKT n'apparaît pas modifié dans cette série de tumeurs.

Statut mutationnel de RET	Nombre (%)	P-p44/42 positif (%)
RET sauvage	12 (35%)	6 (50%)
RET muté	22 (65%)	12 (55%)
<b>RET muté en 634</b>	<b>9 (41%)</b>	<b>6 (67%)</b>
RET muté en 918	10 (45%)	4 (40%)

**Tableau 4** : Immunomarquage de phospho-p44/42 (P-p44/42) des 34 cas de CMT en fonction du statut mutationnel de RET.

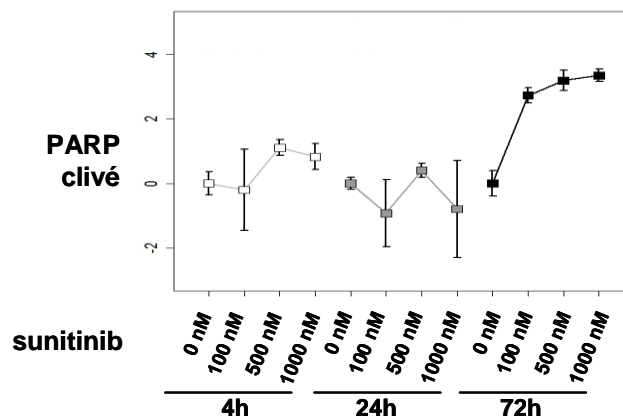
### 1.3 Etude de la forme clivée de PARP en réponse au sunitinib et au vandetanib

L'effet des deux inhibiteurs sur l'apoptose a été analysé sur les cellules TT, en étudiant le niveau d'expression de la forme clivée de PARP, en fonction du temps et pour des doses croissantes d'inhibiteur (0, 100 et 1000 nM). Les résultats obtenus par RPPA montrent une légère augmentation de la forme clivée de PARP, comparativement à la forme totale, en réponse au vandetanib (**Fig. 21**). Ces résultats ont été confirmés par western-blotting (**Fig. 21**). On constate que parallèlement la forme totale de PARP ne diminue pas en réponse au traitement. Il est important de souligner que ces résultats ont été obtenus à partir de lysats protéiques des cellules adhérentes et que la majorité des cellules apoptotiques sont très certainement majoritairement présentes dans le surnageant de culture. Il convient donc de poursuivre ces travaux sur des lysats protéiques issus des cellules relarguées dans le surnageant de culture.



**Figure 21** : Profils d'expression de PARP clivé dans les cellules TT en réponse au vandetanib obtenus par RPPA (gauche) et western-blot (droite).

Enfin, une augmentation de la forme clivée de PARP a également été mise en évidence par RPPA en réponse au sunitinib. Cette augmentation est particulièrement marquée après 3 jours de traitement dès la dose de 100 nM (Fig. 22).



**Figure 22** : Profils d'expression de PARP clivé dans les cellules TT, en réponse au sunitinib, obtenus par RPPA.

## 1.4 Discussion

La protéomique est un domaine d'étude relativement récent et en pleine expansion, faisant appel à des technologies haut-débit telles que les puces à anticorps (antibody array) ou la Reverse Phase Protein Array (RPPA). Ces approches, dont l'utilisation est guidée par une hypothèse *a priori*, permettent d'établir des signatures multiprotéiques à visée diagnostique, pronostique et prédictive (Gilbert, et al., 2010). En effet, les protéines, en particulier les protéines à activité kinase, jouent un rôle clé dans de nombreux processus cellulaires et ont été identifiées comme des cibles thérapeutiques majeures en cancérologie (Berg, et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011; Mendelsohn J., 2008; Voshol, et al., 2009). L'établissement d'une cartographie protéique fonctionnelle de la signature moléculaire de chaque tumeur et de la réponse à chaque traitement apparaît donc essentiel dans l'optique d'une prise en charge thérapeutique individualisée (Parikh and Peppelenbosch, 2010). Dans ce contexte, ce travail a eu pour but d'améliorer la compréhension de la réponse moléculaire au sunitinib et au vandetanib, en étudiant par RPPA l'évolution dans le temps du profil d'expression de phospho-protéines clés des voies de signalisation après traitement par ces inhibiteurs.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets antiprolifératifs et antitumoraux du vandetanib dans des modèles précliniques de CMT porteurs de la mutation RET<sup>C634W</sup>. *In vitro*, nous avons montré que le vandetanib inhibe fortement la prolifération des cellules TT en fonction du temps et de la concentration d'inhibiteur. Un arrêt de la croissance tumorale est observé *in vivo* dans le groupe des souris xénotreffées avec des cellules TT et traitées par vandetanib (50 mg/kg/j). Cet effet est significatif dès 4 jours de traitement et est associé à une inhibition de la prolifération, comme illustrée par la diminution de l'immunomarquage du Ki67. Ces résultats confirment des travaux récents étudiant les mécanismes d'action du vandetanib sur deux modèles de CMT (lignée TT et lignée MZ-CRC-1 mutée RET<sup>918</sup>) (Verbeek, et al., 2011; Vitagliano, et al., 2010). Nos résultats ont également permis de montrer les effets antiangiogéniques *in vivo* du vandetanib, comme attestée par la diminution du nombre de microvaisseaux, effet probablement lié à l'inhibition du récepteur VEGFR-2. En effet, le vandetanib est un inhibiteur multikinase, actif contre les récepteurs RET, VEGFR-2 et EGFR. Si l'implication du récepteur RET dans les effets du vandetanib est bien documentée, le rôle des récepteurs VEGFR-2 et EGFR, tous deux exprimés dans les tumeurs humaines de CMT, est

actuellement à l'étude (Rodriguez-Antona, et al., 2010). Ainsi, de façon intéressante, Vitagliano et al., ont récemment montré que si EGFR et VEGFR-2 ne jouent pas un rôle majeur dans la prolifération des cellules TT en absence d'une activation de RET, l'activation continue d'EGFR tend à compenser partiellement l'inhibition de RET en réactivant des voies de signalisation. Ces résultats confortent donc l'activation d'effets compensateurs lors de l'inhibition de kinase par des ITKs (Stommel, et al., 2007; Vitagliano, et al., 2010). Par ailleurs, les résultats obtenus *in vitro* tendent à montrer également une augmentation de la forme clivée de PARP par le vandetanib et le sunitinib, traduisant une activation de l'apoptose. Ces résultats, obtenus sur culots cellulaires doivent être complétés par une étude sur les surnageants de culture, contenant la majorité des cellules apoptotiques qui perdent leur capacités d'adhésion.

Dans un deuxième temps, après avoir vérifié l'inhibition de l'autophosphorylation de RET par les deux ITKs, nous avons caractérisé par Reverse-Phase Protein Array (RPPA) les principales voies de signalisation mises en jeu lors de la réponse au vandetanib et au sunitinib dans des modèles précliniques de CMT porteurs de la mutation RET<sup>C634W</sup>. Globalement, les résultats obtenus, *in vitro* et *in vivo*, pour les deux inhibiteurs sont comparables et mettent en évidence le rôle clé des voies MAPK et PI3K/AKT lors de la réponse. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui montrent que ces deux voies sont principalement impliquées dans la signalisation médiée par RET (de Groot, et al., 2006; Santoro, et al., 2004). De plus, l'analyse immunohistochimique sur une collection de tissus provenant de 34 CMT montre que près de la moitié des cas présentent une activation de la voie des MAPK. Ce résultat est à rapprocher d'une étude récente montrant également l'activation de cette voie dans un quart des cas d'une série de 49 patients et associant une expression de phospho-p44/42 plus importante chez les patients RET mutés (Rapa, et al., 2011). De façon intéressante, si nos résultats ne différencient pas les patients RET mutés et RET sauvage, ils suggèrent une activation de la voie MAPK préférentiellement chez les patients porteurs d'une mutation RET au niveau du codon 634 (70% des cas). Il est important de souligner que peu de données ont été publiées sur le lien entre mutations spécifiques de RET et voies de signalisation de RET. L'ensemble de ces résultats, qui doivent être approfondis, renforcent l'intérêt d'une caractérisation moléculaire et fonctionnelle des tumeurs pour guider le choix du traitement pour chaque patient.

Les effets du sunitinib et du vandetanib sur les voies STAT3 et mTOR sont moins clairs, suggérant un rôle secondaire de ces voies lors de la réponse à ces inhibiteurs. La voie AKT/mTOR, dont l'activation dans le CMT est bien documentée, est également une cible

thérapeutique potentielle dans cette pathologie (Kunnimalaiyaan, et al., 2006; Pitt and Chen, 2008; Rapa, et al., 2011; Segouffin-Cariou and Billaud, 2000). L'everolimus (RAD001), un inhibiteur de mTOR, a ainsi montré une inhibition de la viabilité des cellules TT (Grozinsky-Glasberg, et al., 2010). Dans ce contexte, l'association thérapeutique entre inhibiteur de RET et de mTOR apparaît donc particulièrement intéressante à évaluer.

Enfin, de façon surprenante, les résultats obtenus en RPPA suggèrent une activation, par le sunitinib et le vandetanib, de la voie NFκB dont l'implication dans les CMT a été démontrée en particulier dans les formes *RET* mutées (Gallel, et al., 2008). Ces résultats doivent être confirmés et approfondis. En effet, ils pourraient dévoiler un mécanisme de rétrocontrôle cellulaire mis en jeu pour compenser les effets des ITKs, identifiant ainsi cette voie comme nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le cadre d'une association avec des inhibiteurs de RET (Li, et al., 2011; Veeraraghavan, et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats soulignent la complexité des voies de signalisation et leurs interactions dans la maladie cancéreuse, justifiant l'utilisation d'inhibiteurs d'activité tyrosine kinase à spectre large et le développement d'approches combinatoires de thérapies moléculaires ciblés (Vignot S., 2008). De façon plus générale, nos travaux confirment l'intérêt de la RPPA dans l'étude des profils d'expression protéique et plus particulièrement dans la caractérisation fonctionnelle des voies de signalisation. Cette technologie innovante est particulièrement prometteuse dans ce domaine comme le montre un nombre de plus en plus important de publications (Paweletz, et al., 2001).

Il est important de souligner que cette méthode, en dépit de ces résultats prometteurs, reste d'utilisation encore limitée en clinique, en partie à cause du faible nombre d'anticorps validés disponibles, de leur coût, et des seuils de spécificité (Gilabert, et al., 2010). Cette limitation explique que notre étude a porté sur un nombre restreint de paramètres et ne peut donc prétendre à une exhaustivité dans l'analyse des voies de signalisation. Une autre limitation au développement de cette méthode est la complexité de l'analyse des signaux. Toutefois, cette complexité de l'interprétation des analyses à haut-débit se retrouve dans toutes les méthodes de génomique et de protéomique. En effet, d'autres technologies d'étude du protéome sont également développées telles que les puces à anticorps, une des techniques les plus utilisées pour l'étude du phosphoprotéome, et la spectrométrie de masse en particulier pour l'identification de nouveaux biomarqueurs dans des échantillons biologiques complexes (Dietel and Sers, 2006; Gilabert, et al., 2010).

## 2. Identification de nouveaux biomarqueurs de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase

### 2.1 Introduction

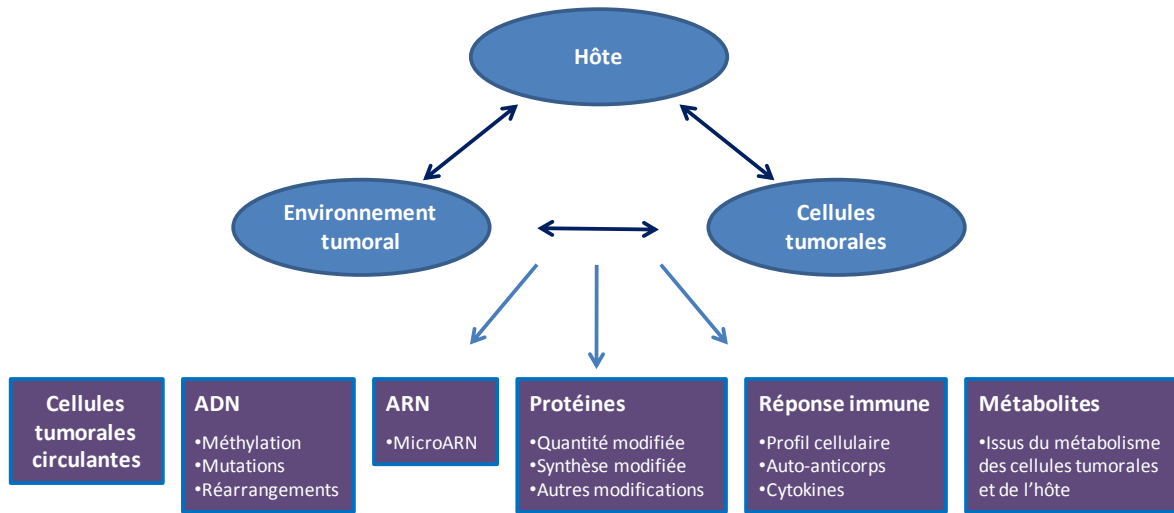
L'identification de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques est un enjeu majeur en cancérologie. Dans les lignes suivantes, la définition, les méthodes d'étude et l'intérêt des biomarqueurs seront décrits. Ces notions sont à la base d'une partie de notre travail de thèse, visant à caractériser de nouveaux biomarqueurs de réponse thérapeutique dans le CMT.

#### 2.1.1 Les biomarqueurs en cancérologie

Un biomarqueur, ou marqueur biologique, désigne une caractéristique, mesurée objectivement, servant d'indicateur de processus physiologiques, normaux ou pathologiques, ou de l'action de médicaments ([Biomarkers Definitions Working Group, 2001](#)). En cancérologie l'importance de ces marqueurs est croissante et leur identification est un enjeu majeur, entre autres, pour la prise en charge thérapeutique personnalisée des patients. Concrètement les biomarqueurs représentent un domaine très vaste, tant par leur nature que par leurs applications, dont nous présenterons, de manière non exhaustive, les principales caractéristiques.

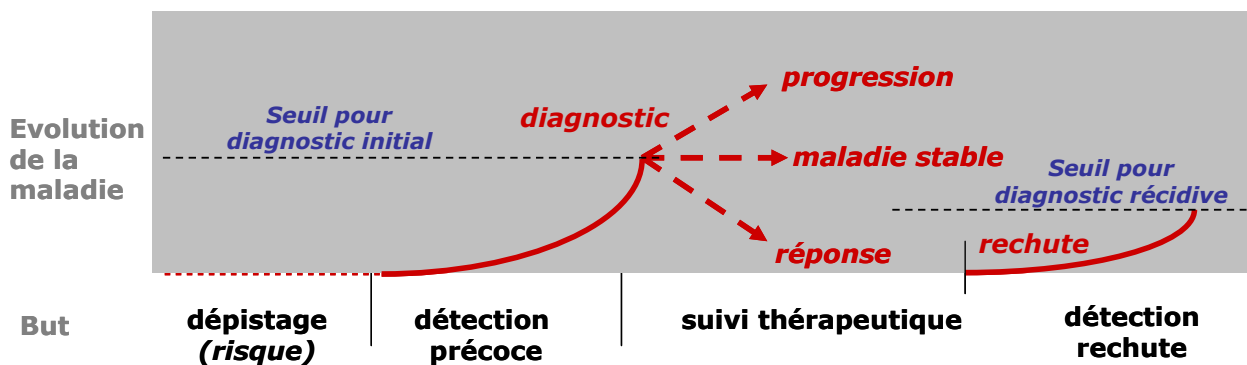
Il est coutume de classer les biomarqueurs selon leur nature ou selon leur intérêt en pratique médicale. La nature des biomarqueurs est extrêmement variable (**Fig. 23**). Schématiquement, on distingue des marqueurs moléculaires tels que les acides nucléiques comme l'ADN (mutation, translocation, amplification, délétion, méthylation), l'ARN et les micro-ARN (profils d'expression génique avec sur et sous-expressions) et les protéines (sur et sous-expressions, activation, inhibition) ; des marqueurs cellulaires tels que les cellules tumorales circulantes ; et des biomarqueurs fonctionnels principalement associés aux techniques d'imagerie (modification de la perfusion tumorale). Les biomarqueurs moléculaires informant sur les événements de l'oncogenèse et de la réponse thérapeutique sont actuellement les plus utilisés en cancérologie et leur évaluation est réalisée soit au sein de la tumeur soit dans les fluides biologiques ([Hanash, et al., 2011](#); [Ludwig and Weinstein, 2005](#)).





**Figure 23: Origine des biomarqueurs sanguins.** Les interactions entre les cellules tumorales, l’environnement tumoral et l’hôte conduisent au relargage d’éléments cellulaires et moléculaires, source de biomarqueurs circulants (Hanash, et al., 2011).

L’intérêt clinique des biomarqueurs est également très vaste, couvrant chaque étape de l’histoire naturelle de la maladie depuis le dépistage jusqu’au suivi des récidives. Ils participent à l’amélioration de la précocité du diagnostic, l’anticipation de l’agressivité de la maladie pour mieux sélectionner les patients à traiter, mais également à la prédiction de la réponse au traitement et/ou sa toxicité (Fig. 24).



**Figure 24 :** Représentation schématique de l’utilisation des biomarqueurs à chaque stade de l’évolution de la maladie cancéreuse (Ludwig and Weinstein, 2005).

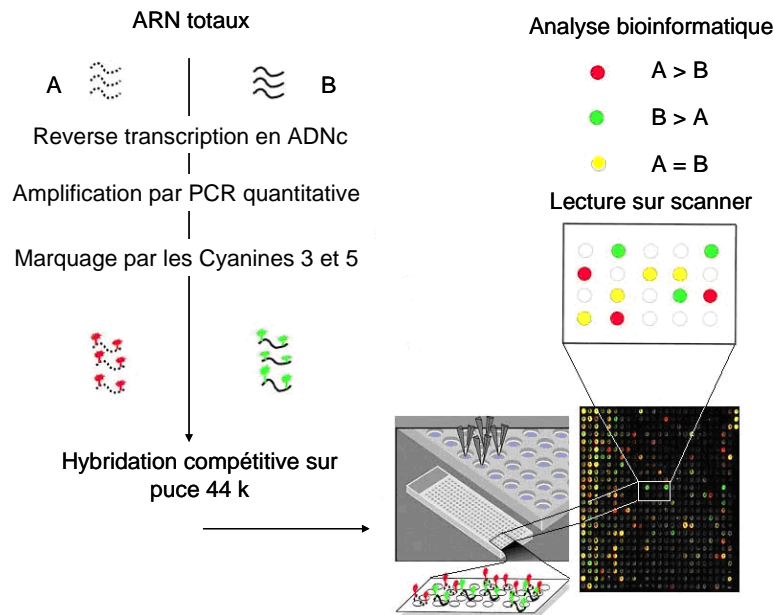
Sur le plan historique, les premiers biomarqueurs utilisés ont été les protéines circulantes dont l'augmentation sérique traduit la présence d'une tumeur. Ces marqueurs, comme l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), le prostate-spécific antigen (PSA) ou bien encore la calcitonine, présentent une bonne sensibilité mais, en dehors de quelques cas, leur mauvaise spécificité vis à vis de la maladie cancéreuse, fait qu'ils ne sont pas utiles au dépistage et rarement en situation diagnostique. S'ils ont une certaine valeur pronostique et prédictive<sup>1</sup>, ils sont surtout utiles pour le suivi de l'évolution de la maladie. Dans les années 90, la découverte de gènes de prédisposition au cancer, comme BRCA1 dans les cancers mammaires ou RET dans les cancers de la thyroïde, a permis l'établissement de « marqueurs génétiques » dans les syndromes familiaux. Enfin, depuis maintenant une vingtaine d'années, de nombreux biomarqueurs, de différente nature et détectés par des méthodes variées, permettent de mieux caractériser la tumeur, d'évaluer le pronostic mais aussi de proposer des alternatives thérapeutiques (**Fig. 24**). En effet, l'évaluation précoce de l'efficacité d'un traitement, en regard du nombre croissant des candidats médicaments, des toxicités associées et de leur coût, est également essentielle. Dans cette optique l'identification de nouveaux biomarqueurs permettant de suivre la réponse clinique est un enjeu majeur. Face aux approches classiques de type « gène candidat » ou « protéine candidate », des approches haut-débit, dans les domaines de la génomique, de la transcriptomique, de la protéomique et de la métabolomique ont été développées. Cette stratégie permet le criblage différentiel à grande échelle d'ADN, d'ARN, de protéines ou de métabolites contenus dans des produits biologiques de nature diverse (tissu, liquide biologique, ...) issus de sujets sains et de patients ([Kulasingam and Diamandis, 2008](#)).

### 2.1.2 Identification de biomarqueurs par transcriptomique à haut-débit

L'analyse et la compréhension du transcriptome, ensemble des gènes transcrits à un instant donné dans une cellule ou un tissu donné, est essentielle pour améliorer les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogenèse. Parmi les différentes techniques d'étude (Northern blot, RT-PCR quantitative, SAGE,...), les puces à ADN, encore appelées microarray ou biochips, sont des outils de choix permettant d'analyser les différences d'expression génique à l'échelle d'un génome complet.

<sup>1</sup> La définition des facteurs pronostiques et prédictifs est théoriquement distincte : les facteurs pronostiques permettent d'identifier des tumeurs à haut risque de rechute locale ou à distance en l'absence de tout traitement, alors que les marqueurs prédictifs permettent de définir la probabilité de réponse ou de non-réponse à un traitement. En pratique, certains marqueurs pronostiques sont aussi prédictifs. De plus, en 2010, il est difficile d'identifier un marqueur pronostique strict qui devrait être évalué en l'absence de traitement ([de Cremoux P. 2010. \[Molecular prognostic and predictive markers of breast cancer treatment\]. Bull Cancer 97\(11\):1297-304.](#)).

Le principe des puces à ADN est basé sur la notion d'hybridation moléculaire spécifique entre deux séquences d'acides nucléiques, des sondes d'ADN déposées sur un support solide, et des cibles correspondant à des ARNm rétrotranscrits et marqués. La technologie des ADN microarrays sur lames de verre, mise au point par l'équipe de P. Brown est la plus répandue et permet de comparer en globalité le niveau d'expression génique de 2 échantillons sur une même lame (**Fig. 25**) (Schena, et al., 1995).



**Figure 25 : Principe des puces à ADN.** Une puce à ADN est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le Southern blot ou le Northern blot. Il s'agit d'une hybridation à une sonde de séquence complémentaire marquée. Une puce contient quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « spots », chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par une molécule fluorescente (cyanines 3 et 5), permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.

Aujourd'hui, les techniques d'analyse du transcriptome jouent un rôle important dans les activités précliniques et cliniques en cancérologie. La détermination des profils d'expression génique est utilisée, entre autres, pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la tumorigenèse, des sous-groupes moléculaires de tumeurs, des signatures pronostiques et/ou prédictifs de réponse (exemple, Mammaprint® dans le cancer du sein), ou bien encore pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la dissémination métastatique, la résistance, ... (Alizadeh, et al., 2000; Brown and Botstein, 1999; Desmedt, et al., 2008; Glinsky, et al., 2004; Perou, et al., 2000; Wang, et al., 2011).

### 2.1.3 Objectifs du travail

L'objectif de ce travail était d'identifier de nouveaux biomarqueurs permettant d'évaluer précocement la réponse clinique au sunitinib et au vandetanib. Par une approche transcriptomique haut-débit, menée sur des modèles précliniques de cancer médullaire de la thyroïde, nous avons caractérisé un ensemble de gènes et leurs principales fonctions cellulaires associées dans la réponse. Parmi ceux-ci, nous avons identifié les gènes régulés par les inhibiteurs et codant pour des protéines circulantes. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans *Clinical Cancer Research* et de travaux complémentaires.

## 2.2 Identification de biomarqueurs potentiels de réponse au sunitinib dans des modèles de cancer médullaire de la thyroïde

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant qui sera discuté dans la discussion §2.5 (p.95) :

### **Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in Medullary Thyroid Carcinoma in preclinical models.**

Broutin S, Ameur N, Lacroix L, Robert T, Petit B, Oumata N, Talbot M, Caillou B, Schlumberger M, Dupuy C, Bidart JM. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 1;17(7):2044-54.

Dans ce travail, nous avons cherché, par une approche transcriptomique haut-débit, à identifier de nouveaux biomarqueurs de réponse au sunitinib. L'activité du sunitinib a été caractérisée *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de cancer médullaire de la thyroïde. Cet inhibiteur présente des activités antiprolifératives et antiangiogéniques et inhibe l'autophosphorylation de RET et l'activation des voies de signalisation efférentes. Une étude séquentielle des modifications transcriptionnelles induites par le sunitinib a permis d'identifier les principales fonctions moléculaires modifiées lors de la réponse. Cet inhibiteur entraîne notamment des changements d'expression génique majeurs parmi les gènes impliqués dans l'invasion tissulaire et le pouvoir métastatique (*VIM*, *PLAU*, *TN-C*, *SPARC*, et *CD44*), soulignant l'impact du sunitinib dans le contrôle de l'invasion tissulaire. Des gènes dont l'expression est inhibée par le sunitinib et codant des protéines sécrétées ont été sélectionnés comme biomarqueur potentiel de réponse, en particulier l'IL-8 et le TGF- $\beta$ 2. De façon intéressante, nos résultats mettent en évidence des taux sériques de ces 2 protéines, significativement augmentés chez les patients atteints de CMT, sporadique ou germinale, comparativement à des sujets sains.

# Clinical Cancer Research



## Identification of Soluble Candidate Biomarkers of Therapeutic Response to Sunitinib in Medullary Thyroid Carcinoma in Preclinical Models

Sophie Broutin, Nabahet Ameur, Ludovic Lacroix, et al.

*Clin Cancer Res* 2011;17:2044-2054. Published OnlineFirst February 15, 2011.

### Updated Version

Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-10-2041](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2041)

### Supplementary Material

Access the most recent supplemental material at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2011/03/30/1078-0432.CCR-10-2041.DC1.html>

### Cited Articles

This article cites 47 articles, 29 of which you can access for free at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/7/2044.full.html#ref-list-1>

### E-mail alerts

[Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

### Reprints and Subscriptions

To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

### Permissions

To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at [permissions@aacr.org](mailto:permissions@aacr.org).

## Identification of Soluble Candidate Biomarkers of Therapeutic Response to Sunitinib in Medullary Thyroid Carcinoma in Preclinical Models

Sophie Broutin<sup>1</sup>, Nabahet Ameer<sup>1</sup>, Ludovic Lacroix<sup>2</sup>, Thomas Robert<sup>3</sup>, Benoit Petit<sup>4</sup>, Nassima Oumata<sup>6</sup>, Monique Talbot<sup>1</sup>, Bernard Caillou<sup>2</sup>, Martin Schlumberger<sup>1,5</sup>, Corinne Dupuy<sup>1</sup>, and Jean-Michel Bidart<sup>1,2</sup>

### Abstract

**Purpose:** Medullary thyroid carcinoma (MTC), an aggressive rare tumor due to activating mutations in the proto-oncogene *RET*, requires new therapeutic strategies. Sunitinib, a potent inhibitor of RET, VEGF receptor (VEGFR)-1, VEGFR-2, VEGFR-3, and platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) $\alpha/\beta$ , has been reported as clinically effective in some patients with advanced MTC. In this study, we examine molecular mechanisms of action of sunitinib and identify candidate soluble biomarkers of response.

**Experimental Design:** Both *in vitro* and *in vivo* assays, using the human TT RET<sup>C634W</sup> MTC cell line, were done to assess the activity of sunitinib. Kinetic microarray studies were used to analyze molecular pathways modified by sunitinib and to identify candidate biomarkers that were subsequently investigated in the serum of patients.

**Results:** Sunitinib displayed antiproliferative and antiangiogenic activities and inhibited RET autophosphorylation and activation of downstream signaling pathways. We showed that sunitinib treatment induced major changes in the expression of genes involved in tissue invasion and metastasis including vimentin (*VIM*), urokinase plasminogen (*PLAU*), tenascin-C (*TN-C*), *SPARC*, and *CD44*. Analyzing downregulated genes, we identified those encoding secreted proteins and, among them, interleukin (IL)-8 was found to be modulated in the serum of xenografted mice under sunitinib treatment. Furthermore, we demonstrated that metastatic MTC patients presented increased serum levels of IL-8 and TGF- $\beta$ 2.

**Conclusions:** Experimental models confirm the clinical efficacy of sunitinib observed in a few studies. Molecular pathways revealed by genomic signatures underline the impact of sunitinib on tissue invasion. Selected soluble candidate biomarkers could be of value for monitoring sunitinib response in metastatic MTC patients. *Clin Cancer Res*; 17(7); 2044–54. ©2011 AACR.

### Introduction

Medullary thyroid carcinoma (MTC) arises from calcitonin (CT)-producing parafollicular C cells and accounts for 5% to 8% of all thyroid cancers (1). MTC occurs as either a sporadic form or in a familial context (25% of cases). Activating mutations of the *RET* proto-oncogene, encoding a tyrosine kinase receptor (TKR), are responsible

for familial forms and are also detected in one third of sporadic tumors (2). Constitutive activated RET receptor stimulates downstream signaling pathways (PI3K/AKT, Ras/ERK, PLC $\gamma$ , etc.) resulting in C-cell growth and differentiation (2, 3).

MTC patients with local disease may be cured after initial surgery, but persistent or recurrent disease occurs in half of cases, and distant metastases are the major cause of tumor-related death. Cytotoxic chemotherapy or external radiation therapy are poorly effective and new therapeutic strategies are needed for locally advanced or metastatic MTC patients (4, 5).

The constitutive activation of RET is crucial in MTC pathogenesis and led to the development of small compounds targeting its tyrosine kinase activity, some of them being currently used in clinical trials (6–9). Among these compounds, sunitinib (SU11248, Sutent, Pfizer) is a multi-kinase inhibitor with both antiangiogenic and antitumoral activities, that inhibits VEGF receptor (VEGFR)-1, VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , C-KIT, FLT3, CSF1R, and also displays inhibition of RET *in vitro* (10, 11). Sunitinib

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Unité CNRS UMR8200, <sup>2</sup>Laboratoire de Recherche Translationnelle, <sup>3</sup>Unité de Génomique Fonctionnelle, <sup>4</sup>Animalerie, and <sup>5</sup>Département de médecine nucléaire et de carcinologie endocrinienne, Institut de Cancérologie Gustave Roussy and Univ Paris-Sud, Villejuif, France; and <sup>6</sup>Unité INSERM U648 Faculté de Pharmacie, Université Paris, Descartes, France

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Author:** Jean-Michel Bidart, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France. Phone: 33-(0)142114024; Fax: 33-1142115008; E-mail: bidart@igr.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2041

©2011 American Association for Cancer Research.

### Translational Relevance

Sunitinib, a multi-tyrosine kinase inhibitor, has been reported as clinically effective in some patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid carcinoma (MTC). However, molecular mechanisms of action of sunitinib remain still poorly understood in this disease. Discovery of biomarkers that can predict for early therapeutic response is highly required to improve patient care. Here, we investigated molecular mechanisms of action of sunitinib and identified a collection of putative biomarkers predictive of response to sunitinib in MTC using a kinetic microarray approach in preclinical models. These biomarkers include interleukin (IL)-8, TGF- $\beta$ 2, TN-C, and CD44. Furthermore, we demonstrated that metastatic MTC patients presented increased serum levels of IL-8 and TGF- $\beta$ 2. We suggest that these soluble candidate biomarkers may be of value for monitoring sunitinib response in metastatic MTC patients and should be evaluated in clinical trials.

has been effective in some patients with advanced MTC (12–15). Although its effects at the TKR target level are well documented in GIST (gastrointestinal stromal tumor) and renal cell carcinoma models, the molecular mechanisms of action remain poorly understood in MTC (16, 17). Furthermore, in parallel to the development of molecular targeted therapies, identification of surrogate biomarkers that can early determine those patients who are most likely to achieve clinical benefits will be useful for clinical management of such therapies (18, 19).

In the present report, we demonstrate that sunitinib displays antiproliferative and antiangiogenic activities in TT cells, a human RET<sup>C634W</sup> MTC model. Sunitinib inhibits RET autophosphorylation and activation of downstream signaling pathways. Furthermore, sunitinib inhibits CT production at both the gene and protein expression levels. Using an original approach based on *in vitro* kinetic microarray studies (16), we identified during sunitinib treatment major changes in tissue invasion and metastasis gene expression. Among downregulated genes, some encode secreted proteins that were found to be highly expressed in the serum of metastatic MTC patients and thus may constitute putative biomarkers for sunitinib response.

### Materials and Methods

#### Compounds

Sunitinib or SU11248, (N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxamide) was synthesized as previously described (20). For *in vitro* experiments, sunitinib stock solutions were made in 100% dimethylsulfoxide (DMSO). Equivalent DMSO concentration (0.1%) served as vehicle control. For *in vivo* experiments,

sunitinib was dissolved in a citrate-buffered (pH = 3.5) solution.

#### Serum from MTC patients and healthy donors

Serum samples were obtained according to ethical rules from 10 healthy donors and 27 MTC patients with distant metastases who were treated at Institut Gustave Roussy (Supplementary Data S1).

#### Cell culture

The TT cell line (CRL-1803), derived from a human MTC harboring the RET/C634W mutation, was purchased from ATCC (American Type Culture Collection). TT cells were cultured in RPMI-1640 (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (PAA Laboratories GmbH), 2 mmol/L L-glutamine (Glutamax, Invitrogen), 100 units/mL penicillin-streptomycin, and 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin (Antibiotic-Antimycotic, Invitrogen).

#### Cell proliferation assay

TT cells (4,000/well) were seeded in 96-well plates and treated with vehicle or sunitinib over 12 days. Culture media were changed every 3 days. Cell proliferation was quantified by means of a colorimetric assay based on the reduction of the tetrazolium salt 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (WST-1, Roche Applied Science) to formazan, according to manufacturer's instructions.

#### Western blot analysis

TT cells were treated with vehicle or sunitinib over 6 days. Briefly, TT cells were lysed in a RIPA (radioimmunoprecipitation assay) solution containing 50 mmol/L HEPES (pH = 7.5), 1% (v/v) Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EGTA, 50 mmol/L NaF, 20 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 $\times$  protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem, Merck Chemicals Ltd.). Lysates were clarified by centrifugation at 10,000  $\times$  g for 20 minutes. Immunoblotting experiments were performed according to standard procedures. Extracted proteins (50  $\mu$ g/lane) were separated by 4% to 12% SDS-PAGE (Invitrogen) and subjected to immunoblots onto nitrocellulose membrane (Protran BA 83, 0.2  $\mu$ m, Schleicher & Schuell). A rabbit polyclonal anti-RET antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (sc-167, 1:500). Rabbit polyclonal antibodies directed against phospho-RET (3221; 1:750), anti-p44/42 MAPK (9102; 1:1,000), phospho-p44/42 MAPK (9106; 1:1,000), AKT (4691; 1:1,000), and phospho-AKT (9271; 1:750) were purchased from Cell Signaling Technology. Anti-GAPD (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; 1:1,250) was a mouse polyclonal antibody from Millipore. Blots were incubated with primary antibodies overnight at +4°C. Immune complexes were detected with the West Dura Signal Kit (Pierce Biotechnology).

### TT cells xenografts in nude mice

All animal experiments were carried out according to the French Laws for animal welfare under the supervision of authorized investigators. TT cells ( $6 \times 10^6$ ) in 200  $\mu$ L of serum-free medium containing 50% Matrigel Matrix (BD Biosciences) were injected s.c. into the flank of eighteen 6-week-old athymic *nu/nu* female mice. Tumor volume was measured using an Aplio ultrasound scanner (Toshiba), equipped with a 14-MHz probe (PZT, PLT-1204AT; Toshiba). Two weeks after cell injection, tumors reached a mean volume of 247 mm<sup>3</sup> ( $\pm 62$ ) and animals were randomized into 2 groups of 9 mice each: mice then received [*per os*, once daily (5d/wk)] either sunitinib (50 mg/kg/d) or vehicle (citrate-buffered, pH 3.5, solution) during 6 weeks. Tumor volume and body weights were monitored at weekly intervals.

### Immunohistochemistry

Xenografts were formalin fixed and paraffin embedded for preparation of 4  $\mu$ m sections used for histologic examination after standard hematoxylin and eosin (H&E) staining or immunohistochemistry labeling with Ki-67 (SP6, 1:150, Neomarkers) and CD34 (MEC 14.7, 1:50, Tebu-bio) antibodies. Microvessel density was quantified by counting the number of CD34-positive cells in 3 representative areas of 0.3 mm<sup>2</sup> ( $\times 200$ ). The percentage of Ki-67-positive cells was estimated in 1 representative area ( $\times 630$ ). The percentages of necrosis and fibrosis were evaluated on the whole section of all the xenografts ( $\times 25$ ) and a mean score was reached. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. Pictures were acquired on a Leica DM 2000 video camera.

### Biomarker analysis

TT cell culture media were collected simultaneously to cell lysates, as described above. Mice blood samples were collected by orbital puncture (days 3 and 18) or by cardiac puncture (day 38) from TT cells xenografted mice treated with sunitinib or placebo as described above. Human calcitonin (Biomerica), interleukin (IL)-8, TGF- $\beta$ 2 (R&D Systems), CD44 (Tebu-bio), and TN-C (IBL International) levels were quantified by ELISAs according to manufacturers' instructions in TT cell culture media and/or in the serums of xenografted mice and/or MTC patients and/or healthy donors. Immunoenzymatic assay of human carcinoembryonic antigen (CEA) was performed on the UniCel Dxl 800 Access device (Beckman Coulter). All measurements were done in duplicate.

### RNA extraction and purification

Frozen xenografts and cell samples were lysed in Trizol Reagent (Invitrogen), total RNAs were isolated according to manufacturer recommendations, and then purified using the RNeasy microkit (QIAGEN). RNA quality (28S/18S ratio  $> 1.5$ ) was assessed using the RNA 6000 Nano Lab-On-Chip technology (Agilent Technologies).

### Pan genomic expression profile analysis during sunitinib treatment

*In vitro* gene expression was analyzed by microarray experiments as previously described (21). Briefly, each experiment was performed 3 times. Samples analyzed were RNA pools of TT cells treated with 250 nmol/L of sunitinib during 1, 3, or 6 days. References used were RNA pools of TT cells treated with vehicle at each time point. Reverse transcription, linear amplification, cRNA labeling, and purification were performed using the Agilent Linear amplification Kit and labeling with Cyanine 3 (Cy3)-CTP or cyanine 5 (Cy5)-CTP (Agilent Technologies; ref. 22). Dye-swap competitive hybridization procedure was performed with 1  $\mu$ g of cRNAs of labeled samples against 1  $\mu$ g of labeled time-matched references on 44K Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies) and then scanned with an Agilent Technologies Scanner. Image analyses (quantification, normalization) were performed with Feature Extraction software (Agilent Technologies) and gene expression analysis was performed using Resolver software (Rosetta Inpharmatics). Differential expressed genes compared with each time point-matched references were retained for fold change over 1.75 and value of  $P < 10^{-3}$  as previously published (16). Molecular and cellular functions of genes were investigated using the Ingenuity software and considered as most regulated according to lowest  $P$  value. Top-regulated genes using the Ingenuity software refer to gene with highest fold change. All raw microarray data are available on Array Express at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>; accession number E-TABM-929).

### Real-time quantitative PCR

One microgram of total RNA from each sample was reverse transcribed by superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of random primers (Applied Biosystems). Quantitative PCR (Q-PCR) was performed on an equivalent amount of 12.5 ng total RNA per tube in a final volume of 25  $\mu$ L. Oligonucleotide primers and TaqMan probes were designed using the PrimerExpress computer software (Applied Biosystems) and purchased from MWG Biotech (*G2M*, *GAPD*, *PPIA*, *TBP*, *CT*, *VIM*, and *CD44*) or obtained from Assays-On-demand (Applied Biosystems; *TN-C*, *SPARC*, *IL-8*, *PLAU*, *STMN4*, *SCEL*, *TGF- $\beta$ 2*, and *FST*). The expression values were normalized using housekeeping genes (*G2M*, *GAPD*, *PPIA*, *TBP*) as previously described (21, 22).

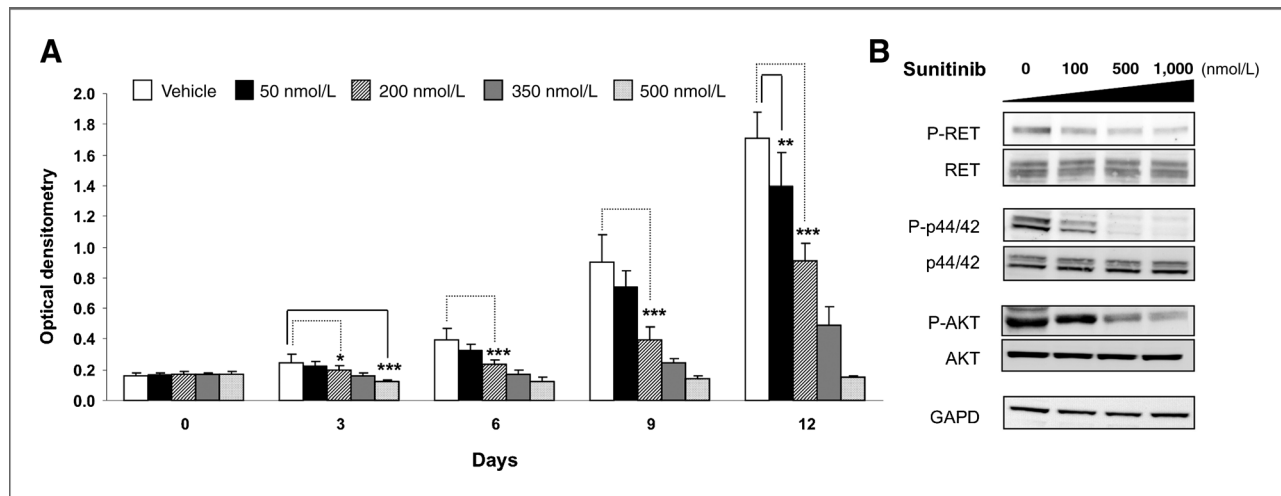
### Small interfering RNA cell transfection

TT cells were transfected using the Nucleofector transfection Kit (Amaxa), RET siRNA (Dharmacon), and nontargeted Stealth siRNA used as control (Invitrogen), as previously published (21).

### Statistical analysis

Data are reported as means  $\pm$  SE or median. Statistical significance ( $P < 0.05$ ) was evaluated by paired Student's





**Figure 1.** Sunitinib displays an antiproliferative activity. A, sunitinib blocks proliferation of TT cells in a dose- and time-dependent manner. TT cells were treated with vehicle or sunitinib over 12 days. Cell growth was measured by WST-1 assay. Bars,  $\pm$ SD. Unpaired *t* test (\*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ ). B, sunitinib inhibits RET, AKT, and p44/42 activation in TT cells in a dose-dependent manner. TT cells were treated with vehicle or sunitinib for 4 hours. Lysates were immunoblotted with anti-RET, anti-phospho-RET/Y905 (P-RET), anti p44/42, anti-phospho-p44/42 (P-p44/42), anti-AKT, anti-phospho-AKT (P-AKT), anti-GAPD as described in the "Materials and Methods" section.

*t* or Mann-Whitney's *w* tests. Results were subjected to statistical analysis by using the GraphPad Prism software package, version 4.02 (GraphPad).

## Results

### Sunitinib inhibits proliferation and angiogenesis in MTC models

The effect of sunitinib on MTC was first evaluated *in vitro* on TT cells cultured over 12 days and treated with either sunitinib (50, 200, 350, and 500 nmol/L) or vehicle as control. The cell proliferation was assessed by WST-1 assay. A significant antiproliferative effect occurred after 3 days of treatment for concentrations above 200 nmol/L ( $P < 0.05$ ) and a complete growth arrest was obtained with 500 nmol/L ( $P < 0.001$ ; Fig. 1A). We then tested the effects of sunitinib on RET phosphorylation and signaling by Western blotting experiments on TT cell lysates. A dose-dependent decrease of RET, p44/42, and AKT phosphorylation was observed after 4 hours of sunitinib treatment (Fig. 1B).

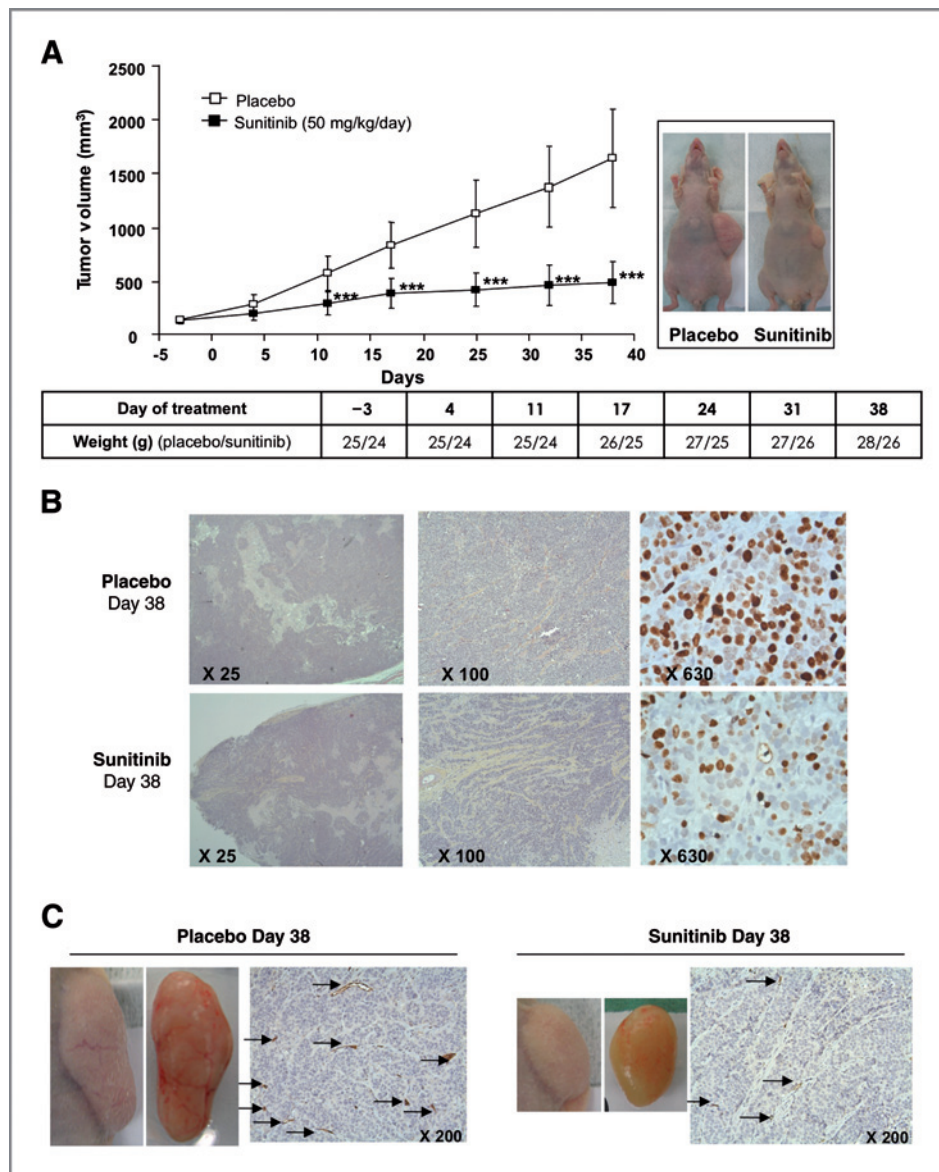
Then, sunitinib effect was explored *in vivo* on nude mice bearing TT cells xenografts which were treated once daily with either sunitinib (50 mg/kg/d) or placebo during 38 days. Treatment did not affect the body weight gain profile and no apparent toxicity was observed. Sunitinib significantly reduced tumor growth as soon as 11 days after initiation of treatment ( $P < 0.001$ ; Fig. 2A) and after 38 days of treatment, a 70% decrease in tumor volume was observed in the sunitinib group. After sacrifice at day 38, sunitinib-treated tumors displayed a reduced number of tumor cells (−30%), a decreased proliferation of tumor cells (−43%) determined using Ki67 immunostaining and also an increased necrosis ( $\times 1.25$ ) and fibrosis ( $\times 2.2$ ; Fig. 2B).

Then, the antiangiogenic properties of sunitinib were investigated *in vivo* in the MTC model. After 38 days of treatment, vascularization of the skin and of the xenograft surfaces were macroscopically less developed in sunitinib-treated animals. At a microscopic level, sunitinib treatment reduced the number of vessels (−43%;  $5 \pm 1$  vs.  $9 \pm 2$ ), as shown by CD34 immunostaining (Fig. 2C). This effect may explain the increased necrosis observed during sunitinib treatment.

### Sunitinib treatment induces major changes in tissue invasion and metastasis processes

To identify biological pathways modified during sunitinib treatment with antiproliferative effects, we analyzed gene expression changes in TT cells treated with 250 nmol/L of sunitinib for 1, 3, and 6 days. After 1 day of treatment, 1,107 transcripts were differentially expressed including 419 that were upregulated and 688 that were downregulated; at day 3, 292 transcripts (69 upregulated and 223 downregulated) and at day 6, 313 transcripts (95 upregulated and 218 downregulated) were modulated. Together these results showed that the number of genes modified in their expression was more important after a short exposure to sunitinib and, that a higher number of genes were downregulated than upregulated. At day one, about half of the genes were related to cell division and proliferation, in particular those encoding transcription factors (Supplementary Data S2 and S3). Finally, 269 genes were shared for at least 2 time points and 115 genes for all 3 time points.

Analysis of molecular and cellular functions of genes, whose expression was modified during sunitinib treatment, was performed using Ingenuity software. At any time of treatment, the major modified function, as defined in



**Figure 2.** Sunitinib inhibits TT cells tumor growth and angiogenesis in nude mice. TT-xenografted nude mice (9 per group) received sunitinib (50 mg/kg/d) or vehicle for 5 d/wk for 6 weeks by oral gavages (day 1 is the treatment starting day). A, diameters of tumors were determined by ultrasonographic measures. Data represent the mean of tumor volume. Bars,  $\pm$ SD. Unpaired *t* test (\*\*\*,  $P < 0.001$ ). Mouse weights were comparable. B, after 38 days, tumors were examined by conventional H&E (left & middle) and Ki67 immunostaining (right). Sunitinib reduced the number of tumor cells ( $\sim 30\%$ ), increased necrosis ( $\times 1.25$ ), and fibrosis ( $\times 2.2$ ), and decreased tumor cells proliferation ( $\sim 43\%$ ). C, sunitinib treatment reduced macrovascularisation of xenografts and the number of vessels by 43% after 38 days as shown by CD34 immunostaining. Arrows indicate CD34-positive cells (vessel elements). Representative micrographs are shown.

the "Material and Methods" section, was cellular growth and proliferation. After one day of sunitinib treatment, genes involved in cell cycle and DNA replication, recombination and repair functions were changed in their expression. At days 3 and 6, modified gene functions were similar and included cell-to-cell signaling and interaction, cell death, and cellular movement (Supplementary Data S4).

Regarding biological functions, top-regulated genes, in terms of fold change levels, mainly referred to tissue invasion and metastasis capabilities of tumor cells. Among these, several genes were upregulated during sunitinib treatment including *CDH4*, *FGF7*, and *MMP26* (Supplementary Data S5). Most genes were downregulated and encoded proteins that are mainly involved in the extracellular matrix composition and remodeling (*TN-C*, *PLAU*, *PAI-1*, *LAMA4*, *LAMB3*, *SPARC*), cytoskeleton and cell

mobility (*JUB*, *VIM*, *STMN4*, *LUM*, *SCEL*), and cell-to-cell interactions (*CD44*, *PCDH7*, *CDH6*; Table 1).

#### Gene expression profiling identifies potential soluble biomarkers of sunitinib response

We then focused transcriptome analysis on downregulated genes, looking for potential biomarkers of sunitinib response. To confirm microarray observations, real-time Q-PCR was carried out for 9 selected genes, among those mostly downregulated during sunitinib treatment. In *in vitro* sunitinib-treated TT cells, comparable results were observed between microarray and Q-PCR experiments (Table 2). Moreover, 5 of these 9 genes (*TN-C*, *PLAU*, *SCEL*, *FST*, *IL-8*) displayed similar changes in expression during sunitinib treatment, both *in vitro* and *in vivo* (Table 2). Interestingly, *TN-C*, *PLAU*, *FST*, and *IL-8* encode

**Table 1.** Summary of top downregulated genes modulated by sunitinib in TT cells obtained by microarray technology as described in the "Materials and Methods" section

GenBank accession no.	Symbol	Name	Fold change		
			Day 1	Day 3	Day 6
A_23_P161190	VIM	Vimentin	-1.9	-4.2	-5.4
A_23_P500000	SCEL	Sciellin	-4.5	-3.4	-4.3
A_23_P31739	STMN4	Stathmin like-4	-2.0	-2.3	-3.4
A_23_P24104	PLAU	Urokinase	-3.8	-3.1	-3.0
A_23_P157865	TN-C	Tenascin-C	-2.0	-3.1	-3.0
A_23_P156327	TGFB1	TGF beta inhibitor	ND	-2.8	-2.9
A_23_P7642	SPARC	Osteonectin	ND	-1.9	-2.8
A_23_P110531	FST	Follistatin	-1.9	-2.3	-2.7
A_23_P310921	PCDH7	Protocadherin 7	-3.2	-2.9	-2.6
A_23_P54055	JUB	Ajuba	-2.1	-2.4	-2.5
A_23_P86012	LAMB3	Laminin B3	-1.5	-2.6	-2.4
A_24_P148261	TGFB2	TGF beta 2	-1.8	-1.8	-2.4
A_23_P133656	LAMA4	Laminin A4	-2.4	-2.2	-2.3
A_23_P341938	NOG	Noggin	-2.7	-2.0	-2.1
A_24_P158089	PAI-1	Plasminogen inhibitor 1	-2.2	-2.1	-2.0
A_23_P88404	TGFB3	TGF beta 3	-2.3	-2.0	-2.0
A_23_P24870	CD44	Cluster differentiation 44	-1.7	-1.6	-2.0
A_23_P99063	LUM	Luminal	ND	-2.5	-1.9
A_23_P214011	CDH6	Cadherin 6	-4.9	-2.1	-1.7
A_32_P87013	IL-8	Interleukin 8	-1.9	-2.3	ND

NOTE:  $P < 0.05$ .

Abbreviation: ND, nondetermined.

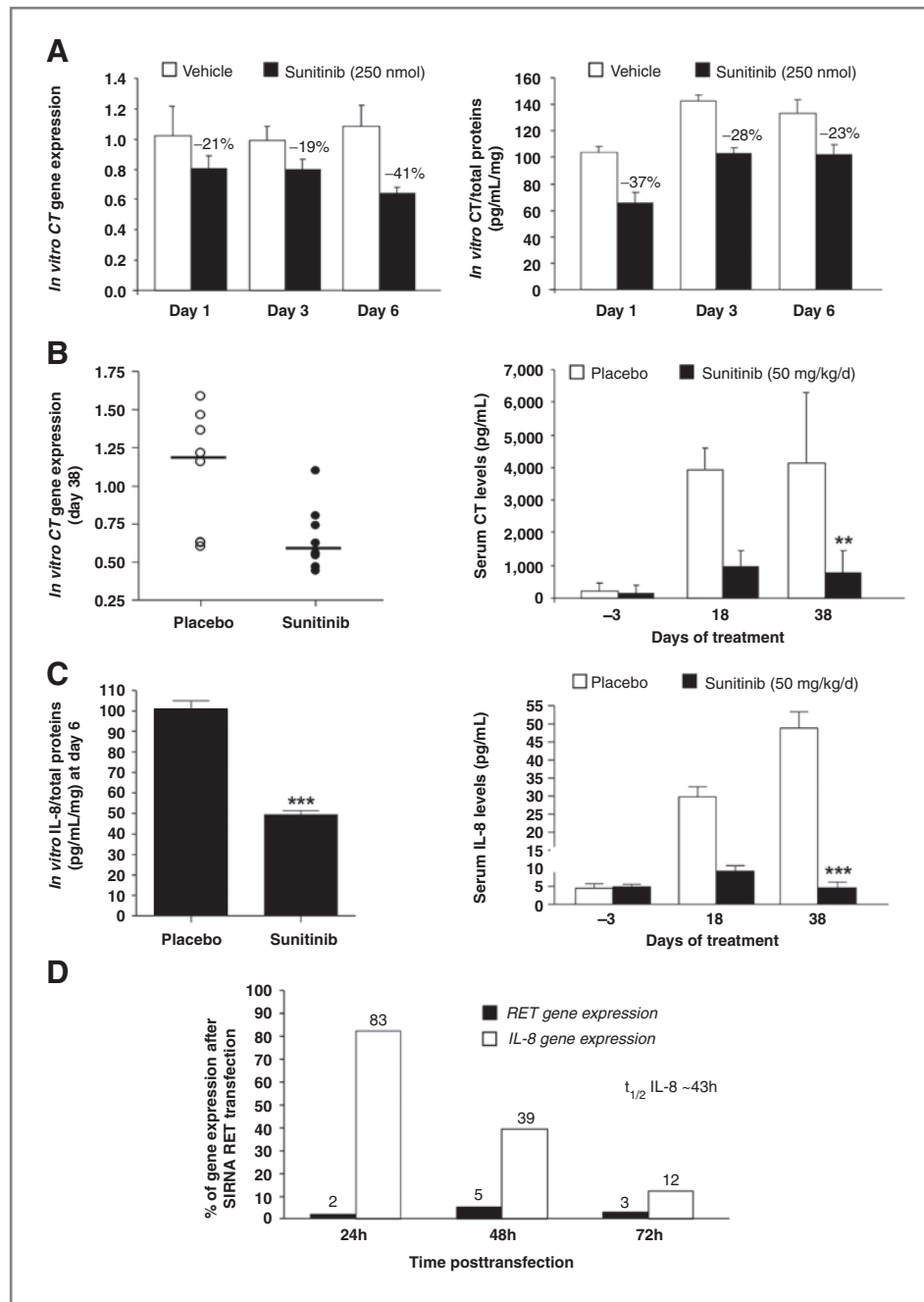
secreted proteins that may constitute soluble biomarkers of sunitinib response.

In this context, we also investigated sunitinib effect on CT production, a seminal protein biomarker routinely used for follow-up of MTC patients. We first examined CT gene and protein expressions using Q-PCR and ELISAs, respec-

tively, in both *in vitro* and *in vivo* models. *In vitro*, CT gene expression was inhibited up to 40% after a 6-day treatment with 250 nmol/L of sunitinib (Fig. 3A, left). This observation is in agreement with the dramatic decrease of CT concentration in culture medium that remained significant when normalized for total protein amounts (Fig. 3A, right).

**Table 2.** Gene expression of invasiveness markers modulated by sunitinib treatment (Q-PCR)

Gene	Fold change (sunitinib/placebo)			
	TT cells (250 nmol/L)			TT xenografts
	Day 1	Day 3	Day 6	Day 38
VIM	-1.9	-4.6	-6.4	-1.3
SCEL	-3.3	-3.7	-4.7	-2.8
TN-C	-1.5	-4.4	-4.4	-4.2
STMN4	-2.0	-2.5	-3.6	-1.2
PLAU	-2.1	-4.0	-3.4	-1.9
SPARC	-1.1	-2.2	-2.9	-1.0
FST	-1.7	-2.1	-2.9	-1.7
IL-8	-1.8	-3.0	-2.8	-2.0
CD44	-1.6	-1.7	-1.9	-1.3
TGFB2	-1.4	-1.6	-1.7	+1.2



**Figure 3.** Sunitinib inhibits biomarkers expression. TT cells were treated with vehicle or sunitinib (250 nmol/L). TT xenografted nude mice received sunitinib (50 mg/kg/d) or vehicle for 5 d/wk for 6 weeks. Biomarkers levels were assessed by ELISA. Gene expression was determined by Q-PCR. **A**, *in vitro* CT gene (left) and protein (right) expression. **B**, *in vivo* CT gene (left) and protein (right) expression. Bars, median. **C**, *in vitro* (left) and *in vivo* (right) IL-8 protein expression. **D**, levels of *RET* and *IL-8* gene expression in TT cells siRNA *RET* transfected as compared with TT cells transfected with a nontargeted siRNA used as control.

During sunitinib treatment, CT decrease is thus likely to be due to both the decrease in the number of TT cells and the inhibition of CT expression in viable tumor cells. Similar results were observed *in vivo*, with a reduction (–40%) of CT gene expression in xenografts after a 38-day sunitinib treatment (Fig. 3B, left). Moreover, serum CT concentration decreases up to 80% during sunitinib treatment as compared with that in control animals (Fig. 3B, right). No linear relationship was found between serum CT values and xenograft volumes. Indeed, after 38 days of treatment, both placebo- and sunitinib-treated

xenografts displayed necrosis, and tumor volume is not strictly representative of the number of viable tumor cells. No changes were observed both on *CEA* gene and protein expressions (data not shown).

We then investigated the effects of sunitinib on IL-8, one of the putative biomarkers identified during the gene expression profiling analysis. As determined by ELISA, sunitinib strongly reduced IL-8 secretion in TT cell culture media, up to 50% after 6 days of sunitinib treatment (250 nmol/L; Fig. 3C, left). Moreover, *in vivo*, IL-8 serum level was dramatically decreased after 38 days of sunitinib

treatment (Fig. 3C, right). To assess the link between RET inhibition and *IL-8* gene expression, siRNA RET transfection was performed on the TT cell line. Nontargeted siRNA, used as control, did not reduce *RET* and *IL-8* gene expression levels as analyzed by Q-PCR (data not shown). After siRNA RET transfection, the expression of RET mRNA was strongly reduced as of 24 hours of exposure. In the same experimental conditions, *IL-8* gene expression was decreased in a time-dependent manner, from 17% at 24 hours to 88% at 72 hours of posttransfection. *IL-8* half life was calculated to be about 43 hours (Fig. 3D).

Finally, we examined the presence of several identified potential biomarkers, including *IL-8* and TGF- $\beta$ 2, in the serum of 27 MTC patients with metastatic disease and 10 healthy donors. Basal levels in the healthy donor population were in accordance with already published data. In MTC patients, significantly higher serum concentrations of *IL-8* ( $w < 0.001$ ) and TGF- $\beta$ 2 ( $w < 0.05$ ) were observed. In addition, serum concentrations of TN-C and CD44 also appeared to be slightly higher in MTC patients but with a large range of variations (Fig. 4).

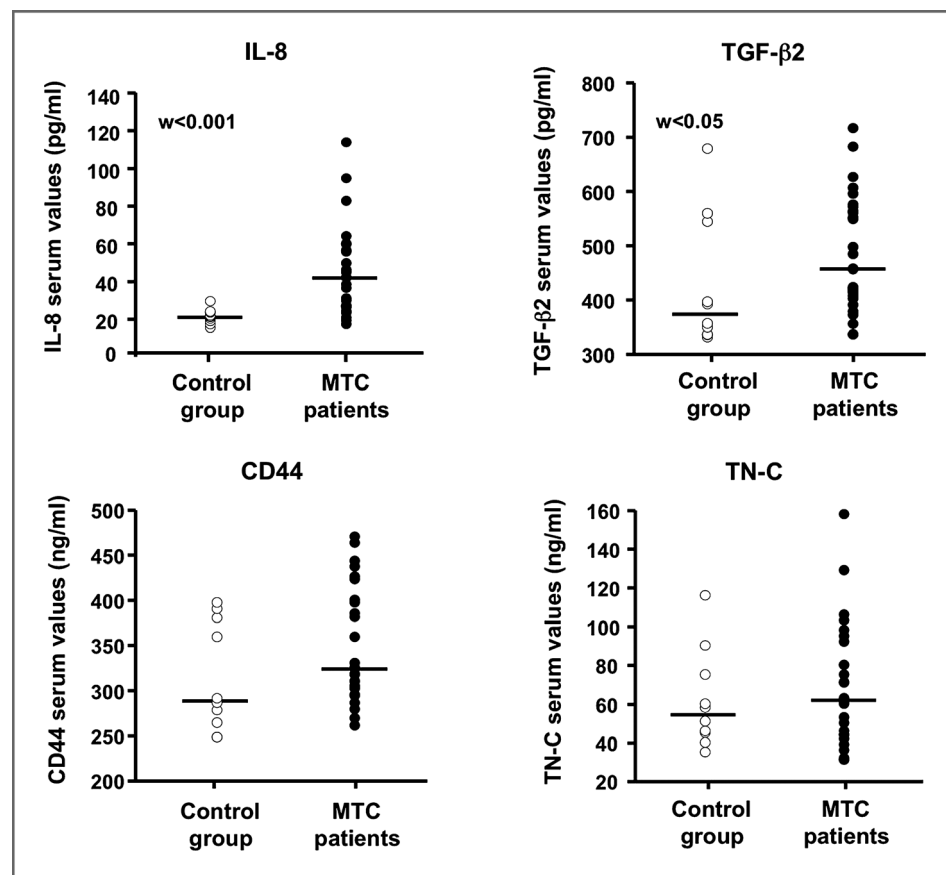
## Discussion

Our results demonstrate that sunitinib has antiproliferative, antitumoral, and antiangiogenic properties in *in vitro*

as well as *in vivo* MTC models based on TT cell line. *In vitro*, sunitinib strongly reduces proliferation of TT cells in a dose- and time-dependent manner. This observation is in line with previous results showing a growth inhibitory effect of sunitinib on a thyroid carcinoma cell line (TPC-1) harboring a RET/PTC rearrangement (11). Moreover, doses used are in agreement with already published preclinical data showing effectiveness of sunitinib in different cancer types (23, 24). At the molecular level, RET kinase inactivation was associated with an inhibition of AKT and p44/42 pathways in TT cells. These findings are consistent with previous data involving PI3K/AKT and Ras/MAPK as major downstream RET signaling pathways. Indeed, other signaling cascades that have been involved in MTC, such as PLC- $\gamma$ , STAT3, NF $\kappa$ B, p38MAPK, c-Jun N-terminal kinase should also be explored in this model (2, 3, 14, 15).

A strong antitumor effect was also observed *in vivo*, at a well-tolerated dose of sunitinib (50 mg/kg/d), as substantiated by the inhibition of TT cell xenografted tumor growth and the decrease of Ki67 immunostaining. Other multi-kinase inhibitors, such as vandetanib or sorafenib, have shown similar antitumor activity in this model (25–29). Interestingly, tumor volume was not reduced by sunitinib but tumor growth was limited. Moreover, sunitinib increased fibrosis in the xenografts stroma, indicating that it acts not only on tumor cells but also on

Figure 4. Serum levels of potential biomarkers of sunitinib response in MTC patients ( $n = 27$ ) and healthy donors (control group;  $n = 10$ ). *IL-8*, TN-C, TGF- $\beta$ 2, and CD44 levels were assessed by ELISA. Bars, median.  $w$ , Mann-Whitney test.



their environment, and also decreased angiogenesis, as shown by the significant reduction in microvessel density. This effect is likely to be due to the potent inhibition of angiogenesis TKR including KDR, PDGFR $\alpha$ , and PDGFR $\beta$ . Recent evidence suggest that sunitinib inhibits renal cancer growth primarily through an antiangiogenic mechanism rather than through direct targeting of tumor cells (30). Indeed, the potential inhibition of additional TKR and their contribution to the therapeutic efficacy of sunitinib cannot be ruled out. Furthermore, in sporadic *RET* wild-type MTC, other molecular events are thought to contribute to malignant transformation and to the metastatic process (6, 21). These data may explain the clinical efficacy of sunitinib in sporadic advanced MTC patients without *RET* mutation (12).

Serial time microarray analysis allowed identifying changes in gene expression induced by sunitinib treatment that were confirmed by Q-PCR. Interestingly, sunitinib treatment induced major changes on the expression of genes with putative function in tissue invasion and metastasis suggesting a potential key role of the encoded proteins in MTC malignancy (31, 32). Thereby, urokinase plasminogen (*PLAU*) and endogenous protease inhibitor (*PAI-1*) that promote cancer metastasis were found to be inhibited by sunitinib (33). In addition, differential effects were observed on members of the cadherin and metalloprotease family genes. Expression of cadherins in MTC is poorly documented (28) and sunitinib treatment induced up- and downregulation of *CDH4* or R-cadherin and *CDH6*, respectively. R-cadherin acts as a critical regulator of the normal phenotype and its loss contributes to epithelial suppression and metastatic progression (34). Aberrant expression of cadherin-6 is associated with a poor prognosis. Interestingly, *CDH11*, that is expressed in the follicular histotype of differentiated thyroid carcinomas, has been reported to be modulated by sunitinib but does not appear to be a target in MTC (16). During sunitinib treatment, metalloprotease gene expression was up-, *MMP26*, or downregulated, *MMP16*. The precise role of these MMP as well as their differential regulation by sunitinib remains to be investigated. Finally, sunitinib also decreased vimentin, a key regulator of epithelial–mesenchymal transition whose expression is associated to invasiveness and metastasis (35) and *CD44* that likely contributes to tumor progression (36).

Discovery of novel biomarkers of targeted therapies remains challenging for identifying patients likely to benefit from treatment (37). In this study, we showed that *CT* gene expression, the current seminal biomarker of MTC, was inhibited by sunitinib *in vitro* and *in vivo* and consequently, its protein secretion was decreased. This effect appears to be dissociated from that on tumor burden, as observed with other TKR inhibitors (25). Thus, serum *CT* may not indicate changes in tumor burden in MTC patients treated with TKR inhibitors and new early predictive biomarkers of therapeutic response would be of value.

Using gene expression profiling (16), we identified genes that were downregulated by sunitinib, and that

encoded secreted proteins, and we selected IL-8, tenascin-C (TN-C), TGF- $\beta$ 2, and CD44 as candidate biomarkers. IL-8, a cytokine with proangiogenic and mitogenic effects, was selected among genes displaying major changes. Its production is known to be regulated by the RET receptor (38), and the inhibitory effect observed during sunitinib exposure is likely to be due, at least partly, to the inhibition of RET phosphorylation, as shown in Western blotting and siRNA experiments. Decreased tumor secretion of IL-8 during sunitinib treatment, observed both *in vitro* and *in vivo*, has been described in other carcinomas and can be due to other mechanisms including inhibition of VEGF regulatory loops (39). Furthermore, recent results indicated that IL-8 is highly expressed in some carcinomas (40) and could mediate sunitinib resistance in renal carcinoma (41). This observation is in line with our clinical results showing significantly higher concentrations of IL-8 in the serum of metastatic MTC patients than in healthy donors. Therefore, IL-8 can be considered both as a potential therapeutic target and clinical biomarker for follow-up.

TGF- $\beta$ 2 was also found to be increased in the serum of metastatic MTC patients and downregulated after sunitinib treatment in our preclinical models. TGF- $\beta$ 2 controls cell growth and differentiation, may promote angiogenesis, wound healing, and also acts as a factor for remodeling the extracellular matrix (42). Interestingly, elevated serum levels of TGF- $\beta$ 2 have also been described in various cancer types and it has been considered as a potential biomarker of cancer (43, 44). TN-C, an extracellular matrix glycoprotein involved in tissue interactions, was also one of the most downregulated genes both *in vitro* and *in vivo*. TN-C has been reported to inhibit cell adhesion to fibronectin and to promote cell migration, tumor proliferation, and metastasis (45, 46). A recent study showed that, if not expressed in normal tissue, TN-C is detectable in both stroma and tumor cells from human MTC samples, suggesting that it may be an early indicator of MTC carcinogenesis (47). Our results also indicate that sunitinib may control stroma remodelling induced by TN-C.

Together, our observations demonstrated that sunitinib displays both antiproliferative and antiangiogenic properties on MTC models bearing a *RET*<sup>C634W</sup> activating mutation through direct inhibition of tumor cells and tumoral environment. Whether these effects are also observed for other *RET* mutations and/or resistance mutants remain to be investigated. Furthermore, mechanisms of action underlying its efficacy reveal major changes in tissue invasion and metastasis processes. Among modified genes, some encoded potential surrogate biomarkers of sunitinib response that would deserve further investigation. Finally, further clinical investigations of IL-8 and other proteins identified as a single or a panel of biomarkers of sunitinib response is warranted.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

The authors thank Hervé Galons, Virginie Quidville, Ingrid Leguerey, Amélie Boichard, Hugues Ripoche, Patrick Saulnier, and Frédéric Commo for their precious help and advices.

## Grant Support

This work was supported by grants from Institut Gustave Roussy. S. Broutin is a recipient from the Association pour la Recherche sur le

Cancer. M. Schlumberger and J.M. Bidart have declared research grants from the following companies: AstraZeneca, BMS, Exelixis, and Genzyme.

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

Received July 29, 2010; revised January 19, 2011; accepted January 20, 2011; published OnlineFirst February 15, 2011.

## References

- Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 2004;61:299–310.
- Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145:5448–51.
- de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 2006;27:535–60.
- Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009;19:565–612.
- Schlumberger M, Carlomagno F, Baudin E, Bidart JM, Santoro M. New therapeutic approaches to treat medullary thyroid carcinoma. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:22–32.
- Santarpia L, Ye L, Gagel RF. Beyond RET: potential therapeutic approaches for advanced and metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Intern Med* 2009;266:99–113.
- Sherman SI. Advances in chemotherapy of differentiated epithelial and medullary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1493–9.
- Wells SA Jr, Santoro M. Targeting the RET pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:7119–23.
- Schlumberger MJ, Elisei R, Bastholt L, Wirth LJ, Martins RG, Locati LD, et al. Phase II study of safety and efficacy of motesanib in patients with progressive or symptomatic, advanced or metastatic medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:3794–801.
- Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 2007;25:884–96.
- Kim DW, Jo YS, Jung HS, Chung HK, Song JH, Park KC, et al. An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/papillary thyroid cancer kinases. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4070–6.
- Bugalho MJ, Domingues R, Borges A. A case of advanced medullary thyroid carcinoma successfully treated with sunitinib. *Oncologist* 2009;14:1083–7.
- Cohen E, Needles B, Cullen K. Phase 2 study of sunitinib in refractory thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:6025.
- Carr LL, Mankoff DA, Goulart BH, Eaton KD, Capell PT, Kell EM, et al. Phase II study of daily sunitinib in FDG-PET-positive, iodine-refractory differentiated thyroid cancer and metastatic medullary carcinoma of the thyroid with functional imaging correlation. *Clin Cancer Res* 2010;16:5260–8.
- Phay JE, Shah MH. Targeting RET receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:5936–41.
- Morimoto AM, Tan N, West K, McArthur G, Toner GC, Manning WC, et al. Gene expression profiling of human colon xenograft tumors following treatment with SU11248, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Oncogene* 2004;23:1618–26.
- Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 2009;69:2506–13.
- Kelloff GJ, Bast RC Jr, Coffey DS, D'Amico AV, Kerbel RS, Park JW, et al. Biomarkers, surrogate end points, and the acceleration of drug development for cancer prevention and treatment: an update prologue. *Clin Cancer Res* 2004;10:3881–4.
- Park JW, Kerbel RS, Kelloff GJ, Barrett JC, Chabner BA, Parkinson DR, et al. Rationale for biomarkers and surrogate end points in mechanism-driven oncology drug development. *Clin Cancer Res* 2004;10:3885–96.
- Sun L, Liang C, Shirazian S, Zhou Y, Miller T, Cui J, et al. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 2003;46:1116–9.
- Ameur N, Lacroix L, Roucan S, Roux V, Broutin S, Talbot M, et al. Aggressive inherited and sporadic medullary thyroid carcinomas display similar oncogenic pathways. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:1261–72.
- Lacroix L, Lazar V, Michiels S, Ripoche H, Dessen P, Talbot M, et al. Follicular thyroid tumors with the PAX8-PPARGgamma1 rearrangement display characteristic genetic alterations. *Am J Pathol* 2005;167:223–31.
- Christensen JG. A preclinical review of sunitinib, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor with anti-angiogenic and antitumor activities. *Ann Oncol* 2007;18Suppl 10:x3–10.
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003;9:327–37.
- Akeno-Stuart N, Croyle M, Knauf JA, Malaguarnera R, Vitagliano D, Santoro M, et al. The RET kinase inhibitor NVP-AST487 blocks growth and calcitonin gene expression through distinct mechanisms in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:6956–64.
- Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, Wilhelm SM, et al. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:326–34.
- Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, et al. ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res* 2002;62:7284–90.
- Johanson V, Ahlman H, Bernhardt P, Jansson S, Kölbl L, Persson F, et al. A transplantable human medullary thyroid carcinoma as a model for RET tyrosine kinase-driven tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:433–44.
- Petrangolini G, Cuccuru G, Lanzi C, Tortoreto M, Belluco S, Pratesi G, et al. Apoptotic cell death induction and angiogenesis inhibition in large established medullary thyroid carcinoma xenografts by Ret inhibitor RPI-1. *Biochem Pharmacol* 2006;72:405–14.
- Huang D, Ding Y, Li Y, Luo WM, Zhang ZF, Snider J, et al. Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:1053–62.
- Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature* 2002;418:823.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
- Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 2008;214:283–93.

34. Agjostatidou G, Li M, Suyama K, Badano I, Keren R, Chung S, et al. Loss of retinal cadherin facilitates mammary tumor progression and metastasis. *Cancer Res* 2009;69:5030–8.
35. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, et al. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2803–8.
36. Xu Y, Yu Q. E-cadherin negatively regulates CD44-hyaluronan interaction and CD44-mediated tumor invasion and branching morphogenesis. *J Biol Chem* 2003;278:8661–8.
37. Duda DG, Ancukiewicz M, Jain RK. Biomarkers of antiangiogenic therapy: how do we move from candidate biomarkers to valid biomarkers? *J Clin Oncol* 2010;28:183–5.
38. Iwahashi N, Murakami H, Nimura Y, Takahashi M. Activation of RET tyrosine kinase regulates interleukin-8 production by multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:642–9.
39. Crawford S, Belajic D, Wei J, Riley JP, Dunford PJ, Bembenek S, et al. A novel B-RAF inhibitor blocks interleukin-8 (IL-8) synthesis in human melanoma xenografts, revealing IL-8 as a potential pharmacodynamic biomarker. *Mol Cancer Ther* 2008;7:492–9.
40. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res* 2010;106:91–111.
41. Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2010;70:1063–71.
42. Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, Yae T, Suzuki Y, Shinoda T, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. *J Biol Chem* 2010;285:4060–73.
43. Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 1998;77:1492–4.
44. Schneider T, Sailer M, Ansorge S, Firsching R, Reinhold D. Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 2006;79:61–5.
45. Chiquet-Ehrismann R. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:986–90.
46. Maschler S, Grunert S, Danielopol A, Beug H, Wirtl G. Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF-beta-induced progression of mammary tumor cells. *Oncogene* 2004;23:3622–33.
47. Koperek O, Prinz A, Scheuba C, Niederle B, Kaserer K. Tenascin C in medullary thyroid microcarcinoma and C-cell hyperplasia. *Virchows Arch* 2009;455:43–8.



	<b>Control group</b>	<b>MTC group</b>
<b>Number</b>	10	27
<b>Sex</b>		
<i>Male</i>	4	20
<i>Female</i>	6	7
<b>Age (year)</b>		
<i>Median</i>	29	53
<i>Mean</i>	29	55
<i>Range</i>	22-43	34-84
<b>Baseline calcitonin level (pg/ml)</b>		
<i>Median</i>	/	9 667
<i>Mean</i>	/	27 557
<i>Range</i>	/	1 164 - 166 000

**Supplementary data 1.** Characteristics of healthy donors (control group) and MTC patients (MTC group).

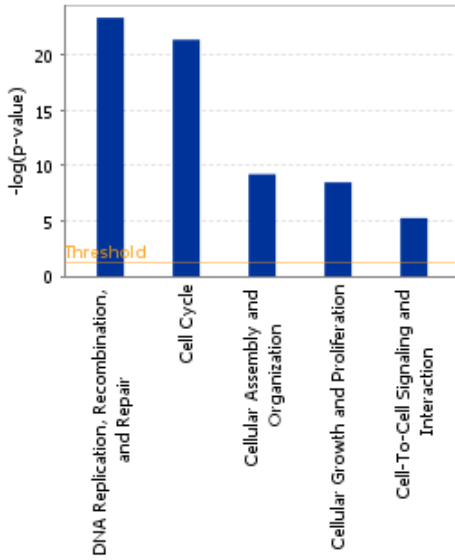
Biological process	Number of genes in the GO database	Number of modified genes		
		Only day 1 study set	Only day 3 study set	Only day 6 study set
Cell cycle	89	84 (94%)	1 (1%)	0
DNA replication	59	58 (98%)	0	0
Response to DNA damage stimulus	40	40 (100%)	0	0
DNA repair	34	34 (100%)	0	0
Cell division	53	50 (94%)	1 (2%)	0
Mitosis	37	36 (97%)	0	0
Regulation of transcription DNA dependent	86	71 (83%)	0 (0%)	5 (6%)
Transcription	78	61 (78%)	2 (3%)	6 (8%)

**Supplementary data 2.** Biological processes related to control of cell proliferation and division that are modified under sunitinib treatment as defined using the Gene Ontology (GO) Viewer function of the Rosetta resolver® software.

<b>Biological process</b>	<b>Number of genes in the GO database</b>	<b>Number of modified genes</b>
Cell Adhesion	41	21 (51%)
Homophilic cell adhesion	13	10 (77%)
Signal transduction	81	31 (38%)
Cell-cell signaling	27	14 (52%)
Ion transport	29	14 (48%)
Cell motion	10	7 (70%)
Apoptosis	22	11 (50%)

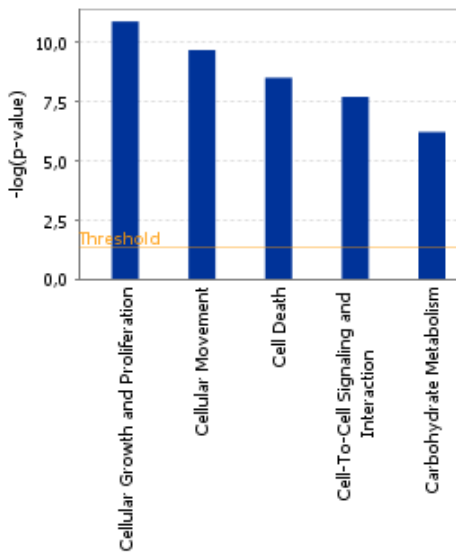
**Supplementary data 3.** Main biological processes related to modified TT cell genes, shared at least at 2 time points after sunitinib treatment, defined using the Gene Ontology (GO) Viewer function of the Rosetta resolver® software.

## Molecular & Cellular functions - Day 1



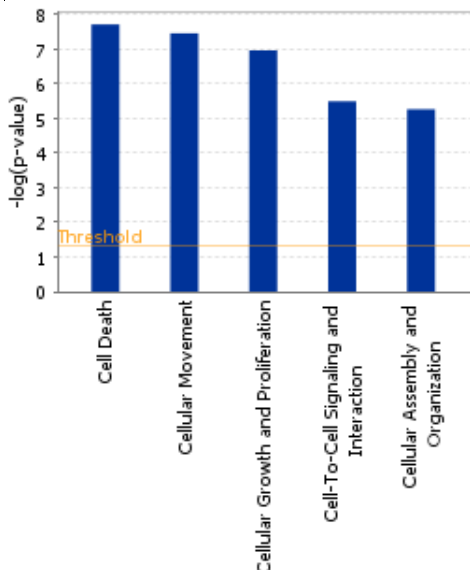
Function	<i>p</i> value	Molecules
DNA replication, recombination and DNA repair	$10^{-24}$ to $10^{-03}$	115
Cell cycle	$10^{-22}$ to $10^{-03}$	116
Cellular assembly and organisation	$10^{-10}$ to $10^{-03}$	48
Cellular growth and proliferation	$10^{-09}$ to $10^{-03}$	143
Cell-to-cell signaling and interaction	$10^{-06}$ to $10^{-03}$	7

## Molecular & Cellular functions - Day 3



Function	<i>p</i> value	Molecules
Cellular growth and proliferation	$10^{-11}$ to $10^{-03}$	64
Cellular movement	$10^{-10}$ to $10^{-03}$	46
Cell death	$10^{-09}$ to $10^{-03}$	53
Cell-to-cell signaling and interaction	$10^{-08}$ to $10^{-03}$	54
Carbohydrate metabolism	$10^{-07}$ to $10^{-03}$	17

## Molecular & Cellular functions - Day 6



Function	<i>p</i> value	Molecules
Cell death	$10^{-08}$ to $10^{-03}$	56
Cellular movement	$10^{-08}$ to $10^{-03}$	42
Cellular growth and proliferation	$10^{-07}$ to $10^{-03}$	66
Cell-to-cell signaling and interaction	$10^{-9}$ to $10^{-03}$	55
Cellular assembly and organisation	$10^{-6}$ to $10^{-03}$	20

**Supplementary data 4.** Molecular & Cellular functions modulated by sunitinib (250 nM) in TT cells after 1 day (up), 3 days (middle) and 6 days (bottom) of treatment.

GeneBank cession no.	Symbol	Name	Fold Change		
			Day 1	Day 3	Day 6
A_24_P224116	PLA2G1B	Phospholipase A2, group 1B	1.9	2.8	3.8
A_23_P115261	AGT	Angiotensinogen	3.5	3.3	3.4
A_23_P17593	CDH4	Cadherin 4	3.0	2.5	2.8
A_23_P34888	CHIA	Chitinase, acidic	3.2	2.1	2.8
A_23_P114597	SPRR2G	Smal Proline rich protein 2G	1.8	<i>ND</i>	2.8
A_24_P165864	P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	4.7	3.7	2.7
A_23_P69738	RASL11B	Ras-like, family 11 member B	2.2	2.0	2.6
A_23_P148088	FGG	Fibrinogen G	3.6	3.2	2.5
A_23_P29719	CASR	Calcium sensing receptor	2.6	2.4	2.5
A_23_P18672	GBA3	Glucosidase, beta, acid 3	2.5	2.6	2.4
A_23_P206626	SCNN1G	Sodium Channel non-voltage gated 1, gamma	2.7	2.2	2.4
A_23_P135417	GSTA1	Gluthation S Transferase A1	2.0	1.9	2.4
A_23_P145978	VIPR2	Vasoactive intestinal peptide receptor 2	2.3	2.4	2.3
A_23_P93141	GSTA 4	Gluthation S Transferase A4	1.9	1.8	2.2
A_24_P300394	GSTA 2	Gluthation S Transferase A2	1.9	1.8	2.1
A_23_P253495	GSTA 3	Gluthation S Transferase A3	1.9	<i>ND</i>	2.0
A_23_P136125	FGB	Fibrinogen B	<i>ND</i>	<i>ND</i>	1.9
A_23_P2052	MMP26	Matrix metalloproteinase 26	2.3	1.6	1.8
A_32_P196021	FGF7	Fibroblast growth factor 7	1.6	1.3	1.4
A_23_P375372	FGA	Fibrinogen A	2.6	<i>ND</i>	<i>ND</i>

**Supplementary data 5.** Summary of top up-regulated genes induced by sunitinib in TT cells obtained by microarray technology as described in Methods. *p value* <0.05. *ND*: non determined.

## 2.1 Identification de biomarqueurs potentiels de réponse au vandetanib

### 2.1.1 Le vandetanib modifie également l'expression de gènes impliqués dans l'invasion cellulaire et le pouvoir métastatique

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets cellulaires et moléculaires du vandetanib sur le modèle de CMT muté RET<sup>C634W</sup>. Par une approche semblable à celle utilisée pour le sunitinib nous avons étudié, *in vitro* et *in vivo*, les modifications d'expression génique induites par le vandetanib. Une étude séquentielle dans le temps a été réalisée, *in vitro*, sur les cellules TT traitées par le vandetanib à la dose de 250 nM. L'analyse du transcriptome a mis en évidence la modification de la régulation de 1129 transcrits après 24h de traitement. Parmi eux, 305 ont une expression diminuée alors que 824 gènes voient leur expression augmentée. Le **tableau 5** ci-dessous résume les modifications du nombre de gènes après 3 jours et 6 jours de traitement.

Temps d'exposition	Modifications d'expression génique		
	Augmentation	Diminution	Total
1 jour	305	804	1129
3 jours	138	490	628
6 jours	196	330	526

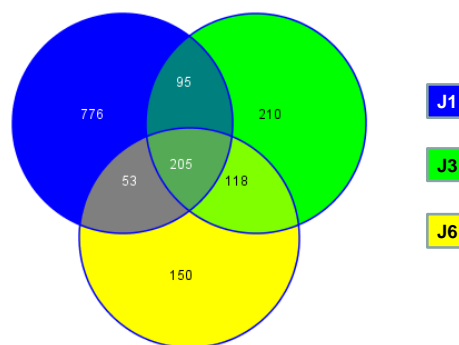
**Tableau 5**: Nombre de gènes dont l'expression est modifiée, *in vitro* (cellules TT), par le vandetanib (250 nM). *p*value<0,01 et modification d'expression génique >1,75.

Comme pour le sunitinib, les résultats montrent que les gènes dont l'expression est diminuée sont plus nombreux que les gènes dont l'expression est augmentée, et que le nombre de gènes dont l'expression est modifiée par le vandetanib est plus important après une courte exposition (1 jour). La majorité de ces gènes modifiés après 1 jour de traitement participent à la prolifération et la division cellulaire, et codent en particulier pour des facteurs de transcription (**Tableau 6**).

Processus biologique	Nombre de gènes dans la GO database	Nombre de gènes dont l'expression est modifiée		
		Seulement à J1	Seulement à J3	Seulement à J6
Cycle cellulaire	119	88 (74%)	7 (6%)	1
Régulation de la transcription dépendante de l'ADN	125	72 (58%)	10 (8%)	9 (8%)
Transcription	102	66 (65%)	6 (6%)	6 (6%)
Réplication de l'ADN	63	57 (90%)	0	0
Division cellulaire	75	51 (68%)	7 (9%)	1
Réponse aux dommages à l'ADN	54	50 (93%)	1 (2%)	0
Réparation de l'ADN	47	43 (91%)	1 (2%)	0
Mitose	58	36 (62%)	5 (9%)	1

**Tableau 6 :** Processus biologiques associés au contrôle de la prolifération et de la division cellulaire et modifiés *in vitro* (cellules TT) par le vandetanib (250 nM). Détermination à l'aide de la fonction « Gene Ontology (GO) Viewer » du logiciel Rosetta resolver®.

Parmi les 471 gènes modulés par le vandetanib à au moins deux temps de la cinétique de traitement, 205 gènes sont communs aux trois temps (J1, J3 et J6) et sont principalement impliqués dans la transduction du signal et l'adhésion cellulaire (Fig. 26 & Annexe 2).



**Figure 26 :** Diagrammes de Venn des gènes régulés, *in vitro* (cellules TT), par le vandetanib (250 nM) après 1, 3 et 6 jours de traitement.

L'analyse des fonctions cellulaires et moléculaires des gènes modifiés par le vandetanib a été réalisée par le logiciel Ingenuity®. Comme pour le sunitinib, la principale fonction modifiée par le vandetanib sur l'ensemble de la cinétique, en termes de nombre de gènes dont l'expression est régulée, est celle de la prolifération et croissance cellulaire. Après un jour de traitement, les gènes modulés sont également impliqués dans le cycle cellulaire, ainsi que dans les processus de

réplication, de recombinaison et de réparation de l'ADN. Enfin, après trois et six jours de traitement, les autres gènes majoritairement engagés dans la réponse au vandetanib sont impliqués dans la mort cellulaire (**Annexe 3**).

Comme pour le sunitinib, les gènes dont l'expression est la plus fortement modifiée par le vandetanib ont un rôle dans l'invasion tissulaire et le pouvoir métastatique. L'expression de nombreux transcrits est ainsi modifiée à la fois par le vandetanib et le sunitinib, en particulier des gènes sous-exprimés et impliqués dans la composition et le remodelage de la matrice extracellulaire (*TN-C*, *PLAU*, *PAI-1*, *LAMA4*, *LAMB3*), le cytosquelette et la mobilité cellulaire (*JUB*, *VIM*, *SCEL*) et les interactions entre cellules (*CD44*, *PCDH7*, *CDH6*) (**Tableau 7**). Quelques gènes surexprimés sont également communs aux deux inhibiteurs, notamment *CDH4* et *MMP26* (**Annexe 4**).

Symbole	Nom	Modifications d'expression génique		
		Jour 1	Jour 3	Jour 6
<b>PIWIL1</b>	piwi-like 1 (Drosophila)	-4,9	-4,1	-8,7
<b>SCEL</b>	sciellin	-5,5	-3,8	-8,1
<b>HKDC1</b>	hexokinase domain containing 1	-11,6	-5,5	-6,2
<b>VIM</b>	vimentin	-1,9	-4,1	-5,2
<b>L3MBTL3</b>	l(3)mbt-like 3 (Drosophila)	-2,1	-3,8	-5,0
<b>GCNT3</b>	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type	-3,9	-3,6	-4,9
<b>PCDH7</b>	protocadherin 7	-4,0	-4,6	-4,2
<b>DKK1</b>	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	-3,8	-3,3	-3,7
<b>HS3ST5</b>	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5	-2,4	-2,8	-3,6
<b>FST</b>	follistatin	-1,9	-2,6	-3,5
<b>HCRTR2</b>	hypocretin (orexin) receptor 2	-7,4	-2,8	-3,3
<b>LAMA4</b>	laminin, alpha 4	-2,3	-2,6	-3,2
<b>RFTN1</b>	raftlin, lipid raft linker 1	-2,0	-2,4	-3,1
<b>IL8</b>	interleukin 8	-2,3	-3,0	-3,1
<b>PHLDA1</b>	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	-2,9	-2,6	-2,9
<b>NXPH1</b>	neurexophilin 1	-2,3	-2,3	-2,8
<b>PTGS2</b>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-4,0	-2,8	-2,7
<b>TN-C</b>	tenascin C (hexabrachion)	-1,8	-3,1	-2,7
<b>DUSP6</b>	dual specificity phosphatase 6	-2,3	-2,1	-2,7

**Tableau 7 : Principaux gènes dont l'expression est diminuée, *in vitro* (cellules TT), en réponse à un traitement par le vandetanib (250 nM). *p* value <0.05.**



Une étude séquentielle a également été menée, *in vivo*, pour comparer les modifications d'expression génique entre les xéno greffes de cellules TT issues de souris traitées par le vandetanib (50 mg/kg/j) ou celles recevant le placebo. Les résultats montrent que la majorité des gènes sont sous-exprimés après un jour et quatre jours de traitement et majoritairement surexprimés après 45 jours (**Tableau 8**). De plus, contrairement aux résultats *in vitro*, les gènes dont l'expression est modifiée par le vandetanib *in vivo* sont bien plus nombreux après 45 jours de traitement que lors des temps précoces (**Tableau 8**).

Temps d'exposition	Modifications d'expression génique		
	Augmentation	Diminution	Total
1 jour	137	266	403
4 jours	177	446	623
45 jours	855	682	1537

**Tableau 8** : Nombre de gènes dont l'expression est modifiée, *in vivo* (xéno greffes de cellules TT), par le vandetanib (50 mg/kg/j).  $pvalue < 0,01$  et modification d'expression génique  $> 1,75$ .

Comme pour l'étude *in vitro*, l'analyse des fonctions cellulaires et moléculaires réalisée à l'aide du logiciel Ingenuity®, montre que les gènes régulés par le vandetanib *in vivo* sont majoritairement impliqués dans les fonctions de prolifération et de croissance cellulaire quelque soit le temps d'étude ; les gènes impliqués dans le cycle cellulaire sont principalement modifiés aux temps précoces (J1 et J4) ; les gènes liés à la fonction de mort cellulaire sont modulés à un temps plus tardif (J45) (**Annexe 5**). De façon intéressante, une partie des gènes dont l'expression est la plus significativement diminués par le vandetanib *in vitro*, sont également sous-exprimés *in vivo*, en particulier les gènes *VIM*, *JUB* et *LUM* qui participent à la mobilité cellulaire (**Tableau 9 & Annexe 6**). De même, une partie des gènes surexprimés est commune aux études *in vitro* et *in vivo*, en particulier le gène *MMP26* et des gènes en lien avec les processus de l'hémostase (*AGT*, *FGG*) (**Annexe 7**).

Symbole	Nom	Modifications d'expression génique		
		<i>Jour 1</i>	<i>Jour 4</i>	<i>Jour 45</i>
VIM	vimentin	-1,4	-3,3	-4,8
JUB	ajuba	-3,0		-4,6
LUM	lumican		-4,4	-4,5
NOG	noggin			-2,8
LAMB3	laminin, beta 3	-1,4	-2,4	-2,4
SCEL	sciellin	-1,8	-2,1	
LAMA4	laminin, alpha 4	-1,6	-1,8	
PLAU	urokinase	-1,6		

**Tableau 9** : Gènes dont l'expression est diminuée, *in vivo* (xénogreffes de cellules TT), par un traitement par le vandetanib (50 mg/kg/j), parmi les principaux gènes identifiés *in vitro* (cellules TT). *p value* <0.05.

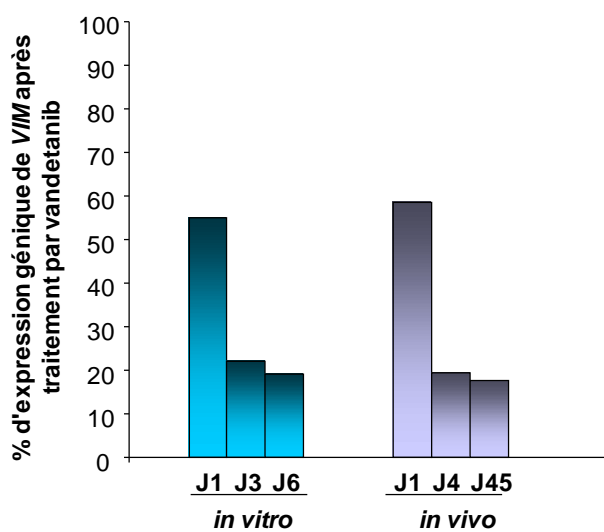
### 2.1.2 Biomarqueurs potentiels de réponse au vandetanib

Afin d'identifier des biomarqueurs de réponse au traitement, l'analyse transcriptomique a été focalisée sur les gènes sous-exprimés en réponse au vandetanib. L'objectif était en effet de sélectionner des gènes dont le produit pouvait être mesuré dans les fluides biologiques, la réponse à l'PTTK se traduisant par une diminution de la concentration de ce biomarqueur, sur le schéma des marqueurs tumoraux conventionnels (CT). Nos travaux réalisés avec le sunitinib et présentés précédemment ont permis d'identifier un panel de 10 gènes sous-exprimés. De façon intéressante, l'expression de 9 de ces gènes (*VIM*, *SCEL*, *TN-C*, *PLAU*, *SPARC*, *FST*, *IL-8*, *CD44*, *TGF-β2*) est également inhibée *in vitro* par le vandetanib et *in vivo*, *VIM* est le principal transcrite sous-exprimé (**Tableau 10**).

Gene	Modifications d'expression génique					
	Sunitinib			Vandetanib		
	Jour 1	Jour 3	Jour 6	Jour 1	Jour 3	Jour 6
VIM	-1,9	-4,6	-6,4	-1,9	-4,1	-5,2
SCEL	-3,3	-3,7	-4,7	-5,5	-3,8	-8,1
TN-C	-1,5	-4,4	-4,4	-1,8	-3,1	-2,7
PLAU	-2,1	-4,0	-3,4	-2,8	-2,1	-2,1
SPARC	-1,1	-2,2	-2,9	ND	-1,9	-2,9
FST	-1,7	-2,1	-2,9	-1,9	-2,6	-3,5
IL-8	-1,8	-3,0	-2,8	-2,3	-3,0	-3,1
CD44	-1,6	-1,7	-1,9	-1,8	-2,5	-2,5
TGFB2	-1,4	-1,6	-1,7	-1,6	-1,9	-2,4

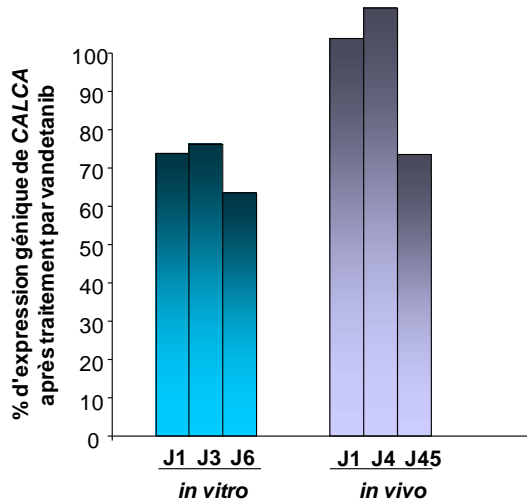
**Tableau 10** : Expression génique des principaux gènes sous-exprimés, *in vitro*, en réponse au sunitinib (250 nM) et au vandetanib (250 nM). Modèle cellulaire TT.  $p$  value < 0.05.

Comme pour le sunitinib, les résultats d'expression génique de la vimentine ont été confirmés par PCR quantitative. La diminution précoce l'expression génique de *VIM*, en réponse au vandetanib, est confirmée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette inhibition s'intensifie et se maintient dans le temps (Fig. 27).



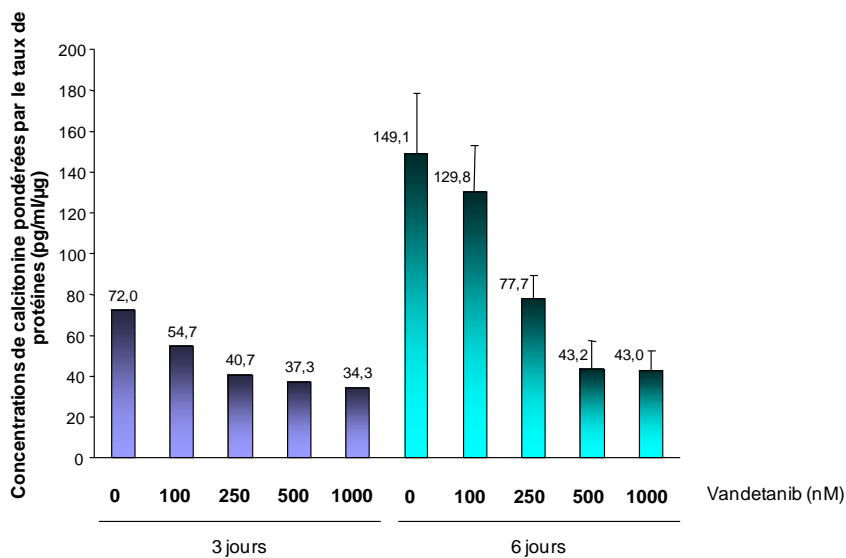
**Figure 27** : Pourcentage d'expression génique du gène codant la vimentine (*VIM*), *in vitro* (cellules TT traitées par 250 nM de vandetanib) et *in vivo* (souris xéno greffées avec des cellules TT et traitées par 50 mg/kg/j de vandetanib). J, jour de traitement.

Les effets du vandetanib sur la production de la calcitonine (CT), marqueur biologique de référence du cancer médullaire de la thyroïde, ont ensuite été étudiés. *In vitro*, une diminution de l'expression du gène de la calcitonine *CALCA* est observée. Elle est corrélée au niveau protéique, objectivée par une diminution de la sécrétion de CT dans le surnageant de culture (Fig. 28).



**Figure 28 :** Pourcentage d'expression génique du gène codant la calcitonine (*CALCA*), *in vitro* (cellules TT traitées par 250 nM de vandetanib) et *in vivo* (souris xénotreffées avec des cellules TT et traitées par 50 mg/kg/j de vandetanib).

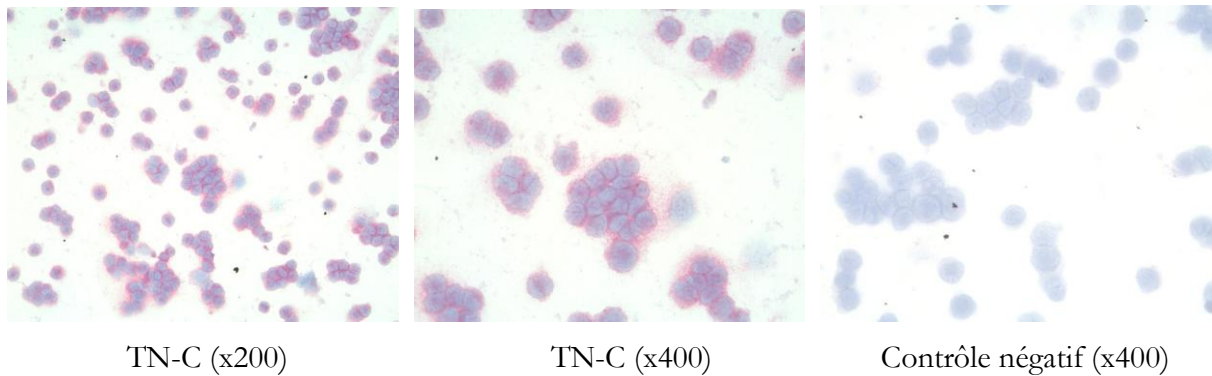
La diminution des taux de CT est fonction du temps et de la concentration en inhibiteur. Elle reste significative après normalisation par la quantité totale de protéines cellulaires (Fig. 29). Ainsi, comme pour le sunitinib, cette diminution induite par le vandetanib est probablement liée simultanément à une réduction du nombre de cellules et à une inhibition de l'expression génique de *CALCA*.



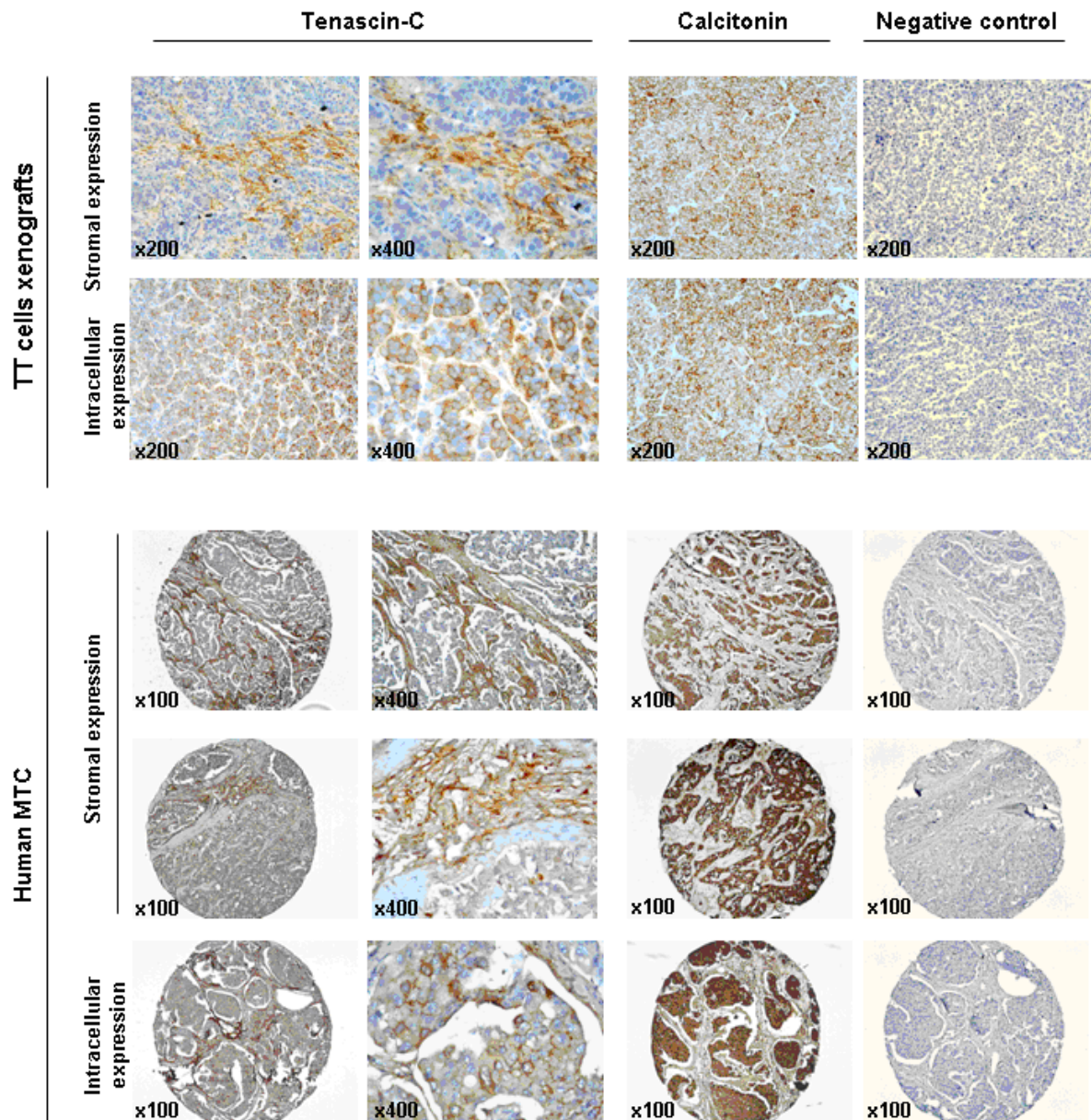
**Figure 29 :** Concentration de calcitonine, rapportée à la quantité de protéines totales, dans le surnageant de culture de cellules TT, après traitement par vandetanib. Barres, écart-type.

## 2.2 La Tenascin-C, un nouveau biomarqueur potentiel de réponse au sunitinib et au vandetanib ?

Les analyses transcriptomiques ont mis en évidence la régulation négative du gène de la ténascine-C (*TN-C*) en réponse au sunitinib et au vandetanib, identifiant ainsi ce composant de la matrice extracellulaire comme un biomarqueur potentiel de réponse à ces traitements. L'expression protéique de la TN-C a été évaluée en l'absence de tout traitement par immunohistochimie (IHC) sur des tumeurs de CMT humains et la lignée cellulaire TT, modèle d'étude préclinique du CMT. Les résultats montrent que les cellules TT, les xénogreffes de cellules TT et les CMT humains expriment bien la TN-C. Celle-ci est localisée dans le stroma autour des cellules C mais également dans les cellules C des xénogreffes, indiquant une synthèse de la TN-C par les cellules tumorales. De façon intéressante, un marquage semblable est également observé au niveau des tissus humains (**Fig. 30 & Fig. 31**).



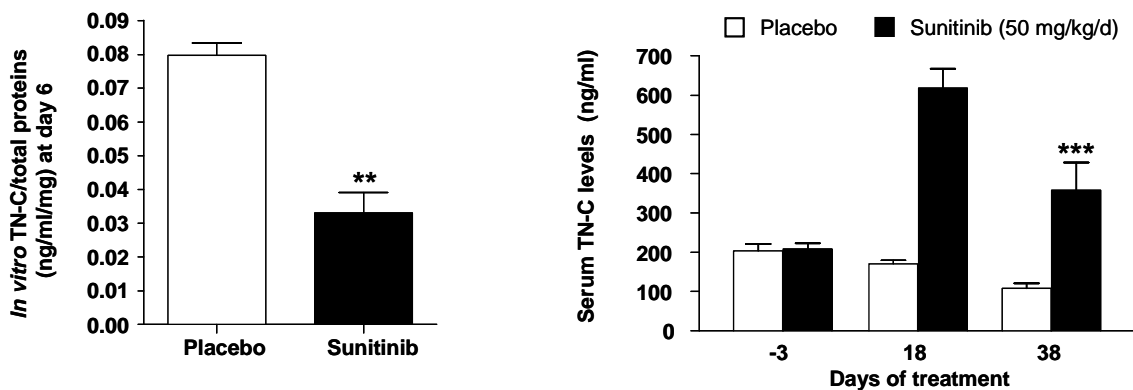
**Figure 30** : Expression protéique de la tenascin-C (TN-C) dans les cellules TT, déterminée par immunomarquage sur cytopspin. Le contrôle négatif a été réalisé en absence de l'anticorps primaire.



**Figure 31 :** Immunomarquage de la tenascin-C dans des xéno greffes de cellules TT (TT cells xenografts) et dans des tumeurs de cancer médullaire de la thyroïde (Human MTC). L'immunomarquage de la calcitonine permet d'identifier les cellules C tumorales. Les contrôles négatifs ont été réalisés en absence de l'anticorps primaire.

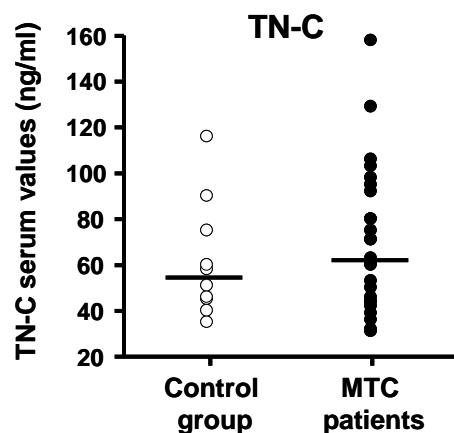
La sécrétion de TN-C dans le surnageant de culture des cellules TT a été quantifiée après traitement par le sunitinib. Les résultats indiquent une diminution de la sécrétion de TN-C de près de 60% après 6 jours de traitement à la dose de 250 nM (**Fig. 32** gauche). *In vivo*, les taux sériques de TN-C augmentent après 18 jours de traitement par le sunitinib. Cette augmentation pourrait être liée à un phénomène de sécrétion ou de relargage par les cellules tumorales, comme

cela est observé en réponse à certaines chimiothérapies conventionnelles (Bidart, et al., 1999). Dans un deuxième temps, une diminution significative des taux sériques de TN-C est observée après 38 jours de traitement par le sunitinib. Cette diminution est très certainement corrélée à la diminution de l'expression du gène de la *TN-C* en réponse au sunitinib. Dans le groupe des souris traitées par le placebo une légère diminution des taux circulants de TN-C est observée au cours du temps (Fig. 32 droite). Des travaux doivent être menés afin de mieux comprendre cette observation.



**Figure 32** : Expression protéique de la tenascin-C (TN-C), *in vitro* dans le surnageant de culture de cellules TT traitées 6 jours par le sunitinib (250 nM) ou par le placebo (gauche), et *in vivo* dans le sérum de souris xénotransplantées avec des cellules TT et traitées par le sunitinib (50 mg/kg/j) ou par le placebo (droite). Barre,  $\pm$ SD. Test non apparié (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Enfin les concentrations de TN-C ont été mesurées dans le sérum de 27 patients atteints de CMT et de 10 sujets sains. Si des taux plus élevés sont mesurés chez les patients, les médianes des concentrations ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes ( $w > 0.6$ ) (Fig. 33).



**Figure 33** : Taux sérique de Tenascin-C (TN-C) chez des patients atteints de CMT (MTC patients,  $n = 27$ ) et des donneurs sains (control group,  $n = 10$ ). Barres, médiane.

## 2.3 Discussion

La prise en charge personnalisée des patients atteints de cancer est un objectif majeur en cancérologie. La mise en place d'une telle stratégie nécessite au préalable la caractérisation moléculaire de chaque tumeur et de chaque patient, pour identifier spécifiquement les anomalies géniques en cause et les cibler par un traitement individuel adapté. Dans cette démarche, l'identification de biomarqueurs, outils clés participant au dépistage, au diagnostic, au pronostic, au choix thérapeutique, et au suivi de la réponse est un point essentiel. Dans ce contexte, notre travail a eu pour but d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels de réponse au vandetanib et au sunitinib, par une approche transcriptomique haut-débit menée sur des modèles précliniques.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets antiprolifératifs, antitumoraux et antiangiogéniques du sunitinib dans des modèles précliniques de CMT porteurs de la mutation  $RET^{C634W}$ , comme nous l'avons fait précédemment pour le vandetanib. *In vitro*, nous avons montré que le sunitinib inhibe fortement la prolifération des cellules TT en fonction du temps et de la concentration. Ces résultats sont à rapprocher de travaux antérieurs montrant l'effet antiprolifératif du sunitinib sur la lignée cellulaire thyroïdienne TPC-1, caractérisée par un réarrangement RET/PTC (Kim, et al., 2006). *In vivo*, nous avons montré sur des souris xénotreffées avec des cellules TT, que la croissance tumorale est très fortement ralentie dans le groupe traité par le sunitinib, comparativement au groupe des souris recevant le placebo. Cet effet est significatif dès 10 jours et est associé à une inhibition de la prolifération cellulaire, comme illustrée par la diminution de l'immunomarquage du Ki67 réalisé sur les xénotreffes. Nos résultats ont également mis en évidence, *in vivo*, les effets antiangiogéniques du sunitinib, comme l'atteste la diminution macroscopique de la vascularisation des xénotreffes et la réduction du nombre de microvaisseaux, effet probablement lié à l'inhibition du récepteur VEGFR-2. En effet, le sunitinib est un inhibiteur multikinase actif vis-à-vis du récepteur VEGFR-2, développé initialement pour ses propriétés antiangiogéniques (Mendel, et al., 2003). Le sunitinib et le vandetanib partagent donc des effets antiprolifératifs, antitumoraux et antiangiogéniques relativement proches observés dans nos modèles de CMT muté  $RET^{C634W}$ .



Dans un deuxième temps, les modifications d'expression génique induites par le sunitinib et le vandetanib ont été explorées, *in vitro* et *in vivo*, par une approche transcriptomique haut-débit. Les études séquentielles mettent en évidence des résultats semblables entre les deux inhibiteurs. *In vitro*, une majorité de gènes est sous-exprimée en réponse aux inhibiteurs et les variations d'expression génique sont plus nombreuses après 1 jour de traitement, en lien avec une modification précoce des facteurs de transcription (Morimoto, et al., 2004). De plus, tous temps confondus, les gènes régulés par le sunitinib et le vandetanib sont principalement impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. Cette fonction est partagée au cours du temps dans les modèles *in vitro* et *in vivo*. Après 1 jour de traitement, les gènes régulés sont plus particulièrement liés au cycle cellulaire. Ceux modifiés plus tardivement sont majoritairement impliqués dans la mobilité cellulaire et la mort cellulaire. L'établissement de profils cinétiques, à la fois *in vitro* et *in vivo*, a permis d'identifier les principales fonctions cellulaires et moléculaires mises en jeu lors de la réponse au sunitinib et au vandetanib. Cette approche apparaît particulièrement intéressante pour dresser un portrait dynamique de la régulation génique et pour identifier de façon plus rationnelle et plus significative les fonctions géniques et les gènes clés régulés par les traitements.

L'analyse des gènes régulés par le sunitinib et le vandetanib montre un nombre important de transcrits communs entre les deux inhibiteurs. Notre travail s'est focalisé sur ces gènes et l'étude des gènes régulés spécifiquement par chaque inhibiteur devra être menée ultérieurement. Le sunitinib et le vandetanib régulent en particulier l'expression de gènes impliqués dans l'invasion tissulaire et le pouvoir métastatique, suggérant un rôle clé des protéines codées, dans le processus tumoral (Bernards and Weinberg, 2002; Hanahan and Weinberg, 2011). Ainsi le gène codant l'uokinase (PLAU), molécule impliquée dans les capacités métastatiques des cellules tumorales, est sous-exprimé en réponse aux inhibiteurs. Parallèlement, des régulations de gènes codant des métalloprotéases (MMP) et des cadhérines (CDH) ont été observées. Les MMP, composants enzymatiques de la matrice extracellulaire, sont impliqués dans les modifications de celle-ci et leur rôle précis dans le CMT et la réponse aux ITKs doit être approfondi. L'expression des CDH reste peu documentée dans le CMT (Johanson, et al., 2007). Enfin nos résultats montrent que le gène *VIM*, codant la vimentine un régulateur de la transition épithélio-mésenchymateuse, est très fortement inhibé par les 2 ITKs et ce à la fois *in vivo* et *in vitro*. Il est intéressant de souligner que la surexpression de la vimentine est corrélée à une croissance tumorale accélérée, à des propriétés d'invasivité et de métastase, et à un pronostic plus péjoratif chez les patients (Satelli and Li, 2011; Vasko, et al., 2007). Si son rôle dans la progression tumorale reste à préciser, la vimentine apparaît de plus en plus comme une cible thérapeutique potentielle en cancérologie (Satelli and

Li, 2011). Enfin, parmi les gènes surexprimés en réponse au sunitinib et au vandetanib, plusieurs sont liés au processus de l'hémostase (*AGT, FGG, FGA, TNNI2, TNNT3, VIPR2*). Les liens éventuels entre ces gènes et les troubles cardiovasculaires décrits en clinique et associés à ces traitements méritent d'être approfondis (Force, et al., 2007; Mellor, et al., 2011).

Dans un troisième temps, notre analyse transcriptomique s'est focalisée sur la recherche de biomarqueurs de réponse au traitement. En effet, comme déjà décrit, le développement de nouveaux biomarqueurs est un enjeu majeur pour déterminer précocement si les patients peuvent bénéficier du traitement ou si une alternative thérapeutique doit leur être proposée (Duda, et al., 2010). A ce jour, la calcitonine (CT) est le marqueur biologique de référence dans le CMT, utilisé lors du dépistage, du diagnostic différentiel, du pronostic et du suivi la maladie. Nos résultats montrent que l'expression génique et protéique de la calcitonine (CT) est inhibée par le sunitinib et le vandetanib, à la fois *in vivo* et *in vitro*. En pratique médicale, des diminutions de CT sont également observées chez les patients traités par ITK mais cette diminution n'est pas toujours corrélée à la masse tumorale (Akeno-Stuart, et al., 2007; Schlumberger, et al., 2008). Cette diminution pourrait être en effet liée à une diminution de synthèse et/ou de sécrétion. Par ailleurs, la demi-vie d'élimination de CT à la fois longue et variable selon les concentrations sériques, ne permet pas d'obtenir une évaluation précoce de la réponse thérapeutique et de nouveaux biomarqueurs doivent être recherchés (Costante, et al., 2009). Notre travail a également permis d'identifier plusieurs gènes sous-exprimés en réponse au sunitinib et au vandetanib, et codant des protéines sécrétées. Ainsi l'IL-8, la TN-C, le TGF- $\beta$ 2 et le CD44 ont été sélectionnés comme biomarqueurs potentiels de réponse au traitement par ces deux ITKs. De plus, nos résultats montrent que les taux sériques d'IL-8 et de TGF- $\beta$ 2 sont significativement plus élevés chez les patients atteints de CMT que chez les sujets sains, renforçant l'intérêt pour ces protéines.

L'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire et mitogène, dont la production est en partie régulée par le récepteur RET (Iwahashi, et al., 2002). Nos travaux ont permis de sélectionner l'IL-8 parmi les gènes les plus significativement diminués après traitement par le sunitinib et le vandetanib et suggèrent que cette inhibition pourrait être liée, au moins en partie, à une inhibition de la phosphorylation de RET, comme le montrent les expériences de western-blot et de SiRNA. Une diminution de la sécrétion d'IL-8 en réponse au sunitinib a déjà été décrite *in vivo* et *in vitro* dans d'autres modèles de cancers, et pourrait être liée à d'autres mécanismes tels que l'inhibition de la

boucle de rétrocontrôle du VEGF (Crawford, et al., 2008). La contribution de la voie de signalisation activée par l'oncogène Ras a également été impliquée dans la production d'IL-8. Sparmann et al. ont montré que l'IL-8 est une cible transcriptionnelle de la voie Ras et que la sécrétion d'IL-8 *via* la voie Ras est nécessaire pour initier l'inflammation tumorale et la néovascularisation (Sparmann and Bar-Sagi, 2005). Ces résultats sont particulièrement intéressants en regard des mutations de l'oncogène Ras récemment décrites dans les formes RET sauvage de CMT (Moura, et al., 2011). Nos résultats ont également montré que les concentrations d'IL-8 étaient significativement plus élevées chez les patients atteints de CMT que dans le groupe des sujets sains. Ces résultats confirment les travaux récents de Kobalawa et al., qui suggèrent l'implication de l'IL-8 dans le développement des pathologies thyroïdiennes, cancéreuses et non cancéreuses (Kobawala, et al., 2011). De façon plus générale, la surexpression d'IL-8 est fréquemment associée à un pronostic péjoratif dans différents cancers (Keeley, et al., 2010; Merritt, et al., 2008) et l'implication de l'IL-8 dans la résistance au sunitinib dans les formes de cancer du rein a été proposée (Huang, et al., 2010). Enfin, des travaux récents ont montré, dans des modèles de cancer de l'ovaire, que l'inhibition du gène de l'IL-8 par SiRNA diminuait la croissance tumorale *via* des mécanismes antiangiogéniques (Merritt, et al., 2008). L'ensemble de ces résultats permet d'identifier l'IL-8 à la fois comme un outil diagnostique, une cible thérapeutique et un marqueur potentiel de suivi de réponse au traitement.

De façon plus générale, il est intéressant de noter que l'inflammation est un phénomène étroitement corrélé aux différentes étapes du développement tumoral (initiation, promotion, transformation tumorale, invasion, métastases) et joue également sur la surveillance immunitaire et les réponses aux traitements. Les liens entre l'inflammation et le développement des cancers sont nombreux. En particulier il a été démontré que l'inflammation chronique augmente les risques de cancer ; plusieurs types de cellules immunitaires et de l'inflammation sont souvent présentes dans les tumeurs ; les cellules immunitaires agissent sur les cellules tumorales *via* la sécrétion de nombreuses cytokines, chemokines, facteurs de croissance, prostaglandines, espèces réactives de l'oxygène... (Grivennikov, et al., 2010). Les liens entre CMT et inflammation apparaissent donc particulièrement intéressants à explorer.

Le TGF- $\beta$ 2, identifié parmi les marqueurs potentiels de réponse aux ITKs, est également augmenté dans le sérum des patients et sous-exprimé en réponse au sunitinib et au vandetanib dans nos modèles précliniques. Le TGF- $\beta$ 2 contrôle la différenciation et la croissance cellulaire et pourrait induire l'angiogenèse, la cicatrisation et agit également en tant que facteur de remodelage

de la matrice extracellulaire (Takahashi, et al., 2010). De façon intéressante, des taux élevés ont également été décrits dans le sérum de nombreux types de cancers et le TGF- $\beta$ 2 est considéré comme un marqueur tumoral potentiel (Krasagakis, et al., 1998; Schneider, et al., 2006).

La tenascin-C (TN-C), codant une glycoprotéine de la matrice extracellulaire impliquée dans les interactions tissulaires, est également un des gènes les plus fortement sous-exprimés en réponse au sunitinib et au vandetanib, à la fois *in vitro* et *in vivo*. La TN-C inhibe l'adhésion des cellules à la fibronectine et induit la migration cellulaire, la prolifération tumorale et la formation de métastases (Chiquet-Ehrismann, 2004; Maschler, et al., 2004). De façon intéressante, une étude récente a montré que si la TN-C n'était pas exprimée dans les tissus sains, elle est détectée dans le stroma et les cellules tumorales de CMT humains, suggérant que la TN-C pourrait être un indicateur précoce du développement de la maladie (Koperek, et al., 2009). Nos résultats confirment l'expression de TN-C dans les tumeurs de patients et indiquent également que le sunitinib pourrait contrôler le remodelage du stroma induit par la TN-C. Cependant, dans les souris xénotreffées, les taux sériques de TN-C ne sont pas corrélés à la croissance tumorale comme l'indique la légère diminution de TN-C au cours du temps. De plus, de façon discordante avec l'inhibition de l'expression génique de TN-C observée *in vitro* et *in vivo*, une augmentation des taux sériques de TN-C a été observée après 18 jours de traitement par le sunitinib. Cette augmentation ne semble pas pouvoir être attribuée à une régulation indépendante de la tumeur (Ebos, et al., 2007), telle qu'une production par les cellules stromales des souris, la méthode de dosage de la TN-C étant spécifique de la protéine humaine, sécrétée par les cellules TT. Nous suggérons que cette augmentation pourrait être liée à un phénomène de sécrétion ou de relargage par les cellules tumorales, comme cela est parfois observé en réponse à certaines chimiothérapies conventionnelles, durant le remodelage de la matrice extra-cellulaire (Beachy and Repasky, 2008; Bidart, et al., 1999).

De façon plus générale, les nombreux biomarqueurs potentiels doivent être, dans un second temps, évalués en clinique et validés. De telles études commencent à être mises en place chez les patients traités avec des ITKs. Un travail récent a notamment montré que le vandetanib induit des changements spécifiques de cytokines et facteurs angiogéniques chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Ces modifications ont été en partie corrélées à la survie sans progression des patients et les auteurs suggèrent que ces profils devraient permettre de mieux comprendre les effets biologiques de la réponse et d'identifier des marqueurs spécifiques

d'activité et de réponse au traitement (Hanrahan, et al., 2010). En particulier, des augmentations de VEGF et des diminutions de la forme soluble de VEGFR-2 (sVEGFR-2) ont été observées dans le sérum de patients après traitement par le vandetanib. Des diminutions des taux sériques de sVEGFR-2 et de PIGF, ont également été rapportées chez des patients atteints de CMT et traités par le motesanib (Bass, et al., 2010). Ces modifications, observées peu de temps après l'initiation du traitement, pourraient prédire la réponse thérapeutique chez les patients. De telles variations de cytokines et de facteurs angiogéniques sont communément décrites avec les inhibiteurs d'activité kinase, en particulier ceux ciblant le VEGFR, mais à ce jour aucun n'a été clairement validé comme marqueurs de suivie de la réponse au traitement (Ebos, et al., 2007; Kiura, et al., 2008). De façon intéressante, Ebos et al., ont par ailleurs démontré que le sunitinib produisait parallèlement des élévations dose-dépendantes des taux circulants de VEGF, PIGF, SDF-1 et G-CSF et une diminution de sVEGFR-2 dans des modèles de souris non xénotransplantées par des lignées tumorales, suggérant que ces variations étaient indépendantes de la tumeur. L'intérêt de ces biomarqueurs pour le suivi de la réponse thérapeutique apparaît limité (Ebos, et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt des profils d'expression génique dans des modèles précliniques pour l'identification de nouveaux biomarqueurs potentiels de réponse au traitement. Cependant, le passage entre la préclinique et la clinique est complexe et délicat. L'évaluation de ces biomarqueurs et leur validation chez les patients, dans le cadre d'essais prospectifs randomisés, reste un enjeu majeur.

### 3. Suivi et évaluation de la réponse aux ITKs chez les patients atteints de CMT

#### 3.1 Introduction

Une des problématiques liée à tout traitement anticancéreux concerne les modalités de suivi et d'évaluation de la réponse antitumorale de façon précise et continue. L'enjeu pour les cliniciens est de savoir, le plus précocement possible, si le traitement est efficace et dans le cas contraire, de proposer une alternative thérapeutique au patient, avant que la tumeur ne développe des propriétés de résistance.

##### 3.1.1 Suivi et évaluation de la réponse en cancérologie

La question de l'évaluation de la réponse à un traitement s'est en particulier posée dans le cadre du développement de nouveaux médicaments. Le taux de survie globale est le meilleur paramètre objectif d'efficacité d'une nouvelle molécule, mais ce paramètre est obtenu trop tardivement pour décider précocement du devenir des candidats médicaments. Des critères de substitution ont donc été développés. Les critères RECIST (Response Criteria In Solid Tumors), basés sur les changements du nombre et de la taille de cibles tumorales mesurables, et définis par des tests d'imagerie classique (scanner, IRM), sont actuellement les principaux critères utilisés dans les tumeurs solides de l'adulte (Eisenhauer, et al., 2009; Therasse, et al., 2000). La détermination des dimensions tumorales par imagerie permet ainsi de classer la réponse des patients en 4 groupes : maladie progressive, maladie stable, réponse partielle et réponse complète (Beachy and Repasky, 2008). L'évaluation de la réponse est également essentielle pour tout patient recevant des traitements et une nouvelle fois, les critères RECIST sont très largement utilisés. Le développement récent des thérapies moléculaires ciblées a toutefois remis en cause la pertinence de ces critères morphologiques. En effet, ces nouveaux traitements, et en particulier les médicaments antiangiogéniques, ne sont pas tous susceptibles d'induire une régression du volume tumoral qui ne peut donc plus être le seul paramètre de suivi de la réponse. Pour ne pas risquer d'écarter des molécules potentiellement actives, l'établissement de nouveaux critères d'évaluation, complémentaires aux critères RECIST et adaptés aux thérapies ciblées, est donc nécessaire. Les études PK/PD, les biomarqueurs sériques (présentés dans le §.2 de ce chapitre) et l'imagerie fonctionnelle font partis des principales approches développées dans ce domaine.

- Etudes pharmacocinétiques/pharmacodynamiques

L'évaluation de la réponse à un traitement donné n'a de sens que si le traitement est administré à la bonne dose et s'il agit au bon endroit. Les essais cliniques de phase I ont pour but, par leur schéma d'escalade de dose, de déterminer la dose recommandée pour les essais de phase II et III qui évalueront l'efficacité des candidats médicaments. Classiquement, en cancérologie, le choix de cette dose correspond à la dose maximale tolérée (DMT), définie suite à l'apparition de toxicités sévères. Les thérapies moléculaires ciblées, qui présentent des mécanismes d'action et des profils de toxicité différents des chimiothérapies conventionnelles, remettent en cause ce processus de sélection de la dose efficace (Booth, et al., 2008a; Booth, et al., 2008b). En effet, de part leur mécanisme d'action plus ciblé, les toxicités aiguës de ces nouvelles chimiothérapies sont généralement plus faibles et la DMT n'est pas toujours atteinte lors des essais de phase I. De plus, les toxicités cumulées de ces nouvelles chimiothérapies, administrées au long cours ne sont pas prise en compte dans le choix de la dose efficace. Enfin, il n'est pas évident que la dose la plus efficace soit, comme pour les chimiothérapies conventionnelles, la dose la plus élevée.

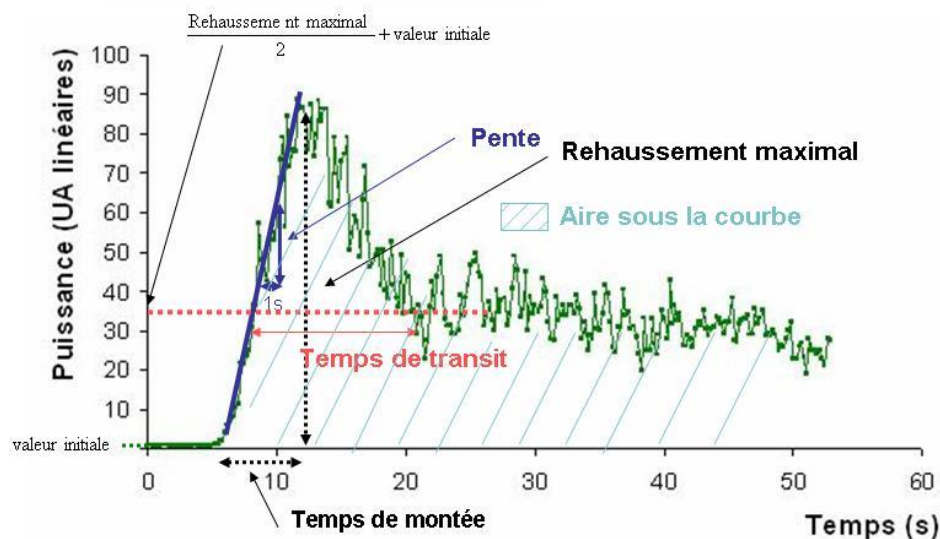
Le choix de la dose efficace au long cours est donc un point critique avec les thérapies ciblées et des essais sont mis en place pour évaluer l'efficacité de posologies plus faibles que la DMT, susceptibles d'être moins toxiques. Le vandetanib en est un exemple. En effet, les études de phase I ont initialement permis de recommander une administration quotidienne et par voie orale de vandetanib à la dose de 300 mg (DMT) (Holden, et al., 2005; Tamura, et al., 2006). Le nombre élevé de patients présentant des toxicités sévères et nécessitant un arrêt définitif, une interruption temporaire, ou une diminution de posologie, laisse cependant supposer que cette dose n'est pas la dose maximale tolérée au long cours. Ceci a conduit récemment à la mise en place d'un essai de phase II démontrant l'efficacité d'une posologie réduite à la dose de 100 mg/j (Robinson, et al., 2010).

Il est important de souligner que les thérapies ciblées, administrées par voie orale, sont à ce jour prescrites à une posologie standard qui ne prend pas en compte les éventuelles variabilités interindividuelles. Ces variations pourraient expliquer les profils de toxicité et de réponse différents selon les patients. Elles pourraient être atténuées ou anticipées par la mise en place d'un suivi thérapeutique et la réalisation au préalable d'études pharmacocinétiques /pharmacodynamiques (PK/PD) décrivant l'évolution des effets en fonction des doses et du temps, et permettant d'adapter la dose administrée à chaque patient.

- Imagerie fonctionnelle

L'imagerie fonctionnelle apparaît de plus en plus comme un outil majeur pour évaluer la réponse anti-tumorale des thérapies ciblées, et en particulier des traitements antiangiogéniques, caractérisés par la formation de nécrose tumorale souvent sans modification de la taille initiale de la lésion cancéreuse.

L'échographie doppler est une technique de ces techniques, permettant l'étude morphologique de la tumeur mais aussi de sa vascularisation. L'intérêt de cette technique dans l'évaluation des thérapies ciblées, en particulier des antiangiogéniques est croissant (Lassau, et al., 2008). Cette méthode utilise la propriété d'un agent ultrasonore, injecté dans la circulation sanguine en bolus, de réfléchir les ondes ultrasonores et d'être exclusivement intravasculaire. Il s'agit d'un outil de détection fine et de quantification de la microvascularisation dont l'évaluation est basée sur l'analyse de la courbe décrivant l'évolution de l'intensité du signal en fonction du temps dans la région d'intérêt (ROI, Region of interest) (Fig. 34 & Annexe 8).



**Figure 34 :** Schéma d'une courbe modélisée décrivant l'évolution de l'intensité du signal en fonction du temps après injection d'un produit de contraste, et définition des indices de perfusion. Les paramètres de perfusion servant à la quantification de la vascularisation sont : le pic d'intensité maximal (rehaussement maximal), la pente de montée de la prise de contraste, le temps de montée au maximum, le temps de transit du produit de contraste et l'aire sous la courbe (document Dr Ingrid Leguérney).



### 3.1.2 Objectifs du travail

L'objectif de ce travail était d'étudier l'intérêt de trois approches pour le suivi et l'évaluation de la réponse clinique chez des patients atteints de CMT et traités par inhibiteur de tyrosine kinase.

Pour cela, nous avons réalisé :

- le développement d'une méthode de dosage du vandetanib pour, dans un second temps, étudier les relations PK/PD chez les patients recevant cet inhibiteur,
- l'évaluation de biomarqueurs dans le sérum de patients traités par le vandetanib,
- l'évaluation de l'imagerie fonctionnelle par échographie doppler dans un modèle expérimental (souris xénogreffées) dans le suivi de la réponse au sunitinib.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article soumis à Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis, et de travaux complémentaires.

## 3.2 Etude Pharmacocinétique/Pharmacodynamique (PK/PD)

Les études pharmacocinétiques (PK), qui décrivent l'évolution des concentrations d'un médicament en fonction des doses administrées et du temps, et les études pharmacodynamiques (PD), qui décrivent l'évolution des effets d'un médicament en fonction des concentrations de celui-ci au site d'action de la molécule, sont des outils de choix pour le suivi thérapeutique des patients. En effet la relation PK/PD permet de relier ces deux aspects et ainsi de décrire l'évolution des effets en fonction des doses et du temps et assurer une adaptation posologique. Pour cela, il est nécessaire dans un premier temps, de développer des méthodes d'analyse et de dosage fiables et sensibles.

### 3.2.1 Mise au point du dosage du vandetanib par LC-MS/MS

Ce travail a fait l'objet de l'article suivant et sera discuté dans la discussion générale §3.5 (p.114) :

**Quantitation of vandetanib in human serum and plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** Alain Deroussent, Sophie Broutin, Jean-Michel Bidart, Gilles Vassal, Anderson Ryan, Martin Schlumberger, Angelo Paci. *Soumis à Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis.*

Le but de ce travail a été de mettre au point et de valider une méthode de dosage du vandetanib par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) dans le sérum et le plasma humains. L'extraction du vandetanib a été réalisée par précipitation des protéines à l'aide d'une solution d'acétonitrile contenant un étalon interne, la trazodone. Le vandetanib a été isolé sur une colonne C18 en phase inverse, à l'aide d'une phase mobile contenant un mélange {acétonitrile/eau, 80 :20, v/v, 0.1% acide acétique, pH4} puis a été identifié et quantifié par spectrométrie de masse en tandem, en suivant la transition sélective  $m/z$  475→112. Cette méthode de dosage est linéaire entre 2,5 et 5000 ng/mL dans le sérum et le plasma. Les rendements d'extraction dans le sérum et le plasma sont respectivement de 105% et de 95%. La méthode est sensible avec une limite inférieure de quantification de 2,5 ng/mL définie avec une précision de 92% et un coefficient de variation (CV) de 10%. La méthode est précise (CV de répétabilité <6%) et exacte (biais <10%) dans le sérum et le plasma. Cette méthode a permis de mesurer les concentrations sériques et plasmatiques de vandetanib chez des patients atteints de CMT et traités à la posologie de 300 mg par jour. Les résultats mettent en évidence des taux plasmatiques plus élevés que les taux sériques. Cette méthode est actuellement appliquée au suivi des concentrations de vandetanib chez les patients et à la conduite d'études pharmacocinétiques/pharmacodynamiques.

Manuscript Number:

Title: Quantitation of vandetanib in human serum and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Tandem mass spectrometry; Vandetanib; Tyrosine kinase inhibitor; Medullary thyroid carcinoma.

Corresponding Author: Dr Angelo PACI, Pharm.D, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Institut Gustave Roussy

First Author: Alain DEROUSSENT, Engineer

Order of Authors: Alain DEROUSSENT, Engineer; Sophie BROUTIN, Pharm.D; Jean-Michel BIDART, Pr; Anderson J RYAN, Ph.D; Martin SCHLUMBERGER, Pr; Angelo PACI, Pharm.D, Ph.D

Abstract: Vandetanib, a once-daily oral multikinase inhibitor with anti-tumor activity, has been recently approved by the FDA to treat adult patients with metastatic medullary thyroid carcinoma (MTC) who are ineligible for surgery and who have disease that is progressing or causing symptoms. A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay was developed and validated for the quantitation of vandetanib in human serum and plasma. A 0.1 mL-sample volume was extracted using a protein precipitation with acetonitrile containing trazodone as internal standard. Vandetanib was analyzed on a reversed-phase C18 column using the mobile phase, acetonitrile/aqueous buffer with acetic acid 0.1% (80:20, v/v) and quantified by tandem mass spectrometry using selective reaction monitoring of mass transition  $m/z$  475→112. The LC-MS/MS assay was linear from 2.5 to 5,000 ng/mL in both matrices. Mean recoveries of vandetanib from human serum and plasma were 105 and 95%, respectively. The lower limit of quantitation was achieved at 2.5 ng/mL with 92% accuracy and a coefficient of variation (CV) of 10%. The method was accurate with inter-day recoveries in serum and plasma ranging from 89.9 to 99.1% and from 89.6 to 99.6%, respectively and precise with CV ranging from 2.0 to 5.6%. The LC-MS/MS assay was applied for vandetanib assessment of serum and plasma levels in MTC patients receiving oral vandetanib at 300 mg/day.

Suggested Reviewers:

Villejuif, 4<sup>th</sup> of July 2011

**Sergio Pinzauti**  
**Department of Pharmaceutical Sciences**  
**University of Florence**  
**Via G. Capponi 9**  
**50121 Firenze**  
**Italy**

N/REF : AP/2011-214

Please find enclosed a manuscript entitled « Quantitation of vandetanib in human serum and plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry » we would like to submit for publication in the Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis".

According to the scope of JPBA, we would appreciate if you can review this article that present a rapid and reliable method for the measurement of this promising tyrosine kinase inhibitor in cancer treatment that could be used by our colleagues for therapeutic monitoring purpose.

Hoping to hearing from you.

Yours sincerely.

Dr. Angelo PACI

Quantitation of vandetanib in human serum and plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

Alain Deroussent<sup>1</sup>, Sophie Broutin<sup>2,3</sup>, Jean-Michel Bidart<sup>2,4</sup>, Anderson Joseph Ryan<sup>5</sup>, Martin Schlumberger<sup>6</sup>, Angelo Paci<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> *CNRS UMR 8203, Vectorology and Anticancer treatments, Paris-Sud University, IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

<sup>2</sup> *CNRS UMR 8200, Paris-Sud University, IRCIV, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

<sup>3</sup> *Department of Clinical Pharmacology and Drug analysis, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

<sup>4</sup> *Laboratory of Translational research, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.*

<sup>5</sup> *Cancer Discovery, Astra Zeneca Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, UK ,*

<sup>6</sup> *Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Paris-Sud University , Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.*

\*

Institut de cancérologie Gustave Roussy,

*CNRS UMR 8203*

114, rue Edouard Vaillant

94805 Villejuif - France

Phone: 33-01 42 11 47 30

Fax: 33-01 42 11 52 77

E-mail address: [angelo.paci@igr.fr](mailto:angelo.paci@igr.fr)

## ABSTRACT

Vandetanib, a once-daily oral multikinase inhibitor with anti-tumor activity, has been recently approved by the FDA to treat adult patients with metastatic medullary thyroid carcinoma (MTC) who are ineligible for surgery and who have disease that is progressing or causing symptoms. A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) assay was developed and validated for the quantitation of vandetanib in human serum and plasma. A 0.1 mL-sample volume was extracted using a protein precipitation with acetonitrile containing trazodone as internal standard. Vandetanib was analyzed on a reversed-phase C18 column using the mobile phase, acetonitrile/aqueous buffer with acetic acid 0.1% (80:20, v/v) and quantified by tandem mass spectrometry using selective reaction monitoring of mass transition  $m/z$  475→112. The LC-MS/MS assay was linear from 2.5 to 5,000 ng/mL in both matrices. Mean recoveries of vandetanib from human serum and plasma were 105 and 95%, respectively. The lower limit of quantitation was achieved at 2.5 ng/mL with 92% accuracy and a coefficient of variation (CV) of 10%. The method was accurate with inter-day recoveries in serum and plasma ranging from 89.9 to 99.1% and from 89.6 to 99.6%, respectively and precise with CV ranging from 2.0 to 5.6%. The LC-MS/MS assay was applied for vandetanib assessment of serum and plasma levels in MTC patients receiving oral vandetanib at 300 mg/day.

### *Keywords:*

Tandem mass spectrometry; Vandetanib; Tyrosine kinase inhibitor; Medullary thyroid carcinoma.

## 1. Introduction

Vandetanib is a 4-anilinoquinazoline tyrosine kinase inhibitor that selectively targets the RET, a membrane receptor, vascular endothelial cell growth factor receptor 2 (VEGFR2, Flk1/KDR) [1] and epidermal growth-factor receptor (EGFR) [2] kinase activity. This once-daily oral agent has shown antitumoral activity in patients with advanced medullary thyroid carcinoma (MTC), a rare thyroid tumor that develops from parafollicular C cells [3], and the FDA has recently approved vandetanib to treat adult patients with metastatic MTC who are ineligible for surgery and who have disease that is progressing or causing symptoms.

Previous preclinical pharmacokinetic studies of vandetanib [4-6] were carried out in mouse plasma and tissues using a specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) quantitative assay. Two clinical pharmacokinetic trials of vandetanib were performed in a phase I dose-escalation study to achieve optimal dosing in patients [7, 8]. Some LC-MS/MS assays of other tyrosine kinase inhibitors were recently developed for drug therapeutic monitoring both in human plasma and in serum [9, 10]. The aim of this work was to develop a fast and sensitive quantitative LC-MS/MS assay of vandetanib in human serum and plasma to support the pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in MTC patients. Here, we report the validation and the application of this assay in human serum and plasma in MTC patients treated with vandetanib at a daily dose of 300 mg.

## 2. Experimental

### 2.1 Chemicals and reagents

Vandetanib (*N*-(4-Bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]quinazolin-4-amine) was provided by AstraZeneca (Macclesfield, UK). Trazodone (purity of 99%) and ammonium acetate were purchased from Sigma (St Quentin-en-Fallavier,

France). HPLC grade acetonitrile and acetic acid were supplied by CWR International (Fontenay sous-Bois, France). Deionized water was prepared using a Milli-Q (Millipore, St Quentin-en-Yvelines, France). Drug-free blank human serum and plasma were provided by the French Blood Company (Etablissement Français du Sang, EFS, Rungis, France).

## *2.2. Stock solutions*

Two independent stock solutions of vandetanib for standards and quality controls were prepared at 10 mg/mL in methanol/acetonitrile (10/90, v:v). Two working solutions were diluted at 200 µg/mL and 10 µg/mL in acetonitrile. The stock solution of trazodone, used as internal standard (IS) was prepared at 5 mg/mL in methanol. The final IS working solution was diluted at 50 ng/mL in acetonitrile. All solutions were stored at -20°C.

## *2.3 Human samples collection*

MTC patients received oral vandetanib at 300 mg/day. Blood samples were collected before and after dosing. Serum and plasma were recovered after centrifugation at 3,000 x g for 15 min, and then stored at -20°C prior to extraction according the following procedure.

## *2.4 Sample preparation*

Calibration standards (2.5, 10, 25, 125, 250, 500, 1250, 2500, 5000 ng/mL) and quality controls (QC) (2.5, 20, 200, 2000, 4000 ng/mL) were prepared in blank human serum and plasma spiked with appropriate working solutions containing vandetanib. Aliquots (0.1 mL) of human calibration standards, QCs or patient samples were extracted by protein precipitation with 0.4 mL volume of cold acetonitrile containing IS (50 ng/mL in acetonitrile). After vortex-mixing, aliquots were centrifuged at 4°C at 10,000 x g for 10 min. Then, 0.3 mL



of the supernatant was drawn in a glass microvolume vial before LC-MS/MS analysis of 10  $\mu\text{L}$  aliquot.

### *2.5 LC-MS/MS conditions*

Analyses were performed using a 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Massy, France) including an autosampler, a binary pump and a degasser fitted with an Uptisphere<sup>®</sup> C18 5 $\mu\text{m}$  column, 2.1 mm i.d.  $\times$  50 mm long (Interchim, Montluçon, France). Isocratic elution was achieved with a flow rate of 0.2 mL/min using the mobile phase (acetonitrile/aqueous buffer 5 mM ammonium acetate and 0.1% acetic acid at pH 4, 80:20, v/v). The run time is 3.0 min. Before each sample injection, autosampler was washed twice with 20  $\mu\text{L}$  of acetonitrile. Detection was performed with a Quattro<sup>®</sup>-LCZ triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters, Manchester, UK). Analytes were detected in the positive electrospray ion mode using tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring (MRM). The dwell time was set at 500 ms for both compounds. The capillary voltage and the cone voltage were set at 3500V and 35V, respectively. The source temperature and the nebulisation gas temperature were set at 80°C and 250°C, respectively. Nitrogen gas flow was set at 500 L/h. The analyzer settings used low mass resolution for Q1 and unit mass resolution for Q3. Collision gas (argon) pressure was set at  $1.3 \cdot 10^{-3}$  mbar. Mass transitions monitored were  $m/z$  475 $\rightarrow$ 112 for vandetanib and  $m/z$  372 $\rightarrow$ 176 for trazodone, using collision energy of 20 and 25 eV, respectively. Analytes were quantified using Masslynx<sup>™</sup> software (Micromass, Waters, Manchester, UK).

### **3. Analytical assay validation**

The LC-MS/MS assay was validated in terms of selectivity, linearity, sensitivity, accuracy and precision according to the international guidelines requirements and based on the recommendations by the Food and Drugs Administration [11].

### *3.1 Selectivity*

Six different control samples prepared from blank human serum and plasma collected from patients before dosing were analyzed for testing absence of matrix interference with MRM detection using the described LC-MS/MS assay. Selectivity was performed as well with human samples spiked at the lower limit of quantitation (LLOQ).

### *3.2 Extraction recovery and matrix effect*

Extraction recoveries in human plasma and serum for the two analytes (vandetanib and trazodone) were determined at three levels of QC samples, 20, 200 and 4000 ng/mL. They were calculated as the ratio of analyte peak area from extracted QC plasma to mean peak area from extracted blank plasma spiked with the neat solutions.

The matrix effect variation was evaluated using extracted blank samples prepared from different human plasma spiked with vandetanib at the same three QCs concentrations. Matrix effect for the analyte was determined as the ratio of analyte peak area from extracted blank plasma spiked with the neat solutions to the mean peak area of the neat solutions at the same concentration prepared in solvent (acetonitrile/water with 0.1% acetic acid, 80:20, v/v).

### *3.3 Linearity and limits of quantification and of detection*

Calibration curves were plotted based on the relationship between the nominal concentration of analyte and the peak area ratio of the analyte and of the internal standard. A  $1/x^2$  weighted least-squares linear regression was fitted over the 2.5-5,000 ng/mL concentration range using Quanlynx<sup>TM</sup> software. Mean regression equations were expressed as  $y = a x + b$ , where  $y$  corresponds to the analyte/IS peak area ratio and  $x$  to the analyte concentration. The lower limit of quantitation (LLOQ) of the assay was the lowest

concentration of vandetanib with recommended variation of accuracy lower than 20 % [11]. The lower limit of detection (LLOD) was calculated with a signal to noise equal to 3, using the ratio of the standard deviation of the intercept ( $b$ ) and of the mean slope ( $a$ ) from three calibration curves.

### *3.4 Accuracy and precision*

QCs were prepared at five vandetanib concentrations (2.5, 20, 200, 2000, 4000 ng/mL) with six replicates in human serum and three replicates in human plasma for each run over three days. Accuracy was measured by the recovery as the ratio (%) of the mean experimental concentration from the nominal concentration. Within-run precision or repeatability expressed as the coefficient of variation ( $CV_r$ ), was investigated for the five levels of QCs prepared the same day. Between-run or intermediate precision, expressed as the coefficient of variation ( $CV_i$ ), was evaluated for each QC level.

### *3.5 Stability*

Stability of vandetanib in QCs was evaluated in solvent (water/acetonitrile, 20:80, v/v) on the autosampler at room temperature. Stability in human serum and plasma was determined for three QC levels (20, 200, 4000 ng/mL) at room temperature over 24 h and after three freeze (-20°C) and thaw cycles. Long-term stability was performed at -20°C after 12 weeks in plasma and up to 36 weeks in serum.

## **4 Results and discussion**

### *4.1 Performance results of the LC-MS/MS assay*

Assay selectivity using the specific mass transitions was shown by analysis of blank human serum sample spiked with IS at 200 ng/mL plasma (Fig. 1a). MRM chromatograms of

human serum at the LLOQ of 2.5 ng/mL (Fig. 1b) showed vandetanib at a retention time of 0.95 min and trazodone (IS) with a retention time of 1.04 min. Selectivity in human plasma was similar (Fig. 1c).

#### *4.2 Extraction recovery and matrix effect*

The extraction recovery for the two compounds was calculated in human samples at three QC levels and for IS at 200 ng/mL using protein precipitation. Mean extraction recoveries of  $105 \pm 3\%$  and  $95.4 \pm 4.8 \%$  were found in human serum and plasma for vandetanib, respectively. Mean extraction recoveries of  $93.8 \pm 1.8 \%$  and  $99.4 \pm 2.8 \%$  were found in human serum and plasma for trazodone, respectively. These high recoveries were in agreement with those previously reported (88 and 96 %) with liquid-liquid extraction for the analytes in mouse plasma [5]. No significant matrix effect (ME) for vandetanib and trazodone was observed in extracted human plasma or serum spiked with the same three QC levels. ME ratios of  $84 \pm 5\%$  and  $116 \pm 3\%$  were obtained for vandetanib in human serum and plasma, respectively.

#### *4.3 Linearity and sensitivity*

The calibration was linear in the 2.5-5,000 ng/mL concentration range for vandetanib using a  $1/x^2$  weighted least-squares regression. The determination coefficients ( $r^2$ ) obtained in human serum and plasma, were 0.995 and 0.990 respectively. The regression equations were  $y = 0.003244 x + 0.011146$  in serum and  $y = 0.002698 x + 0.008488$  in plasma. The slope of each regression line was reproducible with relative standard deviation of 4 and 7%, respectively. Thus, the LLOQ and the LLOD were determined at 2.5 and at 1.0 ng/mL, in serum and plasma, respectively.

#### *4.4 Accuracy and precision*

The accuracy results (Table 1) in QCs human serum at five concentrations of vandetanib from 2.5 to 4,000 ng/mL showed that intra-day values (89.8-97.1%) and inter-day values (89.9 to 99.1%) were within the 85-115 % range with precision better than 10%. The LLOQ in serum was found with 92% accuracy with CV of 10%. In the same way, the accuracy results (Table 1) in QCs human plasma showed that intra- and inter-day values were within the 85-115 % range with precision better than 10%. Thus, this LC-MS/MS assay was found accurate and precise for the analysis of vandetanib in human plasma and in serum from 2.5 to 5,000 ng/mL.

#### *4.5 Stability*

There was no significant variation (< 10%) of extracted vandetanib in acetonitrile for 24h at room temperature and for one week at 4°C and for 6 months storage at -20°C in methanol. On one hand, observed recoveries (Table 2) between freshly extracted analyte from human serum and from samples kept at room temperature for 24 hours preparation time before analysis showed variations less than 10%. On the other hand, minimal variations lower than 10% were observed after three freeze and thaw cycles. Same stability experiments were performed in human plasma and showed similar results. Thus, vandetanib is stable in human serum and plasma at room temperature. In addition, long-term stability of vandetanib at (-20°C) was achieved in human plasma for 12 weeks and in human serum for 36 weeks and showed variations less than 15%.

The LC-MS/MS assay uses rapid sample preparation with good analytical performance for the determination of vandetanib in human serum and plasma. The LC-MS/MS sensitivity in human serum and plasma was comparable with the previous assay in

mouse plasma [5]. Thus, this validated assay could be used to quantify vandetanib in human biological samples for further pharmacokinetic studies.

#### *4.6 Application in patients*

This LC-MS/MS assay was applied for the determination of the vandetanib concentration from MTC patients treated with vandetanib 300 mg/day. The LC-MS/MS analysis (Fig. 2) of patient serum and plasma samples collected 33 days after dosing showed concentrations of 759 and 846 ng/mL, respectively. Human plasma levels, higher than serum levels, are in agreement with mean steady-state values observed during a phase I study [7]. Interestingly, recent pharmacokinetic data from an open-label phase I study in Chinese patients showed higher plasma concentrations of vandetanib at steady-state [8].

### **5. Conclusion**

The validated LC-MS/MS assay is suitable for the quantitation of vandetanib in human serum and plasma using trazodone as internal standard. Using a fast sample preparation, it shows good sensitivity, linearity, accuracy and precision over the range of 2.5-5,000 ng/mL. Thus, this bioanalytical assay should be of value for drug monitoring during therapy.

## References

- [1] L.F. Hennequin, A.P. Thomas, C. Johnstone, E.S.E. Stokes, P.A. Pl'e, J.-J.M. Lohmann, D.J. Ogilvie, M. Dukes, S.R. Wedge, J.O. Curwen, J. Kendrew, C. Lambert-van der Brempt, Design and structure-activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 42 (1999) 5369–5389.
- [2] L.F. Hennequin, E.S.E. Stokes, A.P. Thomas, C. Johnstone, P.A. Pl'e, D.J. Ogilvie, M. Dukes, S.R. Wedge, J. Kedrew, J.O. Curwen, Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 1300–1312.
- [3] S.A. Wells, J.E. Gosnell, RF Gagel, J. Moley, D. Pfister, JA Sosa, M. Skimmer, A. Krebs, J. Vasseli, M. Schlumberger. Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 767-772.
- [4] J.A. Zirrolli, E.L. Bradshaw, M.E. Long, D.L. Gustafson, Rapid and sensitive LC/MS/MS analysis of the novel tyrosine kinase inhibitor ZD6474 in mouse plasma and tissues, *J Pharm Biomed Anal.* 39 (2005) 705-11.
- [5] D.L. Gustafson , E.L. Bradshaw-Pierce, A.L. Merz, J.A. Zirrolli, Tissue distribution and metabolism of the tyrosine kinase inhibitor ZD6474 (Zactima) in tumor-bearing nude mice following oral dosing, *J Pharmacol Exp Ther.* 318 (2006) 872-80.
- [6] E.L. Bradshaw-Pierce, C. A. Steinhauer, D. Raben, D. L. Gustafson, Pharmacokinetic-directed dosing of vandetanib and docetaxel in a mouse model of human squamous cell carcinoma, *Mol Cancer Ther.* 7 (2008) 3006-17

- [7] SN Holden, SG Eckhardt, R Basser, R de Boer, D Rischin, M Green, MA Rosenthal, C Wheeler, A Barge, HI Hurwitz, Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF and EGF receptor signaling, in patients with solid, malignant tumors, *Ann Oncol.* 16 (2005) 1391-7.
- [8] L Zhang, L Zhang, Su Li, Y Zhang, J Zhan, B-Y Zou, R Smith, PD. Martin, Y Jiang, H Liao, Z Guan Pharmacokinetics and Tolerability of Vandetanib in Chinese Patients With Solid, Malignant Tumors: An Open-Label, Phase I, Rising Multiple-Dose Study. *Clin Therapeutics* 33 (2011) 315-327.
- [9] RA Parise, MJ Egorin, SM Christner, DD Shah, W Zhou, JH Beumer, A high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantitation of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib in human plasma and serum, *J Chromatogr B*, 877 (2009) 1894-900.
- [10] R Honeywell, K Yarzadah, E Giovannetti, N Losekoot, EF Smit, M Walraven, JS Lind, C Tibaldi, HM Verheul, GJ Peters, Simple and selective method for the determination of various tyrosine kinase inhibitors used in the clinical setting by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B*. 878 (2010) 1059-68.
- [11] FDA, Homepage, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.



## Tables

Table 1. Intra- and inter-assay accuracy and precision of vandetanib in human serum and in human plasma quality controls.

Table 2. Stability of vandetanib in human serum at room temperature and after freeze/thaw cycles.

## Figures

Fig. 1. MRM chromatograms of human (a) blank serum or plasma spiked with 200 ng/mL of trazodone (IS), of (b) serum and (c) plasma samples spiked at 2.5 ng/mL LLOQ of vandetanib with (IS).

Fig. 2. MRM chromatograms of patient samples collected at day 33 after dosing at 300 mg/day of (a) serum and (b) plasma showed vandetanib concentrations of 846 and 759 ng/mL, respectively.

Table 1a

Human serum QCs				
Concentration (ng/mL)	Intra-assay (n=6)		Intra-assay (n=18)	
	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
2.5	92.1	8.1	92.1	10.0
20	95.1	2.9	99.1	5.6
200	97.1	4.7	98.4	3.7
2000	89.8	1.2	89.9	2.0
4000	96.6	0.9	95.8	4.0

Table 1b

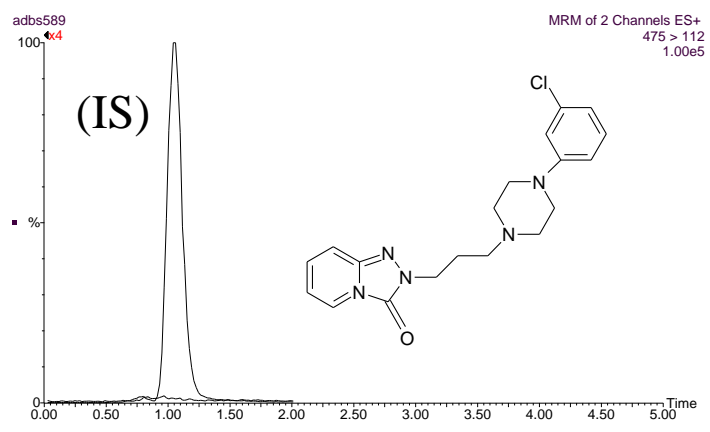
Human plasma QCs				
Concentration (ng/mL)	Intra-assay (n=3)		Intra-assay (n=9)	
	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
2.5	90.4	4.2	92.1	3.7
20	90.6	3.1	94.2	6.6
200	92.9	4.4	94.8	4.5
2000	87.5	1.8	89.6	6.6
4000	103.5	5.8	99.6	10.0

Table 2

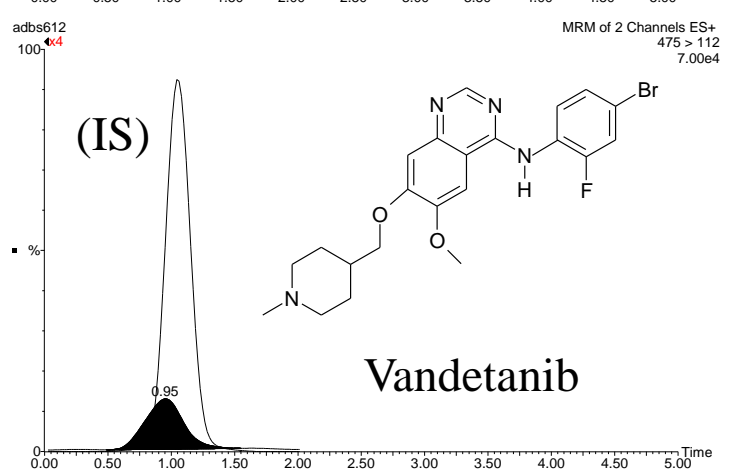
Concentration (ng/mL)	Time (h) Cycle (-20°C)					Cycle (-20°C)		
	0	1	2	4	24	1	2	3
20	100	108	101	99	96	100	106	108
200	100	107	105	98	101	100	98	101
2000	100	97	95	100	97	100	103	103
4000	100	102	97	96	98	100	99	108

Figure(s)

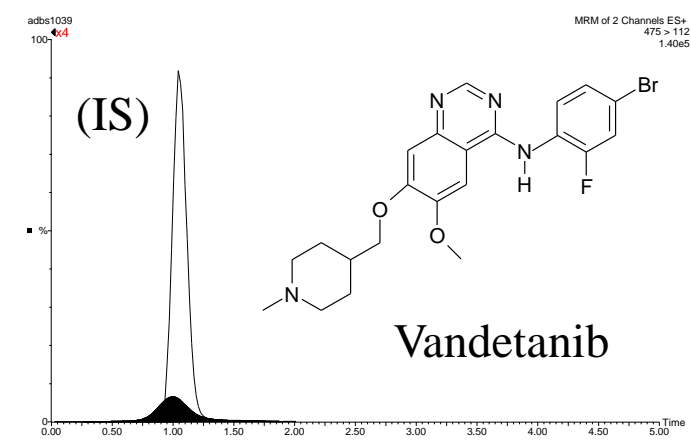
(a)



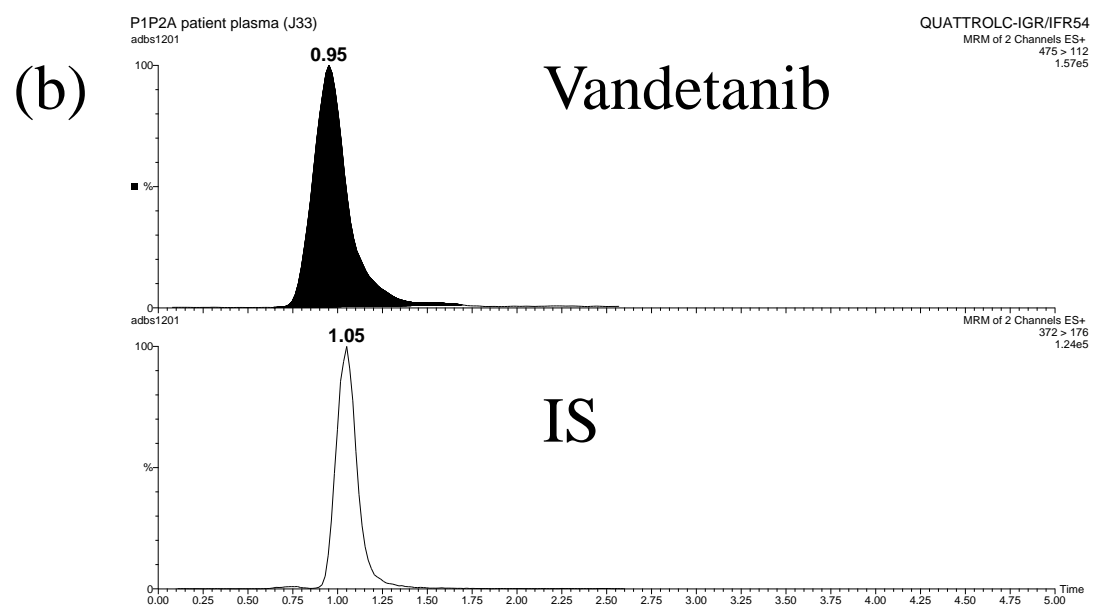
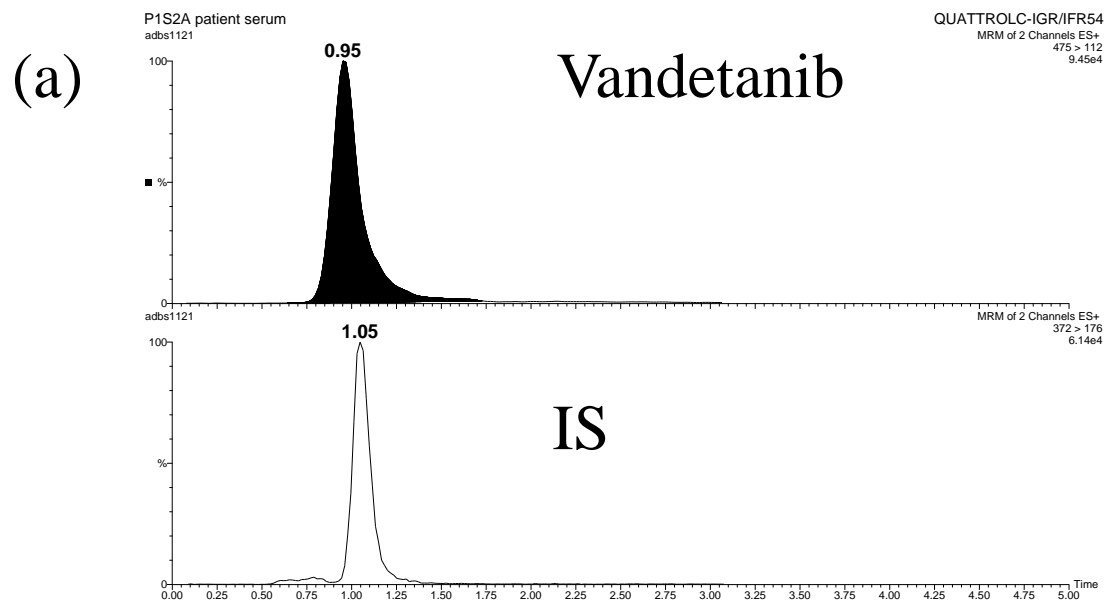
(b)



(c)

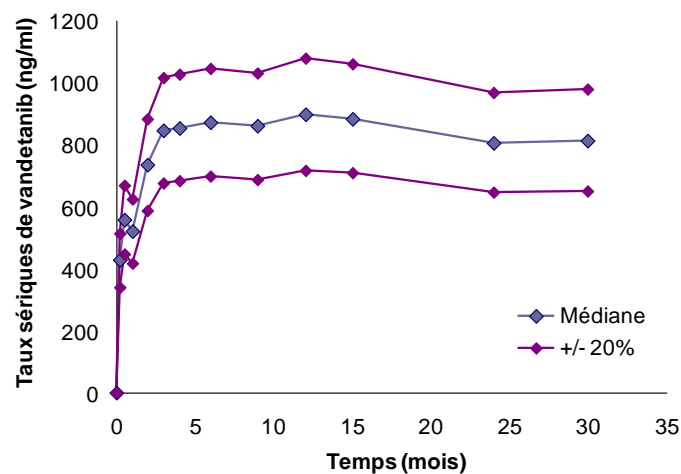


Figure(s)



### 3.1.1 Suivi des concentrations sériques de vandetanib au cours du temps

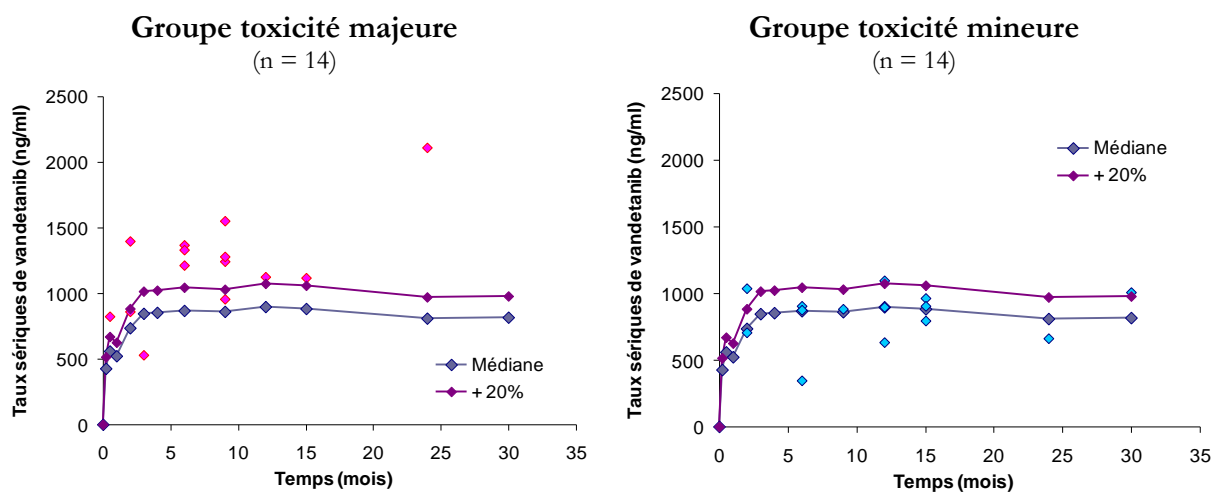
L'objectif de ce travail était d'étudier la relation pharmacocinétique/pharmacodynamique du vandetanib chez les patients. Pour cela, les taux médians de vandetanib ont été déterminés chez 28 patients atteints de CMT et traités par vandetanib à la posologie de 300 mg/j. Un total de 121 échantillons sériques, prélevés entre 1 semaine et 33 mois après l'initiation du traitement, ont été analysés de façon rétrospective. Les résultats montrent une augmentation progressive des taux sériques médians de vandetanib de 400 ng/mL, après 7 jours de traitement, à 800 ng/mL après 3 mois, puis une stabilisation dans le temps autour de cette concentration (**Fig. 35**). Ces résultats sont cohérents avec les valeurs de demi-vie élevées rapportées pour le vandetanib ( $t_{1/2} \sim 19$  jours) qui prédit un état d'équilibre après 95 jours ( $5 t_{1/2}$ ). Cette étude permet de proposer une fenêtre thérapeutique potentielle, définie dans un intervalle de plus ou moins 20% autour de la médiane (640-960 ng/mL), qui devra être précisée et validée lors d'études prospectives.



**Figure 35** : Taux médian de vandetanib au cours du temps. Cohorte de 28 patients atteints de CMT et traités par 300 mg/j de vandetanib.

### 3.1.2 Corrélation entre taux sériques de vandetanib et toxicité

Parmi les 28 patients traités par le vandetanib à la posologie de 300 mg/j, 14 ont présenté une toxicité majeure, définie par la nécessité d'un arrêt de traitement et/ou d'une diminution de posologie (allongement du QTc, rash, atteinte neurologique...). Les résultats montrent que près de 80% des patients avec une toxicité majeure (11/14), ont eu un taux maximal de vandetanib supérieur à 20% au-dessus de la médiane. Comparativement, un seul patient (7%) a présenté un tel taux dans le groupe sans toxicité majeure (**Fig. 36**).

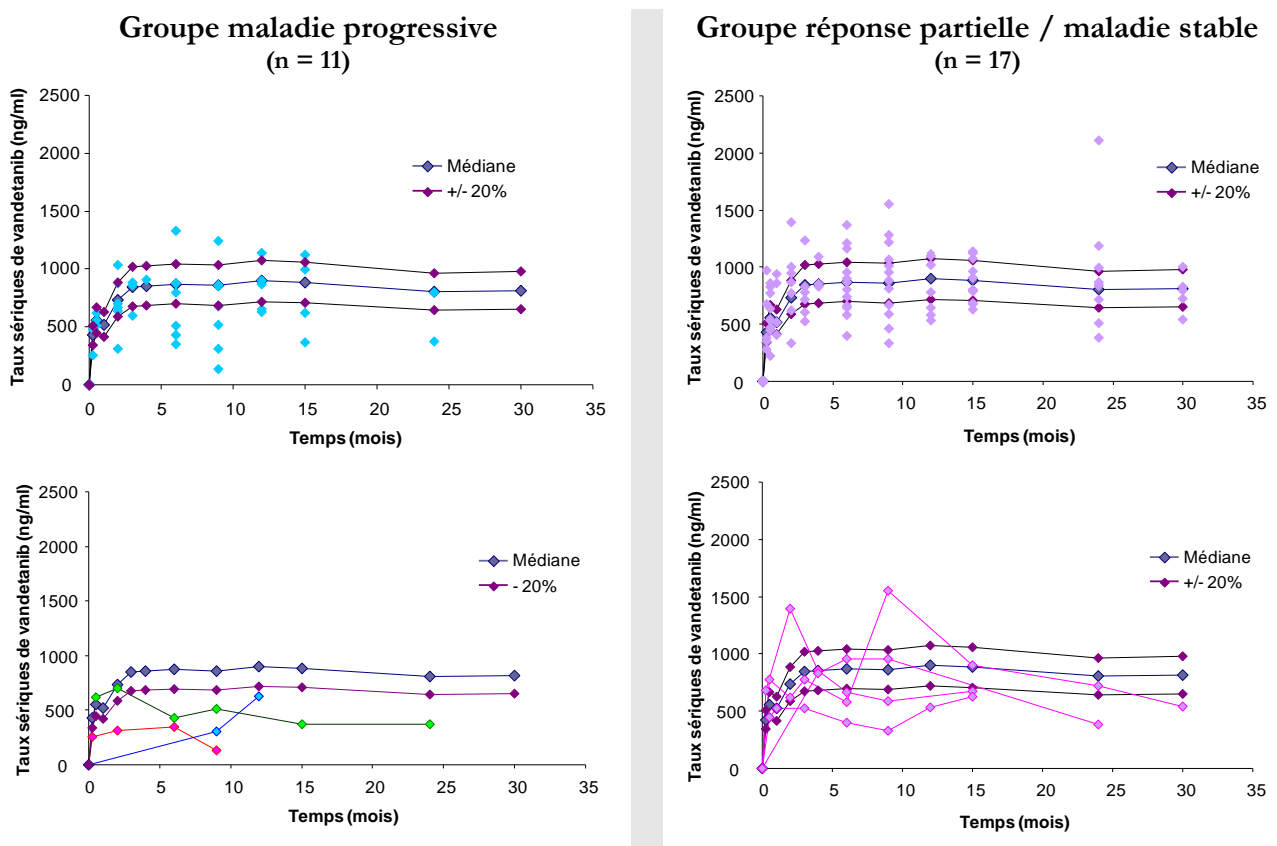


**Figure 36** : Concentration maximale de vandetanib dans la série de 28 patients atteints de CMT et traités par 300 mg/j de vandetanib. *Groupe toxicité majeure* : arrêt temporaire ou définitif du traitement et/ou diminution de la posologie. *Groupe toxicité mineure* : sans modification de posologie.

### 3.1.3 Corrélation entre taux sériques de vandetanib et efficacité

Le lien entre concentration sérique de vandetanib et réponse au traitement a ensuite été étudié. Selon les critères RECIST, la maladie de 11 des 28 patients a progressé, et celle des 17 autres patients a été stabilisée ou a diminuée (réponse partielle) (**Fig. 37**).

Les résultats montrent que les patients répondeurs ou stables ont des concentrations médianes supérieures à celles que présentent les patients dont la maladie progresse. Ainsi, à 6 mois, pour une concentration médiane globale de vandetanib de 871 ng/mL (extrêmes, 697 – 1045 ng/mL), le groupe des patients dont la maladie progresse présente une concentration médiane de vandetanib de 653 ng/mL *versus* 834 ng/mL pour les patients dits stables ou répondeurs.



**Figure 37** : Taux sérique de vandetanib chez les patients regroupés selon leur réponse tumorale définie par les critères RECIST (graphiques supérieurs). Exemple de patients avec des concentrations sériques inférieurs à -20% en-dessous de la médiane (graphiques inférieurs). Médiane, définie pour l'ensemble des 28 patients.

Parmi les patients qui progressent, trois ont présenté des taux sériques de vandetanib fortement inférieurs à -20% en-dessous de la médiane. Dans le groupe des patients dits répondeurs ou stables, quatre patients avaient également des taux sériques inférieurs à cette limite. De façon



intéressante, les valeurs basses de ces patients dits répondeurs ou stables, sont liées à une adaptation posologique (arrêt et/ou diminution) consécutive à l'apparition de toxicités majeures, principalement des cardiotoxicités (**Fig. 37**). Enfin, dans le groupe des patients répondeurs ou stables, 6 d'entre eux (38%) ont présentés une toxicité importante nécessitant un arrêt ou une diminution de posologie. Comparativement, seuls 2 patients (18%) dans le groupe des patients avec une maladie qui progresse ont eu une modification de posologie (**Fig. 37**).

L'ensemble de ces résultats préliminaires suggèrent donc un lien entre le taux sérique de vandetanib et la réponse clinique définie selon les critères RECIST, ainsi qu'avec l'apparition de toxicités. Toutefois le faible nombre de patients analysés ne permet pas de conclure et des travaux complémentaires sont en cours.

### 3.2 Intérêt de nouveaux biomarqueurs sériques

Les analyses transcriptomiques, présentées dans le §.2 de ce chapitre, ont permis d'identifier un panel de biomarqueurs circulants dont l'expression génique apparaît être régulée par le sunitinib et le vandetanib. Les résultats obtenus ont par ailleurs permis de mettre en évidence des taux sériques d'IL-8 et de TGF- $\beta$ 2 significativement plus élevés chez les patients atteints de CMT que chez des sujets sains. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'intérêt potentiel de ces deux biomarqueurs dans la prise en charge des patients atteints de CMT et traités par vandetanib. Pour cela, les taux d'IL-8 et de TGF- $\beta$ 2 ont été dosés, rétrospectivement, dans le sérum de 29 patients traités entre 6 et 42 mois par le vandetanib.

En tout, 198 prélèvements ont été dosés correspondant en moyenne à près de 7 prélèvements par patients. Tous les patients ont eu un prélèvement avant traitement (valeur basale). Les autres prélèvements ont été obtenus, quand cela a été possible, après 7 jours, 14 jours, 1 mois, 3 mois puis tous les 3 mois jusqu'à 33 mois, de traitement par le vandetanib.

A la date de point<sup>15</sup>, 8 patients étaient décédés et 15 patients étaient toujours traités par le vandetanib. La réponse au traitement, estimée par les critères RECIST, indique que 9 patients ont vu leur maladie progresser, 15 ont répondu et 5 présentaient une maladie stable. En moyenne,

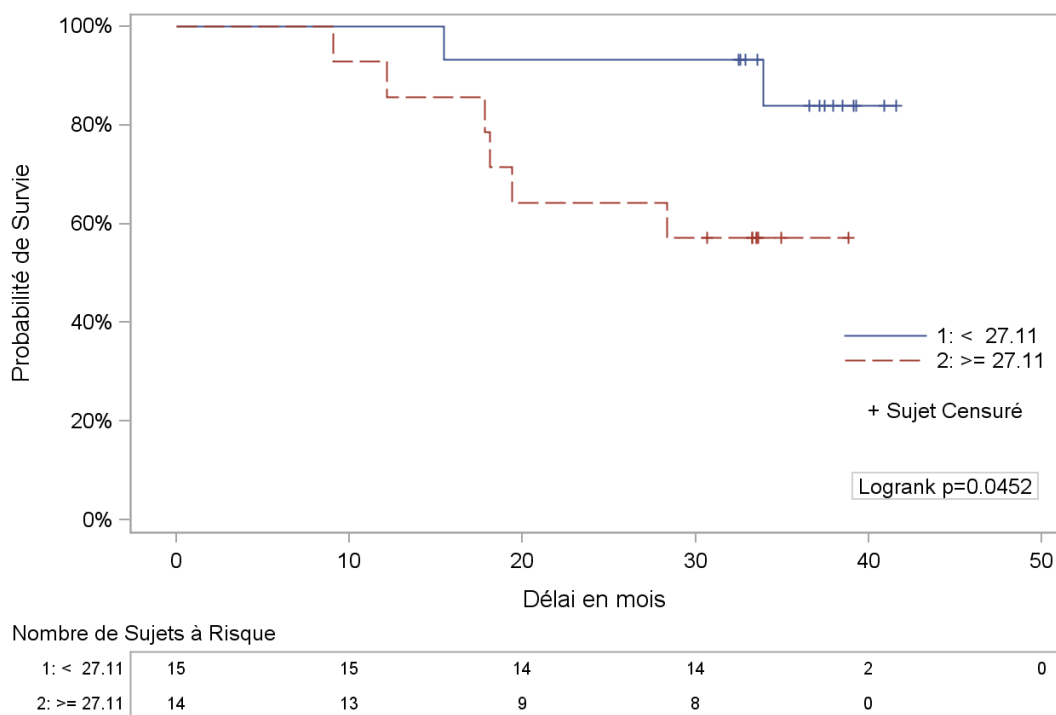
---

<sup>15</sup> Date à laquelle les données sont arrêtées pour réaliser l'analyse.

les patients ont été traités pendant 21,6 mois : 11,3 mois pour les patients qui ont progressé, 23,6 mois pour les patients stables, et 27,1 mois pour les patients en réponse partielle.

### 3.2.1 Association entre taux sérique des biomarqueurs avant traitement et survie globale

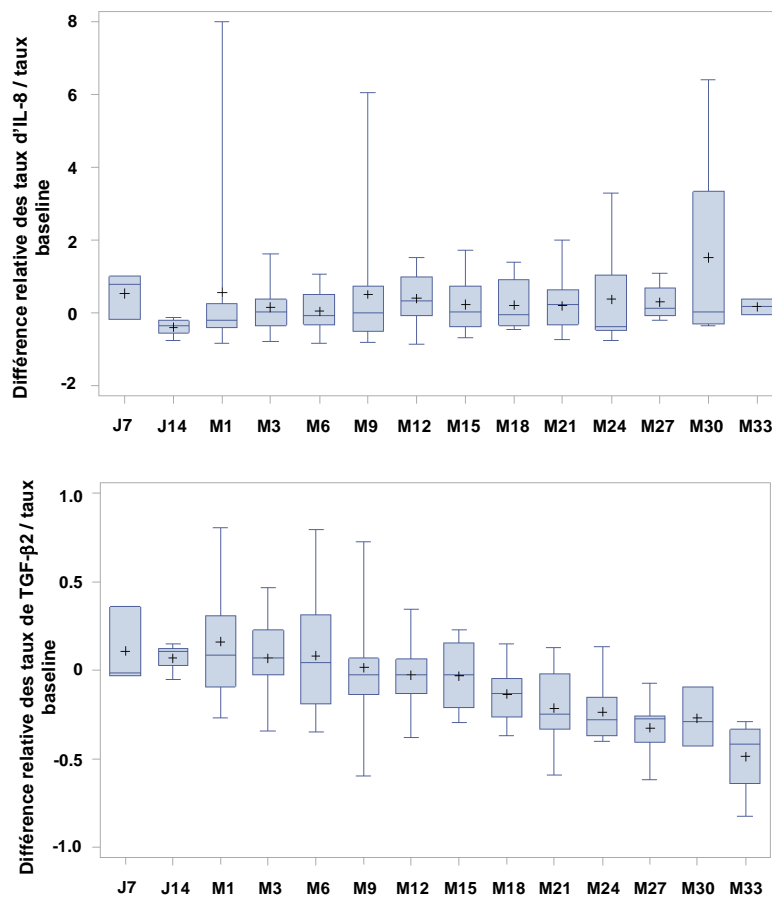
L'estimation de la survie globale en fonction du taux sérique basal d'IL-8 et de TGF-β2, mesurés avant tout traitement, a été réalisée par une analyse de Kaplan-Meier. Deux groupes, définis en fonction de la valeur médiane de chaque biomarqueur, ont ainsi été comparés. Pour l'IL-8, les résultats montrent que les patients qui ont un taux sérique supérieur à la médiane ont significativement une moins bonne survie que ceux qui ont des concentrations basales plus faibles ( $p=0.045$ ) (**Fig. 38**). Les résultats concernant le TGF-β2 ne mettent pas en évidence une association entre le niveau de concentration sérique et la survie globale des patients.



**Figure 38** : Survie globale des patients atteints de CMT, en fonction de leur concentration basale d'IL-8. Méthode de Kaplan-Meier (*cut-off* à la médiane).

### 3.2.2 Pharmacodynamie des biomarqueurs potentiels après traitement par le vandetanib

Les variations au cours du temps des concentrations sériques d'IL-8 et de TGF- $\beta$ 2 ont été évaluées par la différence relative mesurée à chaque temps par rapport à la concentration du biomarqueur avant traitement. Globalement, les résultats pour l'ensemble des 28 patients ne montrent pas de variations des taux d'IL-8 et mettent en évidence une diminution progressive des concentrations sériques de TGF- $\beta$ 2 (Fig. 39).



**Figure 39** : Evolution des taux relatifs d'IL-8 (haut) et de TGF- $\beta$ 2 (bas) dans le temps, chez les 28 patients atteints de CMT et traités par le vandetanib. Chaque valeur représente la différence entre la concentration de biomarqueur observée à un temps donné et la concentration du biomarqueur mesurée avant traitement. J, jour ; M, mois après le début de traitement.

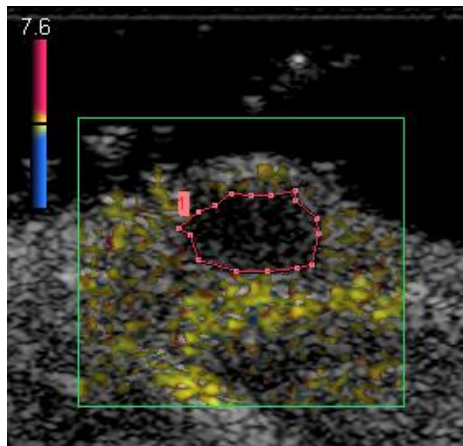
L'association entre les changements des taux circulants d'IL-8 et de TGF- $\beta$ 2, et la réponse tumorale reste à évaluer pour définir l'intérêt potentiel de ces biomarqueurs dans le suivi de la réponse au traitement par le vandetanib.

### 3.3 Evaluation de la perfusion tumorale par imagerie fonctionnelle

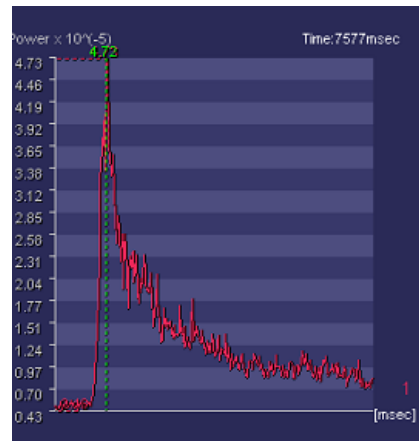
L'imagerie fonctionnelle fait partie des nouvelles modalités d'évaluation de la réponse aux thérapies moléculaires ciblées, en particulier des traitements antiangiogéniques. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'intérêt potentiel de l'imagerie fonctionnelle chez les patients atteints de CMT et traités par sunitinib. Pour cela, l'effet du sunitinib sur la perfusion tumorale a été évalué dans un modèle préclinique *in vivo*. Ce travail était associé à la mise en place du modèle de souris xénotreffées, permettant ainsi d'associer observations fonctionnelles, morphologiques et biologiques.

Les souris xénotreffées avec les cellules TT ont été traitées par placebo ou sunitinib (60 mg/kg/j) 5 jours sur 7 pendant 4 semaines. La perfusion tumorale a été évaluée à l'aide d'un échographe Aplio® (Toshiba), en mode d'imagerie de contraste (Vascular Recognition Imaging) après injection du produit de contraste Sonovue® (Bracco). La quantification de la perfusion, en 2D, a été réalisée à l'aide du logiciel CHI-Q® (Toshiba) qui permet de déterminer, au cours du temps, la courbe de produit de contraste pour une région d'intérêt délimitée (**Fig. 40**). Les paramètres de perfusion, caractéristiques de la prise de contraste et du flux sanguin tumoral, ont été quantifiés à partir de ces courbes. Ces paramètres sont le pic d'intensité maximal (rehaussement), la pente de montée, le temps de montée, le temps de transit et l'aire.

Les résultats obtenus suggèrent que la perfusion tumorale est plus importante (rehaussement et aire supérieurs) et plus efficace (pente, temps de montée et temps de transit) dans le groupe des souris recevant le placebo comparativement au groupe des souris traitées par le sunitinib. L'échographie doppler met donc en évidence une diminution fonctionnelle de la vascularisation tumorale entre les souris traitées par le placebo et celles recevant le sunitinib, confirmant l'intérêt potentiel de cette technique dans l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des antiangiogéniques.

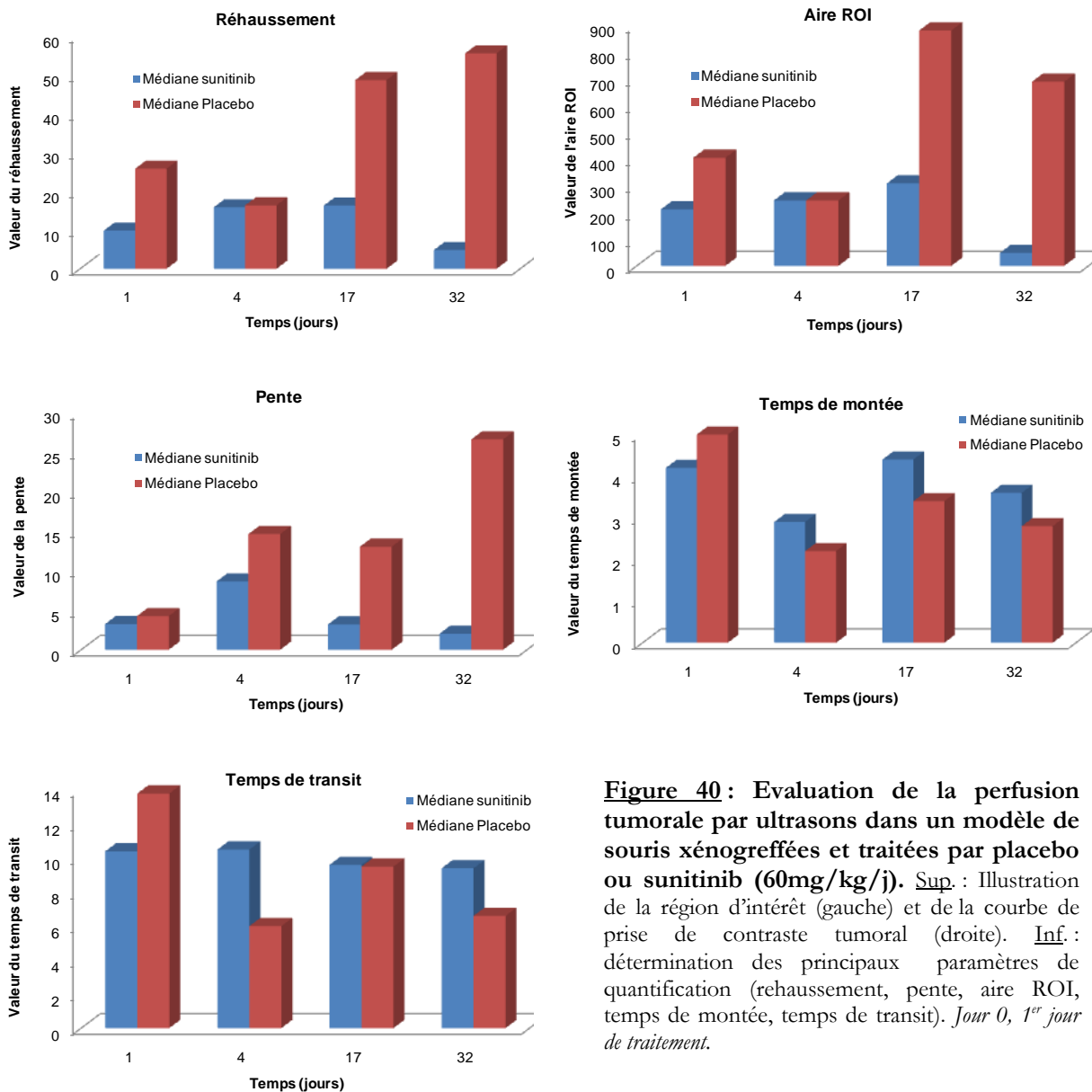


Région d'intérêt (ROI), délimitée en rouge.



Courbe de prise de contraste tumoral de la ROI

### Paramètres de quantification



**Figure 40 :** Evaluation de la perfusion tumorale par ultrasons dans un modèle de souris xénotransplantées et traitées par placebo ou sunitinib (60mg/kg/j). *Sup.* : Illustration de la région d'intérêt (gauche) et de la courbe de prise de contraste tumoral (droite). *Inf.* : détermination des principaux paramètres de quantification (rehaussement, pente, aire ROI, temps de montée, temps de transit). *Jour 0, 1<sup>er</sup> jour de traitement.*

### 3.4 Discussion

La prise en charge personnalisée des patients impose de pouvoir évaluer précisément et précocement la réponse à un traitement donné afin de pouvoir, le cas échéant, adapter la prise en charge thérapeutique (modification de posologie, changement de molécule). La pertinence des critères RECIST, basés sur la mesure des lésions tumorales et longtemps prépondérants en cancérologie, a été remise en question avec le développement des thérapies ciblées. En effet, ces nouveaux traitements ne sont pas tous susceptibles d'induire une régression du volume tumoral et la recherche de nouveaux critères s'est rapidement avérée nécessaire (Benjamin, et al., 2007). Dans ce contexte, le travail présenté a eu pour objectif d'étudier trois approches visant à améliorer le suivi et l'évaluation de la réponse à des inhibiteurs d'activité tyrosine kinase dans le cancer médullaire de la thyroïde (CMT).

Dans un premier temps nous avons mis au point une méthode de dosage du vandetanib dans le sérum et le plasma de patient, par spectrométrie de masse en tandem. Cette technologie, sensible et spécifique, est actuellement une des plus utilisées pour le dosage des inhibiteurs d'activité kinase (Bouchet, et al., 2011; Sparidans, et al., 2009). Notre méthode a permis de doser le vandetanib dans le sérum de 28 patients atteints de CMT et traités par le vandetanib à la posologie initiale de 300 mg/j, *per os*, entre 7 jours et 33 mois de traitement. Les résultats, cohérents avec les données de pharmacocinétique du vandetanib, montrent une augmentation progressive des taux sériques de l'inhibiteur, qui se stabilisent autour de 800 ng/ml à partir de 3 mois (FDA, 2 December 2010). Il est important de souligner que les concentrations sériques se sont avérées inférieures aux concentrations plasmatiques mesurées chez les mêmes patients. Cette observation est cohérente avec les travaux de Holden qui décrit, dans un essai de phase I, des taux plasmatiques à l'équilibre proche de 1000 ng/ml (Holden, et al., 2005). Enfin il est intéressant de constater que des concentrations plasmatiques plus élevées ont été décrites dans une population chinoise (Zhang, et al., 2011).

Si l'efficacité clinique du vandetanib à la posologie de 300 mg/j a été démontrée chez les patients atteints de CMT (FDA, 2 December 2010; Wells, et al., 2010), la pertinence de cette dose est remise en question par la fréquence élevée de toxicités nécessitant une interruption ou une diminution de posologie (Robinson, et al., 2010). L'étude PK/PD que nous avons menée sur la série de 28 patients atteints de CMT a permis de montrer un lien probable entre des concentrations sériques très élevées (supérieures à 20% au-dessus de la médiane) et la fréquence

de toxicités majeures avec modification de posologie. Nos résultats suggèrent également un lien entre des taux sériques bas (inférieurs à 20% en-dessous de la médiane) et la progression de la maladie chez certains patients. Plusieurs facteurs pourraient expliquer les variations de concentration observées chez les patients : la diarrhée, effet secondaire fréquent dans le CMT et en cas de traitement par le vandetanib, des variants génétiques codant les pompes d'efflux de la barrière intestinale, des variants génétiques des cytochromes P450, la prise alimentaire, des interactions médicamenteuses... Ces liens probables entre la concentration de vandetanib et les toxicités/réponses observées chez les patients doivent être approfondis. Une étude PK/PD prospective a été mise en place chez les patients atteints de CMT et traités par la vandetanib dans le cadre de l'ATU nominative en vigueur en France depuis juillet 2010.

L'ensemble de ces résultats confirme l'intérêt potentiel d'un suivi thérapeutique, permettant, par une adaptation posologique individuelle, l'amélioration de la tolérance et de l'efficacité du traitement. Des travaux complémentaires doivent être menés en particulier pour définir une fenêtre thérapeutique, zone concentrations efficaces sans risque d'apparition de toxicités sévères. Une telle démarche est entreprise avec les autres inhibiteurs d'activité kinase comme l'atteste le nombre croissant de méthodes de dosages d'ITKs et d'études PK/PD (Miura, et al., 2011; Sharma, et al., 2011; Takahashi and Miura, 2011). Enfin, il est important de souligner que certains patients dont la maladie a progressé, présentaient des concentrations proches de la médiane ou supérieures. Les variabilités PK ne peuvent à elles seules expliquer l'absence de réponse chez l'ensemble des patients. Des mécanismes de résistance, tels que les MDR des cellules tumorales, des variants de résistance de RET (V804 et Y806), l'implication d'autres oncogènes, doivent également être explorés chez les patients non répondeurs (Massart, et al., 1996; Moura, et al., 2011).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au suivi de la réponse thérapeutique à l'aide de biomarqueurs sériques. Le développement des technologies « omiques » à haut-débit a permis d'accumuler une quantité impressionnante de données et d'identifier un nombre important de biomarqueurs potentiels dont l'utilité en clinique reste à démontrer.

Notre travail, réalisé sur une série de 29 patients atteints de CMT et traités par le vandetanib, montre que la concentration sérique d'IL-8, biomarqueur identifié précédemment dans notre étude transcriptomique, pourrait être un marqueur pronostique dans le CMT. Nos résultats indiquent également que la concentration sérique du TGF- $\beta$ 2, un autre marqueur potentiel identifié dans nos travaux précliniques, tend à diminuer au cours du traitement par le vandetanib.

L'analyse de l'ensemble des résultats doit être poursuivie afin de déterminer un potentiel caractère prédictif de ces biomarqueurs. Cette étude rétrospective est limitée par le petit nombre de patients<sup>16</sup> et le caractère rétrospectif de l'étude. De nouveaux travaux doivent être menés pour confirmer ces premiers résultats.

La validation des nombreux biomarqueurs potentiels, identifiés dans les multiples travaux publiés ces dernières années, est un point critique. Le défi pour les années à venir est de valider ces données en clinique de façon pragmatique et efficace. Il apparaît donc nécessaire de réaliser des études prospectives, multicentriques, sur un grand nombre d'échantillons et dans le cadre d'essais cliniques. Un rationnel fort, reposant sur l'intégration des différentes disciplines, devrait être au préalable défini et des objectifs attendus devraient apparaître de façon claire. La mise en œuvre d'études standardisées devrait ainsi garantir une haute qualité des résultats. Dans ce contexte, Pepe et al. ont proposé en 2008 une structure dénommée ProBe (*Prospective-specimen-collection ; retrospective-blinded-evaluation*), définissant des critères relatifs au contexte clinique, au matériel d'étude, à la taille de l'étude, et les performances des critères d'évaluation (Hanash, et al., 2011; Pepe, et al., 2008). Ces propositions font suite à la liste de recommandations REMARK (*Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies*) visant à améliorer la qualité des données publiées relatives aux biomarqueurs pronostiques, en particulier *via* la description précise du design de l'étude, des hypothèses de départ, des caractéristiques des patients et des échantillons, de la méthodologie, et de l'analyse statistique utilisée (McShane, et al., 2005).

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'imagerie fonctionnelle en tant qu'outil d'évaluation de la réponse thérapeutique. En effet les ITKs, et en particulier les antiangiogéniques, induisent une nécrose tumorale et des modifications de la vascularisation tumorale, qui doivent également être prises en compte lors du suivi de la réponse. Nos résultats dans ce domaine ont mis en évidence une diminution de la perfusion tumorale dans notre modèle *in vivo* de CMT, en réponse au traitement par le sunitinib et confirment l'intérêt de l'imagerie fonctionnelle, en particulier de l'échographie doppler, dans l'évaluation de la réponse aux antiangiogéniques. De façon générale, la visualisation de la néovascularisation de la tumeur et de son flux sanguin est un objectif important en imagerie médicale car cela permet d'évaluer l'efficacité des traitements antiangiogéniques de façon plus précise. La technique d'échographie, répétable, sans risque pour le patient permet de détecter des changements dans la vascularisation tumorale

---

<sup>16</sup> Toutefois, il ne faut pas oublier que le CMT est une maladie rare. Cette cohorte constitue un échantillonnage assez important en soi, en regard des études publiées.



dans de nombreux types de cancers traités par des antiangiogéniques (GIST, RCC). D'autres techniques d'imagerie fonctionnelle, telles que le scanner, dynamic contrast-enhanced l'IRM (imagerie par résonance magnétique), la TEP-FDG, ont été développées pour améliorer l'évaluation de la réponse aux traitements anticancéreux (Lassau, et al., 2011a; Lassau, et al., 2011b). Notons en particulier que le scanner CT (computed tomography) qui renseigne sur la taille des tumeurs, permet également de mesurer la densité des tissus. Choi et al. ont été les premiers à proposer l'utilisation de tels critères chez des patients atteints de GIST et traités par imatinib (Choi, et al., 2007), qui ont démontré leur intérêt dans d'autres cancers (Faivre, et al., 2011). En utilisant l'IRM dynamique de contraste, Zhu et al. (Zhu, et al., 2009) ont montré que le sunitinib réduit de façon significative la vascularisation intratumorale chez les patients présentant une réponse partielle ou une stabilisation tumorale prolongée. Enfin, la place de l'imagerie métabolique a également été évaluée dans la prise en charge des patients cancéreux. En effet la plupart des cellules cancéreuses sont caractérisées par un métabolisme glucidique accéléré, liée à une activation des transporteurs du glucose (GLUTs) et d'enzymes de la glycolyse. Ce métabolisme glucidique tumoral peut être quantifié de façon non invasive par la scintigraphie en tomographie par émission de positons (TEP), couplée au 18F-fluorodéoxyglucose (TEP-<sup>18</sup>F-FDG). Cette technique a notamment été utilisée pour évaluer la réponse au sunitinib chez des patients atteints de GIST, montrant que la réponse métabolique, évaluée par les modifications dans la prise du FDG après 4 semaines de traitement était fortement corrélée à la survie sans progression. (Prior, et al., 2009). Plusieurs études ont également montré l'intérêt de la TEP-18F-FDG chez les patients atteints de CMT et traités par le vandetanib, confirmant l'intérêt potentiel de la TEP-18F-FDG pour prédire la réponse aux inhibiteurs d'activité kinase de RET dans les essais cliniques (Walter, et al., 2011).

---

## **CHAPITRE 5**

### **CONCLUSION & PERSPECTIVES**

---

---

## CHAPITRE 5 : CONCLUSION & PERSPECTIVES

---

La meilleure compréhension de la biologie des tumeurs, tant au niveau de la tumeur que de son environnement, a permis le développement de thérapies plus rationnelles et plus spécifiques, en particulier des molécules de synthèse tels que les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase (ITK). De nombreux ITK sont actuellement en cours de développement dans le cancer médullaire de la thyroïde (CMT), une tumeur rare de la thyroïde mais dont la relative agressivité nécessite des traitements efficaces. Le vandetanib et le sunitinib, deux inhibiteurs compétitifs de la fixation de l'ATP, actifs vis à vis de plusieurs récepteurs dont RET et VEGFR-2, montrent des résultats prometteurs chez les patients atteints de CMT. Le développement des thérapies ciblées repose sur la caractérisation moléculaire spécifique de la tumeur et du patient, et sur la meilleure compréhension des mécanismes d'action des thérapeutiques. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été à la fois cognitifs et cliniques, visant à améliorer la compréhension de la réponse moléculaire à deux ITK, le sunitinib et le vandetanib, dans le CMT, et ainsi identifier de nouveaux biomarqueurs.

Ce travail a permis de caractériser les effets antiprolifératifs, antitumoraux et antiangiogéniques du sunitinib et du vandetanib dans un modèle de CMT muté RET<sup>C634W</sup>, mettant en évidence des profils d'activité proches entre les deux inhibiteurs. Les principales voies de signalisation mises en jeu lors de la réponse aux traitements ont été déterminées par Reverse-Phase Protein Array (RPPA), démontrant une nouvelle fois des profils comparables entre les deux ITKs. Des voies de signalisation activées dans le CMT mais non inhibées par le sunitinib et le vandetanib ont également été identifiées, justifiant l'étude d'associations thérapeutiques avec des inhibiteurs spécifiques de ces voies. Par une approche transcriptomique haut-débit menée sur des modèles précliniques de CMT, les principales fonctions cellulaires mises en œuvre lors de la réponse au sunitinib et au vandetanib ont été identifiées. Ce travail, qui s'est principalement attaché aux gènes régulés communs entre les deux ITKs, a mis en évidence le rôle de gènes impliqués dans l'invasion tissulaire et le pouvoir métastatique, suggérant une participation clé des protéines codées dans le processus tumoral. Cette étude transcriptomique a également permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels de réponse au vandetanib et au sunitinib, tels que l'IL-8 et le TGF- $\beta$ 2. L'inhibition de la synthèse et de la sécrétion de CT, le marqueur de référence du CMT par deux inhibiteurs a également été caractérisée dans notre modèle d'étude préclinique. Enfin, l'intérêt de trois approches dans le suivi et l'évaluation de la réponse chez des patients

atteints de CMT et traités par ITK a été évalué. Le développement d'une méthode de dosage du vandetanib par spectrométrie de masse a permis de mener une étude PK/PD chez 28 patients atteints de CMT. Les résultats préliminaires suggèrent un lien entre des taux sériques élevés et l'apparition de toxicités sévères. L'évaluation de biomarqueurs potentiels dans le sérum de patients traités par le vandetanib a souligné l'intérêt de l'IL-8 comme marqueur pronostic potentiel dans cette pathologie. Enfin les résultats préliminaires, obtenus sur un modèle préclinique de souris xénogreffées, et évaluant la réponse au sunitinib par échographie doppler, ont confirmé l'intérêt de l'imagerie fonctionnelle dans ce domaine.

L'ensemble de ce travail a été réalisé sur un modèle de CMT caractérisé par une mutation activatrice du proto-oncogène RET au niveau du codon 634, codant pour la partie extracellulaire du récepteur. Cette mutation est particulièrement associée à la forme clinique NEM-2A. Si ce modèle est l'un des principaux disponibles dans le CMT, il ne permet pas de refléter à lui seul la diversité des anomalies génétiques d'expression phénotypique variable de la maladie. Il apparaît donc nécessaire de compléter ce travail avec d'autres modèles, tels que les cellules MZ-CRC1, caractérisées par une mutation au niveau du codon 918 et d'expression phénotypique plus agressive, ou bien encore des constructions cellulaires exprimant le variant de mutation V804 associé à des résistances à certains inhibiteurs d'activité tyrosine kinase. L'établissement de nouveaux modèles, plus proches de la diversité clinique est également un enjeu majeur. Dans ce domaine l'accès à des prélèvements tumoraux de patients apparaît essentiel. L'initiative du projet CreMEC, visant à établir de nouveaux modèles par xénogreffe de tumeurs de patients et caractérisation moléculaire, est un exemple particulièrement pertinent.

Ce travail s'appuie principalement sur deux technologies haut-débit : les puces à ADN et la Reverse-Phase Protein Array (RPPA). Les progrès technologiques majeurs de ces dernières années en particulier avec l'avènement des technologies haut-débit, appliquées aux domaines de la génomique, la transcriptomique, la protéomique et plus récemment la métabolomique, ont été le support aux progrès récents dans la compréhension de la biologie des tumeurs. De tels outils sont essentiels pour caractériser l'hétérogénéité des tumeurs, permettant de comparer un nombre très important d'échantillons. Les puces à ADN, de plus en plus performantes, donnent accès à l'intégralité du génome. Toutefois, il est important de noter que, compte tenu de la faible linéarité des signaux générés dans ce type de méthode, les résultats des gènes dont l'expression était significativement modifiée ont été contrôlés par RT-PCR quantitative. La diversité des protéines étant bien supérieure à celle des gènes, des puces protéomiques représentant une grande partie du

protéome, ne sont pas réalisables en l'état actuel des techniques. Cependant, certaines, basées sur un nombre limité de protéines, ont été développées pour tester des hypothèses spécifiques (Haab, 2003). La RPPA constitue une de ces méthodes et ses limitations sont de deux types : le nombre restreint d'anticorps spécifiques pour les protéines d'intérêt et la conservation de la qualité des échantillons biologiques « spottés » sur la lame (Parikh and Peppelenbosch, 2010). Le premier point est critique dans ce type de technologie car outre la disponibilité de l'anticorps, les problèmes de liaison non spécifiques, en particulier les effets matrice, et de linéarité liée à l'affinité constituent de réelles difficultés pour la mise en œuvre. Le second point est effectivement problématique quand on utilise des échantillons tissulaires fixés ce qui est le cas pour les tissus inclus en paraffine. Notre travail montre une bonne corrélation entre les résultats obtenus sur les cellules (*in vitro*) et les xénogreffes (*in vivo*) suggérant que du matériel biologique frais, voire congelé telles des biopsies, donne des résultats fiables. Enfin, il est important de souligner que ces technologies haut-débit génèrent un nombre très important de données à traiter et dont l'analyse requiert un savoir-faire et des compétences en bioinformatique qui sont aujourd'hui un des facteurs limitants dans le développement de ces technologies.

Nos résultats ont permis de mieux caractériser la réponse moléculaire au sunitinib et au vandetanib dans un modèle de cancer de la thyroïde. La compréhension de cette réponse reste toutefois partielle. En particulier le rôle de chaque cible moléculaire reste à déterminer. Si l'implication du récepteur RET est clairement établie dans l'oncogenèse et la réponse thérapeutique dans le CMT, celle d'autres récepteurs tels que le VEGFR-2 et l'EGFR restent à approfondir. La recherche d'autres cibles de ces inhibiteurs est également essentielle dans ce domaine. La technique de chromatographie d'affinité basée sur la liaison de petites molécules d'intérêt thérapeutique, dans le cas présent les ITKs, à des billes d'agarose<sup>17</sup> permet de répondre à cette problématique. Une telle démarche serait particulièrement pertinente à mettre en place dans la suite de notre projet. Ce travail de démantèlement des mécanismes moléculaire en réponse aux ITKs doit être également complété et étendu aux autres champs d'investigation moléculaire tels que la métabolomique et la régulation post-transcriptionnelle en particulier par les micro-ARN. Dans ce domaine très peu de données relatives au CMT ont été publiées. Des travaux préliminaires ont été menés dans notre équipe pour évaluer l'expression des micro-ARN en réponse au vandetanib. De façon intéressante, les premiers résultats obtenus sur la lignée cellulaire TT et sur des xénogreffes de cellules TT mettent en évidence une régulation des micro-

---

<sup>17</sup> Méthode développée en particulier par l'équipe du Pr. H. Galons (Faculté de pharmacie, Univ. Paris Descartes, INSERM U648).

ARN par l'inhibiteur. Ces travaux seront poursuivis et devraient permettre de mieux comprendre la réponse moléculaire.

Notre travail s'est intéressé à deux inhibiteurs d'activité tyrosine kinase à spectre large, le sunitinib et le vandetanib, dont les résultats en cliniques sont prometteurs. De façon plus générale, si ces nouveaux traitements ont eu un impact majeur dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer, comme l'atteste l'exemple du Glivec® dans la LMC, ils présentent quelques limites telles que l'absence de guérison complète, l'absence de réponse thérapeutique chez certains patients, ou bien encore l'existence de résistances acquises ou de-novo, qui justifient les travaux de recherche et de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans le cadre du CMT, de nouveaux inhibiteurs d'activité kinase sont en cours de développement, en particulier le xl-184 ciblant les récepteurs RET, VEGFR-2 mais également EGFR, et dont les premiers résultats sont prometteurs (Kurzrock, et al., 2011). Une autre voie de recherche majeure est celle des associations thérapeutiques entre thérapies ciblées mais également entre thérapies ciblées et chimiothérapies conventionnelles. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est également un point essentiel dans l'optimisation des traitements. Dans ce domaine notre travail d'analyse protéomique et transcriptomique a permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires potentielles, telles que les voies de signalisation mTOR et NFκB. Des travaux récents montrent que ces deux voies jouent vraisemblablement un rôle important dans l'oncogenèse du CMT (Gallel, et al., 2008; Tamburrino, 2011). Toutefois, il est établi que l'inhibition de la voie mTOR entraîne une activation de la voie AKT, mécanisme de résistance. Un travail récent de Holland et al. montre que l'inhibition simultanée des voies mTOR et AKT a des effets additifs sur l'inhibition de la croissance tumorale et, entre autres, bloque la voie de signalisation de l'interleukine 8 (Holland, et al., 2011). Dans notre travail, l'IL-8 apparaît être un biomarqueur important dans le CMT ; cette cytokine est retrouvée chez les patients métastatiques, son expression est régulée par les ITKs. Ces propriétés de l'IL-8 ont déjà été décrites dans d'autres tumeurs et sous l'action d'autres types d'ITKs, en particulier ciblant BRAF (Crawford, et al., 2008). Enfin, il est montré récemment que l'IL-8 joue un rôle critique dans la transition épithélio-mésenchymateuse, processus clé dans le pouvoir métastatique des tumeurs (Fernando, et al., 2011). L'ensemble de nos observations permet donc de proposer une vision globale, combinant nouvelle stratégie thérapeutique et biomarqueurs de suivi de la réponse thérapeutique.

Si l'implication du proto-oncogène *RET* a clairement été établie dans l'oncogenèse du CMT, il ne peut à lui seul expliquer l'ensemble des cas cliniques. L'identification récente de mutations de

l'oncogène RAS (H-RAS et K-RAS) dans près de 70% des cas de CMT *RET* « sauvage » et dans seulement 25 % des cas de CMT porteurs d'une mutation *RET*, suggérant ainsi des voies alternatives d'oncogénèse dans les formes sporadiques est particulièrement intéressante et l'implication d'autres anomalies génétiques dans l'oncogénèse du CMT doivent être recherchées (Moura, et al., 2011). Un travail en cours dans notre laboratoire confirme ces résultats. Il sera particulièrement important d'analyser l'existence d'une relation éventuelle entre ces mutations et la réponse aux ITKs<sup>18</sup>. En effet, de telles relations ont déjà été décrites dans les cancers du poumon (EGFR) et du colon (RAS), et à ce jour, n'ont pas été explorés dans le cas des CMT (Allegra, et al., 2009; Dahabreh, et al., 2010).

Il est important de souligner que l'évaluation de la réponse à un traitement donné n'a de sens que si le traitement est administré à la bonne dose. A ce jour les thérapies ciblées administrées par voie orale sont prescrites à une posologie standard qui ne prend pas en compte les éventuelles variabilités inter- et intra-individuelles. L'influence de facteurs modulant les concentrations plasmatiques des ITKs est à l'étude. Ainsi l'insuffisance rénale et la co-administration de médicaments inducteurs enzymatiques ont été identifiées comme paramètres augmentant et diminuant respectivement de plus de 40% le taux de vandetanib (Martin, et al., 2011; Weil, et al., 2010). Nos résultats préliminaires suggèrent que les variations inter- et intra-individuelles pourraient expliquer les profils de toxicité et de réponse différents selon les patients. De façon intéressante, un lien entre niveau d'exposition au sunitinib et efficacité mais aussi apparition d'effets indésirables, a également été mis en évidence dans une méta-analyse récente des données PK/PD relatives au sunitinib (Houk, et al., 2009). L'étude de l'intérêt clinique d'un suivi thérapeutique et d'une adaptation posologique individuelle chez les patients traités par inhibiteurs d'activité kinase est un objectif majeur dans la suite de ce travail.

En conclusion, notre objectif était de caractériser la réponse pharmacologique moléculaire au sunitinib et au vandetanib, deux inhibiteurs d'activité kinase, dans le cancer médullaire de la thyroïde, une tumeur rare mais dont l'agressivité justifie l'intérêt de l'innovation diagnostique et thérapeutique dans ce domaine. Sur un plan cognitif, notre travail de thèse met en lumière l'importance de l'intégration des données de génétique, de génomique, et de protéomique pour mieux comprendre les réseaux sous-tendant les perturbations impliquées dans l'oncogénèse et les modifications induites par les thérapeutiques moléculaires ciblées. Sur un plan clinique, il contribue à l'identification de candidats biomarqueurs de réponse thérapeutique dont l'intérêt en

---

<sup>18</sup> Ces travaux font l'objet de la thèse de Mlle A. Boichard.

pratique médicale devra être confirmé (Hanash, et al., 2011) et propose une méthode de dosage qui devrait contribuer à une adaptation posologique plus rationnelle. Enfin, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles devrait permettre de dégager de pistes pour une meilleure prise en charge personnalisée des patients.



---

## ANNEXES

---

**ANNEXE 1 : Essais cliniques évaluant de nouveaux traitements dans le cancer médullaire de la thyroïde, référencés sur ClinicalTrials.gov en date du 10 juin 2011.**

N°	Médicaments	Stratégie	Association	Phase	Statut	But	N°enregistrement
1	Imatinib, Dacarbazine, Capecitabine	ITK <sup>19</sup>	Oui	I/II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00354523
2	RIT <sup>20</sup> ciblée	RIT <sup>20</sup>	Non	II	Inconnu	Efficacité et tolérance	NCT00467506
3	Vandetanib	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00410761
4	Vandetanib	ITK	Non	I/II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance (enfants & adolescents)	NCT00514046
5	Cabozantinib	ITK	Non	III	Actif, sans recrutement	Survie sans progression <i>vs</i> placebo	NCT00704730
6	Sorafenib	ITK	Non	II	Inconnu	Efficacité et tolérance	NCT00390325
7	Lithium	autre	Non	II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00582712
8	Vandetanib	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance (100 mg)	NCT00358956
9	Vandetanib	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00098345
10	Everolimus	inhibiteur mTOR	Non	II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance	NCT01118065
11	Cabozantinib	ITK	Non	I	Actif, sans recrutement	Sélection de la meilleure dose	NCT00215605
12	Everolimus, pasireotide	inhibiteur mTOR	Oui	II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance	NCT01270321
13	Thalidomide	chimiothérapie	Non	II	Inconnu	Efficacité et tolérance	NCT00026533
14	Irinotecan	chimiothérapie	Non	II	Complet	Efficacité et tolérance	NCT00100828
15	Vandetanib, Bortezomib	ITK	Oui	I/II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00923247
16	Sunitinib	ITK	Non	II	Inconnu	Efficacité et tolérance	NCT00381641
17	AMG706	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00121628
18	Panobinostat	inhibiteur HDAC <sup>21</sup>	Non	II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance	NCT01013597
19	Sunitinib	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00519896
20	90Y- MN-14 , doxorubicin, stem cell	RIT <sup>20</sup>	Oui	I/II	Inconnu	Efficacité et tolérance	NCT00004048
21	Sorafenib	ITK	Non	II	Inconnu	Efficacité et tolérance	NCT00654238
22	Temsirolimus, vinorelbine	inhibiteur mTOR	Oui	I	Actif, avec recrutement	Sélection de la meilleure dose	NCT01155258
23	Sunitinib	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00510640
24	Tanespimycin (17AAG)	inhibiteur hsp90	Non	II	Inconnu	Efficacité et tolérance	NCT00118248
25	Pazopanib	ITK	Non	II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00625846
26	Vorinostat	inhibiteur HDAC	Non	II	Complet	Efficacité et tolérance	NCT00134043
27	Everolimus	inhibiteur mTOR	Non	II	Actif, avec recrutement	Efficacité et tolérance	NCT01164176
28	Gefitinib	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00095836
29	E7080	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00784303
30	Irofulven, capecitabine	chimiothérapie	Oui	II	Complet	Efficacité et tolérance	NCT00124527
31	Axitinib	ITK	Non	II	Actif, sans recrutement	Efficacité et tolérance	NCT00389441

<sup>19</sup> Inhibiteur d'activité tyrosine kinase <sup>20</sup> Radio-immunothérapie <sup>21</sup> Histone déacétylase

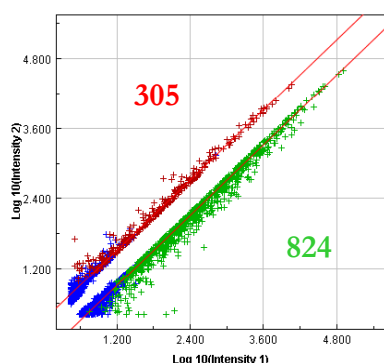
**ANNEXE 2 : Principaux processus biologiques régulés par les gènes dont l'expression est modifiée, *in vitro* (cellules TT), à la fois après 1 jour, 3 jour et 6 jours de traitement par le vandetnaïb (250 nM). Détermination à l'aide de la fonction « Gene Ontology (GO) Viewer » du logiciel Rosetta resolver®.**

---

<b>Processus biologiques</b>	<b>Nombre de gènes de la GO database</b>	<b>Nombre de gènes dont l'expression est modifiée</b>
Transduction du signal	113	23
Développement des organismes multicellulaires	70	16
Adhésion cellulaire	48	13
Régulation de la transcription dépendante de l'ADN	125	13
Signalisation des récepteur couplés aux protéines G	29	11
Adhésion cellulaire homophilique	12	10
Transport ionique	43	10
Autres	-	109

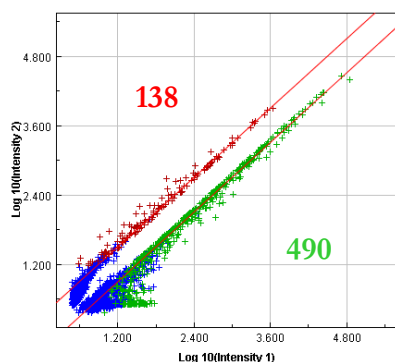
**ANNEXE 3 : Fonctions cellulaires et moléculaires modulées *in vitro* (cellules T1) par le vandetanib (250 nM) après 1 jour, 3 jours et 6 jours de traitement<sup>2</sup>.**

**Fonctions cellulaires et moléculaires - Jour 1**



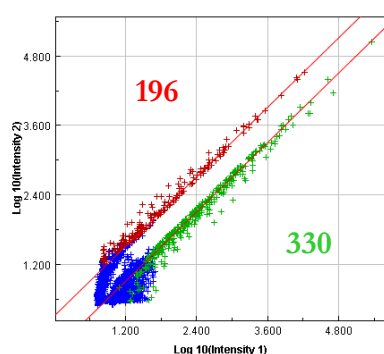
Fonction	<i>p</i> value	Molécules
Réplication de l'ADN, recombinaison et réparation de l'ADN	$10^{-26} - 10^{-03}$	127
Cycle cellulaire	$10^{-25} - 10^{-03}$	133
Assemblage cellulaire et organisation	$10^{-11} - 10^{-03}$	71
Croissance cellulaire et prolifération	$10^{-08} - 10^{-03}$	163

**Fonctions cellulaires et moléculaires - Jour 3**



Fonction	<i>p</i> value	Molécules
Mort cellulaire	$10^{-10} - 10^{-03}$	84
Croissance cellulaire et prolifération	$10^{-10} - 10^{-03}$	106
Cycle cellulaire	$10^{-10} - 10^{-03}$	53
Assemblage cellulaire et organisation	$10^{-10} - 10^{-03}$	55
Réplication de l'ADN, recombinaison et réparation de l'ADN	$10^{-10} - 10^{-03}$	24

**Fonctions cellulaires et moléculaires - Jour 6**



Fonction	<i>p</i> value	Molécules
Mort cellulaire	$10^{-13} - 10^{-03}$	90
Croissance cellulaire et prolifération	$10^{-11} - 10^{-03}$	103
Mobilité cellulaire	$10^{-11} - 10^{-03}$	64
Développement cellulaire	$10^{-08} - 10^{-03}$	64
Signalisation cellulaire et interaction	$10^{-08} - 10^{-03}$	81

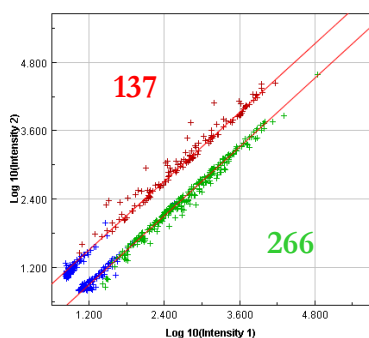
<sup>2</sup> Graphiques représentant l'intensité de chaque signal (Cyanine 3 et cyanine 5) pour chaque séquence génique étudiée. Les gènes dont l'expression est modifiée d'un facteur supérieur à 1.75 pour une pvalue inférieure à 0.001 ont été sélectionnés. En vert, gènes dont l'expression génique est significativement diminuée. En rouge, gènes dont l'expression génique est significativement augmentée.

**ANNEXE 4 : Principaux gènes dont l'expression est augmentée, *in vitro* (cellules TT), en réponse à un traitement par le vandetanib (250 nM). p value <0.05.**

Symbole	Nom	Modifications d'expression génique		
		Jour 1	Jour 3	Jour 6
<b>AGT</b>	angiotensinogen	4,3	4,5	5,4
<b>PLA2G1B</b>	phospholipase A2, group IB	2,0	3,3	4,4
<b>CDH4</b>	cadherin 4, type 1, R-cadherin	3,2	3,8	4,4
<b>P2RY14</b>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	4,6	5,0	4,0
<b>CHIA</b>	chitinase, acidic	4,0	2,6	3,7
<b>FGG</b>	fibrinogen gamma chain	4,8	5,4	3,7
<b>GPM6A</b>	glycoprotein M6A	2,0	2,9	3,5
<b>SCNN1B</b>	sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta	2,7	3,0	3,2
<b>VIPR2</b>	vasoactive intestinal peptide receptor 2	2,3	2,8	3,1
<b>GBA3</b>	glucosidase, beta, acid 3 (cytosolic)	2,7	3,2	3,0
<b>CASR</b>	calcium-sensing receptor	2,8	2,9	3,0
<b>RASL11B</b>	RAS-like, family 11, member B	2,2	2,1	3,0
<b>SCNN1G</b>	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	3,0	2,4	2,9
<b>MAFB</b>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	2,6	2,3	2,7
<b>GSTA1</b>	glutathione S-transferase A1	2,2	2,2	2,6
<b>NKX2-2</b>	NK2 homeobox 2	1,9	2,4	2,6
<b>PEG3</b>	paternally expressed 3	2,4	2,0	2,3
<b>GSTA5</b>	glutathione S-transferase A5	2,1	2,0	2,3
<b>C8ORF13</b>	family with sequence similarity 167, member A	1,9	2,0	2,3
<b>SLC6A4</b>	solute carrier family 6, member 4	1,9	2,0	2,3
<b>GSTA2</b>	glutathione S-transferase A2	2,1	2,0	2,3
<b>MMP26</b>	matrix metalloproteinase 26	2,2	1,8	2,2

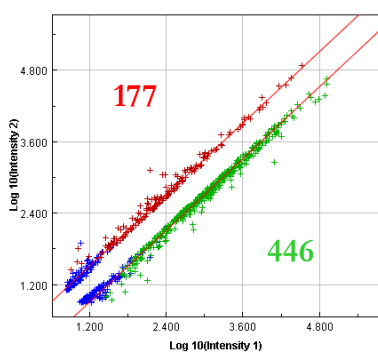
**ANNEXE 5 : Fonctions cellulaires et moléculaires modulées *in vivo* (souris xéno greffées avec des cellules T1) par le vandetanib (50 mg/kg/j) après 1 jour, 4 jours et 45 jours de traitement<sup>3</sup>.**

**Fonctions cellulaires et moléculaires – Jour 1**



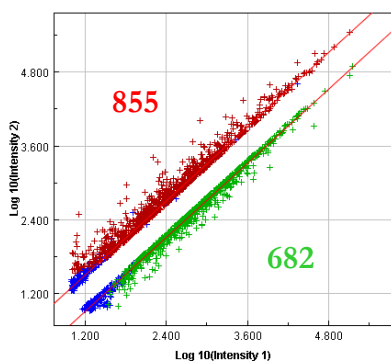
Fonction	<i>p</i> value	Molécules
Cycle cellulaire	$10^{-21} - 10^{-03}$	74
Réplication de l'ADN, recombinaison et réparation de l'ADN	$10^{-15} - 10^{-03}$	71
Assemblage cellulaire et organisation	$10^{-08} - 10^{-03}$	33
Croissance cellulaire et prolifération	$10^{-07} - 10^{-03}$	73
Mort cellulaire	$10^{-06} - 10^{-03}$	67

**Fonctions cellulaires et moléculaires – Jour 4**



Fonction	<i>p</i> value	Molécules
Cycle cellulaire	$10^{-32} - 10^{-03}$	106
Assemblage cellulaire et organisation	$10^{-15} - 10^{-04}$	69
Réplication de l'ADN, recombinaison et réparation de l'ADN	$10^{-15} - 10^{-04}$	91
Mobilité cellulaire	$10^{-15} - 10^{-03}$	49
Croissance cellulaire et prolifération	$10^{-14} - 10^{-03}$	136

**Fonctions cellulaires et moléculaires – Jour 45**



Fonction	<i>p</i> value	Molécules
Croissance cellulaire et prolifération	$10^{-13} - 10^{-03}$	252
Mort cellulaire	$10^{-09} - 10^{-03}$	207
Cycle cellulaire	$10^{-08} - 10^{-03}$	114
Mobilité cellulaire	$10^{-08} - 10^{-03}$	151
Développement cellulaire	$10^{-07} - 10^{-03}$	148

<sup>3</sup> Graphiques représentant l'intensité de chaque signal (Cyanine 3 et cyanine 5) pour chaque séquence génique étudiée. Les gènes dont l'expression est modifiée d'un facteur supérieur à 1.75 pour une pvalue inférieure à 0.001 ont été sélectionnés. En vert, gènes dont l'expression génique est significativement diminuée. En rouge, gènes dont l'expression génique est significativement augmentée

**ANNEXE 6 : Principaux gènes dont l'expression est diminuée, *in vivo* (souris nude xénotreffées avec des cellules TT), en réponse à un traitement par le vandetanib (50 mg/kg/j). p value <0.05.**

Symbole	Nom	Modifications d'expression génique		
		<i>Jour 1</i>	<i>Jour 4</i>	<i>Jour 45</i>
VIM	vimentin	-1,4	-3,3	-4,8
JUB	ajuba	-3,0		-4,6
LUM	lumican		-4,4	-4,5
RFTN1	raftlin, lipid raft linker 1		-2,0	-4,3
CD52	CD52 molecule		-1,8	-3,9
HS3ST5	heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 5	-1,4	-2,0	-2,8
NOG	noggin			-2,8
SPP1	osteopontin		-1,9	-2,6
CHST11	carbohydrate sulfotransferase 11	-1,5	-1,8	-2,6
PDGFC	platelet derived growth factor C		-1,8	-2,6
ARHGAP11A	Rho GTPase activating protein 11A	-1,7	-2,5	-2,6
CASC5	cancer susceptibility candidate 5	-1,7	-2,9	-2,5
SEMA5B	semaphorin 5B	-1,9	-1,8	-2,5
LAMB3	laminin, beta 3	-1,4	-2,4	-2,4
JAG1	jagged 1	-1,4	-1,8	-1,8
ANGPTL1	angiopoietin-like 1		-4,0	8,2
SCEL	sciellin	-1,8	-2,1	
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha	-1,7	-2,5	
LAMA4	laminin, alpha 4	-1,6	-1,8	
PIWIL1	piwi-like 1	-2,5		
CDH6	cadherin 6	-1,7		
PLAU	urokinase	-1,6		

**ANNEXE 7 : Principaux gènes dont l'expression est augmentée, *in vivo* (souris nude xéno greffées avec des cellules TT), en réponse à un traitement par le vandetanib (50 mg/kg/j). *p* value <0.05.**

Symbole	Nom	Modifications d'expression génique		
		Jour 1	Jour 4	Jour 45
TNNI2	troponin I type 2	2,8	-1,8	12,3
MYL1	myosin, light chain 1	2,7	-3,0	11,3
PDGFD	platelet derived growth factor D			9,0
ABRA	actin-binding Rho activating protein	2,9	-2,9	8,4
TNNT3	troponin T type 3	2,7		6,1
DCN	decorin	1,4		6,1
GSTA1	glutathione S-transferase A1		2,3	4,3
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1		2,6	4,1
HGF	hepatocyte growth factor	1,4		4,1
GRP	gastrin-releasing peptide		2,0	3,9
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha	1,3		3,9
AGL	amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase		1,9	3,8
HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	2,9		3,4
MYLPF	fast skeletal myosin light chain 2	2,9		3,4
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3		1,9	3,1
CDH11	cadherin 11			3,0
FGG	fibrinogen gamma chain	2,5	2,3	
MMP26	matrix metalloproteinase 26	1,5	2,2	
PLA2G1B	phospholipase A2, group IB		1,9	
VEGFA	vascular endothelial growth factor A		1,7	



## ANNEXE 8 : Perfusion tissulaire avec injection de produit de contraste

---

L'un des buts principaux de l'imagerie fonctionnelle est la quantification de la perfusion tissulaire (organe, tumeur). Celle-ci permet d'obtenir des paramètres pour étudier la microcirculation tissulaire (variations physiologiques et pathologiques), caractériser les tissus (pathologie diffuse et/ou tumorale) et même évaluer différents traitements thérapeutiques (antimitotiques, antiangiogéniques, thérapie génique par vecteur). Des logiciels de quantification permettent de quantifier objectivement la cinétique de prise de contraste.

Suite à une injection de produit de contraste en bolus, le passage des microbulles à travers un tissu d'intérêt comme la tumeur génère des courbes de cinétique de prise de contraste à partir desquelles il est possible d'extraire des informations fonctionnelles. Ces prises de contrastes étant purement vasculaires, elles apportent des informations fonctionnelles totalement représentatives des modifications vasculaires. Plusieurs indices quantitatifs peuvent alors être déduits de ces courbes. Ces paramètres peuvent être reliés à la vitesse du sang (pente du wash-in, ..), au volume sanguin (rehaussement maximum, aire sous la courbe, temps de transit moyen..) et au flux (temps de montée au maximum), correspondant au produit de la vitesse par le volume sanguin (Krix, et al., 2003; Thijssen and de Korte, 2005; Ugolini, et al., 2000).

Sur l'échographe Aplio, la cinétique de prise de contraste est quantifiée à l'aide d'un logiciel prototype dédié, CHI-Q® (Contrast Harmonic Imaging Quantification). A partir de l'enregistrement des séquences numériques acquises en terme de puissance linéaire dans le mode VRI (imagerie harmonique), le logiciel calcule la puissance moyenne linéaire (en unités arbitraires) renvoyée par les microbulles au sein d'une ou de plusieurs ROI définies par l'opérateur. Pour chaque ROI, le logiciel calcule la prise de contraste en fonction du temps.

Les examens ont été réalisés à l'aide d'un échographe Aplio (Toshiba) muni d'une sonde 9 MHz pour les examens avec produit de contraste (Sonovue®, Bracco) en mode VRI (« Vascular Recognition Imaging »). Les boucles Raw Data acquises en mode VRI pendant le protocole échographique sont analysées à l'aide d'un logiciel de quantification CHI-Q. Le contourage de la région d'intérêt (ROI) correspondant à la surface totale de la tumeur permet d'extraire la cinétique de prise de contraste intra-tumorale.

Les courbes obtenues avec le logiciel CHI-Q sont transférées depuis l'échographe vers un ordinateur pour une modélisation mathématique permettant d'accéder à des paramètres de perfusion :

- le rehaussement VRI défini comme la valeur maximale de la prise de contraste dans la ROI
- le temps de montée correspondant au temps mis par le produit de contraste pour atteindre le rehaussement maximal VRI au sein de la ROI
- la pente correspondant à la vitesse maximale de la prise de contraste pour arriver au rehaussement maximal VRI au sein de la ROI
- le temps de transit défini comme le temps mis par le produit de contraste entre son arrivée dans la tumeur et son évacuation. La durée est calculée pour (rehaussement VRI)/2
- l'aire sous la courbe définie comme l'intégrale de prise de contraste entre le temps initial et le temps pour retourner au rehaussement de base.

---

## **BIBLIOGRAPHIE**

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Acton DS, Velthuyzen D, Lips CJ, Hoppener JW. 2000. Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. *Oncogene* 19(27):3121-5.
2. Agostino N, Chinchilli VM, Lynch CJ, Koszyk-Szewczyk A, Gingrich R, Sivik J, Drabick JJ. 2010. Effect of the tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, dasatinib, and imatinib) on blood glucose levels in diabetic and nondiabetic patients in general clinical practice. *J Oncol Pharm Pract*.
3. Akeno-Stuart N, Croyle M, Knauf JA, Malaguarnera R, Vitagliano D, Santoro M, Stephan C, Grosios K, Wartmann M, Cozens R and others. 2007. The RET kinase inhibitor NVP-AST487 blocks growth and calcitonin gene expression through distinct mechanisms in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Res* 67(14):6956-64.
4. Akkiprik M, Nicorici D, Cogdell D, Jia YJ, Hategan A, Tabus I, Yli-Harja O, Y D, Sahin A, Zhang W. 2006. Dissection of signaling pathways in fourteen breast cancer cell lines using reverse-phase protein lysate microarray. *Technol Cancer Res Treat* 5(6):543-51.
5. Albores-Saavedra JA, Krueger JE. 2001. C-cell hyperplasia and medullary thyroid microcarcinoma. *Endocr Pathol* 12(4):365-77.
6. Alfano L, Guida T, Provitera L, Vecchio G, Billaud M, Santoro M, Carlomagno F. 2010. RET is a heat shock protein 90 (HSP90) client protein and is knocked down upon HSP90 pharmacological block. *J Clin Endocrinol Metab* 95(7):3552-7.
7. Algeciras-Schimmich A, Preissner CM, Theobald JP, Finseth MS, Grebe SK. 2009. Procalcitonin: a marker for the diagnosis and follow-up of patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 94(3):861-8.
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X and others. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403(6769):503-11.
9. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL. 2009. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 27(12):2091-6.
10. Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM. 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298(5871):240-4.
11. Ameur N, Lacroix L, Motte N, Baudin E, Caillou B, Ducreux M, Elias D, Chanson P, Schlumberger M, Bidart JM. 2009a. Mutational status of EGFR, BRAF, PI3KCA and JAK2 genes in endocrine tumors. *Int J Cancer* 124(3):751-3.
12. Ameur N, Lacroix L, Roucan S, Roux V, Broutin S, Talbot M, Dupuy C, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM. 2009b. Aggressive inherited and sporadic medullary thyroid carcinomas display similar oncogenic pathways. *Endocr Relat Cancer* 16(4):1261-72.
13. Andreoli M. 1981. *Advances in thyroid neoplasia*. Rome: Field educational.
14. Arbeit JM, Hirose R. 1999. Murine mentors: transgenic and knockout models of surgical disease. *Ann Surg* 229(1):21-40.
15. Arena S, Benvenuti S, Bardelli A. 2005. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cell Mol Life Sci* 62(18):2092-9.
16. Arthan D, Hong SK, Park JI. 2010. Leukemia inhibitory factor can mediate Ras/Raf/MEK/ERK-induced growth inhibitory signaling in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Lett* 297(1):31-41.
17. Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M. 1995. Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol* 15(3):1613-9.
18. Baetscher M, Schmidt E, Shimizu A, Leder P, Fishman MC. 1991. SV40 T antigen transforms calcitonin cells of the thyroid but not CGRP-containing neurons in transgenic mice. *Oncogene* 6(7):1133-8.
19. Bai F, Pei XH, Pandolfi PP, Xiong Y. 2006. p18 Ink4c and Pten constrain a positive regulatory loop between cell growth and cell cycle control. *Mol Cell Biol* 26(12):4564-76.
20. Bailiff R. 1937. Cytological changes in the rat thyroid following exposure to heat and cold, and their relationship to the physiology of secretion. *Am J Anat* 61:1-20.
21. Ball D. 2000. *Medullary thyroid carcinoma*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
22. Barber E. 1876. Contributions to the minute anatomy of the thyroid gland of the dog. *Proc R Soc Lond* 24:240-241.

23. Barbet J, Campion L, Kraeber-Bodere F, Chatal JF. 2005. Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 90(11):6077-84.
24. Barbot N, Calmettes C, Schuffenecker I, Saint-Andre JP, Franc B, Rohmer V, Jallet P, Bigorgne JC. 1994. Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary thyroid carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 78(1):114-20.
25. Baselga J. 2001a. Clinical trials of Herceptin(trastuzumab). *Eur J Cancer* 37 Suppl 1:S18-24.
26. Baselga J. 2001b. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4:S16-22.
27. Bass MB, Sherman SI, Schlumberger MJ, Davis MT, Kivman L, Khoo HM, Notari KH, Peach M, Hei YJ, Patterson SD. 2010. Biomarkers as predictors of response to treatment with motesanib in patients with progressive advanced thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 95(11):5018-27.
28. Baudin E, Bidart JM, Rougier P, Lazar V, Ruffie P, Ropers J, Ducreux M, Troalen F, Sabourin JC, Comoy E and others. 1999. Screening for multiple endocrine neoplasia type 1 and hormonal production in apparently sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 84(1):69-75.
29. Beachy SH, Repasky EA. 2008. Using extracellular biomarkers for monitoring efficacy of therapeutics in cancer patients: an update. *Cancer Immunol Immunother* 57(6):759-75.
30. Becker KL, Nysten ES, White JC, Muller B, Snider RH, Jr. 2004. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. *J Clin Endocrinol Metab* 89(4):1512-25.
31. Benjamin RS, Choi H, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Charnsangavej C. 2007. We should desist using RECIST, at least in GIST. *J Clin Oncol* 25(13):1760-4.
32. Berg D, Hipp S, Malinowsky K, Bollner C, Becker KF. 2010. Molecular profiling of signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded cancer tissues. *Eur J Cancer* 46(1):47-55.
33. Bernards R, Weinberg RA. 2002. A progression puzzle. *Nature* 418(6900):823.
34. Bible KC, Suman VJ, Molina JR, Smallridge RC, Maples WJ, Menefee ME, Rubin J, Sideras K, Morris JC, 3rd, McIver B and others. 2010. Efficacy of pazopanib in progressive, radioiodine-refractory, metastatic differentiated thyroid cancers: results of a phase 2 consortium study. *Lancet Oncol* 11(10):962-72.
35. Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, Labrousse F, Voitot H. 1999. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 45(10):1695-707.
36. Biomarkers Definitions Working Group. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69(3):89-95.
37. Blume-Jensen P, Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411(6835):355-65.
38. Booth CM, Calvert AH, Giaccone G, Lobbezoo MW, Eisenhauer EA, Seymour LK. 2008a. Design and conduct of phase II studies of targeted anticancer therapy: recommendations from the task force on methodology for the development of innovative cancer therapies (MDICT). *Eur J Cancer* 44(1):25-9.
39. Booth CM, Calvert AH, Giaccone G, Lobbezoo MW, Seymour LK, Eisenhauer EA. 2008b. Endpoints and other considerations in phase I studies of targeted anticancer therapy: recommendations from the task force on Methodology for the Development of Innovative Cancer Therapies (MDICT). *Eur J Cancer* 44(1):19-24.
40. Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M, Bredesen DE, Edery P, Mehlen P. 2000. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *Embo J* 19(15):4056-63.
41. Borrello MG, Smith DP, Pasini B, Bongarzone I, Greco A, Lorenzo MJ, Arighi E, Miranda C, Eng C, Alberti L and others. 1995. RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. *Oncogene* 11(11):2419-27.
42. Bouchet S, Chauzit E, Ducint D, Castaing N, Canal-Raffin M, Moore N, Titier K, Molimard M. 2011. Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS. *Clin Chim Acta* 412(11-12):1060-7.
43. Brave SR, Odedra R, James NH, Smith NR, Marshall GB, Acheson KL, Baker D, Howard Z, Jackson L, Ratcliffe K and others. 2011. Vandetanib inhibits both VEGFR-2 and EGFR signalling at clinically relevant drug levels in preclinical models of human cancer. *Int J Oncol* 39(1):271-8.
44. Brierley J, Tsang R, Simpson WJ, Gospodarowicz M, Sutcliffe S, Panzarella T. 1996. Medullary thyroid cancer: analyses of survival and prognostic factors and the role of radiation therapy in local control. *Thyroid* 6(4):305-10.
45. Brown PO, Botstein D. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21(1 Suppl):33-7.
46. Bugalho MJ, Domingues R, Borges A. 2009. A case of advanced medullary thyroid carcinoma successfully treated with sunitinib. *Oncologist* 14(11):1083-7.

47. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I. 1999. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 155(6):1967-76.
48. Burnett G, Kennedy EP. 1954. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 211(2):969-80.
49. Cabebe EC, Fisher GA, Sikic BI. 2011. A phase I trial of vandetanib combined with capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab for the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs*.
50. Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Maia AL. 2010. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 20(8):863-71.
51. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, Wilhelm SM, Santoro M. 2006. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* 98(5):326-34.
52. Carlomagno F, Guida T, Anaganti S, Provitera L, Kjaer S, McDonald NQ, Ryan AJ, Santoro M. 2009. Identification of tyrosine 806 as a molecular determinant of RET kinase sensitivity to ZD6474. *Endocr Relat Cancer* 16(1):233-41.
53. Carlomagno F, Guida T, Anaganti S, Vecchio G, Fusco A, Ryan AJ, Billaud M, Santoro M. 2004. Disease associated mutations at valine 804 in the RET receptor tyrosine kinase confer resistance to selective kinase inhibitors. *Oncogene* 23(36):6056-63.
54. Carlomagno F, Salvatore D, Santoro M, de Franciscis V, Quadro L, Panariello L, Colantuoni V, Fusco A. 1995. Point mutation of the RET proto-oncogene in the TT human medullary thyroid carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 207(3):1022-8.
55. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, Ryan AJ, Fontanini G, Fusco A, Santoro M. 2002. ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res* 62(24):7284-90.
56. Carlson KM, Dou S, Chi D, Scavarda N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA, Jr., Goodfellow PJ, Donis-Keller H. 1994. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4):1579-83.
57. Carmeliet P, Jain RK. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473(7347):298-307.
58. Carr LL, Mankoff DA, Goulart BH, Eaton KD, Capell PT, Kell EM, Bauman JE, Martins RG. 2010. Phase II study of daily sunitinib in FDG-PET-positive, iodine-refractory differentiated thyroid cancer and metastatic medullary carcinoma of the thyroid with functional imaging correlation. *Clin Cancer Res* 16(21):5260-8.
59. Chambers TJ, Magnus CJ. 1982. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol* 136(1):27-39.
60. Chatal JF, Campion L, Kraeber-Bodere F, Bardet S, Vuillez JP, Charbonnel B, Rohmer V, Chang CH, Sharkey RM, Goldenberg DM and others. 2006. Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group. *J Clin Oncol* 24(11):1705-11.
61. Chiquet-Ehrismann R. 2004. Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36(6):986-90.
62. Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Benjamin RS. 2007. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol* 25(13):1753-9.
63. Chow LQ, Eckhardt SG. 2007. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 25(7):884-96.
64. Cohen E, Needles B, Cullen K. 2008. Phase 2 study of sunitinib in refractory thyroid cancer. *J Clin Oncol* 26:6025.
65. Cohen P. 2001. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* 268(19):5001-10.
66. Colombo-Benkmann M, Li Z, Riemann B, Hengst K, Herbst H, Keuser R, Gross U, Rondot S, Raue F, Senninger N and others. 2008. Characterization of the RET protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 158(6):811-6.
67. Cooley LD, Elder FF, Knuth A, Gagel RF. 1995. Cytogenetic characterization of three human and three rat medullary thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 80(2):138-49.
68. Copp DH, Cameron EC. 1961. Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science* 134:2038.
69. Costante G, Durante C, Francis Z, Schlumberger M, Filetti S. 2009. Determination of calcitonin levels in C-cell disease: clinical interest and potential pitfalls. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 5(1):35-44.
70. Crawford S, Belajic D, Wei J, Riley JP, Dunford PJ, Bembenek S, Fourie A, Edwards JP, Karlsson L, Brunmark A and others. 2008. A novel B-RAF inhibitor blocks interleukin-8 (IL-8) synthesis in human melanoma xenografts, revealing IL-8 as a potential pharmacodynamic biomarker. *Mol Cancer Ther* 7(3):492-9.

71. Cuccuru G, Lanzi C, Cassinelli G, Pratesi G, Tortoreto M, Petrangolini G, Seregni E, Martinetti A, Laccabue D, Zanchi C and others. 2004. Cellular effects and antitumor activity of RET inhibitor RPI-1 on MEN2A-associated medullary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96(13):1006-14.
72. Dadan J, Wolczynski S, Sawicki B, Chyczewski L, Azzadin A, Dzieciol J, Puchalski Z. 2001. Preliminary evaluation of influence of gemcitabine (Gemzar) on proliferation and neuroendocrine activity of human TT cell line: immunocytochemical investigations. *Folia Histochem Cytobiol* 39(2):187-8.
73. Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Kosmidis P, Bafaloukos D, Murray S. 2010. Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16(1):291-303.
74. Das T, Cagan R. 2010. *Drosophila* as a novel therapeutic discovery tool for thyroid cancer. *Thyroid* 20(7):689-95.
75. Davies L, Welch HG. 2006. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *Jama* 295(18):2164-7.
76. de Cremoux P. 2010. [Molecular prognostic and predictive markers of breast cancer treatment]. *Bull Cancer* 97(11):1297-304.
77. de Groot JW, Links TP, Plukker JT, Lips CJ, Hofstra RM. 2006. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 27(5):535-60.
78. DeGroot L.J. 1989. *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders.
79. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA and others. 2006. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 368(9544):1329-38.
80. Desai J, Yassa L, Marqusee E, George S, Frates MC, Chen MH, Morgan JA, Dychter SS, Larsen PR, Demetri GD and others. 2006. Hypothyroidism after sunitinib treatment for patients with gastrointestinal stromal tumors. *Ann Intern Med* 145(9):660-4.
81. Desmedt C, Ruiz-Garcia E, Andre F. 2008. Gene expression predictors in breast cancer: current status, limitations and perspectives. *Eur J Cancer* 44(18):2714-20.
82. Dietel M, Sers C. 2006. Personalized medicine and development of targeted therapies: The upcoming challenge for diagnostic molecular pathology. A review. *Virchows Arch* 448(6):744-55.
83. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA, Jr. 1993. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 2(7):851-6.
84. Drosten M, Hilken G, Bockmann M, Rodicker F, Mise N, Cranston AN, Dahmen U, Ponder BA, Putzer BM. 2004. Role of MEN2A-derived RET in maintenance and proliferation of medullary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96(16):1231-9.
85. Drosten M, Putzer BM. 2006. Mechanisms of Disease: cancer targeting and the impact of oncogenic RET for medullary thyroid carcinoma therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3(10):564-74.
86. Drosten M, Stiewe T, Putzer BM. 2003. Antitumor capacity of a dominant-negative RET proto-oncogene mutant in a medullary thyroid carcinoma model. *Hum Gene Ther* 14(10):971-82.
87. Droz JP, Schlumberger M, Rougier P, Ghosn M, Gardet P, Parmentier C. 1990. Chemotherapy in metastatic nonanaplastic thyroid cancer: experience at the Institut Gustave-Roussy. *Tumori* 76(5):480-3.
88. Duda DG, Ancukiewicz M, Jain RK. 2010. Biomarkers of antiangiogenic therapy: how do we move from candidate biomarkers to valid biomarkers? *J Clin Oncol* 28(2):183-5.
89. Durante C, Russo D, Verrienti A, Filetti S. 2011. XL184 (cabozantinib) for medullary thyroid carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 20(3):407-413.
90. Ebos JM, Lee CR, Christensen JG, Mutsaers AJ, Kerbel RS. 2007. Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43):17069-74.
91. Eglen RM, Reisine T. 2009. The current status of drug discovery against the human kinome. *Assay Drug Dev Technol* 7(1):22-43.
92. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M and others. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45(2):228-47.
93. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Nagai MA, Healey CS, Ponder MA, Gardner E, Scheumann GF, Jackson CE, Tunnacliffe A and others. 1994. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet* 3(2):237-41.
94. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G and others. 2006. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 24(1):25-35.

95. Faivre S, Raymond E, Boucher E, Douillard J, Lim HY, Kim JS, Zappa M, Lanzalone S, Lin X, Deprimo S and others. 2009. Safety and efficacy of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: an open-label, multicentre, phase II study. *Lancet Oncol* 10(8):794-800.
96. Faivre S, Zappa M, Vilgrain V, Boucher E, Douillard JY, Lim HY, Kim JS, Im SA, Kang YK, Bouattour M and others. 2011. Changes in Tumor Density in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Treated with Sunitinib. *Clin Cancer Res*.
97. FDA. 2 December 2010. Briefing Document Oncology Drugs Advisory Committee Meeting NDA 22405/S000 Vandetanib.
98. Felici A, Giorgio M, Krauzewicz N, Della Rocca C, Santoro M, Rovere P, Manni I, Amati P, Pozzi L. 1999. Medullary thyroid carcinomas in transgenic mice expressing a Polyoma carboxyl-terminal truncated middle-T and wild type small-T antigens. *Oncogene* 18(14):2387-95.
99. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. 2011. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res*.
100. Ferrara N, Kerbel RS. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438(7070):967-74.
101. Findlay DM, Sexton PM. 2004. Calcitonin. *Growth Factors* 22(4):217-24.
102. Fletcher RH. 1986. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* 104(1):66-73.
103. Folkman J, Klagsbrun M. 1987. Angiogenic factors. *Science* 235(4787):442-7.
104. Force T, Krause DS, Van Etten RA. 2007. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer* 7(5):332-44.
105. Foster GV, Baghdiantz A, Kumar MA, Slack E, Soliman HA, Macintyre I. 1964. Thyroid Origin of Calcitonin. *Nature* 202:1303-5.
106. Frisk T, Zedenius J, Lundberg J, Wallin G, Kytola S, Larsson C. 2001. CGH alterations in medullary thyroid carcinomas in relation to the RET M918T mutation and clinical outcome. *Int J Oncol* 18(6):1219-25.
107. Fugazzola L, Pinchera A, Luchetti F, Iacconi P, Miccoli P, Romei C, Puccini M, Pacini F. 1994. Disappearance rate of serum calcitonin after total thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma. *Int J Biol Markers* 9(1):21-4.
108. Gagel RF, Jackson CE, Block MA, Feldman ZT, Reichlin S, Hamilton BP, Tashjian AH, Jr. 1982. Age-related probability of development of hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Pediatr* 101(6):941-6.
109. Gagel RF. MS. 2002. Multiple endocrine neoplasia. Philadelphia: WB Saunders.
110. Galle P, Pallares J, Dolcet X, Llobet D, Eritja N, Santacana M, Yeramian A, Palomar-Asenjo V, Lagarda H, Mauricio D and others. 2008. Nuclear factor-kappaB activation is associated with somatic and germ line RET mutations in medullary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 39(7):994-1001.
111. Gazdar AF, Shigematsu H, Herz J, Minna JD. 2004. Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heel' of lung cancers? *Trends Mol Med* 10(10):481-6.
112. Gilabert M, Audebert S, Viens P, Borg JP, Bertucci F, Goncalves A. 2010. [Proteomics and breast cancer: a search for novel diagnostic and theragnostic biomarkers]. *Bull Cancer* 97(3):321-39.
113. Glinsky GV, Higashiyama T, Glinskii AB. 2004. Classification of human breast cancer using gene expression profiling as a component of the survival predictor algorithm. *Clin Cancer Res* 10(7):2272-83.
114. Gorla L, Mondellini P, Cuccuru G, Micciche F, Cassinelli G, Cremona M, Pierotti MA, Lanzi C, Bongarzone I. 2009. Proteomics study of medullary thyroid carcinomas expressing RET germ-line mutations: identification of new signaling elements. *Mol Carcinog* 48(3):220-31.
115. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G. 1990. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60(4):557-63.
116. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6):883-99.
117. Grozinsky-Glasberg S, Rubinfeld H, Nordenberg Y, Gorshtein A, Praiss M, Kandler E, Feinmesser R, Grossman AB, Shimon I. 2010. The rapamycin-derivative RAD001 (everolimus) inhibits cell viability and interacts with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in human medullary thyroid carcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 315(1-2):87-94.
118. Guliana JM. CC. 1992. Calcitonine et peptides apparentés. Paris: Encycl Med Chir.
119. Gulmann C, Sheehan KM, Kay EW, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd. 2006. Array-based proteomics: mapping of protein circuitries for diagnostics, prognostics, and therapy guidance in cancer. *J Pathol* 208(5):595-606.
120. Guyetant S, Josselin N, Savagner F, Rohmer V, Michalak S, Saint-Andre JP. 2003. C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma: clinicopathological and genetic correlations in 66 consecutive patients. *Mod Pathol* 16(8):756-63.
121. Haab BB. 2003. Methods and applications of antibody microarrays in cancer research. *Proteomics* 3(11):2116-22.
122. Hadjadj S, Nunez S, Bohme P, Goulet Salmon B, Klein M, Weryha G, Leclere J. 1997. False elevated serum level of circulating calcitonin induced by omeprazole. *Presse Med* 26(38):1859.
123. Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
124. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-74.

125. Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O. 2011. Emerging molecular biomarkers--blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8(3):142-50.
126. Hanrahan EO, Lin HY, Kim ES, Yan S, Du DZ, McKee KS, Tran HT, Lee JJ, Ryan AJ, Langmuir P and others. 2010. Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28(2):193-201.
127. Hargis GK, Williams GA, Tenenhouse A, Arnaud CD. 1966. Thyrocalcitonin: cytological localization by immunofluorescence. *Science* 152(718):73-5.
128. Hazard JB. 1977. The C cells (parafollicular cells) of the thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. A review. *Am J Pathol* 88(1):213-50.
129. Hazard JB, Hawk WA, Crile G, Jr. 1959. Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab* 19(1):152-61.
130. Hedinger C. WED, Sobin L.H. 1988. Histological typing of thyroid tumors. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
131. Hennequin LF, Stokes ES, Thomas AP, Johnstone C, Ple PA, Ogilvie DJ, Dukes M, Wedge SR, Kendrew J, Curwen JO. 2002. Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 45(6):1300-12.
132. Hennequin LF, Thomas AP, Johnstone C, Stokes ES, Ple PA, Lohmann JJ, Ogilvie DJ, Dukes M, Wedge SR, Curwen JO and others. 1999. Design and structure-activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 42(26):5369-89.
133. Herbst RS, Heymach JV, O'Reilly MS, Onn A, Ryan AJ. 2007. Vandetanib (ZD6474): an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor that selectively targets pathways critical for tumor growth and angiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* 16(2):239-49.
134. Hillyard CJ, Coombes RC, Greenberg PB, Galante LS, MacIntyre I. 1976. Calcitonin in breast and lung cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* 5(1):1-8.
135. Hirsch PF, Voelkel EF, Munson PL. 1964. Thyrocalcitonin: Hypocalcemic Hypophosphatemic Principle of the Thyroid Gland. *Science* 146:412-3.
136. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, Pasini B, Hoppener JW, van Amstel HK, Romeo G and others. 1994. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 367(6461):375-6.
137. Holden SN, Eckhardt SG, Bassler R, de Boer R, Rischin D, Green M, Rosenthal MA, Wheeler C, Barge A, Hurwitz HI. 2005. Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF and EGF receptor signaling, in patients with solid, malignant tumors. *Ann Oncol* 16(8):1391-7.
138. Holland WS, Tepper CG, Pietri JE, Chinn DC, Gandara DR, Mack PC, Lara PN, Jr. 2011. Evaluating rational non-cross-resistant combination therapy in advanced clear cell renal cell carcinoma: combined mTOR and AKT inhibitor therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*.
139. Hopkins AL, Groom CR. 2002. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1(9):727-30.
140. Houk BE, Bello CL, Poland B, Rosen LS, Demetri GD, Motzer RJ. 2009. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 66(2):357-71.
141. Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, Kahnoski R, Futreal PA, Furge KA, Teh BT. 2010. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 70(3):1063-71.
142. Huang SC, Koch CA, Vortmeyer AO, Pack SD, Lichtenauer UD, Mannan P, Lubensky IA, Chrousos GP, Gagel RF, Pacak K and others. 2000. Duplication of the mutant RET allele in trisomy 10 or loss of the wild-type allele in multiple endocrine neoplasia type 2-associated pheochromocytomas. *Cancer Res* 60(22):6223-6.
143. Ikeda I, Ishizaka Y, Tahira T, Suzuki T, Onda M, Sugimura T, Nagao M. 1990. Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 5(9):1291-6.
144. Iwahashi N, Murakami H, Nimura Y, Takahashi M. 2002. Activation of RET tyrosine kinase regulates interleukin-8 production by multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 294(3):642-9.
145. Iwashita T, Asai N, Murakami H, Matsuyama M, Takahashi M. 1996. Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the ret proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. *Oncogene* 12(3):481-7.
146. Iwashita T, Kato M, Murakami H, Asai N, Ishiguro Y, Ito S, Iwata Y, Kawai K, Asai M, Kurokawa K and others. 1999. Biological and biochemical properties of Ret with kinase domain mutations identified in multiple endocrine neoplasia type 2B and familial medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 18(26):3919-22.
147. Iwashita T, Murakami H, Kurokawa K, Kawai K, Miyauchi A, Futami H, Qiao S, Ichihara M, Takahashi M. 2000. A two-hit model for development of multiple endocrine neoplasia type 2B by RET mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 268(3):804-8.



148. Jasim S, Ying AK, Waguespack SG, Rich TA, Grubbs EG, Jimenez C, Hu MI, Cote G, Habra MA. 2010. Multiple endocrine neoplasia type 2B with a RET proto-oncogene A883F mutation displays a more indolent form of medullary thyroid carcinoma compared with a RET M918T mutation. *Thyroid* 21(2):189-92.
149. Johanson V, Ahlman H, Bernhardt P, Jansson S, Kolby L, Persson F, Stenman G, Sward C, Wangberg B, Stridsberg M and others. 2007. A transplantable human medullary thyroid carcinoma as a model for RET tyrosine kinase-driven tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* 14(2):433-44.
150. Johnston D, Hatzis D, Sunday ME. 1998. Expression of v-Ha-ras driven by the calcitonin/calcitonin gene-related peptide promoter: a novel transgenic murine model for medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 16(2):167-77.
151. Jonas V, Lin CR, Kawashima E, Semon D, Swanson LW, Mermod JJ, Evans RM, Rosenfeld MG. 1985. Alternative RNA processing events in human calcitonin/calcitonin gene-related peptide gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(7):1994-8.
152. Joshi PP, Kulkarni MV, Yu BK, Smith KR, Norton DL, Veelen W, Hoppener JW, Franklin DS. 2007. Simultaneous downregulation of CDK inhibitors p18(Ink4c) and p27(Kip1) is required for MEN2A-RET-mediated mitogenesis. *Oncogene* 26(4):554-70.
153. Kaczirek K, Schindl M, Weinhausel A, Scheuba C, Passler C, Prager G, Raderer M, Hamilton G, Mittlbock M, Siegl V and others. 2004. Cytotoxic activity of camptothecin and paclitaxel in newly established continuous human medullary thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 89(5):2397-401.
154. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, Chan KW, Ciceri P, Davis MI, Edeen PT and others. 2008. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 26(1):127-32.
155. Kawai K, Iwashita T, Murakami H, Hiraiwa N, Yoshiki A, Kusakabe M, Ono K, Iida K, Nakayama A, Takahashi M. 2000. Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Cancer Res* 60(18):5254-60.
156. Kedzia C, Lacroix L, Ameur N, Ragot T, Kelly PA, Caillou B, Binart N. 2005. Medullary thyroid carcinoma arises in the absence of prolactin signaling. *Cancer Res* 65(18):8497-503.
157. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. 2010. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res* 106:91-111.
158. Kelland LR. 2004. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40(6):827-36.
159. Kelleher FC, McDermott R. 2008. Response to sunitinib in medullary thyroid cancer. *Ann Intern Med* 148(7):567.
160. Khakoo AY, Kassiotis CM, Tannir N, Plana JC, Halushka M, Bickford C, Trent J, 2nd, Champion JC, Durand JB, Lenihan DJ. 2008. Heart failure associated with sunitinib malate: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer* 112(11):2500-8.
161. Kim DW, Jo YS, Jung HS, Chung HK, Song JH, Park KC, Park SH, Hwang JH, Rha SY, Kweon GR and others. 2006a. An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/papillary thyroid cancer kinases. *J Clin Endocrinol Metab* 91(10):4070-6.
162. Kim S, Park YW, Schiff BA, Doan DD, Yazici Y, Jasser SA, Younes M, Mandal M, Bekele BN, Myers JN. 2005. An orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma in athymic nude mice. *Clin Cancer Res* 11(5):1713-21.
163. Kim S, Prichard CN, Younes MN, Yazici YD, Jasser SA, Bekele BN, Myers JN. 2006b. Cetuximab and irinotecan interact synergistically to inhibit the growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 12(2):600-7.
164. Kim S, Yazici YD, Calzada G, Wang ZY, Younes MN, Jasser SA, El-Naggar AK, Myers JN. 2007. Sorafenib inhibits the angiogenesis and growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Mol Cancer Ther* 6(6):1785-92.
165. Kiura K, Nakagawa K, Shinkai T, Eguchi K, Ohe Y, Yamamoto N, Tsuboi M, Yokota S, Seto T, Jiang H and others. 2008. A randomized, double-blind, phase IIa dose-finding study of Vandetanib (ZD6474) in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 3(4):386-93.
166. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, Moley JF, Pacini F, Ringel MD, Schlumberger M and others. 2009. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 19(6):565-612.
167. Knowles PP, Murray-Rust J, Kjaer S, Scott RP, Hanrahan S, Santoro M, Ibanez CF, McDonald NQ. 2006. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *J Biol Chem* 281(44):33577-87.
168. Knuth A. 1987. Markers in medullary thyroid cancer established in tissue culture (abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res*:28-83.
169. Kobawala TP, Patel GH, Gajjar DR, Patel KN, Thakor PB, Parekh UB, Patel KM, Shukla SN, Shah PM. 2011. Clinical utility of serum interleukin-8 and interferon-alpha in thyroid diseases. *J Thyroid Res* 2011:270149.

170. Koch CA, Brouwers FM, Vortmeyer AO, Tannapfel A, Libutti SK, Zhuang Z, Pacak K, Neumann HP, Paschke R. 2006. Somatic VHL gene alterations in MEN2-associated medullary thyroid carcinoma. *BMC Cancer* 6:131.
171. Koch CA, Huang SC, Moley JF, Azumi N, Chrousos GP, Gagel RF, Zhuang Z, Pacak K, Vortmeyer AO. 2001. Allelic imbalance of the mutant and wild-type RET allele in MEN 2A-associated medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 20(53):7809-11.
172. Koga K, Hattori Y, Komori M, Narishima R, Yamasaki M, Hakoshima M, Fukui T, Maitani Y. 2010. Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts via apoptosis. *Cancer Sci* 101(4):941-7.
173. Koperek O, Prinz A, Scheuba C, Niederle B, Kaserer K. 2009. Tenascin C in medullary thyroid microcarcinoma and C-cell hyperplasia. *Virchows Arch* 455(1):43-8.
174. Kraeber-Bodere F, Bodet-Milin C, Niaudet C, Sai-Maurel C, Moreau A, Faivre-Chauvet A, Thomare P, Deleris G, Estieu-Gionnet K, Bikfalvi A and others. 2010. Comparative toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy in carcinoembryonic antigen-expressing medullary thyroid cancer xenograft. *J Nucl Med* 51(4):624-31.
175. Kraeber-Bodere F, Sai-Maurel C, Campion L, Faivre-Chauvet A, Mirallie E, Cherel M, Supiot S, Barbet J, Chatal JF, Thedrez P. 2002. Enhanced antitumor activity of combined pretargeted radioimmunotherapy and paclitaxel in medullary thyroid cancer xenograft. *Mol Cancer Ther* 1(4):267-74.
176. Krasagakis K, Tholke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. 1998. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 77(9):1492-4.
177. Krix M, Kiessling F, Vosseler S, Farhan N, Mueller MM, Bohlen P, Fusenig NE, Delorme S. 2003. Sensitive noninvasive monitoring of tumor perfusion during antiangiogenic therapy by intermittent bolus-contrast power Doppler sonography. *Cancer Res* 63(23):8264-70.
178. Kulasingam V, Diamandis EP. 2008. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 5(10):588-99.
179. Kunnimalaiyaan M, Ndiaye M, Chen H. 2006. Apoptosis-mediated medullary thyroid cancer growth suppression by the PI3K inhibitor LY294002. *Surgery* 140(6):1009-14; discussion 1014-5.
180. Kurzrock R, Sherman SI, Ball DW, Forastiere AA, Cohen RB, Mehra R, Pfister DG, Cohen EE, Janisch L, Nauling F and others. 2011. Activity of XL184 (Cabozantinib), an Oral Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Medullary Thyroid Cancer. *J Clin Oncol*.
181. Lassau N, Brule A, Chami L, Benatsou B, Peronneau P, Roche A. 2008. Evaluation of early response to antiangiogenic treatment with dynamic contrast enhanced ultrasound. *J Radiol* 89(5 Pt 1):549-55.
182. Lassau N, Chami L, Chebil M, Benatsou B, Bidault S, Girard E, Abboud G, Roche A. 2011a. Dynamic contrast-enhanced ultrasonography (DCE-US) and anti-angiogenic treatments. *Discov Med* 11(56):18-24.
183. Lassau N, Koscielny S, Chami L, Chebil M, Benatsou B, Roche A, Ducreux M, Malka D, Boige V. 2011b. Advanced hepatocellular carcinoma: early evaluation of response to bevacizumab therapy at dynamic contrast-enhanced US with quantification--preliminary results. *Radiology* 258(1):291-300.
184. Laure Giraudet A, Al Ghulzan A, Auperin A, Leboulleux S, Chehboun A, Troalen F, Dromain C, Lumbroso J, Baudin E, Schlumberger M. 2008. Progression of medullary thyroid carcinoma: assessment with calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times. *Eur J Endocrinol* 158(2):239-46.
185. Lausson S, Fournes B, Borrel C, Milhaud G, Treilhou-Lahille F. 1996. Immune response against medullary thyroid carcinoma (MTC) induced by parental and/or interleukin-2-secreting MTC cells in a rat model of human familial medullary thyroid carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 43(2):116-23.
186. Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. 2004. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61(3):299-310.
187. Leboulleux S, Baudin E, Young J, Caillou B, Lazar V, Pellegriti G, Ducreux M, Schaison G, Schlumberger M. 1999. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor metastases to the thyroid gland: differential diagnosis with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 140(3):187-91.
188. Leboulleux S, Travagli JP, Caillou B, Laplanche A, Bidart JM, Schlumberger M, Baudin E. 2002. Medullary thyroid carcinoma as part of a multiple endocrine neoplasia type 2B syndrome: influence of the stage on the clinical course. *Cancer* 94(1):44-50.
189. Leclère J. OJ, Rousset B., Schienger J.L., Wémeau J.L., 2001. *La thyroïde*. Amsterdam: Elsevier.
190. Lee Y, Jung HS, Choi HJ, Kim MJ, Kim TM, Park KS, Kim SY. 2011. Life-threatening hypoglycemia induced by a tyrosine kinase inhibitor in a patient with neuroendocrine tumor: A case report. *Diabetes Res Clin Pract*.
191. Leong SS. 1981. *Advances in thyroid neoplasia*. Rome: Field educational.
192. Li QQ, Chen ZQ, Cao XX, Xu JD, Xu JW, Chen YY, Wang WJ, Chen Q, Tang F, Liu XP and others. 2011. Involvement of NF-kappaB/miR-448 regulatory feedback loop in chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Cell Death Differ* 18(1):16-25.

193. Lissak B, Baudin E, Cohen R, Barbot N, Meyrier A, Niccoli P, Bouyge N, Modigliani E. 1998. Pentagastrin testing in patients with renal insufficiency: normal responsiveness of mature calcitonin. *Thyroid* 8(3):265-8.
194. LiVolsi VA, Feind CR, LoGerfo P, Tashjian AH, Jr. 1973. Demonstration by immunoperoxidase staining of hyperplasia of parafollicular cells in the thyroid gland in hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 37(4):550-9.
195. Ludwig JA, Weinstein JN. 2005. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 5(11):845-56.
196. Malamitsi J, Kosmidis PA, Papadopoulos S, Petounis A, Linos DA. 2002. Contribution of an Anti-CEA Fab' scan in the detection of medullary thyroid cancer. *Clin Nucl Med* 27(6):447-8.
197. Mannavola D, Coco P, Vannucchi G, Bertuelli R, Carletto M, Casali PG, Beck-Peccoz P, Fugazzola L. 2007. A novel tyrosine-kinase selective inhibitor, sunitinib, induces transient hypothyroidism by blocking iodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 92(9):3531-4.
198. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298(5600):1912-34.
199. Marsh DJ, Theodosopoulos G, Martin-Schulte K, Richardson AL, Philips J, Roher HD, Delbridge L, Robinson BG. 2003. Genome-wide copy number imbalances identified in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88(4):1866-72.
200. Martin P, Oliver S, Robertson J, Kennedy SJ, Read J, Duvouchelle T. 2011. Pharmacokinetic Drug Interactions with Vandetanib during Coadministration with Rifampicin or Itraconazole. *Drugs R D* 11(1):37-51.
201. Maschler S, Grunert S, Danielopol A, Beug H, Wirl G. 2004. Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF-beta-induced progression of mammary tumor cells. *Oncogene* 23(20):3622-33.
202. Massart C, Gibassier J, Lucas C, Pourquier P, Robert J. 1996. [Expression of the MDR1 gene in five human cell lines of medullary thyroid cancer and reversion of the resistance to doxorubicine by ciclosporin A and verapamil]. *Bull Cancer* 83(1):39-45.
203. Mathew CG, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Liou GI, Fong SL, Bridges CD, Haak H, Kruseman AC and others. 1987a. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature* 328(6130):527-8.
204. Mathew CG, Smith BA, Thorpe K, Wong Z, Royle NJ, Jeffreys AJ, Ponder BA. 1987b. Deletion of genes on chromosome 1 in endocrine neoplasia. *Nature* 328(6130):524-6.
205. Matsui J, Yamamoto Y, Funahashi Y, Tsuruoka A, Watanabe T, Wakabayashi T, Uenaka T, Asada M. 2008. E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. *Int J Cancer* 122(3):664-71.
206. Matuszczyk A, Petersenn S, Voigt W, Kegel T, Dralle H, Schmoll HJ, Bockisch A, Mann K. 2010. Chemotherapy with paclitaxel and gemcitabine in progressive medullary and thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Horm Metab Res* 42(1):61-4.
207. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. 2005. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Nat Clin Pract Oncol* 2(8):416-22.
208. Mehlen P, Bredesen DE. 2000. [Dependence receptors: links between apoptosis, nervous system development and control of tumorigenesis]. *Bull Cancer* 87(7-8):537-41.
209. Mellor HR, Bell AR, Valentin JP, Roberts RR. 2011. Cardiotoxicity associated with targeting kinase pathways in cancer. *Toxicol Sci* 120(1):14-32.
210. Melvin KE, Tashjian AH, Jr. 1968. The syndrome of excessive thyrocalcitonin produced by medullary carcinoma of the thyroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59(4):1216-22.
211. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB and others. 2003. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 9(1):327-37.
212. Mendelsohn G, Wells SA, Jr., Baylin SB. 1984. Relationship of tissue carcinoembryonic antigen and calcitonin to tumor virulence in medullary thyroid carcinoma. An immunohistochemical study in early, localized, and virulent disseminated stages of disease. *Cancer* 54(4):657-62.
213. Mendelsohn J. 2008. Molecular basis of cancer. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
214. Merritt WM, Lin YG, Spannuth WA, Fletcher MS, Kamat AA, Han LY, Landen CN, Jennings N, De Geest K, Langley RR and others. 2008. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. *J Natl Cancer Inst* 100(5):359-72.
215. Messina M, Yu DM, Both GW, Molloy PL, Robinson BG. 2003. Calcitonin-specific transcription and splicing targets gene-directed enzyme prodrug therapy to medullary thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88(3):1310-8.
216. Meyer JS. 1968. Fine structure of two amyloid-forming medullary carcinomas of thyroid. *Cancer* 21(3):406-25.

217. Meyer JS, Abdel-Bari W. 1968. Granules and thyrocalcitonin-like activity in medullary carcinoma of the thyroid gland. *N Engl J Med* 278(10):523-9.
218. Michiels FM, Chappuis S, Caillou B, Pasini A, Talbot M, Monier R, Lenoir GM, Feunteun J, Billaud M. 1997. Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7):3330-5.
219. Mitsiades CS, McMillin D, Kotoula V, Poulaki V, McMullan C, Negri J, Fanourakis G, Tseleni-Balafouta S, Ain KB, Mitsiades N. 2006. Antitumor effects of the proteasome inhibitor bortezomib in medullary and anaplastic thyroid carcinoma cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 91(10):4013-21.
220. Miura M, Takahashi N, Sawada K. 2011. Quantitative determination of imatinib in human plasma with high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *J Chromatogr Sci* 49(5):412-5.
221. Modigliani E, Cohen R, Joannidis S, Siame-Mouro C, Guliana JM, Charpentier G, Cassuto D, Bentata Pessayre M, Tabarin A, Roger P and others. 1992. Results of long-term continuous subcutaneous octreotide administration in 14 patients with medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 36(2):183-6.
222. Morimoto AM, Tan N, West K, McArthur G, Toner GC, Manning WC, Smolich BD, Cherrington JM. 2004. Gene expression profiling of human colon xenograft tumors following treatment with SU11248, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Oncogene* 23(8):1618-26.
223. Morisi R, Celano M, Tosi E, Schenone S, Navarra M, Ferretti E, Costante G, Durante C, Botta G, D'Agostino M and others. 2007. Growth inhibition of medullary thyroid carcinoma cells by pyrazolo-pyrimidine derivatives. *J Endocrinol Invest* 30(10):RC31-4.
224. Motte P, Vauzelle P, Gardet P, Ghillani P, Caillou B, Parmentier C, Bohuon C, Bellet D. 1988. Construction and clinical validation of a sensitive and specific assay for serum mature calcitonin using monoclonal anti-peptide antibodies. *Clin Chim Acta* 174(1):35-54.
225. Motzer RJ, Bukowski RM. 2006. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24(35):5601-8.
226. Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V. 2011. High Prevalence of RAS Mutations in RET-Negative Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96(5):E863-8.
227. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L and others. 1993. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363(6428):458-60.
228. Natale RB, Thongprasert S, Greco FA, Thomas M, Tsai CM, Sunpaweravong P, Ferry D, Mulatero C, Whorf R, Thompson J and others. 2011. Phase III trial of vandetanib compared with erlotinib in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 29(8):1059-66.
229. Netea-Maier RT, Aben KK, Casparie MK, den Heijer M, Grefte JM, Slootweg P, Hermus A. 2008. Trends in incidence and mortality of thyroid carcinoma in The Netherlands between 1989 and 2003: correlation with thyroid fine-needle aspiration cytology and thyroid surgery. *Int J Cancer* 123(7):1681-4.
230. Niccoli-Sire P, Conte-Devolx B. 2007. Medullary thyroid carcinoma. *Ann Endocrinol (Paris)* 68(5):325-31.
231. Niccoli P, Brunet P, Roubicek C, Roux F, Baudin E, Lejeune PJ, Berland Y, Conte-Devolx B. 1995. Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *Eur J Endocrinol* 132(1):75-81.
232. Ning L, Jaskula-Sztul R, Kunnimalaiyaan M, Chen H. 2008. Suberoyl bishydroxamic acid activates notch1 signaling and suppresses tumor progression in an animal model of medullary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol* 15(9):2600-5.
233. Nishizuka S, Charboneau L, Young L, Major S, Reinhold WC, Waltham M, Kouros-Mehr H, Bussey KJ, Lee JK, Espina V and others. 2003. Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24):14229-34.
234. Nocera M, Baudin E, Pellegriti G, Cailleux AF, Mechelany-Corone C, Schlumberger M. 2000. Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. *Groupe d'Etude des Tumeurs a Calcitonine (GETC)*. *Br J Cancer* 83(6):715-8.
235. Nonidez J. 1932. The origin of the "parafollicular" cell, a second epithelial component of the thyroid gland of the dog. *Am J Anat* 49:479-505.
236. Pacifico F, Leonardi A. 2010. Role of NF-kappaB in thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 321(1):29-35.
237. Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Schlumberger M. 2010. Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22(6):475-85.
238. Parikh K, Peppelenbosch MP. 2010. Kinome profiling of clinical cancer specimens. *Cancer Res* 70(7):2575-8.
239. Pawletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin IE, Liotta LA. 2001. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 20(16):1981-9.
240. Pearse AG. 1966. The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 164(996):478-87.
241. Pearse AG. 1969. The calcitonin secreting C cells and their relationship to the APUD cell series. *J Endocrinol* 45(1):Suppl:13-4.

242. Pearse AG, Carvalheira AF. 1967. Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. *Nature* 214(5091):929-30.
243. Pellegriti G, Leboulleux S, Baudin E, Bellon N, Scollo C, Travagli JP, Schlumberger M. 2003. Long-term outcome of medullary thyroid carcinoma in patients with normal postoperative medical imaging. *Br J Cancer* 88(10):1537-42.
244. Pepe MS, Feng Z, Janes H, Bossuyt PM, Potter JD. 2008. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J Natl Cancer Inst* 100(20):1432-8.
245. Perot S, Sperandio O, Miteva MA, Camproux AC, Villoutreix BO. 2010. Druggable pockets and binding site centric chemical space: a paradigm shift in drug discovery. *Drug Discov Today* 15(15-16):656-67.
246. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA and others. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-52.
247. Petrangolini G, Cuccuru G, Lanzi C, Tortoreto M, Belluco S, Pratesi G, Cassinelli G, Zunino F. 2006. Apoptotic cell death induction and angiogenesis inhibition in large established medullary thyroid carcinoma xenografts by Ret inhibitor RPI-1. *Biochem Pharmacol* 72(4):405-14.
248. Pfragner R, Hofler H, Behmel A, Ingolic E, Walser V. 1990. Establishment and characterization of continuous cell line MTC-SK derived from a human medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 50(13):4160-6.
249. Pitt SC, Chen H. 2008. The phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway in medullary thyroid cancer. *Surgery* 144(5):721-4.
250. Polverino A, Coxon A, Starnes C, Diaz Z, DeMelfi T, Wang L, Bready J, Estrada J, Cattley R, Kaufman S and others. 2006. AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts. *Cancer Res* 66(17):8715-21.
251. Ponder BAJ. 1995. *Medullary carcinoma of the thyroid*. Oxford: Oxford University Press.
252. Prior JO, Montemurro M, Orcurto MV, Michielin O, Luthi F, Benhattar J, Guillou L, Elsig V, Stupp R, Delaloye AB and others. 2009. Early prediction of response to sunitinib after imatinib failure by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 27(3):439-45.
253. Rapa I, Saggiolato E, Giachino D, Palestini N, Orlandi F, Papotti M, Volante M. 2011. Mammalian Target of Rapamycin Pathway Activation Is Associated to RET Mutation Status in Medullary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*.
254. Ravaud A, de la Fouchardiere C, Asselineau J, Delord JP, Do Cao C, Niccoli P, Rodien P, Klein M, Catargi B. 2010. Efficacy of sunitinib in advanced medullary thyroid carcinoma: intermediate results of phase II THYSU. *Oncologist* 15(2):212-3; author reply 214.
255. Read RD, Goodfellow PJ, Mardis ER, Novak N, Armstrong JR, Cagan RL. 2005. A *Drosophila* model of multiple endocrine neoplasia type 2. *Genetics* 171(3):1057-81.
256. Reynolds L, Jones K, Winton DJ, Cranston A, Houghton C, Howard L, Ponder BA, Smith DP. 2001. C-cell and thyroid epithelial tumours and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. *Oncogene* 20(30):3986-94.
257. Richards ML. 2010. Familial syndromes associated with thyroid cancer in the era of personalized medicine. *Thyroid* 20(7):707-13.
258. Rini BI, Tamaskar I, Shaheen P, Salas R, Garcia J, Wood L, Reddy S, Dreicer R, Bukowski RM. 2007. Hypothyroidism in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst* 99(1):81-3.
259. Robinson BG, Paz-Ares L, Krebs A, Vasselli J, Haddad R. 2010. Vandetanib (100 mg) in patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 95(6):2664-71.
260. Rodriguez-Antona C, Pallares J, Montero-Conde C, Inglada-Perez L, Castelblanco E, Landa I, Leskela S, Leandro-Garcia LJ, Lopez-Jimenez E, Leton R and others. 2010. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr Relat Cancer* 17(1):7-16.
261. Roman S, Lin R, Sosa JA. 2006. Prognosis of medullary thyroid carcinoma: demographic, clinical, and pathologic predictors of survival in 1252 cases. *Cancer* 107(9):2134-42.
262. Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, Pasini B, Boccardi R, Lerone M, Kaariainen H and others. 1994. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367(6461):377-8.
263. Rosai J. CML, De Lellis R.A. . 1992. *Tumors of the thyroid gland*. Washington, DC: Forces Institute of Pathology.
264. Rosenfeld MG, Amara SG, Evans RM. 1984. Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. *Science* 225(4668):1315-20.
265. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM. 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304(5922):129-35.

266. Rossel M, Pasini A, Chappuis S, Geneste O, Fournier L, Schuffenecker I, Takahashi M, van Grunsven LA, Urdiales JL, Rudkin BB and others. 1997. Distinct biological properties of two RET isoforms activated by MEN 2A and MEN 2B mutations. *Oncogene* 14(3):265-75.
267. Ryan AJ, Wedge SR. 2005. ZD6474--a novel inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity. *Br J Cancer* 92 Suppl 1:S6-13.
268. Salaun PY, Bodet-Milin C, Frampas E, Oudoux A, Sai-Maurel C, Faivre-Chauvet A, Barbet J, Paris F, Kraeber-Bodere F. 2010. Toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and bevacizumab in a mouse model of medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 116(4 Suppl):1053-8.
269. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, Fusco A, Vecchio G, Matoskova B, Kraus MH and others. 1995. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 267(5196):381-3.
270. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A. 2004. Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145(12):5448-51.
271. Santoro M, Rosati R, Grieco M, Berlingieri MT, D'Amato GL, de Franciscis V, Fusco A. 1990. The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 5(10):1595-8.
272. Sarkar S, Mazumdar A, Dash R, Sarkar D, Fisher PB, Mandal M. 2010. ZD6474, a dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR-2, inhibits MAPK/ERK and AKT/PI3-K and induces apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 9(8):592-603.
273. Satelli A, Li S. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*.
274. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270(5235):467-70.
275. Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2):211-25.
276. Schlumberger M, Carlomagno F, Baudin E, Bidart JM, Santoro M. 2008. New therapeutic approaches to treat medullary thyroid carcinoma. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4(1):22-32.
277. Schlumberger M. PF. 2003. *Thyroid Tumors*. Paris: Nucléon.
278. Schneider T, Sailer M, Ansorge S, Firsching R, Reinhold D. 2006. Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma. *J Neurooncol* 79(1):61-5.
279. Schott M. 2006. Immunesurveillance by dendritic cells: potential implication for immunotherapy of endocrine cancers. *Endocr Relat Cancer* 13(3):779-95.
280. Schulz N, Propst F, Rosenberg MP, Linnoila RI, Paules RS, Kovatch R, Ogiso Y, Vande Woude G. 1992. Pheochromocytomas and C-cell thyroid neoplasms in transgenic c-mos mice: a model for the human multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Cancer Res* 52(2):450-5.
281. Sebolt-Leopold JS, English JM. 2006. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature* 441(7092):457-62.
282. Segouffin-Cariou C, Billaud M. 2000. Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem* 275(5):3568-76.
283. Sharkey RM, Hajjar G, Yeldell D, Brenner A, Burton J, Rubin A, Goldenberg DM. 2005. A phase I trial combining high-dose 90Y-labeled humanized anti-CEA monoclonal antibody with doxorubicin and peripheral blood stem cell rescue in advanced medullary thyroid cancer. *J Nucl Med* 46(4):620-33.
284. Sharma S, Dubey NK, Dasgupta AK, Sahu M, Benjamin B, Mullangi R, Srinivas NR. 2011. Highly sensitive method for the determination of JI-101, a multi-kinase inhibitor in human plasma and urine by LC-MS/MS-ESI: method validation and application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*.
285. Sherman SI. 2010. Targeted therapy of thyroid cancer. *Biochem Pharmacol* 80(5):592-601.
286. Shimaoka K, Schoenfeld DA, DeWys WD, Creech RH, DeConti R. 1985. A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma. *Cancer* 56(9):2155-60.
287. Smith-Hicks CL, Sizer KC, Powers JF, Tischler AS, Costantini F. 2000. C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Embo J* 19(4):612-22.
288. Sobin L.H. 2009. *Classification of malignant tumours (TNM)*. Oxford: Wiley-Blackwell.
289. Sparidans RW, Iusuf D, Schinkel AH, Schellens JH, Beijnen JH. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the light sensitive tyrosine kinase inhibitor axitinib in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(32):4090-6.
290. Sparmann A, Bar-Sagi D. 2005. Ras oncogene and inflammation: partners in crime. *Cell Cycle* 4(6):735-6.
291. Steenbergh PH, Hoppener JW, Zandberg J, Van de Ven WJ, Jansz HS, Lips CJ. 1984. Calcitonin gene related peptide coding sequence is conserved in the human genome and is expressed in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 59(2):358-60.
292. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260(5547):170-3.

293. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, Stegh AH, Bradner JE, Ligon KL, Brennan C and others. 2007. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 318(5848):287-90.
294. Strock CJ, Park JI, Rosen DM, Ruggeri B, Denmeade SR, Ball DW, Nelkin BD. 2006. Activity of irinotecan and the tyrosine kinase inhibitor CEP-751 in medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 91(1):79-84.
295. Strock CJ, Park JI, Rosen M, Dionne C, Ruggeri B, Jones-Bolin S, Denmeade SR, Ball DW, Nelkin BD. 2003. CEP-701 and CEP-751 inhibit constitutively activated RET tyrosine kinase activity and block medullary thyroid carcinoma cell growth. *Cancer Res* 63(17):5559-63.
296. Sun L, Liang C, Shirazian S, Zhou Y, Miller T, Cui J, Fukuda JY, Chu JY, Nematalla A, Wang X and others. 2003. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 46(7):1116-9.
297. Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, Yae T, Suzuki Y, Shinoda T, Nakamura S, Niwa S, Ikeda S, Koga H and others. 2010. Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. *J Biol Chem* 285(6):4060-73.
298. Takahashi M. 2001. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12(4):361-73.
299. Takahashi M, Buma Y, Taniguchi M. 1991. Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene* 6(2):297-301.
300. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. 1985. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 42(2):581-8.
301. Takahashi N, Miura M. 2011. Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia Patients in the Chronic Phase. *Pharmacology* 87(5-6):241-248.
302. Tamburrino A. Activation of the mTOR pathway in primary medullary thyroid carcinoma and lymph node metastases; 2011; Chicago. Abstract n°10598.
303. Tamura T, Minami H, Yamada Y, Yamamoto N, Shimoyama T, Murakami H, Horiike A, Fujisaka Y, Shinkai T, Tahara M and others. 2006. A phase I dose-escalation study of ZD6474 in Japanese patients with solid, malignant tumors. *J Thorac Oncol* 1(9):1002-9.
304. Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Potz O, Kramer S, Joos TO. 2003. Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* 3(11):2155-66.
305. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC and others. 2000. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92(3):205-16.
306. Thijssen JM, de Korte CL. 2005. Modeling ultrasound contrast measurement of blood flow and perfusion in biological tissue. *Ultrasound Med Biol* 31(2):279-85.
307. Tokuda Y, Ohta M, Suzuki Y, Kubota M, Tajima T. 2001. Clinical development of trastuzumab in breast cancer. *Breast Cancer* 8(2):93-7.
308. Tomoda C, Moatamed F, Naeim F, Hershman JM, Sugawara M. 2008. Indomethacin inhibits cell growth of medullary thyroid carcinoma by reducing cell cycle progression into S phase. *Exp Biol Med (Maywood)* 233(11):1433-40.
309. Torino F, Corsello SM, Longo R, Barnabei A, Gasparini G. 2009. Hypothyroidism related to tyrosine kinase inhibitors: an emerging toxic effect of targeted therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 6(4):219-28.
310. Tubiana M, Milhaud G, Coutris G, Lacour J, Parmentier C, Bok B. 1968. Medullary carcinoma and thyrocalcitonin. *Br Med J* 4(5623):87-9.
311. Ugolini P, Delouche A, Herment A, Diebold B. 2000. In vitro flow quantification with contrast power Doppler imaging. *Ultrasound Med Biol* 26(1):113-20.
312. van Veelen W, de Groot JW, Acton DS, Hofstra RM, Hoppener JW, Links TP, Lips CJ. 2009. Medullary thyroid carcinoma and biomarkers: past, present and future. *J Intern Med* 266(1):126-40.
313. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A and others. 2007. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(8):2803-8.
314. Veeraraghavan J, Natarajan M, Aravindan S, Herman TS, Aravindan N. 2011. Radiation-triggered Tumor Necrosis Factor (TNF) {alpha}-NF{kappa}B Cross-signaling Favors Survival Advantage in Human Neuroblastoma Cells. *J Biol Chem* 286(24):21588-600.
315. Verbeek HH, Alves MM, de Groot JW, Osinga J, Plukker JT, Links TP, Hofstra RM. 2011. The effects of four different tyrosine kinase inhibitors on medullary and papillary thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 96(6):E991-5.

316. Vidal M, Wells S, Ryan A, Cagan R. 2005. ZD6474 suppresses oncogenic RET isoforms in a Drosophila model for type 2 multiple endocrine neoplasia syndromes and papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 65(9):3538-41.
317. Vignot S. 2008. *Thérapies moléculaires ciblées : de la biologie aux applications cliniques*. Montrouge: J. Libbey Eurotext.
318. Vitagliano D, De Falco V, Tamburrino A, Coluzzi S, Troncone G, Chiappetta G, Ciardiello F, Tortora G, Fagin JA, Ryan AJ and others. 2010. The tyrosine kinase inhibitor ZD6474 blocks proliferation of RET mutant medullary thyroid carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* 18(1):1-11.
319. Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10(8):789-99.
320. Voshol H, Ehrat M, Traenkle J, Bertrand E, van Oostrum J. 2009. Antibody-based proteomics: analysis of signaling networks using reverse protein arrays. *Febs J* 276(23):6871-9.
321. Vriens MR, Suh I, Moses W, Kebebew E. 2009. Clinical features and genetic predisposition to hereditary nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* 19(12):1343-9.
322. Walter MA, Benz MR, Hildebrandt IJ, Laing RE, Hartung V, Damoiseaux RD, Bockisch A, Phelps ME, Czernin J, Weber WA. 2011. Metabolic imaging allows early prediction of response to vandetanib. *J Nucl Med* 52(2):231-40.
323. Walter MA, Meier C, Radimerski T, Iten F, Kranzlin M, Muller-Brand J, de Groot JW, Kema IP, Links TP, Muller B. 2010. Procalcitonin levels predict clinical course and progression-free survival in patients with medullary thyroid cancer. *Cancer* 116(1):31-40.
324. Walther Z, Sklar J. 2011. Molecular tumor profiling for prediction of response to anticancer therapies. *Cancer J* 17(2):71-9.
325. Wang H, Huang M, Zhang DY, Zhang F. 2011. *Global Profiling of Signaling Networks: Study of Breast Cancer Stem Cells and Potential Regulation*. Oncologist.
326. Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL and others. 2002. ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62(16):4645-55.
327. Weil A, Martin P, Smith R, Oliver S, Langmuir P, Read J, Molz KH. 2010. Pharmacokinetics of vandetanib in subjects with renal or hepatic impairment. *Clin Pharmacokinet* 49(9):607-18.
328. Weinstein IB. 2002. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297(5578):63-4.
329. Weinstein IB, Joe AK. 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3(8):448-57.
330. Wells SA, Jr., Gosnell JE, Gagel RF, Moley J, Pfister D, Sosa JA, Skinner M, Krebs A, Vasselli J, Schlumberger M. 2010. Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 28(5):767-72.
331. Wells SA, Jr., Haagensen DE, Jr., Linehan WM, Farrell RE, Dilley WG. 1978. The detection of elevated plasma levels of carcinoembryonic antigen in patients with suspected or established medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 42(3 Suppl):1498-503.
332. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5(10):835-44.
333. Williams ED. 1966. Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Pathol* 19(2):114-8.
334. Wolfe HJ, Melvin KE, Cervi-Skinner SJ, Saadi AA, Juliar JF, Jackson CE, Tashjian AH, Jr. 1973. C-cell hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 289(9):437-41.
335. Wolter P, Dumez H, Schoffski P. 2007. Sunitinib and hypothyroidism. *N Engl J Med* 356(15):1580; author reply 1580-1.
336. Wong E, Rosen LS, Mulay M, Vanvugt A, Dinolfo M, Tomoda C, Sugawara M, Hershman JM. 2007. Sunitinib induces hypothyroidism in advanced cancer patients and may inhibit thyroid peroxidase activity. *Thyroid* 17(4):351-5.
337. Wu LT, Averbuch SD, Ball DW, de Bustros A, Baylin SB, McGuire WP, 3rd. 1994. Treatment of advanced medullary thyroid carcinoma with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine. *Cancer* 73(2):432-6.
338. Wulfskuhle JD, Edmiston KH, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd. 2006. Technology insight: pharmacoproteomics for cancer--promises of patient-tailored medicine using protein microarrays. *Nat Clin Pract Oncol* 3(5):256-68.
339. Yalcin M, Dyskin E, Lansing L, Bharali DJ, Mousa SS, Bridoux A, Hercbergs AH, Lin HY, Davis FB, Glinsky GV and others. 2010. Tetraiodothyroacetic acid (tetrac) and nanoparticulate tetrac arrest growth of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 95(4):1972-80.
340. Ye L, Santarpia L, Cote GJ, El-Naggar AK, Gagel RF. 2008. High resolution array-comparative genomic hybridization profiling reveals deoxyribonucleic acid copy number alterations associated with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11):4367-72.



341. Zhang L, Li S, Zhang Y, Zhan J, Zou BY, Smith R, Martin PD, Jiang Y, Liao H, Guan Z. 2011. Pharmacokinetics and tolerability of vandetanib in chinese patients with solid, malignant tumors: an open-label, phase I, rising multiple-dose study. *Clin Ther* 33(3):315-27.
342. Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA, Sindhvani V, Blazzkowsky LS, Yoon SS, Lahdenranta J and others. 2009. Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 27(18):3027-35.
343. Zhu W, Hai T, Ye L, Cote GJ. 2010. Medullary thyroid carcinoma cell lines contain a self-renewing CD133+ population that is dependent on ret proto-oncogene activity. *J Clin Endocrinol Metab* 95(1):439-44.

« En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche. »

**Jacques Rouxel.**

## RESUME

---

Le cancer médullaire de la thyroïde (CMT), qui représente 5 à 8% des cancers de la thyroïde, est issu de la transformation maligne des cellules C du parenchyme thyroïdien. Ce cancer, sporadique dans 70 à 80% des cas et familial pour les 20 à 30% restants, est essentiellement lié à des anomalies du proto-oncogène *RET*, codant un récepteur à activité tyrosine kinase. La fréquence élevée des mutations activatrices de *RET* ont permis d'identifier ce récepteur comme une cible thérapeutique majeure. Si la chirurgie est le traitement de référence pour les formes localisées, les formes localement avancées ou métastatiques, de pronostic plus péjoratif étaient avant le développement des thérapies moléculaires ciblées, dans une impasse thérapeutique. La meilleure compréhension de la biologie des tumeurs a permis le développement de ces thérapies plus rationnelles et plus spécifiques, en particulier des inhibiteurs d'activité tyrosine kinase (ITK). L'optimisation de leur utilisation en clinique nécessite de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été à la fois cognitifs et cliniques, visant à améliorer la compréhension de la réponse moléculaire à deux ITKs, le sunitinib et la vandetanib, dans le CMT, et à identifier de nouveaux biomarqueurs de suivi thérapeutique. Dans un premier temps, nous avons montré les effets antiprolifératifs, antitumoraux et antiangiogéniques du sunitinib et du vandetanib dans un modèle de CMT muté *RET*<sup>C634W</sup>, mettant en évidence des profils d'activité proches entre les deux inhibiteurs. Puis, les principales voies de signalisation mises en jeu lors de la réponse à ces ITKs ont été explorées par Reverse-Phase Protein Array (RPPA). Par une approche transcriptomique haut-débit menée sur des modèles précliniques, les principales fonctions cellulaires impliquées dans la réponse au sunitinib et au vandetanib ont été identifiées. Le rôle de gènes participant à l'invasion tissulaire et au pouvoir métastatique a été mis en évidence. De nouveaux biomarqueurs potentiels de réponse au vandetanib et au sunitinib, tels que l'IL-8 et le TGF-β2 dont les taux sériques sont significativement plus élevés chez les patients atteints de CMT, ont été identifiés. Enfin, l'intérêt de trois approches méthodologiques dans le suivi de la réponse antitumorale chez les patients a été évalué. Ainsi, le développement d'une méthode de dosage du vandetanib par spectrométrie de masse a permis de suggérer un lien entre des taux sériques élevés et l'apparition de toxicités sévères. L'évaluation de biomarqueurs dans le sérum de patients traités par le vandetanib a souligné l'intérêt de l'IL-8 comme marqueur pronostic potentiel dans cette pathologie. Enfin les résultats préliminaires, évaluant la réponse au sunitinib par échographie doppler sur un modèle préclinique de souris xénotransplantées, ont confirmé l'intérêt de l'imagerie fonctionnelle dans ce domaine.

**Mots clés :** Cancer médullaire de la thyroïde ; Inhibiteurs d'activité kinase ; Sunitinib ; Vandetanib ; Puces à ADN ; RPPA ; Biomarqueur ; Réponse thérapeutique.

*Frais de reprographie pris en charge par la taxe d'apprentissage collectée par l'Institut Gustave Roussy.*