

# Thèse de Doctorat

Bénédicte ROUSSEAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Cancérologie Préclinique  
Spécialité : Cancérologie Moléculaire  
Unité de recherche : EA 1155 - IICIMED

**TP53 facteur de transcription pour le gène  
NEDD9/HEF1/Cas-L : nouvelles cibles  
potentielles dans le traitement du Cancer du  
Poumon « Non à Petites Cellules »**

## Remerciements

Il existe une relation particulièrement importante pour moi dans le domaine de l'apprentissage scolaire et universitaire des plus petites classes aux études supérieures : la rencontre entre un professeur et son élève. Ces personnes que j'ai pu croiser tout le long de ma scolarité et dont je n'oublierai jamais le nom. Ceux qui, chacun à leur manière, m'ont aiguillé tout au long du chemin qui s'achève aujourd'hui pour se renouveler demain.

Je tiens à remercier Fabienne et Monsieur Florent pour m'avoir aidée à devenir grande, Madame Dubois pour être la première à m'avoir décrit les chromosomes et ainsi m'avoir fait entrer dans le monde merveilleux et magique de la biologie et Monsieur Méhat pour m'avoir montré que l'on peut toujours se relever et exceller dans un domaine même si certaines portes se ferment.

Mais en premier lieu je tiens à remercier Monsieur Christos Roussakis, Professeur à l'U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes pour m'avoir encadrée et soutenue tout au long de cette Thèse et les années précédentes. Merci de m'avoir envoyée au tableau cette toute première fois en E.D. de biologie cellulaire. Merci de m'avoir reçue pour répondre à toutes mes questions surtout après cette terrible épreuve du concours. Merci de m'avoir ouvert le laboratoire pour mes stages de Master. Merci de m'avoir fait confiance pour cette thèse. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi tout au long de ces trois ans même quand moi je n'y croyais pas. Merci de s'être toujours battu pour moi et d'avoir toujours été là pour moi. Merci d'avoir été à l'écoute. Je crois qu'aujourd'hui nous pouvons dire que nous l'avons réussi notre pari. Merci pour tout.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury :

Madame Guylène Page, Professeur à l'U.F.R. Médecine et Pharmacie de Poitiers et Monsieur Bruno Ségui, Professeur à la Faculté de Pharmacie de l'Université Paul Sabatier de Toulouse pour m'avoir tous deux faits l'honneur d'être rapporteur pour cette thèse. Je les remercie également pour les échanges que nous avons pu avoir lors des différentes journées EXON auxquelles j'ai eu le plaisir d'assister.

Madame Odile Sergent, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Rennes pour avoir suivi l'avancée de mon travail pendant cette thèse lors des différents comités de suivi de thèse et de terminer l'aventure en acceptant d'examiner ma thèse et d'être membre du jury.

Monsieur Jean-Michel Robert, Professeur à l'U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse. Je le remercie également pour les moments de détente et les discussions scientifiques ou non autour d'un café qui m'ont toujours permis de souffler.

Enfin je tiens à remercier Madame Catherine Jacquot, Maître de Conférences à L'U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes pour m'avoir accueillie dans l'équipe et permis de partager son bureau. Merci pour l'aide dans la réflexion pendant les manipulations et pour l'étape de la rédaction. Merci d'être présente en tant que membre du jury.

Je voudrais remercier l'ensemble du laboratoire IICiMED – Cancérologie pour m'avoir intégrée à leur équipe mais surtout Christophe « Toto » Tomasoni. Merci pour l'accueil chaleureux et tout en humour. Merci pour la formation complète en culture cellulaire. Merci de m'avoir montré et formé à la logistique : demande de devis, bon de commande et autres travaux de coulisse mais non moins essentiels au laboratoire. Mais surtout merci pour la bonne humeur et la bonne ambiance dans le travail, pour toutes les découvertes musicales et discussions cinéphiles ou sportives lors des pauses déjeuners et pour tous les vrais faux coups de gueule.

Merci au Professeur Vehary Sakanyan pour m'avoir formée aux techniques de protéomiques ainsi que Michèle Lecocq pour son aide dans leurs réalisations.

Je remercie également ceux et celles qui sont passés par le laboratoire de façon plus ou moins brève. Merci Tifenn et Jihane pour votre soutien et pour m'avoir montré le chemin. Merci à Florence, Julie P. et Claire pour les nombreux fous rires et les soirées de détente : le trophée de la meilleure stagiaire et de la plus délurée restera à jamais le tien Julie P. Merci Julie LP. pour ton excellent travail et ton aide dans la dernière ligne droite, j'espère que tu iras très loin à ton tour. Merci Matthieu pour l'aide dans tous les problèmes techniques

informatiques. Et enfin merci à tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire et qui par leurs questions m'ont permis de toujours me remettre en question et de prendre le recul nécessaire.

Merci à l'ensemble des autres équipes de l'EA 1155 IICiMED et notamment Patrice Le Pape, Muriel Duflos et Pascal Marchand ainsi que les équipes du bâtiment ISOMer et principalement Philippe et Joël Fleurence.

Je tiens également à remercier tous les membres du personnel de l'U.F.R. de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes qui m'ont accueillie et intégrée dans les différentes disciplines et qui ont contribué à ma découverte de l'enseignement. Un grand merci à Elise Verron, Yannick François, Françoise Ballereau, Dominique Navas, Karina Petit, Nicolas Ruiz, Stéphane Birklé, Ali El Roz, Edith Bigot, El Hassane Nazih, Alain Pineau et Virginie Ferré. Merci aussi à l'ensemble des membres de l'association EXON pour le partage au niveau pédagogique.

Je veux également remercier ceux et celles qui ont partagé la même galère que moi. Un énorme merci tout particulier à Angélique qui m'a accompagnée tout au long du chemin mais également à Jeff, José, Floriane, Justine, Céline, François, Soun, Maeva, Aude et tous les autres que je suis désolée de ne pas citer. Merci pour les soirées de délibération mais surtout de détente nécessaire.

Merci à Cindy et Julia pour les corrections d'anglais. Merci à Sophie d'avoir été mon détecteur tout personnel d'orthographe. Et merci à vous trois pour votre soutien et encouragement tout au long de ces travaux. Merci pour l'aide et l'entraînement dans la vulgarisation de mon travail.

Vous m'avez toujours laissé le choix, vous m'avez suivi quelque soient mes décisions, vous avez été là pour moi depuis le début et chaque jour, vous m'avez appris tout ce que je sais, vous m'avez fait découvrir tant de choses, et aujourd'hui je suis fière d'être arrivée là où je suis.

Je vous remercie de m'avoir rassurée dans les moments d'angoisse et d'avoir largement contribué à cette thèse. Je vous remercie d'avoir été là mais sans jamais me forcer à quoi que ce soit. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez donné y compris la persévérance, le courage, la volonté d'y arriver, la notion de travail, la culture, le respect des autres et j'espère vous le rendre aujourd'hui et vous montrer ce que votre éducation m'a permis d'avoir.

Papa et maman je vous remercie pour tout.

Je remercie également toute ma famille qui a été là pour moi et qui le sera toujours en particulier Papy Marcel et Mamie Marcelle, Papy Serge et Mamie Josette, merci pour votre soutien. Merci aussi à Andrée d'avoir été là pour moi toutes ces années.

Clarisse, je pense à toi aujourd'hui.

Je pense également très fort aujourd'hui à mes arrières grands-parents : Pépé Henri, Mémé Nénette, Mémé Ninie et Grande Mamie, je vous dédie ce travail.

Et un grand merci à mes nounous pour tous leurs câlins...

Un très grand MERCI à vous tous.

*Quand je repense à ce quai de gare*

*Duquel j'en ai tant vu partir avant moi*

*Je me dis aujourd'hui que*

*Tout arrive bien à celui qui s'arme de patience*

*A tous ceux qui attendent encore le train qui leur correspondra le mieux*

## Sommaire

<b>Remerciements.....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des Abréviations .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>17</b>
1.1. La cellule cancéreuse .....	17
1.2. Les différents types de cancer .....	26
1.3. Epidémiologie .....	33
1.3.1. Epidémiologie des cancers .....	33
1.3.2. Epidémiologie du cancer du poumon .....	37
1.3.3. Etiologie du cancer du poumon .....	38
1.4. Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules.....	40
1.4.1. Classification TNM du cancer broncho-pulmonaire.....	41
1.4.2. Les traitements.....	43
1.4.2.1. La thérapie par chirurgie.....	43
1.4.2.2. La thérapie par radiation .....	44
1.4.2.3. La chimiothérapie .....	45
1.5. La thérapie ciblée .....	46
1.5.1. Les voies de signalisation perturbées .....	47
1.5.2. La chimiothérapie associée à la thérapie ciblée .....	47
1.5.3. Vers une thérapie de plus en plus ciblée .....	49
1.6. Le gène <i>TP53</i> en tant que cible moléculaire dans le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules.....	53
1.6.1. Le gène <i>TP53</i> .....	54
1.6.2. Les mutations <i>TP53</i> .....	55
1.6.3. Les différentes stratégies de traitements ciblant <i>TP53</i> .....	57

1.7. Le gène <i>NEDD9/HEF1/Cas L</i> : nouvelle cible moléculaire dans le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules .....	61
1.7.1. Le gène <i>HEF1</i> .....	61
1.7.2. <i>HEF1</i> dans le processus de tumorigenèse.....	64
1.7.3. Pharmacomodulation du gène <i>HEF1</i> .....	65
<b>2. Problématique .....</b>	<b>67</b>
<b>3. Approche expérimentale.....</b>	<b>69</b>
3.1.1. Modèles expérimentaux .....	69
3.1.1.1. Lignées cellulaires et entretien .....	69
3.1.1.2. Synchronisation des cellules .....	72
3.1.1.3. Traitement des cellules – la molécule A190 .....	75
3.1.2. Etude des cibles moléculaires .....	75
3.1.2.1. Extraction d'ARN messagers .....	75
3.1.2.2. La transcription inverse (reverse transcriptase).....	77
3.1.2.3. La PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	77
3.1.2.4. La PCR quantitative .....	78
3.1.3. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	79
3.1.4. Etude de la capacité de liaison à l'ADN du mutant p53.....	80
3.1.5. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP).....	81
<b>4. Résultats.....</b>	<b>84</b>
4.1. Détermination du pic d'expression du gène <i>HEF1</i> dans la lignée NSCLC-N6-L16 sous l'effet de la molécule A190.....	84
4.2. Etude comparative de l'expression des gènes <i>HEF1</i> et <i>TP53</i> sur les lignées cellulaires NSCLC-N6-L16 et A549.....	86
4.3. Vérification de l'expression du gène <i>LKB1</i> dans la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16..	88
4.4. Etude par cytométrie en flux de l'effet de plusieurs molécules cytostatiques sur le cycle cellulaire .....	89

4.4.1. Etude dans la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16.....	89
4.4.1. Etude dans la lignée cellulaire A549 .....	92
4.5. Capacité des protéines mutées p53 à se fixer à la séquence consensus de l'ADN sous l'effet de A190 .....	94
4.6. Essai CHIP afin d'identifier le lien entre le génome ( <i>HEF1</i> ) et le protéome (p53) : activité facteur de transcription .....	95
4.7. Étude de l'expression des gènes <i>PI3K</i> , <i>AKT</i> et <i>mTOR</i> .....	96
<b>5. Discussion.....</b>	<b>98</b>
<b>Liste des Figures.....</b>	<b>107</b>
<b>Liste des Tableaux.....</b>	<b>110</b>
<b>Bibliographies.....</b>	<b>111</b>
<b>Annexe 1 : Communications.....</b>	<b>121</b>
<b>Annexe 2 : Publications.....</b>	<b>122</b>

## Liste des Abréviations

**ABL** : ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire

**AKT** : v-akt murine thymoma viral oncogene homolog

**ALK** : anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

**AMPK** : (=PRKAA1) protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit

**ARF** : (=CDKN2A) cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**ATP** : adénosine triphosphate

**ATM** : ATM (ataxia telangiectasia mutated) serine/threonine kinase

**BAK** : BCL2-antagonist/killer

**BAX** : BCL2-associated X protein

**BCL-2** : B-cell CLL/lymphoma 2

**BID** : BH3 interacting domain death agonist

**BIM** : BCL2-like 11

**BRAF** : B-Raf (root abundant factor) proto-oncogene, serine/threonine kinase

**BRCA1** : breast cancer 1, early onset

**ChIP** : chromatin immunoprecipitation

**CHK2** : checkpoint kinase 2

**CRK** : v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog

**DDR2** : discoidin domain receptor tyrosine kinase 2

**E2F1** : E2F transcription factor 1

**EFS** : embryonal Fyn-associated substrate

**EGF** : epidermal growth factor

**EGFR** : epidermal growth factor receptor

**ELISA** : enzyme-linked immunosorbent assay

**EML4** : echinoderm microtubule associated protein like 4

**EMT** : epithelial-mesenchymal transition

**ERK** : Extracellular signal-regulated kinases

**ETS** : environmental tobacco smoke

**FAS** : Fas (TNF receptor superfamily, member 6) cell surface death receptor

**FAK** : (=PTK2) protein tyrosine kinase 2

**FES** : FES (feline sarcoma oncogene) proto-oncogene, tyrosine kinase

**FGF** : fibroblast growth factor

**FGFR1** : fibroblast growth factor receptor 1

**FHIT** : fragile histidine triad

**FOS** : FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog

**G1** : phase du cycle cellulaire "GAP" (intervalle) 1

**GADD45** : growth arrest and DNA-damage-inducible

**GDP** : guanosine diphosphate

**GRP** : gastrin-releasing peptide

**GTP** : guanosine triphosphate

**HEF1** : (=NEDD9) homo sapiens enhancer filamentation 1

**HER2** : (=ERBB2) v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

**HGF** : hepatocyte growth factor

**HPV** : *Human papillomavirus*

**ID4** : inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein

**IGF** : insulin-like growth factor

**IGF1** : insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)

**INK4A** : (=CDKN2A, =ARF) cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

**JUN** : jun proto-oncogene

**KRAS** : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

**LASER** : light amplification by stimulated emission of radiation

**LKB1** : Liver Kinase B1 (=STK11) serine/threonine kinase 11

**MAPK** : mitogen-activated protein kinase

**MAPKK3** : mitogen-activated protein kinase kinase 3

**MCAM** : melanoma cell adhesion molecule

**MDM2** : MDM2 (transformed mouse 3T3 cell double minute 2) proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase

**MET** : (=c-MET) MET (Methoprene-tolerant) proto-oncogene, receptor tyrosine kinase

**MTOR** : mammalian target of rapamycin  
(serine/threonine kinase)

**MYC** : (=c-MYC) v-myc avian  
myelocytomatosis viral oncogene homolog

**NEDD9** : (=HEF1) neural precursor cell  
expressed, developmentally down-  
regulated 9

**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor of kappa light  
polypeptide gene enhancer in B-cells

**NOXA** : (=PMAIP1) phorbol-12-myristate-  
13-acetate-induced protein 1

**NSCLC** : non small cell lung cancer

**P16INK4** : (=CDKN2A, =ARF)cyclin-  
dependent kinase inhibitor 2A

**P21** : (=CDKN1A) cyclin-dependent kinase  
inhibitor 1A (p21, Cip1)

**P130CAS** : (=BCAR1) breast cancer anti-  
estrogen resistance 1

**PBS** : phosphate buffered saline

**PCR** : polymerase chain reaction

**qPCR** : quantitative polymerase chain  
reaction

**PI3K** : phosphatidylinositol-4,5-  
bisphosphate 3-kinase

**PIK3CA** : phosphatidylinositol-4,5-  
bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit  
alpha

**PIN1** : peptidylprolyl cis/trans isomerase,  
NIMA-interacting 1

**PLK2** : polo-like kinase 2

**PML** : promyelocytic leukemia

**PRIMA-1** : p53 Reactivation and Induction  
of Massive Apoptosis

**PTEN** : phosphatase and tensin homolog

**PUMA** : p53 upregulated modulator of  
apoptosis (=BBC3 : BCL2 binding  
component 3)

**RAC** : (=AKT1) v-akt murine thymoma viral  
oncogene homolog 1

**RAF** : (=BRAF) B-Raf proto-oncogene  
serine/threonine kinase

**RAP** : (=LRPAP1) low density lipoprotein  
receptor-related protein associated  
protein 1

**RAS** : (=KRAS) Kirsten rat sarcoma viral  
oncogene homolog

**RB** : retinoblastoma

**RET** : ret proto-oncogene

**ROS1** : ROS proto-oncogene 1 , receptor  
tyrosine kinase

**SMAD3** : SMAD family member 3

**STAT3** : signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)

**TGF $\beta$**  : transforming growth factor beta

**TKI** : tyrosine kinase inhibitor

**TNBC** : Triple-negative breast cancer

**TP53** : tumor protein p53

**VEGF** : vascular endothelial growth factor

**VEGF-A** : vascular endothelial growth factor A

**VEGFR** : vascular endothelial growth factor receptor

## 1. Introduction

### 1.1. La cellule cancéreuse

Le cancer se caractérise par la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse maligne sous l'effet de changements au sein de son génome. Ces modifications se retrouvent sur différents gènes regroupés en deux catégories principales définies par le type de mutation. Les mutations dominantes gain de fonction sur des gènes alors appelés « oncogènes ». Et les mutations récessives perte de fonction sur des gènes regroupés sous le terme « gènes suppresseurs de tumeurs ». (Lodish et al., 2000) Cette transformation cellulaire appelée tumorigenèse est donc un processus en plusieurs étapes reflétant différentes altérations génétiques.

La maladie débute par une lésion précancéreuse qui contient des cellules en cours de transformation : il s'agit des étapes d'initiation et de promotion. Une cellule cancéreuse peut alors apparaître des suites de cette lésion cancéreuse et commence à se multiplier : c'est l'étape de progression. (Figure 1)

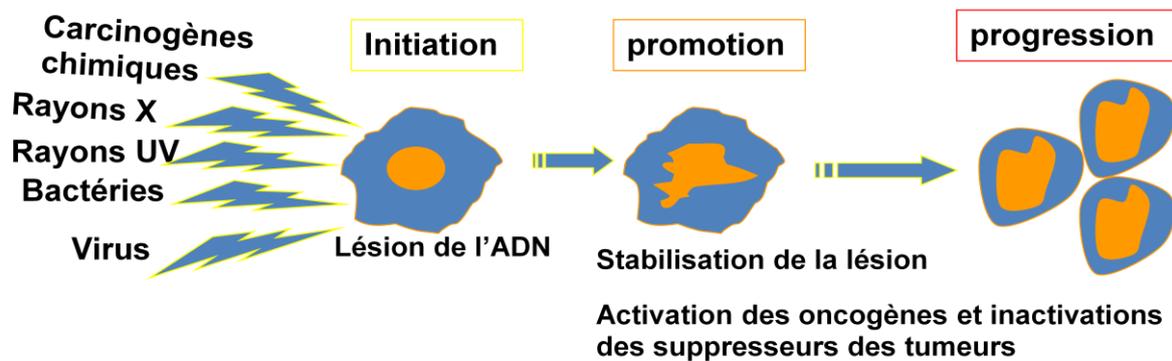


Figure 1 : Les différentes étapes de la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse (©Pr. C. Roussakis – Cours Oncologie)

Dans un premier temps, la tumeur de petite taille reste localisée dans le tissu d'origine. Puis la tumeur grossit et commence à envahir les tissus voisins. Dans un second temps les métastases apparaissent au niveau des ganglions lymphatiques voisins avant de s'étendre aux autres organes.

L'émergence de la biologie cellulaire a permis au début des années 2000 d'établir les règles de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. Les cellules de mammifères

partagent une machinerie moléculaire identique régulant leur prolifération, leur différenciation ou encore leur mort cellulaire. Il a été possible de définir des caractéristiques moléculaires, biochimiques et cellulaires partagées par la majorité des types humains de cellules cancéreuses. Ainsi ont pu être décrites six caractéristiques correspondant à la succession de changements génétiques qui confèrent un avantage, notamment dans la prolifération cellulaire, aboutissant à la tumorigenèse. Ces six changements physiologiques acquis lors du développement tumoral sont : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux inhibiteurs de signaux de croissance, l'échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose), le potentiel répliatif illimité, l'angiogenèse soutenue et l'invasion des tissus et métastases. (Hanahan and Weinberg, 2000) (Figure 2)

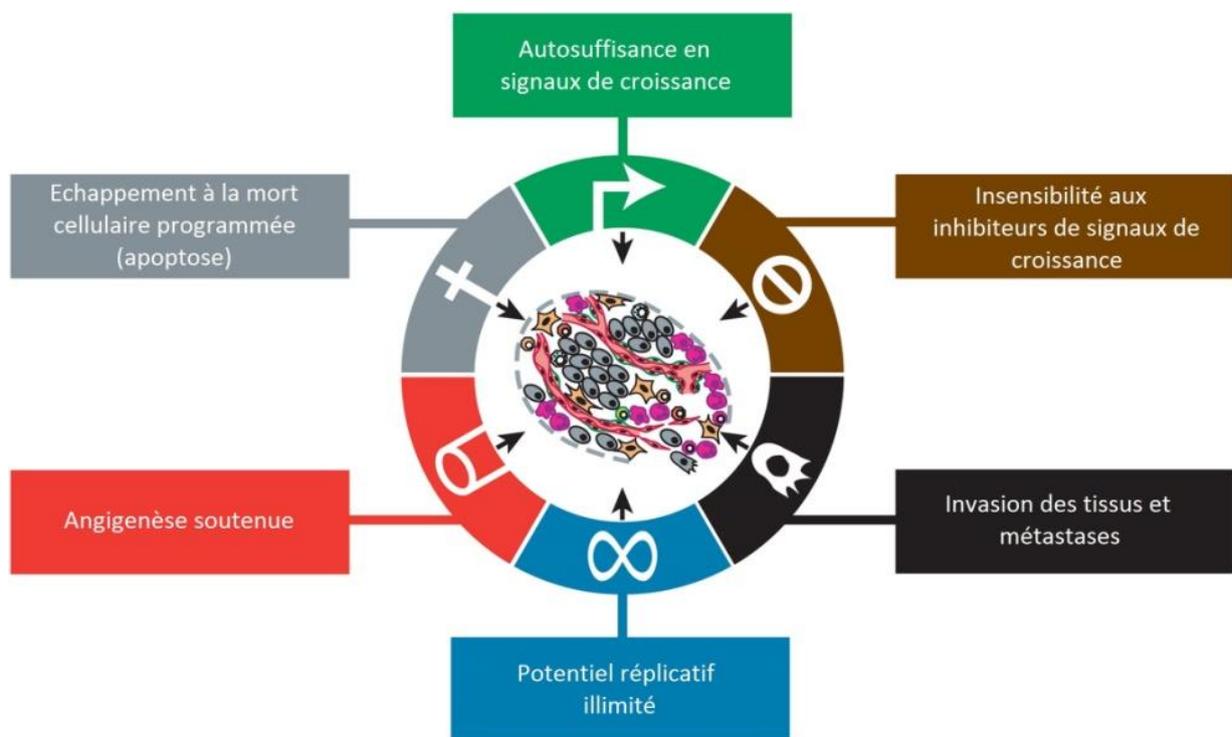


Figure 2 : Les 6 caractéristiques de la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011)

L'autosuffisance en signaux de croissance est la première caractéristique et certainement la plus fondamentale des cancers. En situation physiologique, la production et le relargage des signaux de croissance tout au long du cycle cellulaire obéit à de nombreux contrôles assurant l'homéostasie ainsi que le maintien de l'architecture des tissus. La majorité de ces signaux sont regroupés dans la famille des facteurs de croissance comportant des domaines à tyrosine kinase. Ces domaines sont à l'origine de signaux destinés à diriger la cellule tout au long du cycle cellulaire et jouent donc un rôle majeur dans la prolifération cellulaire. En

dérégulant tous ces signaux la cellule cancéreuse va développer plusieurs stratégies et pourra alors devenir maîtresse de son destin.

Ces stratégies ont été démontrées grâce au séquençage ADN des cellules cancéreuses. D'une part, l'activation constitutive des signaux normalement sous le contrôle des facteurs de croissance en situation physiologique, et d'autre part, des mutations ont été révélées allant contre les mécanismes cellulaires d'atténuation des signaux de prolifération. Ces deux types de mutations ayant pour conséquence une activation de la prolifération cellulaire. Un fort taux de mutation au niveau de l'oncogène *BRAF* des cellules cancéreuses de mélanomes a par exemple été démontré, conduisant à une activation constitutive des voies *MEK* et *MAPK*. (Davies and Samuels, 2010) De même il a été montré dans de nombreux cas de tumeurs solides humaines de fortes mutations activatrices au niveau de l'oncogène *PI3K* et/ou des mutations perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *PTEN* tous deux importants dans le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération cellulaire ainsi que dans les processus de survie de la cellule. (Jiang and Liu, 2009)

Pendant longtemps, il a été postulé que ce phénomène d'activation des oncogènes et d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs était le point de départ de la prolifération des cellules cancéreuses et donc de la croissance des tumeurs. Des données plus récentes ont toutefois montré qu'une activation trop forte des oncogènes tels que *RAS*, *MYC* et *RAF* pouvait au contraire conduire à une sénescence des cellules voire à un phénomène d'apoptose. Ainsi il a été observé qu'une culture de cellules cancéreuses exprimant un fort taux de l'oncogène *RAS* peut entrer dans un cycle non prolifératif mais stable appelé sénescence. Au contraire, une lignée avec un taux plus faible continuera sa prolifération. (Evan and d'Adda di Fagagna, 2009) Le phénomène de sénescence avait été observé pour la première fois par Hayflick qui avait démontré que des fibroblastes perdaient leur capacité de prolifération après plusieurs générations (Hayflick and Moorhead, 1961) ceci dû au raccourcissement de leurs télomères (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Il apparaît désormais comme un mécanisme de défense afin de limiter la croissance tumorale. Les cellules tumorales résultent donc d'un compromis entre un signal fort de prolifération par activation des oncogènes et un échappement aux signaux de sénescence et d'apoptose.

Après avoir acquis la capacité à induire une prolifération active, les cellules cancéreuses doivent également supprimer les nombreuses voies de régulation négative de cette prolifération. C'est la seconde grande caractéristique des cancers : l'insensibilité aux inhibiteurs de signaux de croissance. C'est ainsi qu'un très grand nombre de gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiés de part leur inactivation au niveau de différentes tumeurs humaines comme animales. Les deux gènes les plus représentés de cette catégorie sont le gène *RB* et le gène *TP53*, chefs d'orchestre gouvernant la décision de prolifération des cellules ou bien au contraire leur sénescence ou apoptose.

Il est montré que la protéine *rb* est directement ou indirectement mutée dans la quasi-totalité des cancers : jusqu'à 90% des cas pour le cancer du poumon à petites cellules par exemple. Cette situation fait de ce gène un gène suppresseur de tumeurs majeur. La protéine joue un rôle majoritaire dans le maintien en quiescence des cellules : une perte de sa fonction entraîne la prolifération cellulaire ainsi que l'arrêt du point de contrôle en G1, ceci ayant un impact également sur la différenciation cellulaire. Il a très vite été remarqué que les mutations de ce gène jouent un rôle primordial dans l'initiation de certains types de cancers comme le rétinoblastome, l'ostéosarcome ou le cancer du poumon à petites cellules. Cependant il est intéressant de remarquer que dans la majorité des cas les mutations de *RB* ne sont visibles qu'à des stades tumoraux plus avancés. Ce qui laisse penser qu'une inactivation trop rapide de ce gène dans le processus tumoral serait un inconvénient pour les cellules cancéreuses. (Burkhart and Sage, 2008)

Contrairement à la protéine *rb* qui reçoit des signaux intra comme extracellulaires, *TP53* réagit uniquement à des signaux internes à la cellule. Toutes modifications, dommages ou erreurs au sein de l'ADN cellulaire entraîneront un arrêt du cycle cellulaire sous le contrôle de la protéine *p53* jusqu'à correction de ces problèmes au sein du génome. Une action à court ou long terme selon le degré de dommage qui, s'il est trop important entraînera une apoptose sous contrôle de *p53*.

Il existe plusieurs voies de signalisation totalement indépendantes conduisant à l'apoptose. (Figure 3) La plus ancienne est la voie intrinsèque médiée par les mitochondries. Cette voie est régulée par la famille des *Bcl-2* qui en réponse à un stress ou à un signal apoptotique va entraîner la libération du cytochrome *c* par la mitochondrie, signal d'activation de la caspase

9. Une fois activée, la caspase 9 entraînera une cascade protéolytique aboutissant au désagrégement de la cellule qui sera alors consommée par ses voisines ou bien par des phagocytes. Par opposition à la voie intrinsèque, il existe la voie extrinsèque qui, est quant à elle, médiatisée et activée par les récepteurs de mort à la surface des cellules comme le récepteur Fas. Cette deuxième voie aboutit à l'activation de la caspase 8 qui, comme la caspase 9 dans la voie intrinsèque, induit une cascade protéolytique entraînant la mort cellulaire. (Adams, 2003) Deux autres voies existent : il s'agit de la voie dépendante de la caspase 2 et la voie indépendante des caspases.

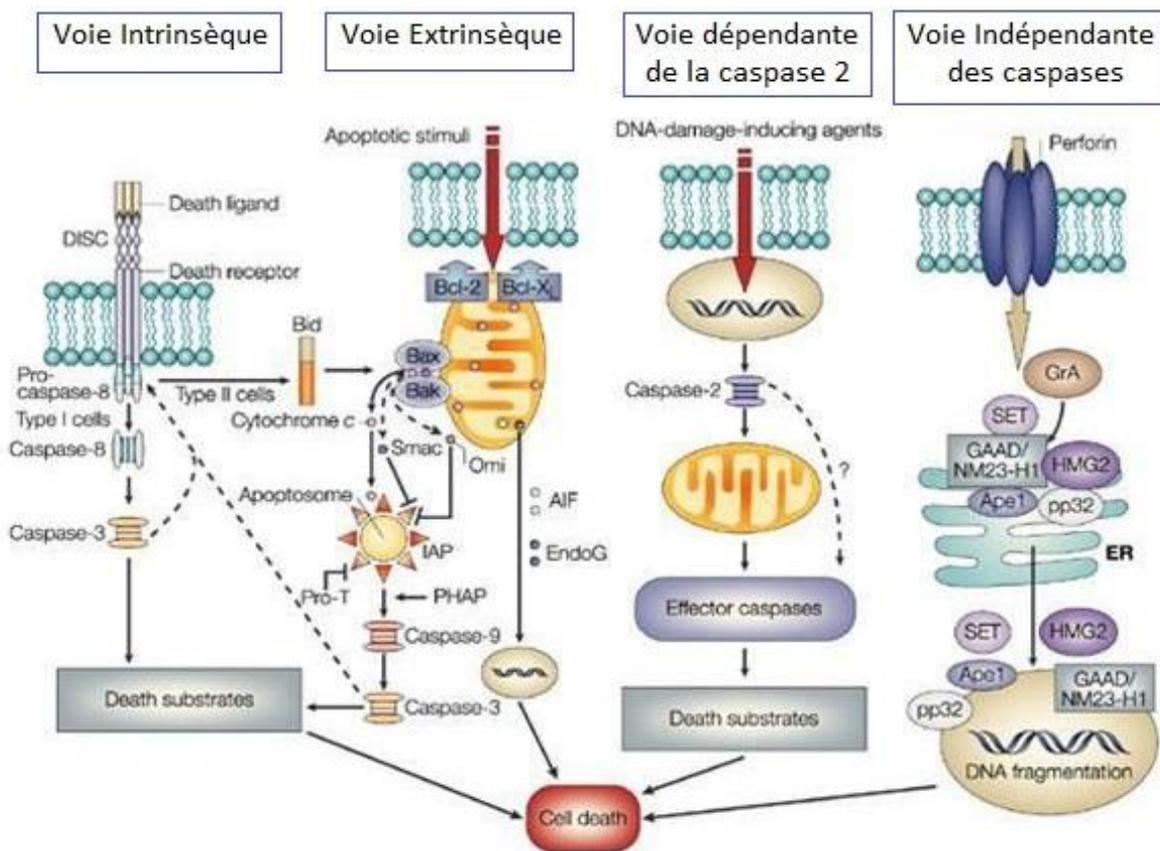


Figure 3 : Les différentes voies de l'apoptose (Nature Reviews - Molecular Cell Biology)

Pour le moment, la voie intrinsèque est la plus largement impliquée dans le processus tumoral lors de l'échappement à la mort cellulaire programmée : c'est la troisième caractéristique du processus de tumorigénèse.

La famille des Bcl-2 contrôle les signaux pro et anti apoptotiques de la voie intrinsèque. Les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1 et Bcl-B agissent en se liant avec les membres pro-apoptotiques de la famille comme Bax et Bak, présents sur la

membrane interne de la mitochondrie, qu'ils inhibent. Lorsqu'ils sont libérés de cette liaison avec leurs partenaires anti-apoptotiques, Bax et Bak rompent la continuité de la membrane mitochondriale interne libérant ainsi la protéine pro-apoptotique qu'est le cytochrome c. (Adams and Cory, 2007) *BAX* et *BAK* apparaissent comme relativement redondants dans leur fonction ; ainsi la perte de l'un ou l'autre de ces gènes n'a pas de grande incidence. Cependant l'absence des deux inhibe l'apoptose dans de nombreux types cellulaires. (Wei et al., 2001)

Bax et Bak partagent un domaine de liaison protéine-protéine avec leurs partenaires anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 appelé motif BH3. Une autre sous-famille pro-apoptotique comportant ce même motif et pouvant se lier avec l'un ou l'autre des partenaires a alors été identifiée : la famille « domaine BH3-only » comportant des membres tels que Bid, Bim, Noxa ou Puma. C'est par l'intermédiaire de cette dernière sous-famille que *TP53* est capable d'induire l'apoptose par une activation de *NOXA* et *PUMA*. (Adams and Cory, 2007)

La multiplication de mutations touchant ces différents acteurs du mécanisme d'apoptose reflète le parcours que les cellules cancéreuses rencontrent contre des signaux d'induction de l'apoptose dans leur évolution vers un stade malin.

La nécessité pour une cellule cancéreuse d'acquérir un potentiel réplicatif illimité afin de générer une tumeur macroscopique est la quatrième caractéristique. Cette dernière est cependant contradictoire avec l'observation faite de la plupart des types cellulaires de l'organisme humain qui ne peuvent subir qu'un certain nombre de divisions cellulaires. Les télomères, petites séquences répétitives d'hexanucléotides, présents à l'extrémité des chromosomes et peu à peu éliminés au cours des cycles de division cellulaire, jouent un rôle important dans ce phénomène. Toujours raccourcis au fur et à mesure de la vie d'une cellule, les télomères finissent par ne plus pouvoir protéger les séquences essentielles du génome ce qui entraîne un phénomène de sénescence et/ou de mort cellulaire. La télomérase, enzyme responsable de la formation de ces séquences répétitives est exprimée et fonctionnelle dans plus de 90% des cellules devenues immortelles dont les cellules cancéreuses. En synthétisant de nouvelles séquences, la télomérase peut ainsi aller à l'encontre de l'érosion des télomères au gré des divisions cellulaires et supprimer la

sénescence et la mort cellulaire dans ce contexte. (Blasco, 2005) (Artandi and DePinho, 2010)

Il a été montré que des clones de cellules cancéreuses naissantes subissaient encore le phénomène de réduction de leurs télomères au cours des premières étapes de leurs développements tumoraux. Ceci est dû à une non expression de la télomérase à ce stade de la transformation cellulaire. (Kawai et al., 2007) Ces données montrent donc qu'il y a eu de multiples cycles de division cellulaire lors du développement tumoral de ces cellules autrefois saines. Et donc qu'un développement tumoral peut être stoppé par ce phénomène d'érosion des télomères et ce bien avant que la croissance ne devienne macroscopique. Au contraire l'absence d'une surveillance de l'intégrité du génome par *TP53* permettrait à ce type de tumeur primaire de perdurer malgré une érosion complète des télomères. Ce faisant, le taux de mutation au sein du génome serait augmenté tout comme la probabilité d'engendrer des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs mutés. D'autant plus si la fonction de la télomérase est réactivée. (Feldser and Greider, 2007)

La prolifération importante des premières cellules cancéreuses appelées également précurseurs peut donc aboutir à la formation d'une masse tumorale de plus en plus grosse jusqu'à l'obtention d'une taille macroscopique. Comme toutes les cellules de l'organisme les cellules cancéreuses ont besoin d'un apport en nutriments et en oxygène ainsi que la nécessité d'éliminer les métabolites et le dioxyde de carbone. Pour cela une néo-vascularisation est nécessaire et c'est ainsi que se met en place une angiogenèse soutenue au sein des tumeurs : cinquième caractéristique de la tumorigenèse.

Les vaisseaux sanguins sont principalement composés de cellules endothéliales. Lors de l'embryogénèse deux processus permettent le développement des vaisseaux : d'une part la vasculogenèse, qui permet la différenciation des cellules endothéliales à partir d'un précurseur. Et d'autre part, l'angiogenèse qui permet la naissance de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux existants. Lors de la vie adulte il n'existe que l'angiogenèse, même si elle reste quiescente en dehors de processus physiologiques tels que la réparation de vaisseaux, le cycle menstruel et la grossesse chez la femme. Cependant, en réponse à un stimulus précis l'angiogenèse peut être réactivée. C'est le cas lors de la tumorigenèse pendant laquelle une activation quasi permanente de l'angiogenèse est observée conduisant à la

naissance de nouveaux vaisseaux qui permettent de subvenir aux besoins des cellules cancéreuses. (Hanahan and Folkman, 1996)

Le principal acteur de l'angiogenèse est le gène *VEGF-A* (vascular endothelial growth factor-A) codant pour le ligand permettant d'induire la croissance de nouveaux vaisseaux. Ce gène peut être surexprimé en cas d'hypoxie ou d'apparition de signaux provenant d'oncogènes.

L'ensemble des vaisseaux générés au sein des tumeurs sont très hétérogènes en opposition à la régularité observée chez leurs homologues sains. La construction sous l'action de facteurs pro-angiogéniques non contrôlés est aberrante. En plus du taux anormal de prolifération et d'apoptose des cellules endothéliales, il est observé : le bourgeonnement de capillaires précoces, un réseau de ramifications compliqué et excessif, des vaisseaux déformés et élargis, un flux sanguin irrégulier, des microhémorragies ainsi qu'une perméabilité des vaisseaux. (Nagy et al., 2010)

Longtemps l'angiogenèse était envisagée comme une caractéristique importante lors du développement macroscopique des tumeurs et de l'invasion tumorale. Or, des données plus récentes ont montré qu'elle pouvait être aussi induite lors des étapes microscopiques et pré-malignes des tumeurs donnant à cette caractéristique une importance toute aussi grande que les autres dans l'ensemble du processus tumoral. (Raica et al., 2009)

La sixième et dernière caractéristique est au contraire acquise par les cellules tumorales dans les stades les plus tardifs et sera responsable du caractère invasif et malin des tumeurs. Elle est donc le plus souvent la cause principale de mortalité chez les patients. Il s'agit de l'invasion des tissus et du développement métastatique. Plusieurs étapes nécessaires à ces deux phénomènes ont été décrites. La première de ces étapes est l'invasion locale du tissu environnant par la masse tumorale issue de la transformation des premières cellules cancéreuses au travers de fines veinules et petits vaisseaux lymphatiques qui n'opposent qu'une faible résistance. Ce processus est appelé intravasation. S'ensuit une diffusion des cellules tumorales à l'intérieur des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui peuvent ensuite s'arrêter plus loin dans un autre vaisseau avant une étape d'extravasation. Cette dernière est nécessaire pour la future prolifération de cellules tumorales dans un nouvel organe créant ainsi une première métastase. (Talmadge and Fidler, 2010)

Afin de se séparer de la tumeur primaire et d'envahir un nouveau tissu la cellule cancéreuse doit rompre les jonctions entre cellules et les jonctions entre cellule et matrice extracellulaire pour suivre un gradient chimio attractif à travers cette matrice extracellulaire. Ces processus sont observés dans certains phénomènes physiologiques et notamment lors de l'embryogénèse. Cette transformation de cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse (EMT) est donc détournée et utilisée par les cellules cancéreuses pour l'invasion et la dissémination métastatique. (Yilmaz and Christofori, 2009) (Klymkowsky and Savagner, 2009)

La famille de protéines de jonctions cellulaires la plus touchée dans les cancers est la superfamille des cadhérines. L'E-cadhérine, spécialisée dans la jonction cellule-cellule des cellules épithéliales, est caractérisée depuis longtemps comme un suppresseur de l'invasion tissulaire et du développement métastatique. Ainsi, il est fréquent de voir une perte partielle ou totale de l'E-cadhérine pendant le processus tumoral. (Berx and van Roy, 2009) Dans un même temps, l'expression de N-cadhérines, caractéristiques des cellules mésenchymateuses, est observée. Plusieurs facteurs de croissance sont également impliqués dans ce phénomène d'EMT comme le TGF $\beta$ , le HGF, l'EGF, l'IGF ou bien encore le FGF. Plus récemment il a été montré l'implication de la voie *NOTCH* par activation du facteur de transcription *SNAIL*, répresseur de l'expression de l'E-cadhérine. (Yilmaz and Christofori, 2009)

En conséquence, le processus de tumorigénèse implique un réseau large et ramifié de voies de signalisation reprogrammées ou dérivées de mécanismes utilisés par les cellules saines en situation physiologique. (Figure 4) Il est alors possible de classer tous les acteurs de la transformation d'une cellule tumorale en différents groupes selon leur appartenance à telle ou telle autre grande fonction cellulaire détournée par la cellule cancéreuse auquel il appartient : la motilité, la différenciation, la prolifération ou bien la viabilité cellulaire. Toutes ces grandes fonctions que l'on retrouve dans les six grandes caractéristiques préalablement décrites. (Hanahan and Weinberg, 2011)

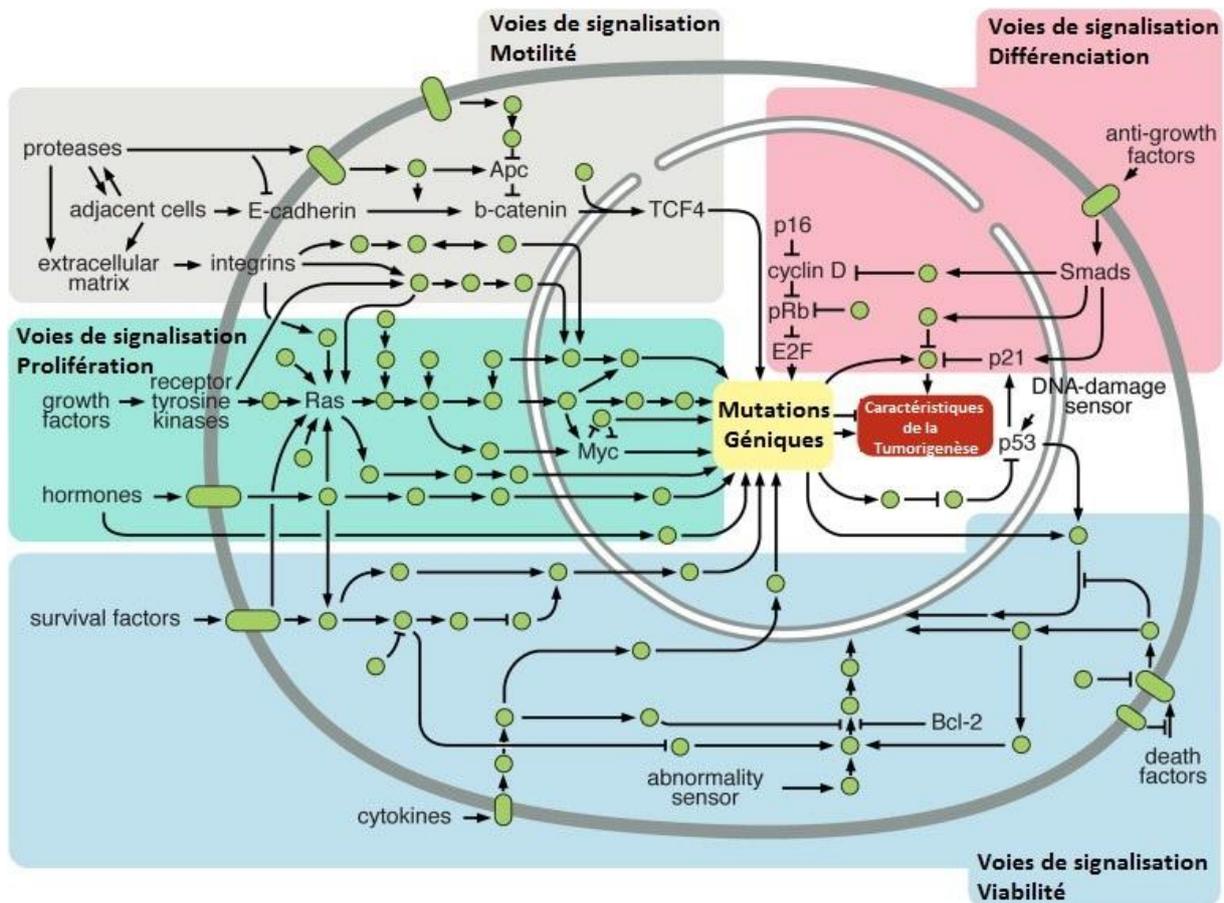


Figure 4 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans le processus de tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011)

## 1.2. Les différents types de cancer

Le cancer est une pathologie qui se caractérise par la prolifération anormale et anarchique d'une cellule cancéreuse clonale aboutissant à la formation d'une masse tumorale plus ou moins maligne. Il est possible de décrire le processus de tumorigenèse de façon globale. Cependant l'origine même de cette première cellule clonale qui peut être très différente d'un type de cancer à l'autre met en lumière le caractère particulier de cette pathologie cancéreuse. En effet, plus qu'une pathologie, le cancer est un ensemble de pathologies dont les caractéristiques et les fonctions cellulaires utilisées et détournées selon l'origine du précurseur seront différentes et variées.

Ainsi, si le développement d'une cellule cancéreuse peut être caractérisé par des éléments communs à la majorité des tumeurs comme le fort taux de prolifération, la capacité à envahir des tissus ou le développement métastatique, les voies utilisées pour aboutir à ces

grandes caractéristiques restent très variables et caractéristiques selon le type de tumeur étudié. (Baba and Catoi, 2007)

Une classification de tous ces différents cas est donc nécessaire pour définir la caractérisation de la pathologie cancéreuse et principalement une classification selon le type du cancer qui est réalisé à partir de l'origine de la première cellule transformée. Deux grands groupes sont ainsi étudiés : les tumeurs solides et les tumeurs liquides. Représentant à eux seuls 90% des cas de cancers chez l'Homme, les cancers solides constituent un large groupe lui-même subdivisé en deux sous-groupes définis selon l'origine épithéliale ou conjonctive de la cellule cancéreuse clonale. Sont ainsi distingués respectivement les carcinomes d'une part, groupe majoritaire, et les sarcomes moins fréquents d'autre part. Le groupe des cancers liquides est également subdivisé en deux sous-groupes : les leucémies ou cancers du sang et de la moelle osseuse d'une part et les lymphomes touchant quant à eux le système lymphatique d'autre part. Ces derniers étant à nouveau scindés en deux catégories : les lymphomes hodgkiniens et les lymphomes non-hodgkiniens.

Chaque type de cancers possède des caractéristiques plus ou moins particulières venant de l'origine du précurseur de la tumeur. Ces caractéristiques peuvent souvent expliquer le profil type des personnes touchées plus particulièrement par un type de cancers ou bien le caractère plus ou moins agressif et morbide de chaque tumeur.

Les lymphomes et leucémies sont de parfaits exemples de la relation existant entre les caractéristiques propres des précurseurs cancéreux et le type de populations atteintes par les cancers qui en découlent. En effet, ces cancers liquides issus de la transformation de cellules d'origine hématopoïétique et donc ayant déjà la capacité de se déplacer dans l'organisme permettent de comprendre pourquoi le processus de tumorigenèse est plus rapide et donc que la pathologie puisse se déclarer chez des sujets plus jeunes. De plus le fort taux de recombinaisons génétiques au sein du génome de certains types de ces cellules permet d'imaginer un risque plus grand dans l'obtention de mutations nécessaires et utiles au processus tumoral.

Les récepteurs des lymphocytes B (BCR) sont essentiels au développement, à la survie et l'activation de ces derniers. De nombreux points contrôles permettent l'élimination de lymphocytes trop réactifs. Cependant certains de ces lymphocytes autoréactifs peuvent

échapper à cette sélection lors de leurs développements successifs dans la moelle osseuse ou les organes lymphoïdes périphériques et pourront ensuite diffuser dans tout l'organisme. Ces lymphocytes cancéreux peuvent ensuite être activés et proliférer de façon importante. Selon l'origine de la cellule cancéreuse clonale se distinguent les leucémies développées à partir de lymphocytes issus de la moelle osseuse et les lymphomes développés à partir de lymphocytes issus des organes lymphoïdes. L'incidence des différents types de leucémies et lymphomes diffère significativement entre les adultes et les enfants. (Ploegh, 2014)

Chez les personnes de plus de 60 ans, dans 90% des cas de lymphomes folliculaires, un fort taux en protéine Bcl2 est observé ce qui en fait l'un des marqueurs principaux de ce cancer. Contrairement à beaucoup d'autres oncogènes, *BCL2* permet la survie de la cellule et non pas sa prolifération. Cependant il a été montré que la surexpression du gène *BCL2* augmente les risques de plusieurs types de lymphomes. Dans le cas du lymphome folliculaire c'est la translocation du chromosome t(14 ;18) de l'oncogène *BCL2* au niveau d'un locus de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (*IGH*) qui permet son activation anormale et constitutive. (Egle et al., 2004) Cette mutation confère aux lymphocytes B naïfs qui la portent un avantage certain pour leur survie ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Il est intéressant de noter que cette translocation est détectable dans le sang chez 50 à 70% de sujets sains qui ne développeront pas de lymphome folliculaire. L'incidence de ce type de lymphome ainsi que la proportion observée de lymphocytes B porteurs de la translocation t(14 ;18) augmentent avec l'âge ce qui explique l'apparition tardive de ce type de cancers. (Kridel et al., 2012)

Une remarque analogue peut être faite pour l'ostéosarcome qui est observé principalement chez les enfants et les adolescents ; les cellules à l'origine de ce cancer font partie de la lignée cellulaire des ostéoblastes particulièrement actifs en début de vie lors de la croissance osseuse et de l'ostéogenèse.

L'ostéosarcome est le cancer des os le plus fréquemment observé et le plus agressif, il représente environ 60% des cas de sarcomes osseux. Il se caractérise par une grande instabilité génétique avec des délétions et des amplifications récurrentes au niveau de l'ADN. Ces tumeurs d'origine mésenchymateuse dérivent d'un précurseur de la lignée cellulaire des ostéoblastes ayant accumulé des mutations lui ayant permis d'échapper aux différents points de contrôle du cycle cellulaire. Ces mutations entraînent chez cette cellule

cancéreuse clonale une prolifération excessive qui l'empêche de se différencier normalement selon le schéma habituel de développement de l'os.

Les mutations observées dans les cas d'ostéosarcomes touchent particulièrement les acteurs du cycle cellulaire. Plusieurs études ont montré le rôle de l'inhibition de la protéine p53 et l'effet combiné d'une perturbation de la protéine rb dans le développement des ostéosarcomes. En plus de permettre une prolifération importante, un rôle dans la dédifférenciation des cellules cancéreuses clonales a été montré permettant l'obtention de cellules ayant un caractère de cellules souches. (Basu-Roy et al., 2013) Conjointement à l'inactivation de ces deux grands gènes suppresseurs de tumeur, l'activation d'oncogènes tels que *c-MYC*, *FOS*, *JUN* ou encore *MDM2* contribue aux effets observés au niveau de la régulation de la croissance cellulaire. L'activation constitutive de la protéine mdm2 qui inhibe la fonction de p53 en se liant à elle permet donc aussi une activation de la prolifération et ce même dans les cas où le gène *TP53* ne serait pas muté. (Tang et al., 2008)

Les gènes *TP53* et *RB* se retrouvent mutés dans une très grande majorité des types de cancers mais ce ne sont pas les seuls. Par exemple, le rôle important du peptide GRP (gastrin-releasing peptide) et de son récepteur dans le développement de plusieurs cancers a été montré ces dernières décennies. C'est d'abord au niveau du cancer du poumon à petites cellules qu'un fort taux d'ARNm de la GRP a été observé ; il y joue d'ailleurs un rôle primordial comme facteur de croissance des cellules cancéreuses. Depuis, un taux important de ce peptide a été démontré dans les cancers de la prostate, du sein, de l'estomac, du pancréas et le cancer colorectal. Ces fort taux d'expression du gène *GRP* et de son récepteur GRP-R sont plutôt visibles dans les stades plus avancés dans le développement tumoral notamment dans les cas de cancers du poumon à petites cellules et de la prostate. La GRP altère la morphologie des cellules et agit au niveau de l'adhésion cellulaire par action sur le cytosquelette par activation des FAK (focal adhesion kinase). Toutes ces modifications sont autant de préludes à la migration et à l'invasion cellulaire dans les cancers préalablement cités. Il a été montré également que la GRP stimulait la prolifération dans les lignées du cancer du poumon, permettant la formation des métastases une fois la migration et l'invasion des cellules cancéreuses réalisées. (Patel et al., 2006) (Ischia et al., 2014)

D'autres gènes des voies de signalisation de la prolifération, de la motilité, de la différenciation ou de la survie cellulaire, au contraire, sont particulièrement spécifiques et caractéristiques d'un type de cancer.

L'*EGFR*, par exemple, est surexprimé dans le cancer du sein et particulièrement associé aux formes les plus agressives de ce type de cancers. L'activation des quatre membres de cette famille dans le cancer du sein favorise la diffusion et l'invasion des cellules épithéliales transformées et contribue au phénotype malin. La dérégulation et la surexpression constitutive de la voie *EGFR* favorisent aussi les étapes d'angiogenèse et de développement métastatique de la tumorigenèse, responsables du faible taux de survie de ce cancer. (Masuda et al., 2012)

Il existe donc quatre types de récepteurs à l'EGF (epidermal growth factor) : *EGFR/ErbB1/HER1*, *HER2*, *ErbB3* et *ErbB4*. Ils sont tous surexprimés à différents degrés dans les cas de cancers du sein. Le plus fort taux de surexpression se retrouve pour le récepteur *HER2* aussi connu sous le nom de *ERBB2*. Dans le même temps une surexpression du ligand de ces récepteurs est également observée, suggérant une possible auto-activation.

Le cancer du sein triple négatif (TNBC) est un type particulier de cancer du sein défini par la perte de l'expression immunohistochimique des récepteurs à l'estrogène et à la progestérone ainsi que de le *HER2*. Il représente 15 à 20% des cas de cancer du sein et apparaît en général chez les femmes de moins de 50 ans. Ce cancer se présente généralement à un stade avancé avec un profil métastatique important, à l'origine du taux faible de survie. Dans 67% des cas le cancer du sein triple négatif se retrouve chez des femmes porteuses de la mutation *BRCA1*. Il a d'ailleurs été montré que la surexpression de ce gène pouvait induire l'expression de l'*EGFR*. De plus, la surexpression de l'*EGFR* est souvent accompagnée d'une surexpression de *VEGF-A*, signal majeur lors de l'angiogenèse, qu'il active. Enfin, l'*ERBB2* est également reconnu comme un activateur de la voie de signalisation responsable de la motilité cellulaire. Ces deux dernières fonctions expliquant le stade avancé de ce type de cancer avec un profil métastatique. (Eccles, 2011)

C'est à partir de ce type d'observation d'un gène ou d'une famille de gène particulièrement touchée dans le même type de cancer, ici la famille *EGFR* dans le cancer de sein, que de nouvelles stratégies de traitements ont émergé. Sont alors apparues des thérapies ciblées

avec par exemple la recherche d'antagonistes des voies activées dans un type de cancers donné afin de stopper la prolifération et/ou l'invasion des tissus par les cellules cancéreuses. Dans le cas du cancer du sein de nombreuses études sont réalisées pour développer des antagonistes de l'EGF. (Gelmon et al., 2012)

Plus qu'une famille de gène, cela peut être une voie de signalisation entière qui peut être touchée dans un type de cancer. C'est le cas du cancer colorectal dont 40% des décès imputés sont associés à un profil métastatique. La plupart des signaux nécessaires au maintien de la prolifération, de la survie et de la motilité des cellules cancéreuses impliquent des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs tous sous le contrôle des récepteurs EGFR. Ces gènes sont les oncogènes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* et le suppresseur de tumeurs *PTEN*. Une stratégie avec des traitements dirigés contre les récepteurs EGFR, à la manière des cancers du sein, ne peut être efficace que si aucune mutation des gènes en aval de ces récepteurs comme *KRAS* et *BRAF* n'est observée. (Eklof et al., 2013)

Or dans 30 à 40% des cas de cancer colorectal, différentes mutations au niveau du gène *KRAS* sont présentes. Une mutation au niveau de l'oncogène *KRAS* induit une activation constitutive du gène qui se traduit par l'activation des voies de signalisation *MAPK* (mitogen activated protein kinase) et *PI3K/AKT* (phosphoinositide-3-kinase/v-akt murine thymoma viral) permettant à la cellule cancéreuse d'être totalement indépendante vis-à-vis des signaux inhibiteurs de la prolifération cellulaire envoyés par les récepteurs de surface EGFR. La voie des *MAPK* est l'une des voies fondamentales de la tumorigenèse. Ce type de phénotype est associé à un mauvais pronostic du cancer colorectal de part sa participation au développement macroscopique de la masse tumorale. De même dans 10 à 20% des cas du cancer colorectal une mutation de *BRAF* est observée et est également souvent associé à un mauvais pronostic. L'analyse de ces deux mutations montre leur présence dans la quasi-totalité des cas de ce type de cancer ce qui en font des marqueurs essentiels de bon ou mauvais pronostic selon leur degré de présence ou d'absence. (Sideris and Papagrigoriadis, 2014)

Une étude plus poussée a montré que des cas de tumeurs non porteuses de mutations sur les gènes *KRAS* et *BRAF* ne semblent pas réagir aux traitements dirigés contre l'EGFR. Dans ces cas là, 30 à 40% d'aberrations au niveau de *PIK3CA* (sous unité catalytique de *PI3K*) et

*PTEN* sont observées, expliquant en partie cette résistance. On a défini alors le type cancer colorectal quadruple négatif permettant d'identifier jusqu'à 70% des tumeurs les plus résistantes. (Sartore-Bianchi et al., 2009)

Certains types de cancer développent des compétences particulières à l'origine de caractéristiques communes à l'ensemble des cancers du même type. On cite le cas des mélanomes qui malgré une hétérogénéité génétique aussi importante que dans d'autres types de cancers suivent un schéma assez prévisible quant au lien de l'invasion cellulaire et du processus métastatique.

Les mélanomes regroupent l'ensemble des tumeurs malignes développées à partir d'une cellule cancéreuse clonale capable de synthétiser la mélanine. Il s'agit donc de tumeurs dérivant majoritairement de cellules de la peau, les mélanocytes (90% des cas) mais aussi dans une moindre mesure de cellules de l'œil ou des muqueuses de l'appareil génital. Dans 80% des cas de cancers de la peau, le mélanome se manifeste par l'apparition d'une tache pigmentée sur la peau saine. Dans les 20% des cas restants il y a modification d'un grain de beauté préexistant. Le développement métastatique est très souvent observé et notamment au niveau des ganglions lymphatiques les plus proches, du foie, des poumons et du cerveau.

Les mélanomes montrent un pouvoir métastatique important souvent cause de décès par ce type de cancer. Ce fort pouvoir métastatique s'explique tout d'abord par le fait que les cellules de mélanomes possèdent des antigènes communs aux cellules endothéliales, comme les N-cadherines par exemple, leur conférant une capacité à l'angiogénèse. Ces molécules de surface, appelées MCAM (melanoma cell adhesion molecule), confèrent également aux cellules de mélanomes une résistance au courant présent dans la circulation sanguine et leur donnent aussi une capacité d'extravasation. Elles sont particulièrement exprimées dans les stades avancés de mélanomes et notamment dans les stades métastatiques contrairement aux mélanocytes sains qui ne les expriment quasiment pas. Un gradient d'expression des *MCAM* est visible tout au long du processus tumoral dans les cas de mélanocytes : le taux d'expression est de 50% dans les stades les plus précoces, il atteint 70% lorsqu'il y a colonisation des régions lymphatiques les plus proches pour finir à un maximum de 90% au niveau des métastases les plus éloignées. Les cellules de mélanomes possèdent également un pouvoir de différenciation supérieur aux autres types de cellules

cancéreuses de cancers solides. Mais elles ont surtout un fort pouvoir d'adaptation aux microenvironnements qui les entourent et montrent des marqueurs caractéristiques des régions qu'elles envahissent, principalement le cerveau. (Braeuer et al., 2014)

Une stratégie de thérapie ciblée a également pu être développée dans le cas des mélanomes. En effet, en plus du fort pouvoir métastatique de ces cancers, il a été montré une mutation particulière au niveau de la protéine codée par le gène *BRAF* dans 40 à 60% des cas. Cette mutation, qui substitue une valine en acide glutamique en position 600 (V600E), est la première cible des traitements dirigés contre les mélanocytes cancéreux. Sont notamment utilisés des inhibiteurs des protéines BRAF alors activées constitutivement et pouvant transmettre des signaux permanents de croissance par la voie MAPK. (Papadatos-Pastos et al., 2013) (Gilks, 2014)

Enfin, la cellule cancéreuse peut également se servir d'outils extérieurs à la machinerie cellulaire pour acquérir les caractéristiques nécessaires à sa transformation. C'est le cas au niveau du cancer du col de l'utérus dont l'oncogène principal mis en cause est le papillomavirus humain (HPV). Ce virus est transmis principalement par voie sexuelle. Environ 10% des individus infectés développent une infection persistante dont approximativement 1% pourra progresser en cancer si la lésion n'est pas traitée. La fréquence du risque varie selon le type de virus concerné : les formes présentant le plus haut risque de transformation sont le HPV-16 et le HPV-18, ces deux formes étant responsables de plus de 70% des cas de cancers du col de l'utérus. (Andreassen and Vogt, 2014) Le risque de développement d'un cancer du col de l'utérus est directement lié au nombre de copies du virus dans la cellule. Ainsi l'analyse du taux d'ADN viral de l'HPV peut être un bon marqueur pour évaluer le risque de ce type de cancer. (Rahman et al., 2013)

### 1.3. Épidémiologie

#### 1.3.1. Épidémiologie des cancers

Le cancer est de nos jours la cause principale de mortalité dans le monde, la première des pays économiquement développés et la seconde cause de décès des pays en voie de développement. (Figure 5) Pathologie dite du sujet âgé car due à une incidence augmentant au cours de la vie, le poids des cancers est de plus en plus important dans les pays économiquement développés, ceci étant lié au vieillissement de leur population. Les modes

de vie occidentaux : tabac, sédentarité, inactivité physique, habitudes alimentaires sont aussi des facteurs de l'augmentation de l'incidence des cancers à l'échelle mondiale. (Jemal et al., 2011)

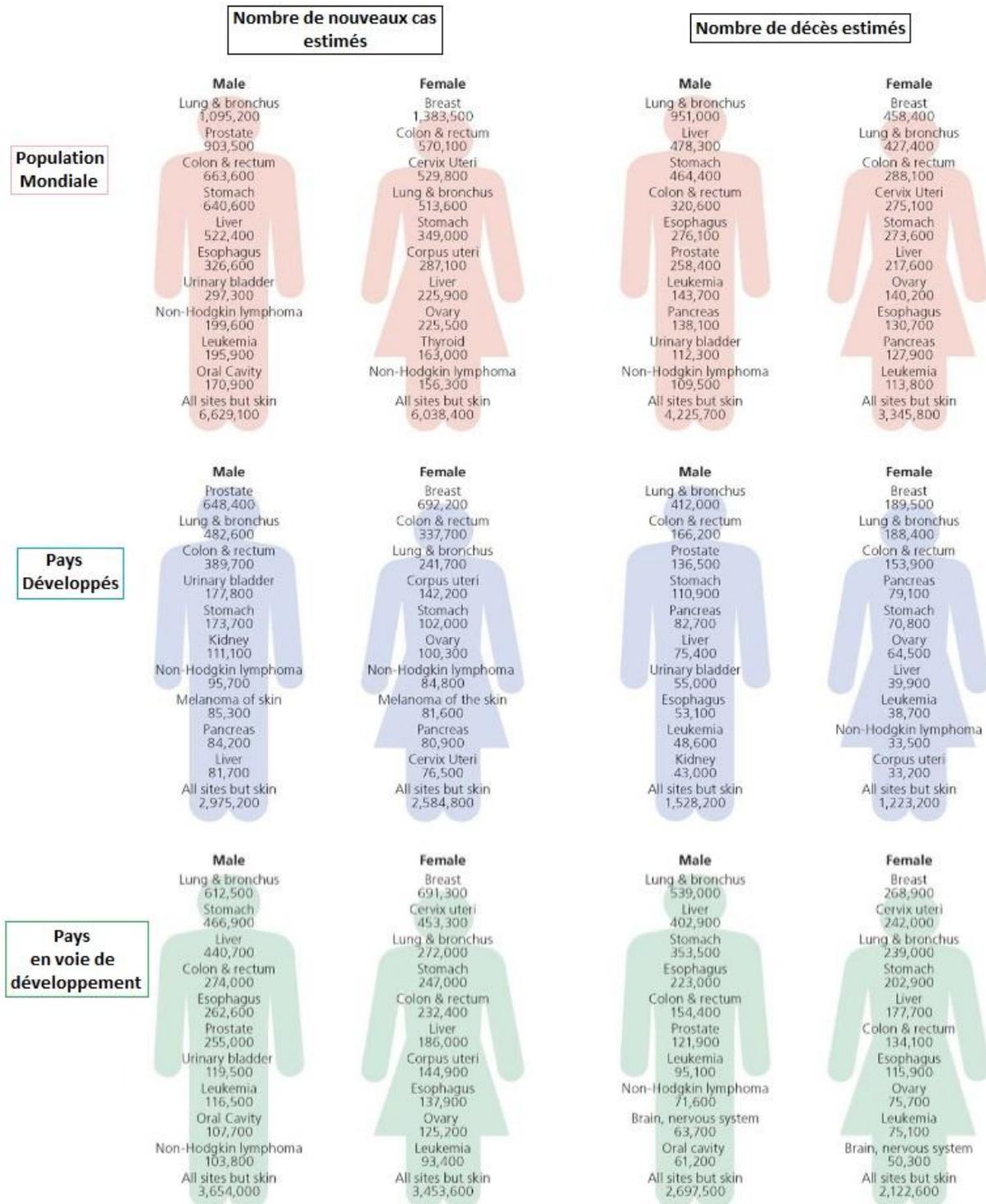


Figure 5 : Estimation du nombre de nouveaux cas de cancer et du nombre de décès par cancer au niveau mondial selon le niveau de développement économique (Jemal et al., 2011)

En 2008, 12,7 millions de nouveaux cas de cancer et 7,6 millions de décès par cancer ont été estimés avec une proportion respectivement de 56% et 64% au niveau des pays développés. Si le taux d'incidence du « tous cancers » est presque deux fois plus élevé chez les hommes et chez les femmes dans les pays développés par rapport au taux observé dans les pays en voie de développement, les différences en terme de mortalité sont moindres avec seulement un taux supérieur de 21% chez les hommes et de 2% chez les femmes. Cette différence peut être expliquée par le fait que le diagnostic est souvent réalisé plus tardivement dans les pays en voie de développement et donc à des stades plus tardifs et souvent plus invasifs et critiques. Ceci combiné à un accès plus difficile aux traitements augmente de façon significative le risque de mortalité au niveau de ces pays. (Sankaranarayanan et al., 2010)

Depuis 2004, le cancer est la première cause de décès en France sur l'ensemble de la population. Une différence est cependant notable si l'on étudie les hommes ou bien les femmes. En effet, si le cancer demeure la première cause de décès chez la population masculine française, les maladies cardio-vasculaires demeurent numéro un chez les femmes encore aujourd'hui.

En 2012 le nombre de nouveaux cas « tous cancers » en France Métropolitaine est évalué à 355 000 (200 350 chez les hommes et 155 004 chez les femmes) selon une étude réalisée sur 19 localisations de tumeurs solides invasives codées selon la classification internationale des maladies appliquées à l'oncologie. 148 000 décès par cancer ont été enregistrés dans la même année, 85 000 chez l'homme et 63 123 chez la femme.

Le cancer de la prostate reste de loin le plus fréquent chez l'homme avec 56 800 nouveaux cas répertoriés en 2012. Il se place devant le cancer du poumon et le cancer colorectal avec respectivement 28 200 et 23 200 nouveaux cas. En termes de mortalité le cancer du poumon prend la première place chez l'homme avec 21 300 décès enregistrés en 2012 devant le cancer colorectal (9 200 décès) et le cancer de la prostate (8 900 décès).

Chez la femme, le cancer du sein est largement devant en termes de fréquence avec 48 800 nouveaux cas en 2012. Il se place ainsi devant le cancer colorectal et le cancer du poumon pour lesquels ont été enregistrés respectivement 18 900 et 11 300 nouveaux cas dans la même année. Pas de changement au niveau de la mortalité, le cancer du sein reste le plus meurtrier chez la femme puisqu'il fut la cause de 11 900 décès en 2012. Cependant le cancer

du poumon se situe désormais à la seconde place avec 8 600 décès enregistrés, il se place juste devant les décès ayant pour origine le cancer colorectal (8 400). (Binder-Foucard et al., 2013)

L'étude de l'incidence et de la mortalité de chaque type de cancer au cours de ces 30 dernières années a permis d'identifier trois grands types d'évolution de ces cancers.

Il se distingue un large groupe pour lequel est observé une augmentation de l'incidence et une diminution de la mortalité. Cette augmentation d'incidence est l'effet combiné de la diminution d'incidence des cancers de mauvais pronostic et l'augmentation d'incidence des cancers de meilleur pronostic. Dans ce premier groupe se retrouvent donc des cancers pour lesquels des détections et des dépistages précoces sont possibles et réalisés comme c'est le cas pour le cancer du sein ou le cancer de la prostate. A noter que cette tendance à l'augmentation de l'incidence due au diagnostic précoce s'est ralentie voire inversée ces dernières années par un épuisement du réservoir des cancers dits dépistables.

Si un groupe majoritaire est ressorti de cette étude de l'évolution de l'incidence et de la mortalité, deux autres profils supplémentaires ont été observés.

Le second profil regroupe des cancers qui montrent une évolution favorable avec une diminution combinée de l'incidence et de la mortalité. Ce profil regroupe des cancers pour lesquels une sensibilisation à certaines habitudes alimentaires ou mode de vie ou bien, encore une fois, des dépistages précoces ont pu diminuer le nombre d'incidence de ces cancers. Avec une détection à des stades précoces le taux de survie et *a fortiori* le taux de mortalité se sont vus diminuer. C'est le cas du cancer de l'estomac, de l'œsophage, du pharynx ou du col de l'utérus.

Enfin, un troisième et dernier groupe, au contraire, a permis d'identifier des cancers aux pronostics plus pessimistes puisqu'ils présentent à la fois une augmentation de l'incidence et de la mortalité. C'est le cas du cancer du poumon, de loin le plus meurtrier et le moins favorable sur l'ensemble de la population. De plus, une part de l'augmentation de l'incidence et de la mortalité de ce cancer s'explique par une augmentation toujours en hausse des deux paramètres chez la femme : +5% d'augmentation de l'incidence par an et +4% pour la mortalité. (Binder-Foucard et al., 2013)

### 1.3.2. Epidémiologie du cancer du poumon

Bien qu'il existe des différences selon les différentes régions du globe et en particulier entre les pays développés et les pays dits en voie de développement, le cancer du poumon reste une pathologie très représentée au niveau mondial avec un diagnostic tardif et un taux de survie bas. A l'échelle planétaire, le cancer du poumon est le plus représenté en termes de diagnostic depuis l'année 1985 tous âges et sexes confondus. Il est le plus représenté chez les hommes ainsi que le plus meurtrier. Chez les femmes il est au rang 4 des cancers les plus diagnostiqués et à la seconde place des causes de décès par cancer derrière le cancer du sein. Le cancer du poumon représentait 13% des cas de cancers mondiaux soit 1,6 millions et 18% des décès par cancers soit 1,4 millions en 2008. (Jemal et al., 2011)

En France, en 2012, 39 495 nouveaux cas de cancer du poumon ont été estimés dont 71% survenant chez l'homme. Cela le place au quatrième rang des 19 localisations de tumeurs solides examinées. Le pic d'incidence est atteint dans la catégorie des hommes âgés de 70 à 74 ans. Avec 29 949 décès enregistrés dans cette même année, 71% chez les hommes, le cancer du poumon est en première place en terme meurtrier sur les 19 localisations.

Les études de tendances réalisées sur ces dernières trois décennies montrent une évolution stable de l'incidence chez les hommes allant même jusqu'à une baisse du taux d'incidence standardisé constaté depuis près de 10 ans. Chez la femme la tendance est tout autre avec une forte augmentation de l'incidence durant cette même période : le taux d'incidence standardisé croît de 5,3% par an depuis 1980 et de 5,4% par an depuis 2005.

L'étude des tendances au niveau de la mortalité montre une plus large différence encore entre hommes et femmes. En effet si la mortalité chez l'homme a globalement diminué entre 1980 et 2012 avec une diminution annuelle moyenne de 0,5% entre 1980 et 2012 et de 2,2% entre 2005 et 2012. Chez la femme en revanche, la mortalité augmente de façon similaire à l'incidence avec une augmentation annuelle de 4,6%. (Binder-Foucard et al., 2013)

Les tendances d'incidence et de mortalité et leur différence selon les sexes observés en France sont également observés dans la plupart des pays développés comme les Etats-Unis. (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011)

Les variations du taux de cancer du poumon observés entre pays, sexes ou encore classes d'âges sont principalement reliées aux différents usages de tabac et au degré de consommation de ce dernier. Le tabac est une cause principale chez 80% des patients masculins et chez au moins 50% des femmes. (Alberg et al., 2013) La géographie et les différences homme/femme observées dans les données épidémiologiques du cancer du poumon reflètent donc avant tout les diverses phases de propagation épidémique du tabagisme dans les populations.

### 1.3.3. Etiologie du cancer du poumon

A partir des années cinquante et soixante plusieurs études de cas associant tabagisme et cancer du poumon ont conclu sur le rôle principal du tabac comme facteur de risque numéro un dans le cancer du poumon. (Wynder and Graham, 1950) (Doll and Hill, 1954) (Cornfield et al., 1959) Depuis, la relation entre le tabac et le cancer du poumon est étudiée et il a été montré combien il était facile de prédire les évolutions de l'incidence et de la mortalité de ce cancer particulier en fonction de la prévalence du tabac.

Cependant, dire que le cancer du poumon est uniquement dû au tabagisme serait une vision trop simpliste. D'autres déterminants autres que le tabac ont été également identifiés et notamment l'exposition à certains facteurs environnementaux. Même si leur impact est relativement moindre en comparaison du tabac, le contrôle des expositions à ces différents facteurs a permis de fortement diminuer la part de cancers du poumon dont ils étaient la cause. L'exposition au radon, ou plus particulièrement aux produits de désintégration radioactifs de ce gaz dans les habitations, est considéré comme le facteur de risque le plus important derrière le tabagisme. Il est estimé comme étant responsable de 9% des décès par cancer du poumon en Europe. (Darby et al., 2005) En plus de l'influence de certaines pathologies préexistantes touchant le poumon ; tuberculoses ou pneumonies, des composés industriels ou chimiques carcinogènes comme l'amiante, la silice ou l'arsenic ont aussi été montrés comme des facteurs augmentant les risques de développement du cancer du poumon. (Whitrow et al., 2003) (Youlten et al., 2008)

Un autre groupe de déterminants est observé dans les pays en voie de développement d'Asie et d'Afrique où le taux élevé de cas du cancer du poumon chez les non-fumeurs, principalement des femmes, suggère d'autres facteurs de risques. En plus du tabagisme

passif, également observé dans les pays développés, les femmes chinoises sont exposées aux vapeurs de cuisine à l'huile (cuisine au wok) et aux fumées de feu de cuisine à l'intérieur des habitations. Ceux-ci, combinés à un mauvais système d'évacuation sont aussi à prendre en compte dans l'origine des cancers du poumon dans ces régions : Taiwan, Shanghai, Shenyang et Honk Kong. (Lam et al., 2004)

La cause principale des cancers du poumon qu'est le tabagisme ne concerne pas seulement les fumeurs. A partir des années 80 un nombre important d'études montre les effets néfastes d'une exposition aux environnements fumeurs ou ETS (environmental tobacco smoke) sur le cancer du poumon. (Saracci and Riboli, 1989) Il a été alors démontré l'association néfaste entre le tabagisme passif et le cancer du poumon. (Kalandidi et al., 1990) Plusieurs travaux ont depuis été réalisés avec des études de cas sur des cohortes de personnes vivant dans un milieu tabagique : non-fumeurs et anciens fumeurs. En plus de la confirmation du plus haut risque de développer un cancer du poumon chez ce type de personne, il a été observé que les anciens fumeurs (ayant arrêtés de fumer depuis 10 ans) avaient un risque accru par rapport aux non-fumeurs, certainement à cause de mutations préexistantes. L'absorption de substances cancérigènes durant l'enfance est également un facteur de risque dans le développement de ce cancer. (Vineis et al., 2005)

Toutes ces observations ont conduit des pays comme la France à l'adoption de campagne visant à lutter à sensibiliser les populations contre le tabagisme. L'étude de la baisse de consommation des cigarettes et son effet sur les maladies pulmonaires a montré ces dernières années de façon évidente une diminution nette du risque de cancer du poumon chez les personnes ayant arrêté de fumer. (Lee, 2013)

Approximativement 1,3 milliards de personnes fument dans le monde de nos jours et plus de 5 millions meurent des causes de la cigarette chaque année. Ce qui fait du tabac la première cause de mortalité évitable. La diminution de la consommation de tabac dans les pays développés n'est malheureusement pas observée dans les pays en voie de développement où la consommation de cigarettes continue d'augmenter. En effet, un tiers des fumeurs se situe en Chine avec une estimation d'un fumeur sur trois dans ce pays à partir de l'âge de 15 ans. Malgré la forte différence observée selon le sexe : 66% des hommes sont fumeurs contre 3% des femmes, 70% des chinois vivent dans une atmosphère chargée en fumée

provenant du tabac, à l'origine de la forte proportion de maladies pulmonaires recensées avec pour conséquence une prédiction de 8 millions de décès mettant en cause la consommation de tabac d'ici 2030. (Yang et al., 2010)

De part sa forte fréquence et surtout sa sévérité, dans plus de 50% des cas le diagnostic est réalisé au stade métastatique, le cancer du poumon est un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale comme française.

### **1.4. Le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules**

La grande majorité des tumeurs pulmonaires sont des carcinomes dérivant le plus souvent de l'épithélium stratifié des bronches dits carcinomes à cellules squameuses. Les autres carcinomes pulmonaires sont issus de l'épithélium des petites voies aériennes pour les adénocarcinomes ou bien des alvéoles terminales dans le cas des carcinomes bronchiolo-alvéolaires.

Les tumeurs pulmonaires primaires sont divisées en deux groupes opposés à savoir les cancers du poumon non à petites cellules représentant environ 85% des cas et les cancers du poumon à petites cellules regroupant les 15% restants. D'autres types non communs existent comme les tumeurs carcinoïdes (0,8%) ou les carcino-sarcomes (0,1%). (Favoni and Alama, 2013)

Les cancers du poumon à petites cellules se caractérisent par un taux de dédoublement cellulaire rapide, une dissémination vers les ganglions lymphatiques rapide et une propagation vers des sites distants. Le taux de survie à 5 ans déjà faible pour l'ensemble des cancers pulmonaires (16%) chute encore pour le seul groupe des cancers du poumon à petites cellules. Il est compris entre 5 et 10%. Malgré une bonne réponse initiale à la chimiothérapie et aux radiations, la survie moyenne après diagnostic de ce type de cancers n'est que de 2 à 4 mois.

Le cancer du poumon non à petites cellules est un groupe composé également de différents types histologiques : les adénocarcinomes (35-40%), les carcinomes épidermoïdes (25-30%) et les carcinomes à cellules indifférenciées (10-15%).

### 1.4.1. Classification TNM du cancer broncho-pulmonaire

La classification TNM fut pour la première fois publiée par l'Union International Contre le Cancer (UICC) en 1968 dans le but d'uniformiser les normes de références à l'échelle mondiale. Les avancées de l'imagerie et des techniques de diagnostic comme la tomodensitométrie, la tomographie par émission de positons, l'imagerie par résonance magnétique ou l'échographie endobronchique ont permis de poser les bases solides de la septième édition publiée en 2009 et révisée en 2010. Le caractère T (pour « *tumor* » soit tumeur) est défini par la taille et l'ampleur de la tumeur primaire. Le caractère N (pour « *node* » soit ganglion) permet de juger l'ampleur de l'envahissement des ganglions lymphatiques les plus proches de la tumeur. Enfin, le caractère M (pour « *metastasis* » soit métastases) renseigne sur l'envahissement par les métastases de la région du thorax ou de sites plus distants de la tumeur primaire. L'intégralité de la classification est présentée dans les tableaux 1 et 2. Une huitième édition est prévue pour 2016. (Chheang and Brown, 2013)

<b>T (tumeur primaire)</b>	
TX	Tumeur primaire ne pouvant être évaluée, ou tumeur révélée par la présence de cellules malignes dans les crachats ou les sécrétions bronchiques mais invisible par imagerie ou bronchoscopie
T0	Aucune tumeur primaire mise en évidence
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1	Tumeur ≤ 3 cm de diamètre, entourée par du tissu pulmonaire ou de la plèvre viscérale sans aucune évidence d'invasion bronchique plus proximale que la bronche lobaire (ou bronche souche)
T1a	Tumeur ≤ 2 cm de diamètre
T1b	Tumeur > 2 cm mais ≤ 3 cm de diamètre
T2	Tumeur > 3 cm mais ≤ 7 cm de diamètre, ou bien tumeur présentant l'une des caractéristiques suivantes : tumeur envahissant la bronche souche, à 2cm ou plus de distance de la carène, associée à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive s'étendant jusqu'à la région du hile mais n'impliquant pas l'ensemble du poumon
T2a	Tumeur > 3 cm mais ≤ 5 cm de diamètre
T2b	Tumeur > 5 cm mais ≤ 7 cm de diamètre
T3	Tumeur > 7 cm ou ayant envahie l'une des régions suivante : la paroi thoracique (y compris les tumeurs de l'apex), le diaphragme, le nerf phrenic, la plèvre médiastinale ou le feuillet pariétal du péricarde, ou bien une tumeur située à moins de 2 cm de la carène sans envahissement de celle ci, ou associée à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive impliquant l'intégralité du poumon ou plusieurs nodules tumoraux distincts dans le même lobe pulmonaire
T4	Tumeur quelque soit sa taille envahissant l'une des régions suivantes : le médiastin, le cœur, les gros vaisseaux, la trachée, le nerf laryngé récurrent, l'œsophage, un corps vertébral, la carène ou plusieurs nodules tumoraux distincts touchant des lobes différents homolatéraux
<b>N (Ganglions lymphatiques régionaux)</b>	
NX	Atteinte des ganglions lymphatiques régionaux ne pouvant être établie
N0	Pas de métastases au niveau des ganglions lymphatiques régionaux
N1	Présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques péribronchiques ou hilaires homolatéraux incluant les prolongements directs
N2	Métastases touchant les ganglions lymphatiques médiastinaux et subcarinaux homolatéraux
N3	Métastases présentes dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ou hilaires contrelatéraux, dans les ganglions lymphatiques scalènes homolatéraux ou contrelatéraux, ou les ganglions lymphatiques sus-claviculaires
<b>M (Métastases à distance)</b>	
MX	Présence de métastases à distance ne pouvant être établie
M0	Pas de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance
M1a	Nodules tumoraux distincts dans le lobe contrelatéral, tumeur avec nodules pleuraux ou un épanchement pleural ou péricardique malin
M1b	Présence de métastases à distance

Tableau 1 : 7ème édition de la Classification TNM du Cancer du Poumon (Goldstraw et al., 2007) (Chheang and Brown, 2013)

Stades	Classification TNM		
Cancer occulte	TX	N0	M0
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1a-b	N0	M0
Stade IB	T2a	N0	M0
Stade IIA	T2b	N0	M0
	T1a-b	N1	M0
Stade IIB	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
Stade IIIA	T3	N0	M0
	T1a-b/T2A-b	N2	M0
	T3	N1/N2	M0
Stade IIIB	T4	N0/N1	M0
	T4	N2	M0
Stade IV	tout T	N3	M0
	tout T	tout N	M1

Tableau 2 : Classification des sous catégories TNM par stade (Goldstraw et al., 2011)

### 1.4.2. Les traitements

Le traitement du cancer du poumon implique différentes approches selon le stade de la maladie, sa propagation et le statut du patient. Trois grands groupes de thérapies sont disponibles pour lutter contre le cancer du poumon : la chirurgie, la radiation et la chimiothérapie.

La chirurgie, quand elle est possible, est la première approche contre le cancer du poumon non à petites cellules lorsqu'il reste localisé. Lorsqu'un stade avancé est diagnostiqué c'est la thérapie par radiation accompagnée d'une chimiothérapie qui sera proposée. Enfin, la chimiothérapie ciblée est envisagée pour les stades très avancés. Cependant le cancer du poumon à petites cellules semble plus réceptif à ce type de thérapie que le cancer du poumon non à petites cellules. (Favoni and Alama, 2013)

#### 1.4.2.1. La thérapie par chirurgie

La chirurgie reste la meilleure option de guérison pour les patients pour lesquels un cancer du poumon a été diagnostiqué. Cependant, pour que cette option soit efficace, deux conditions sont nécessaires : la tumeur doit pouvoir être résécable et le patient doit pouvoir être capable de supporter l'intervention chirurgicale. La possibilité ou non de réséquer complètement la tumeur est jugée par différentes méthodes préopératoires d'imageries et par biopsie. La capacité du patient à supporter l'intervention est basée quant à elle sur le patient lui-même et sur l'approche permettant au mieux de minimiser les risques et la

morbidité chirurgicale. La chirurgie joue un rôle majeur dans l'établissement du diagnostic, dans l'évaluation du stade des cancers du poumon, dans le traitement curatif ainsi que dans les soins palliatifs.

La médiastinoscopie et les biopsies de ganglions lymphatiques médiastinaux furent longtemps utilisées dans le diagnostic des cancers du poumon ainsi que dans l'évaluation des stades. Cependant, la plus en plus grande utilisation de la tomographie à émission de positons (TEP) tout comme le développement de l'échographie endoscopique ont commencé à la remplacer progressivement.

Le traitement chirurgical du cancer du poumon en tant que remède potentiel reste dépendant de la capacité à pouvoir réaliser une résection complète. La stratégie principale reste une lobectomie totale lorsque le patient peut la supporter. Ceci s'appuie sur des observations montrant une augmentation de la survie à long terme et une baisse de la récurrence locale sur les patients ayant subi une lobectomie totale comparé à ceux ayant des résections limitées. (Ginsberg and Rubinstein, 1995) Des études pour déterminer si la lobectomie totale était nécessaire dans le cas de plus petites tumeurs (< 2 cm) et sans colonisation des ganglions lymphatiques ont été réalisées. (Okada et al., 2005) Mais les résultats aléatoires selon les cas ont laissé à la lobectomie totale sa place de traitement chirurgical privilégié dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules. Cette dernière détenant en plus un faible taux de mortalité opératoire de 1,3%. (Allen et al., 2006)

Les avancées techniques ont permis de développer la résection pulmonaire assistée par vidéo par accès thoracoscopique (résection pulmonaire VAST). Cette méthode moins invasive que la chirurgie ouverte permet les mêmes possibilités avec un taux de survie à long terme identique. Elle permet donc à certains patients non candidats aux lobectomies classiques, de par les risques et le taux de morbidité, de subir des résections moins invasives. Ainsi des patients plus âgés subissent de plus en plus ce genre d'actes avec une réussite et un taux de survie tout à fait significatifs.

### ***1.4.2.2. La thérapie par radiation***

La dose et le fractionnement retenus pour l'usage standard de la thérapie par radiation (rayons X et électrons) sur des stades III de cancer du poumon non à petites cellules, stades inopérables, sont 60 Gray (Gy) sur 30 séances quotidiennes. L'utilisation seule de la

radiothérapie permet une survie moyenne de 10 mois et un taux de survie à 5 ans de 5%. Plusieurs études ont montré une augmentation de ce taux de survie en cas d'utilisation de la radiothérapie avec une chimiothérapie à base de cisplatine, le taux étant meilleur si les deux thérapies sont utilisées conjointement plutôt que l'une après l'autre.

Dans le cas des petites tumeurs (T1-2, N0, M0) une thérapie par radiation ciblée sur la masse cellulaire peut être envisagée : il s'agit de la radiothérapie stéréotaxique. Cette technique cible donc de façon précise la masse tumorale, grâce à l'imagerie, et utilise des doses plus fortes de l'ordre de 100 Gy et moins fractionnées (5 doses au lieu de 30). Un fort taux de survie à 2 ans sans progression locale de 90% a été observé pour les stades I de cancers du poumon non à petites cellules. (Molina et al., 2008)

### *1.4.2.3. La chimiothérapie*

Près de 70% des patients atteints du cancer du poumon présentent un stade avancé localement ou bien métastatique au moment du diagnostic. La chimiothérapie est bénéfique pour les soins palliatifs dans ces cas-là. Une chimiothérapie adjuvante est elle indiquée pour les patients ayant subi une résection de stade IIA à IIIA du cancer du poumon non à petites cellules.

Le risque de rechute chez les patients dans les premiers stades du cancer du poumon non à petites cellules ayant subi une résection est élevé. Malgré une chirurgie bien réalisée, le taux de survie à 5 ans des patients après résection des tumeurs reste entre 25 et 73% selon les stades. Avec une diminution de 13% du risque de mortalité, il a été montré dès 1995 un effet bénéfique de 5% sur le taux de survie à 5 ans des patients ayant reçu une chimiothérapie adjuvante. (Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group et al., 1995) Plus récemment, l'étude de chimiothérapies adjuvantes à base de cisplatine a confirmé ces résultats avec une augmentation de 5,3% du taux de survie à 5 ans. Le taux de survie sans maladie est également augmenté à 5,2% à 5 ans. (Pignon et al., 2008) En termes de stades des tumeurs traitées, un effet négatif est observé pour les stades IA, la réduction du risque de rechute est de 8% pour le stade IB et de 17% pour les stades II et III. Le traitement par chimiothérapie en préopératoire offre plusieurs avantages : dans 50% un passage au stade inférieur est observé permettant parfois une résection complète. De plus, la chimiothérapie permet de contrer les micro-métastases.

Il a été démontré l'effet bénéfique de la chimiothérapie systémique par rapport aux soins palliatifs dans les cas avancés et métastatiques de cancer du poumon. La chimiothérapie à base de platine est maintenant acceptée comme traitement standard dans ce genre de cas. Des agents tels que le paclitaxel (Taxol®), le docétaxel (Taxotère®), la gemcitabine (Gemzar®) ou la vinorelbine (Navelbine®) sont également inclus dans ces thérapies à base de platine. L'utilisation de plus de deux molécules en chimiothérapie n'induit cependant pas d'effets cliniques bénéfiques.

Ces cocktails de chimiothérapie demeurent avant tout des traitements utilisés pour une meilleure qualité de vie des patients puisque seule une modeste augmentation de la survie est observée. Au vu, du mauvais pronostic, du taux élevé de mortalité et d'une survie à 5 ans faible (environ 15%) présentée par les patients du cancer du poumon non à petites cellules la recherche de nouveaux traitements s'est dirigée vers des traitements plus ciblés et plus efficaces pour améliorer les résultats.

### **1.5. La thérapie ciblée**

Le cancer du poumon non à petites cellules reste aujourd'hui très résistant envers les thérapies classiques. La première génération de chimiothérapie développée dans les années soixante-dix (doxorubicin (Adriblastine®), méthotrexate, vincristine (Oncovin®)) était quasiment inefficace. Parmi les traitements de seconde génération introduits dans les années quatre-vingt (cisplatine, étoposide (Etopophos®), vinblastine (Velbe®)) seules les chimiothérapies à base de cisplatine, présentant les meilleurs effets bien que faibles, restent encore aujourd'hui une approche de choix dans la plupart des cas. Enfin, l'association de cisplatine avec la troisième génération de chimiothérapie (gemcitabine (Gemzar®), taxanes) approuvée dans les années quatre-vingt-dix est utilisée dans le monde entier dans le cas de cancers du poumon non à petites cellules malgré les effets modestes sur la survie des patients.

Ce constat a engendré le développement de nouvelles stratégies de thérapies basées sur la compréhension des voies moléculaires utilisées dans la carcinogenèse au niveau broncho-pulmonaire. C'est ainsi qu'ont émergé, ces dernières années, de nombreuses nouvelles molécules ou agents biologiques ciblant les acteurs du développement tumoral.

### 1.5.1. Les voies de signalisation perturbées

Les mutations génétiques observées dans les cancers du poumon non à petites cellules, tout comme pour la plupart des autres types de cancers, se retrouvent sur des gènes clés de la régulation : oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. Plus de 100 oncogènes et 10 suppresseurs de tumeurs sont connus aujourd'hui pour être en association avec le développement de cancers du poumon. (Tableau 3) Les modifications moléculaires les plus communes du cancer du poumon non à petites cellules concernent pour les oncogènes la famille *RAS*, *MYC*, *Bcl-2*, *l'IGF-1* (insulin growth factor 1) et *l'EGFR* ainsi que *RB* et *TP53* pour les gènes suppresseurs de tumeurs.

Oncogènes	Gènes Suppresseurs de Tumeurs
Ras	p53
EGFR (Erb-B1/HER-2)	Rb
IGF-1	p16
myc	3p
raf	9p
sis	FHIT
fes	p21
Bcl-1	PTEN
Bcl-2	

**Tableau 3: Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs altérés/surexprimés dans le cancer du poumon non à petites cellules (Favoni and Alama, 2013)**

### 1.5.2. La chimiothérapie associée à la thérapie ciblée

Comme pour d'autres cancers, l'altération de grandes voies de signalisation cellulaire ainsi que leur régulation est très fréquente dans le cancer du poumon par surexpression ou variation de la séquence d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces modifications génétiques touchent principalement les récepteurs à tyrosine kinase comme *l'EGFR* ou bien les voies de l'apoptose, du cycle cellulaire, de la régulation du protéasome parmi d'autres...

Contrairement aux cancers du poumon à petites cellules où la surexpression de *EGFR* n'est observée que dans une minorité de cas (0 à 5%) la surexpression ou l'activation anormale de ce gène sont présentes dans 40 à 80% des cas de cancer du poumon non à petites cellules. De plus, elles sont associées à un mauvais pronostic. *EGFR* joue ici un rôle important dans la

croissance cellulaire, l'invasion, l'angiogenèse, le processus métastatique mais aussi dans le pronostic, la réponse au traitement et la résistance aux chimiothérapies.

Ces vingt dernières années deux grandes catégories de molécules ont été développées pour contrer cette activation des récepteurs à l'EGF dans le cancer du poumon : les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKIs) et les anticorps monoclonaux (mAbs). Les anticorps monoclonaux tels que le cetuximab (Erbix®), IgG1 humaine) ou le panitumumab (Vectibix®, IgG2 humaine) se fixent au domaine extracellulaire des récepteurs empêchant la fixation du ligand à son récepteur à l'origine de l'activation de ce dernier. Les inhibiteurs de tyrosine kinase, quant à eux, bloquent l'autophosphorylation de ces domaines. Le gefitinib (Iressa®) ou l'erlotinib (Tarceva®) sont par exemple deux molécules synthétiques d'inhibiteurs de tyrosine kinase de la famille des anilinoquinazolines. Elles empêchent l'ATP de se fixer au domaine tyrosine kinases des récepteurs EGFR à l'origine de la cascade de signalisation cellulaire. (Favoni and Alama, 2013)

Plusieurs études cliniques ont été réalisées pour ces deux molécules dans le cas des cancers du poumon. Malheureusement il n'a pas été montré d'effets bénéfiques du gefitinib (Iressa®) sur la survie par rapport à un placebo sur l'ensemble des patients testés ou bien ceux présentant un adénocarcinome. Seule la population asiatique et non-fumeur a montré un bénéfice de cette molécule par rapport au placebo sur la survie. (Thatcher et al., 2005) Comme pour le gefitinib (Iressa®), une meilleure réponse à l'erlotinib (Tarceva®) dans certaines catégories de patients a été observée : il s'agit en particulier de patients féminins, de non-fumeurs, présentant un adénocarcinome et de personnes d'origine asiatique. Des recherches ont été faites pour connaître les raisons de ces réponses supérieures aux thérapies ciblées contre les récepteurs à l'EGF. Une relation a été faite entre certaines mutations activatrices du domaine tyrosine kinase de l'*EGFR* et les réponses cliniques positives au gefitinib (Iressa®). Ainsi les tumeurs présentant des mutations sur l'exon 19 induisant une délétion des acides aminés 4-6 (D746-750) et des mutations au niveau de l'exon 21 responsables d'une substitution L858Q répondront au mieux à ce type de traitement. Ce qui suggère que les adénocarcinomes chez les non-fumeurs, par exemple, constituent un groupe distinct de cancers du poumon, porteur de mutations spécifiques au niveau des domaines à tyrosine kinase des récepteurs EGFR, associé à une sensibilité aux traitements par gefitinib (Iressa®) et erlotinib (Tarceva®). (Molina et al., 2008)

D'autres types d'inhibiteurs ont également été développés. Ils sont dirigés contre le facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) et ses récepteurs VEGFRs dont l'activation est suffisante pour induire les processus de mitogenèse, d'angiogenèse et de perméabilité vasculaire. Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal ciblant le VEGF dont l'utilisation conjointe avec le carboplatine et le paclitaxel (Taxol®) a permis l'augmentation de la survie chez les patients atteints de cancers du poumon non petites cellules non issus de cellules squameuses. (Johnson et al., 2004) Le risque accru d'hémoptysie dans les cas de cancers issus de cellules squameuses permet également de comprendre l'utilisation préférentielle de ce traitement dans les cas de cancers du poumon d'origine non squameuse.

### 1.5.3. Vers une thérapie de plus en plus ciblée

Le profil moléculaire des tumeurs jusqu'ici ignoré pour la stratégie de traitement devient donc de plus en plus crucial dans la décision thérapeutique du cancer du poumon non à petites cellules. L'avancée majeure fut ensuite de pouvoir caractériser le leader de la transformation cellulaire (appelés « *drivers* » *genetic alteration* en anglais) de la cellule cancéreuse clonale à l'origine des tumeurs. (Tableau 4) Le ciblage de ces altérations génétiques primaires par différents procédés a déjà permis d'observer des bénéfices cliniques significatifs. (Figure 6) Les deux altérations majeures bénéficiant déjà de traitements disponibles en clinique sont les mutations au niveau de l'*EGFR* et les réarrangements du gène *ALK*. D'autres altérations génétiques sur les oncogènes *KRAS*, *BRAF*, *HER2* et *c-MET* sont également pris pour cibles par des traitements toujours en essai clinique à ce jour. (Gadgeel, 2013)

Gène Voie de signalisation	Statut fumeur	Histology	Altérations génétique
EGFR	non fumeur	adénocarcinomes	mutations
ALK	non fumeur	adénocarcinomes	translocations
Kras	fumeur	adénocarcinomes	mutations
ROS1	non fumeur	adénocarcinomes	translocations
RET	non fumeur	adénocarcinomes	translocations
Her2	non fumeur	adénocarcinomes	mutations amplifications
Braf	fumeur	adénocarcinomes carcinomes squameux	mutations
c-MET		adénocarcinomes carcinomes squameux	surexpression amplifications mutations
PI3K	< fumeur	adénocarcinomes carcinomes squameux	perte PTEN amplifications mutations mutations AKT
FGFR1	fumeur	carcinomes squameux	amplifications
DDR2	fumeur	carcinomes squameux	mutations

**Tableau 4 : Altérations génétiques principales des tumeurs selon leur type histologique dans le cancer du poumon non à petites cellules (driver genetic alteration) (Gadgeel, 2013)**

Tout comme EGFR, MET est un récepteur transmembranaire à tyrosine kinase activé par un ligand : le HGF (hepatocyte growth factor). L'activation de MET est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires comme la motilité, la survie ou la prolifération cellulaire. La surexpression de *MET* et de son ligand *HGF* est connue dans le cancer du poumon non à petites cellules mais des cas de mutations ou d'amplification du gène *MET* sont également documentés. Le caractère oncogénique de ces mutations n'est pas encore bien décrit. Cependant elles joueraient un rôle dans la résistance aux inhibiteurs EGFR-TKIS dans les cas de cancers du poumon non à petites cellules porteurs de mutations *EGFR*. (Turke et al., 2010)

Des essais cliniques ont été réalisés pour évaluer l'effet combiné d'inhibiteur MET, comme l'anticorps humanisé MetMAB, et l'erlotinib (Tarceva®). Aucune différence de survie n'a été visible sur l'ensemble des patients participants à l'essai clinique. Cependant, pour les patients présentant les mutations *MET* (52% des cas) la survie sans progression de la tumeur (PFS) ainsi que la survie globale était significativement meilleure que dans le cas d'un

traitement par l'erlotinib (Tarceva®) seul. Les patients n'ayant pas de mutations *MET* présentaient en revanche un taux de survie moins élevé avec un traitement combiné. (Spigel et al., 2011)

ALK est également un récepteur à tyrosine kinase mais appartenant à la superfamille des récepteurs à insuline. Chez l'Homme son expression est restreinte à quelques tissus nerveux, au petit intestin et aux testicules. Il n'est généralement pas exprimé au niveau du poumon. Cependant, une activation de ALK a été identifiée dans plusieurs pathologies ces dernières décennies et parmi elles le cancer du poumon. C'est ainsi que l'altération génétique qu'est la translocation du gène *ALK* est devenue la seconde cible identifiée dans le cancer du poumon. Dans la majorité des cas de cancers du poumon non à petites cellules le réarrangement du gène *ALK* se fait par inversion avec le gène partenaire *EML4* ; les deux gènes sont présents sur le chromosome 2. La protéine chimérique résultante a montré des caractéristiques oncogéniques. Plusieurs versions de cette protéine existent selon le lieu de la translocation au sein du gène *EML4*. (Solomon et al., 2009) Environ 5% des adénocarcinomes pulmonaires présentent ce réarrangement du gène *ALK*. Le traitement inhibiteur ALK approuvé à ce jour pour les patients de cancers du poumon non à petites cellules *ALK* positifs est le crizotinib (Xalkori®). (Gadgeel, 2013)

Tout comme les mutations *EGFR*, les réarrangements *ALK* se retrouvent majoritairement chez les patients non-fumeurs ayant développé un adénocarcinome. De plus, il est rare de voir les deux types de mutations : *EGFR* et *ALK*, au sein d'une même tumeur.

Autre cible thérapeutique possible, le récepteur *ROS1* à tyrosine kinase (RTK) qui se rapproche de la famille des récepteurs à insuline et donc partage une certaine homologie avec *ALK*. *ROS1* peut activer les voies de signalisation de *PI3K*, *ERK/MEK* et *stat3* augmentant ainsi la prolifération cellulaire, l'invasion et les effets anti-apoptotiques. Il a été observé une activation de ce gène par réarrangement au niveau du cancer du poumon non à petites cellules dans environ 2% des cas. Ce réarrangement, pouvant s'effectuer avec différents partenaires, est à l'origine d'une protéine chimérique possédant le domaine à tyrosine kinase de *ROS1* constitutivement activé et donc oncogénique. Les mutations de *ROS1* sont observées chez le même type de patients que pour *ALK* : les patients les plus jeunes, non-fumeurs et présentant un adénocarcinome.

De part l'homologie constatée entre *ROS1* et *ALK*, en particulier dans le domaine à tyrosine kinase, la capacité de l'inhibiteur *ALK*, crizotinib (Xalkori®), à également inhiber l'activation *ROS1* a été évaluée. Les premiers résultats montrent un effet bénéfique du crizotinib (Xalkori®) qui semble donc être le traitement privilégié pour les patients de cancers du poumon présentant un réarrangement au niveau de *ROS1*. (Shaw et al., 2012)

Présentes dans environ 20% des cas de cancers du poumon non à petites cellules, les mutations au niveau du gène *KRAS* se retrouvent principalement chez les patients fumeurs et préférentiellement dans les cas d'adénocarcinomes. La protéine codée par le gène *KRAS* possède une fonction régulatrice GDP/GTP (guanosine diphosphate/guanosine triphosphate); la forme Ras-GTP étant la forme active et Ras-GDP la forme inactive. Les mutations de substitutions au niveau acides nucléiques dans les codons 12, 13 (glycine) et 61 (glutamine) induisent des protéines insensibles à la GTPase et donc en permanence sous leurs formes actives liées au GTP. Plusieurs études ont montré que les mutations *KRAS* étaient liées à un profil de tumeurs résistantes aux EGFR-TKIs. De plus, la réponse à certains traitements semble varier en fonction du type de mutation *KRAS* observé. (Tejpar et al., 2012)

A ce jour aucun traitement efficace ciblant directement Kras et son inhibition n'a été décrit. L'approche alternative consiste à inhiber les acteurs situés juste en dessous dans la cascade d'activation de Kras afin d'inhiber ses effets et donc ses conséquences oncogéniques.

La voie de signalisation ERK-MEK initiée par *RAF1* lui-même premier effecteur de *RAS* est la voie cible principale pour limiter les effets des mutations *KRAS* dans le cancer du poumon non à petites cellules. Des inhibiteurs des MEK sont en essai clinique et testés sur ce type de cancers actuellement. Les premiers résultats montrent une meilleure efficacité du traitement, le selumitinib, lorsqu'il est combiné au docetaxel (Taxotère®) chez les patients. Le pourcentage de patients vivant sans progression de la tumeur (PFS) à 6 mois est plus important dans le cas d'un traitement combiné que dans le cas d'une utilisation seule du docetaxel (Taxotère®). L'activité des inhibiteurs MEK seuls est très modeste. Cependant des effets indésirables plus nombreux ont également été observés lors de l'utilisation conjointe des deux traitements : neutropénie, asthénie, diarrhée, œdème, éruptions cutanées et stomatite. (Gadgeel, 2013)

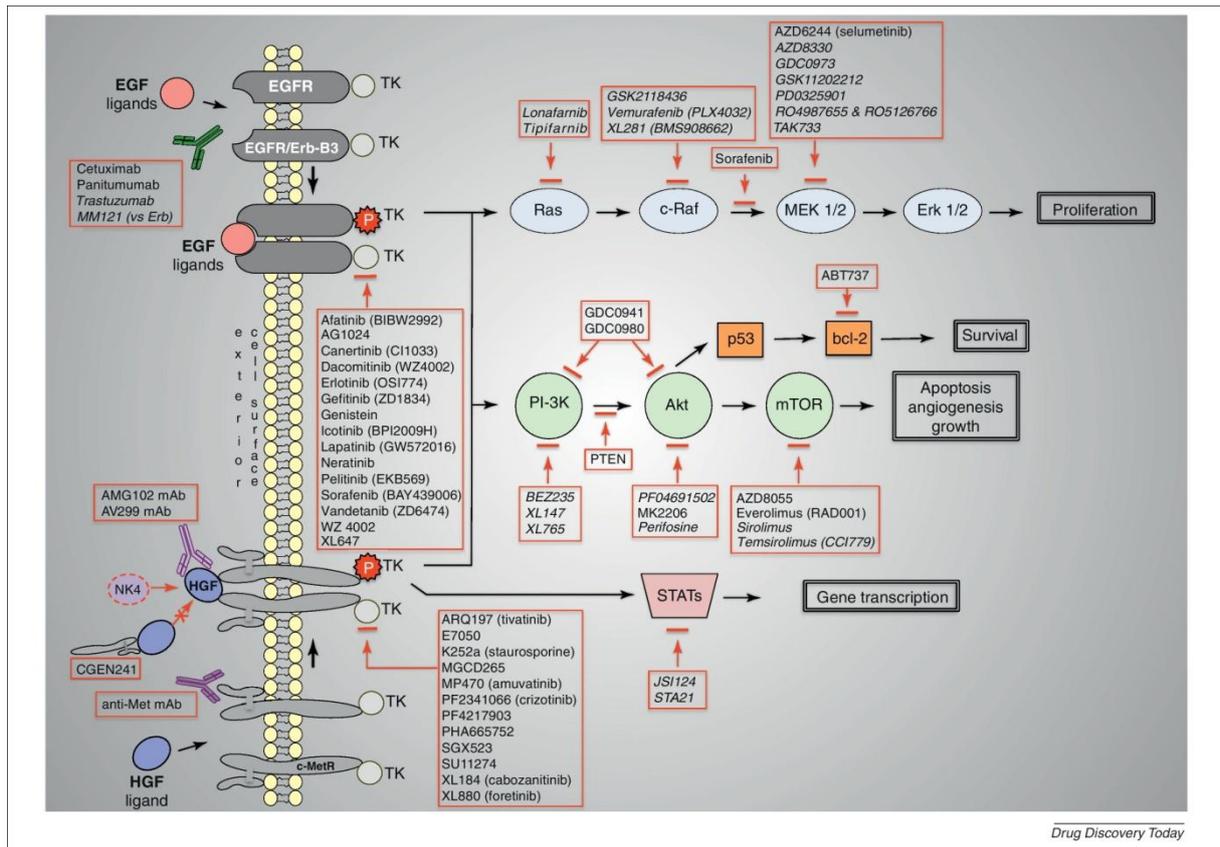


Figure 6 : Les multiples voies de signalisation impliquées dans la thérapie ciblée dans le cancer du poumon non à petites cellules (Favoni and Alama, 2013)

Plusieurs autres altérations génétiques principales (« drivers » genetic alteration) ont été identifiées au niveau du cancer du poumon non à petites cellules. Cependant aucune activité clinique d'inhibiteurs dirigés contre ces acteurs génétiques n'a encore été définie pour ce type de cancer. Ces altérations sont : les translocations *RET*, les modifications au niveau du gène *HER2*, les mutations *BRAF*, les amplifications *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor), les mutations *DDR2* (discoidin domain containing receptor 2) ou les modifications au niveau de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. (Gadgeel, 2013)

### 1.6. Le gène *TP53* en tant que cible moléculaire dans le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* se retrouve fréquemment muté dans les cancers humains, dans environ 50% des cas. En plus du taux élevé de mutation il a été montré que la voie sauvage p53 pouvait également être inactivée dans certaines tumeurs par des mécanismes indirects comme l'amplification de *MDM2* qui entraîne une déstabilisation de p53. Enfin, de plus en plus de données présentent le rôle que peuvent avoir certains mutants

p53 dans le processus de transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. (Soussi and Wiman, 2007) p53 se révèle donc un marqueur clinique important mais surtout une nouvelle cible moléculaire thérapeutique.

Le cancer du poumon n'échappe pas à la règle avec un taux de mutation fort observé au niveau de ce gène jouant un rôle important pour le processus de tumorigenèse. Un taux de mutation de 50% est présenté dans le cancer du poumon non à petites cellules. La présence de mutations au niveau de *TP53* est souvent liée à un mauvais pronostic et une résistance aux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. Cependant, la présence de mutations *TP53* dans la moitié des cas de cancers du poumon non à petites cellules offre la possibilité d'utiliser ce gène comme cible moléculaire et ainsi d'abolir les effets oncogéniques de ces mutations grâce à de nouveaux traitements ciblés contre les mutations activatrices *TP53*.

### 1.6.1. Le gène *TP53*

Décrit pour la première fois en 1979 le gène *TP53* est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été identifié. L'inactivation de fonction de *TP53* lui-même et de la voie de signalisation qui en découle est très commune dans les tumeurs humaines et souvent corrélé aux stades malins, au faible taux de survie des patients et à la résistance aux traitements classiques.

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13). Il contient 11 exons regroupés sur une région de 20 kilobases et code pour une phosphoprotéine nucléaire de 53 kDa. La protéine est composée de différents domaines : un domaine de transactivation dans sa région N-terminale, une séquence spécifique de liaison à l'ADN, un domaine d'oligomérisation et un domaine de régulation négative en C-terminale.

*TP53* est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, l'autophagie, la sénescence, le métabolisme et le vieillissement. C'est un facteur de transcription pour de nombreux gènes tels que *p21*, *GADD45*, *BAX*, *PUMA* et *NOXA* qui jouent des rôles importants dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et/ou l'apoptose. *TP53* est également facteur de transcription pour le gène *MDM2* responsable de la dégradation de p53 médiée par le protéasome, et donc maître du rétrocontrôle du gène. L'activité de *TP53* est régulée par le taux et la localisation

cellulaire de ses ARN messagers et de sa protéine et par la capacité de p53 à se fixer à plus de 100 protéines cellulaires et à contrôler l'expression de milliers de gènes cibles.

Dans les conditions physiologiques, p53 est très rapidement dégradée et donc très peu détectable dans les cellules. Différents types de stress cellulaires comme les dommages à l'ADN induits par les rayons ultra-violets (UV) ou l'activation d'oncogènes peuvent conduire à la stabilisation puis l'activation de p53 qui s'accumule alors dans le noyau cellulaire. La voie de signalisation *TP53* est donc activée par tout stress cellulaire aboutissant à une altération de la progression normale de la cellule dans le cycle cellulaire ou pouvant générer des mutations dans le génome annonciatrices de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse. (Mogi and Kuwano, 2011) (Figure 7)

L'activation d'oncogènes dans les cellules cancéreuses conduit à une réplication aberrante pouvant provoquer des blocages au niveau de la fourche de réplication induisant une réponse de dommages à l'ADN (DDR) impliquant l'activation des kinases ATM et Chk2 et l'accumulation de p53. Elle peut également induire l'expression de la protéine p14Arf qui en inhibant *MDM2* provoque également l'accumulation de p53. L'accumulation comme l'activation de p53 entraîne la sénescence de la cellule ou bien sa mort par apoptose. L'activation de p53 a donc un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses naissantes et forme la première barrière contre le processus de tumorigenèse. (Farnebo et al., 2010a)

### 1.6.2. Les mutations *TP53*

La grande majorité des mutations de p53 observées dans les tumeurs humaines sont des mutations faux-sens au niveau du domaine de liaison à l'ADN (résidus 100 à 300). Ces mutations n'empêchent pas la synthèse d'une protéine complète mutante de p53 mais elles sont incapables de se lier à l'ADN au niveau de la séquence spécifique des gènes cibles et de ce fait ne peuvent plus les activer de part une fonction facteur de transcription. Ceci montre bien, encore une fois, le rôle important joué par p53 en tant que suppresseur de tumeurs. Cependant la perception de ces mutants p53 longtemps considérés comme étant inertes dans la cellule a été modifiée. Ils sont présentés aujourd'hui en tant que protéines régulatrices influentes dans le transcriptome et le phénotype des cellules cancéreuses. En effet, il apparaît désormais que ces mutants p53 peuvent également acquérir de nouvelles

fonctions, indépendantes de celles répertoriées pour p53 sauvage, utiles à la tumorigenèse. Ces nouvelles propriétés sont définies sous le terme « gain de fonction ». Parmi ces nouvelles fonctions se retrouvent par exemple une augmentation de l'activité NF-κB et l'induction de l'invasion tumorale par action au niveau des intégrines et du récepteur à l'EGF. (Brosh and Rotter, 2009) (Figure 7)

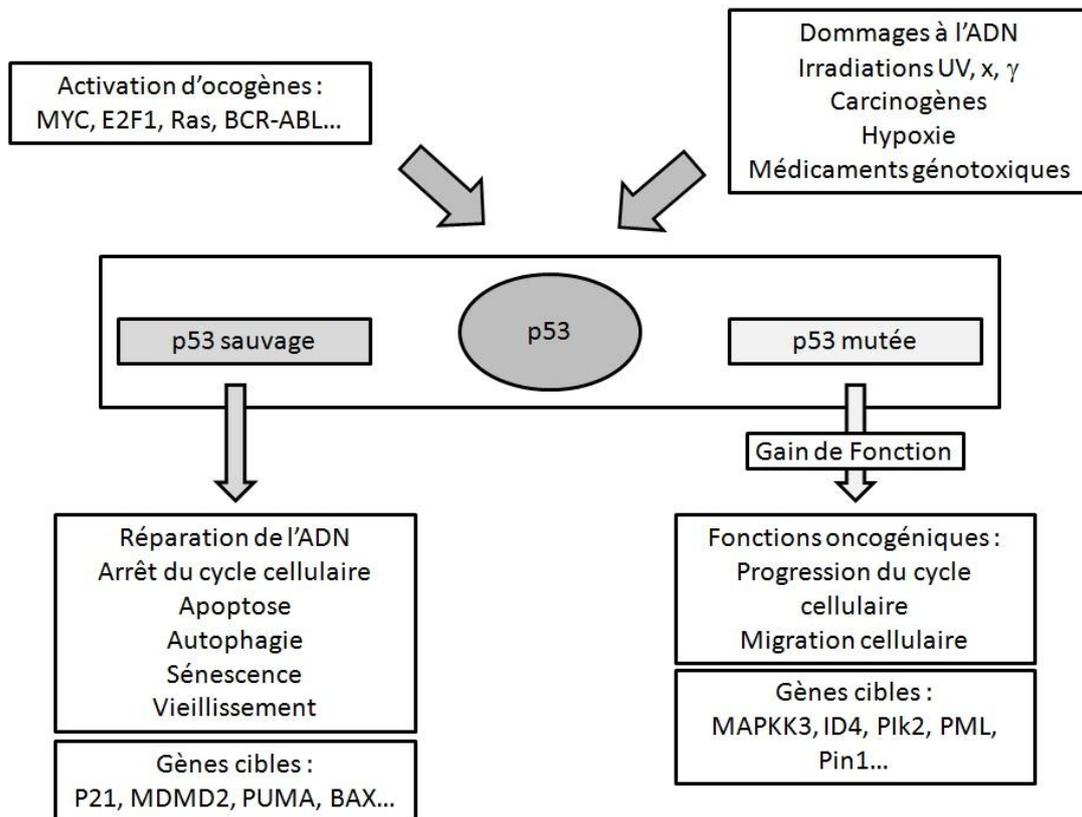


Figure 7 : Schéma synthétique décrivant les différentes voies d'activation de p53 dans les cas physiologique ou tumoral (Mogi and Kuwano, 2011)

La voie p53 est également dysfonctionnelle dans les cas de tumeurs où le gène *TP53* reste sauvage. En effet, dans ce type de cancers il est fréquent de voir une surexpression de l'inhibiteur principal de p53, *MDM2* ou bien la perte de l'inhibiteur de ce dernier, *p14Arf* via une délétion homozygote du locus *INK4a* ou encore l'expression du papilloma virus humain E6 entraînant la dégradation de p53. La réactivation de l'apoptose dépendante de p53 est donc une stratégie thérapeutique importante quelque soit le statut *TP53* des tumeurs.

Au niveau du cancer du poumon non à petites cellules le taux de mutations *TP53* varie selon le type histologique des tumeurs : il est élevé dans le cas des carcinomes squameux et en revanche bas au niveau des adénocarcinomes. Les mutations somatiques sont observées

dans 23% des cas de cancers du poumon non à petites cellules et l'augmentation de l'expression dans 65%. Comme dans le cas général, la plupart des mutations se retrouvent au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Du fait du rôle important des mutations *TP53* dans le développement malin des tumeurs, ces dernières s'expriment de façon précoce dans le processus de tumorigenèse mais elles sont également préservées tout au long de la progression tumorale jusqu'à la diffusion métastatique. Les mutations de *TP53* apparaissent dans la majorité des cas avant le processus métastatique aucune sélection des mutations *TP53* n'est faite à ce stade de la tumorigenèse. (Mogi and Kuwano, 2011)

Le tabac est la première cause de cancer du poumon dans les pays développés. Et il a été démontré que ce sont les effets mutagènes de la cigarette qui sont à l'origine de ces cancers. Etant muté dans plus de la moitié des cancers du poumon il semblerait logique de considérer le gène *TP53* comme une cible majeure des mutations de l'ADN provoquées par le tabac. Après étude il a été confirmé que la fréquence moyenne des mutations *TP53* chez les fumeurs (48%) était plus importante que chez les patients n'ayant jamais fumé (27%). (Husgafvel-Pursiainen et al., 2000) De plus, certaines mutations, en particulier des transversions G vers T dans les codons 157, 248 et 273, sont particulièrement associées avec un profil fumeur du patient et au contraire demeurent rares chez les non-fumeurs et dans les autres types de cancers. Ces transversions semblent être induites par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) issus de la fumée de cigarette et dont le plus connu est le benzo( $\alpha$ )pyrène diol époxyde (BPDE), carcinogène présent en grande quantité. (Denissenko et al., 1996)

### 1.6.3. Les différentes stratégies de traitements ciblant *TP53*

La perte de la fonction sauvage d'apoptose de *TP53* permet aux cellules cancéreuses lors de la tumorigenèse d'y échapper et de sélectionner les clones possédant les caractéristiques les plus malignes. De plus les tumeurs porteuses de mutations *TP53* montrent une plus grande résistance aux traitements classiques de chimiothérapies et radiothérapies. C'est pourquoi, le développement de traitement ciblant p53 est particulièrement important dans la recherche de nouvelles thérapies contre le cancer.

Plusieurs stratégies ont été testées ces dernières années dans le but de réactiver la voie p53 et notamment la voie apoptotique ce qui permettrait une mort massive des cellules

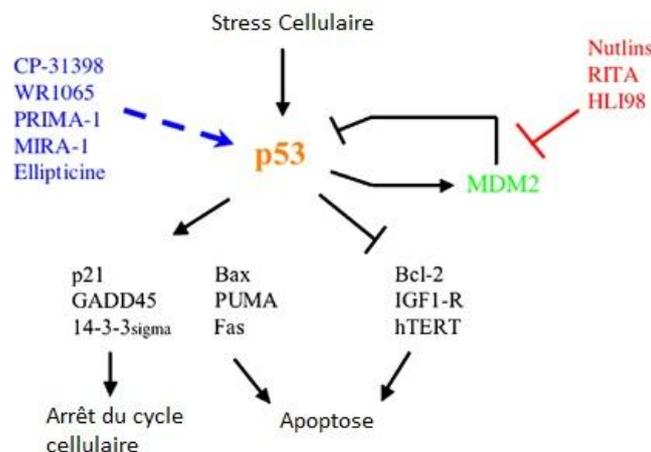
cancéreuses et donc l'élimination des tumeurs. (Haupt and Haupt, 2004) L'inactivation fréquente des fonctions de *TP53* dans les tumeurs humaines suggère que la réintroduction ou la reconstruction du gène *TP53* d'une part ou bien la restitution des fonctions sauvages de la protéine au niveau des mutants p53 d'autre part pourraient être à l'origine de traitement efficace contre le cancer. Ainsi la réactivation du gène *TP53* par thérapie génique ou des mutants p53 par de petites molécules font partie des stratégies les plus étudiées. Une troisième stratégie consiste à inhiber l'inactivation de p53 dans les tumeurs *TP53* sauvages en évitant la dégradation de ces protéines p53 fonctionnelles par mdm2. (Wiman, 2006)

La réintroduction d'une forme fonctionnelle de *TP53* dans des tumeurs *TP53* mutées voire nulles peut être réalisée par thérapie génique. Il s'agit d'introduire une copie intacte du cDNA correspondant à p53 dans une cellule grâce à un vecteur, typiquement un adénovirus (Adp53). Cette thérapie a été testée sur des patients atteints du cancer du poumon et a montré un effet bénéfique avec une stabilisation de la croissance tumorale voire une régression de la masse sans aucune toxicité majeure. (Swisher et al., 1999) La combinaison de ce type de traitement et de chimiothérapie ou radiothérapie classique montre également un meilleur effet clinique. Cette thérapie génique Adp53 n'a pour le moment été testée que par voie locale (injection intra-tumorale), des essais par voie systémique seront nécessaires pour le traitement de tumeur plus invasive et métastatique, cependant de nombreux problèmes dans la délivrance sont à résoudre avant de pouvoir utiliser cliniquement ce genre de thérapie.

La surexpression de *MDM2* est très souvent observée dans les tumeurs où le gène *TP53* est sous sa forme sauvage. Ceci explique le fait que la voie apoptotique médiée par p53 est très souvent perturbée y compris dans ce type de tumeur. Plusieurs mutations sont à l'origine de la dérégulation de *MDM2* : une amplification du gène lui-même ou bien une délétion au niveau du gène p14Arf, inhibiteur de la protéine mdm2. Ainsi, *MDM2* se présente comme une très bonne cible moléculaire dans les cas de tumeur où *TP53* est sauvage. Plusieurs stratégies existent ciblant mdm2 ou bien inhibant le complexe p53-mdm2. (Wiman, 2006)

Un *screening* de molécules fut réalisé par l'équipe de Vassilev afin d'identifier celles pouvant interférer avec le complexe p53-mdm2. (Figure 8) C'est ainsi qu'ils ont pu décrire un groupe particulier de composés imidazole nommés Nutlins. Ces derniers sont capables de mimer

les trois résidus amino-acides de p53 interagissant avec mdm2 (Phe-19, Trp-23 et Leu-26). Ils sont alors capables d'activer la voie p53 dans les cellules cancéreuses induisant l'arrêt dans le cycle cellulaire puis l'apoptose. En revanche, le traitement par ces molécules de cellules saines qui provoque également un arrêt dans le cycle cellulaire ne déclenche pas d'apoptose. Il a été également montré que les Nutlins pouvaient inhiber la croissance de tumeurs xénogreffées *in vivo* sans toxicité apparente. (Vassilev et al., 2004) Dans le même but d'inhibition de l'interaction entre p53 et mdm2, la molécule RITA, identifiée par le *screening* de molécules de l'Institut National du Cancer (NCI), par sa capacité à se lier à la région N-terminal de p53 induit un changement de conformation de la protéine empêchant la liaison de mdm2. La résultante est une accumulation de p53 et donc une régulation positive de ces gènes cibles. De même que les Nutlins, RITA induit une apoptose des cellules tumorales humaines de tumeurs ayant gardé la p53 sauvage et ce sans l'induire au niveau des cellules saines. Une activité anti-tumorale sans toxicité apparente a également été montrée. (Issaeva et al., 2004)



**Figure 8 : Voie de signalisation de l'activité apoptotique de p53 et les nouvelles petites molécules capables de restaurer cette voie dans les tumeurs humaines (Wiman, 2006)**

Dans le cas des tumeurs présentant des mutations *TP53* plusieurs caractéristiques dues à ces mutations facilitent la thérapie ciblée sur les mutants p53. En effet, dans de nombreuses tumeurs de ce type la concentration de ces mutants p53 dans les cellules cancéreuses est très élevée du fait du taux non suffisant de mdm2 pour les dégrader. De plus les stress cellulaires au sein de ces mêmes cellules cancéreuses déclenchés par l'activation d'oncogène, une hypoxie ou l'érosion des télomères entraînent des modifications post traductionnelles de p53 permettant la liaison à l'ADN et donc l'activation de gènes cibles. La

réactivation pharmacologique des mutants p53 devrait donc induire une apoptose massive des cellules cancéreuses sans toucher les cellules saines voisines n'ayant qu'un taux faible de protéines p53. (Wiman, 2006)

L'avantage de l'utilisation de petites molécules est qu'elles peuvent dans la majorité des cas être administrées par voie systémique sans déclencher de réponse immunitaire pouvant diminuer leur effet thérapeutique. De nombreux *screening* ont donc été réalisés ces dernières années ayant permis la découverte de petites molécules pouvant restaurer les fonctions de p53 par différents moyens. (Figure 8)

Grâce aux données de l'Institut National du Cancer (NCI) sur l'activité de plus de 70 000 petites molécules sur un panel de 60 lignées cellulaires issues de tumeurs humaines un groupe en particulier appelés ellipticines est ressorti comme ayant une activité plus importante au niveau des tumeurs porteuses de mutations *TP53*. (Figure 9) Des études plus approfondies ont montré que le 9-hydroxy-ellipticine (9HE) provoquait un arrêt du cycle cellulaire puis une apoptose dans les cellules tumorales humaines porteuses de différents mutants p53. De plus, cette molécule augmente le taux d'ARN messagers de deux gènes cibles de p53 : *p21* et *BAX*, dans les cellules cancéreuses mais pas sur les cellules correspondantes nulles en p53. Ces données montrent donc la possibilité de restituer les fonctions sauvages de p53 au niveau de mutants. (Sugikawa et al., 1999)

Un autre *screening* de la banque de l'Institut National du Cancer (NCI) a permis l'identification de la petite molécule capable de restaurer l'activité « suppresseur de tumeur » de mutants p53 PRIMA-1. (Bykov et al., 2002) (Figure 9) PRIMA-1 restaure la conformation sauvage et l'activité transcriptionnelle des mutants p53 *in vitro*. L'administration systémique de PRIMA-1 a également montré une inhibition de croissance de tumeurs xénogreffées chez la souris.

La réactivation des mutants p53 pourrait également augmenter la sensibilité des tumeurs porteuses de mutations *TP53* aux chimiothérapies classiques qui montrent de meilleurs résultats au niveau des tumeurs ayant gardé l'expression sauvage de *TP53*. Ainsi des molécules telles que PRIMA-1 pourraient agir en synergie avec ces traitements chimiothérapeutiques classiques. Les premiers essais réalisés d'un traitement combiné de cisplatine et de PRIMA-1MET (forme méthylée de PRIMA-1 ayant la même activité) sont

plutôt encourageants *in vitro* et *in vivo* chez la souris. L'induction de mutants p53 par la chimiothérapie classique induit en effet une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses à PRIMA-1MET, l'activité de ce dernier étant dépendante du niveau d'expression des mutants p53. (Bykov et al., 2005) Ces derniers résultats suggèrent donc que tout agent capable d'augmenter le taux de mutants p53 dans les cellules cancéreuses pourra agir en synergie avec des molécules telles que PRIMA-1. (Figure 9)

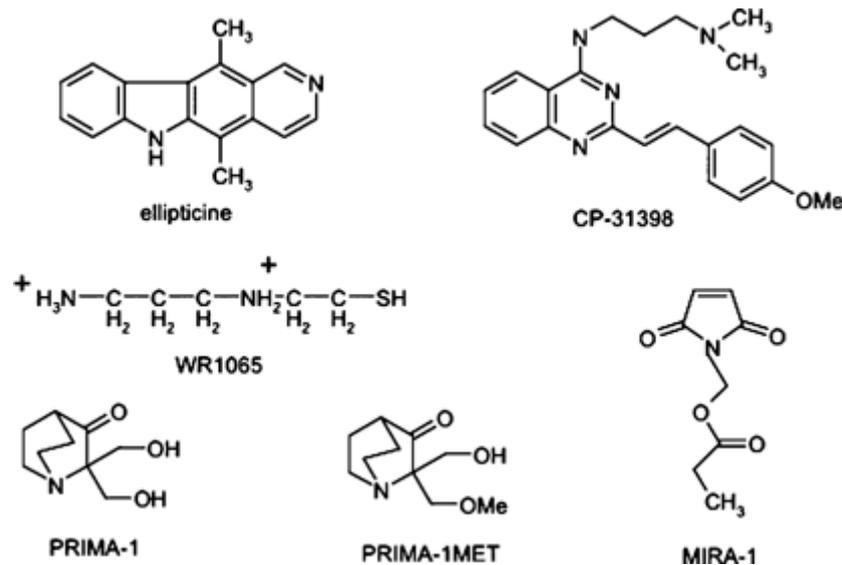


Figure 9 : Structures chimiques de petites molécules identifiées comme capables de réactiver l'activité de mutants p53 ou induisant l'apoptose préférentiellement dans les cellules tumorales exprimant des mutations TP53 (Wiman, 2006)

## 1.7. Le gène *NEDD9/HEF1/Cas L* : nouvelle cible moléculaire dans le Cancer du Poumon Non à Petites Cellules

### 1.7.1. Le gène *HEF1*

Aussi connu sous le nom de *NEDD9* (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9) ou *Cas-L* (Cas Like) du fait de son homologie avec le gène *p130Cas*, *HEF1* (Law et al., 1998) est un gène situé sur le bras court du chromosome 6 en position 6p25-p24, composé de 199 051 paires de bases et de 11 exons. (Gene ID : 4739) Les trois noms sont utilisés de façon commune pour ce même gène depuis 2007.

Le gène *HEF1* appartient à la famille des adaptateurs Cas (CRK associated substrates) tout comme *p130Cas* et *EFS* avec qui il partage de nombreuses similitudes structurales. Tous les membres de cette famille présentent de multiples domaines d'interactions protéine-protéine permettant le recrutement d'autres protéines et formant ainsi un complexe

activant les voies de signalisation d'adhésion cellulaire. Pour le moment aucune activité catalytique n'a été observée chez *HEF1*.

La protéine issue de *HEF1* est composée de 834 acides aminés regroupés en différentes régions. (Figure 10) Ces régions incluent : un domaine SH3 (Src Homology 3) en N-terminal (acides aminés 10-65) permettant des interactions avec des partenaires protéiques porteurs de motif poly-proline. (Li, 2005) Le domaine central peut être divisé en deux sous-régions : la région comprise entre les acides aminés 90 et 350 qui est caractérisée par de nombreux sites de liaison SH2 ; il s'agit de multiples motifs comportant des tyrosines qui lorsqu'elles sont phosphorylées peuvent recruter des protéines contenant des domaines SH2. Cette région est également appelée le domaine de liaison au substrat. Et la région entre les acides aminés 350 et 650 qui regroupe un grand nombre de résidus sérines. (Briknarová et al., 2005) Enfin, le domaine C-terminal (acides aminés 650-834), très conservé dans la famille des protéines Cas, qui permet l'homo ou l'hétéro-dimérisation des différents membres de la famille Cas. (Law et al., 2000)



**Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines structuraux de la protéine HEF1 (Singh et al., 2007)**

Bien que partageant de nombreux points communs avec p130Cas, HEF1 possède quelques caractéristiques qui lui sont propres. En effet, alors que p130Cas est abondant dans de nombreux types cellulaires, le taux d'ARN messagers de HEF1 varie de façon importante entre les différents tissus. Ainsi, HEF1 est retrouvé préférentiellement au niveau des populations de cellules épithéliales, notamment au niveau des épithéliums du sein et du poumon, et possède également un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B et T. De plus, contrairement à p130Cas qui n'est présent qu'au niveau des jonctions d'adhésions focales, HEF1 possède différentes localisations cellulaires. Bien qu'une certaine part de l'ensemble du pool protéique que représente HEF1 soit cytoplasmique, en réponse à différents signaux intrinsèques et extrinsèques, HEF1 se concentre principalement au niveau des jonctions d'adhésions focales ainsi que du centrosome et du fuseau mitotique.

Pendant l'interphase, HEF1, comme les autres membres de la famille des adaptateurs Cas, est localisé au niveau du site des jonctions focales et se lie aux kinases d'adhésions focales (FAK) par leurs domaines SH3. La protéine est alors phosphorylée par FAK et les kinases de la famille Scr en réponse à la liaison des récepteurs intégrines à la matrice extra cellulaire (ECM). Cette phosphorylation active les domaines de liaison SH2 qui recrute alors les protéines adaptatrices Crk qui stimuleront à leur tour la kinase en N-Terminale Ras/Raf/Jun (JNK) et sa cascade de signalisation de migration cellulaire. (Law et al., 1996) (Cary et al., 1998) (Klemke et al., 1998)

Les séquences impliquées dans la localisation de HEF1 au niveau du centrosome sont concentrées dans le domaine de liaison au substrat. (Pugacheva and Golemis, 2005) Les régions N-terminale et C-terminale de la protéine quant à elles permettent des interactions avec SMAD3 et le protéasome permettant une régulation et une élimination rapide de HEF1 en réponse à divers signaux biologiques. (Liu et al., 2000) Ces interactions entre HEF1 et le centrosome d'une part ou le protéasome d'autre part apparaissent aujourd'hui comme uniques dans la famille des protéines Cas.

Quatre produits protéiques sont issus du gène *HEF1* : p115HEF1, p105HEF1, p65HEF1 et p55HEF1. (Figure 11) Les protéines p115HEF1 et p105HEF1 correspondent à deux niveaux de phosphorylation différents de la protéine totale. Les protéines p55HEF1 et p65HEF1 sont quant à elles le résultat d'un clivage de p115HEF1 ou p105HEF1 au niveau des motifs consensus DLVD des caspases. Contrairement au niveau d'expression de *p130Cas* qui reste relativement constant tout au long du cycle cellulaire, l'expression et la phosphorylation des différentes isoformes de HEF1 sont régulées au cours de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire. p105HEF1 et p115HEF1 sont particulièrement exprimés à la transition G1/S du cycle cellulaire alors que p55HEF1 et p65HEF1 possèdent un pic d'expression lors de la mitose (phase M). De plus, alors que p105HEF1 et p115HEF1 sont essentiellement cytoplasmiques, p55HEF1 est associé au fuseau mitotique. Le clivage et la localisation de p55HEF1 lors de la mitose suggère un rôle dans la transition de la forme étendue des cellules lors de l'interphase à la forme ronde lors de la mitose et donc de la prolifération cellulaire. (Law et al., 1998) Contrairement à p55HEF1 qui est relativement stable, p65HEF1 et le produit de son clivage en p28HEF1, toujours selon un motif consensus des caspases ; DDYD, sont instables et rapidement dégradés. (Figure 11) Cependant, lors de l'apoptose, p28HEF1

est stabilisé pour déclencher ce phénomène de mort cellulaire en induisant l'arrondissement puis le détachement de la cellule. (O'Neill and Golemis, 2001)

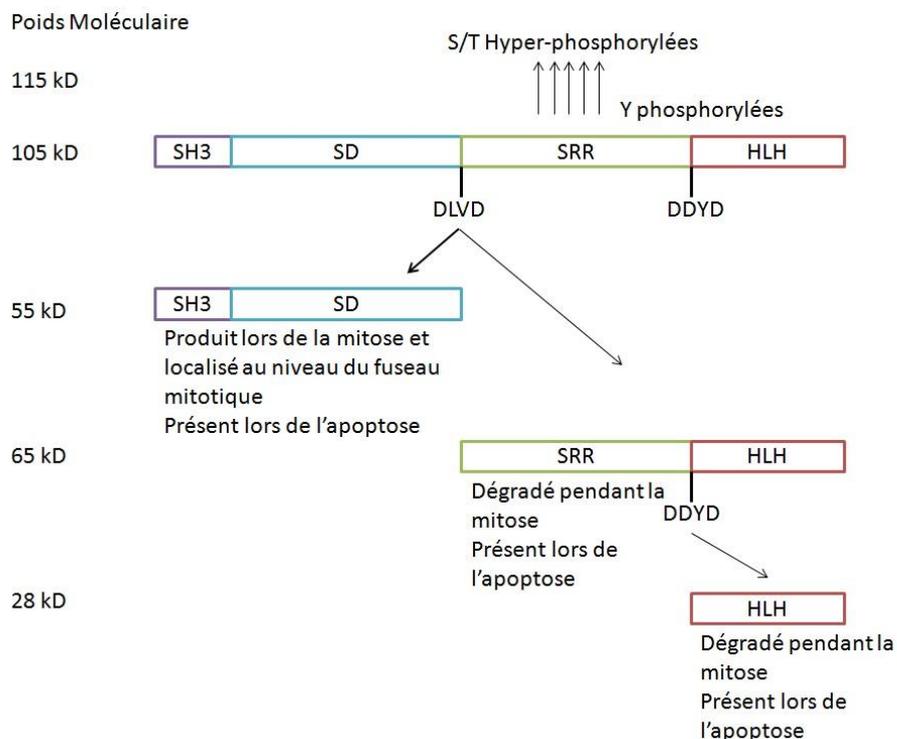


Figure 11 : Modifications post-traductionnelles de HEF1 et représentation de ses différentes isoformes (O'Neill and Golemis, 2001)

### 1.7.2. HEF1 dans le processus de tumorigenèse

Le gène *HEF1* joue donc un rôle important dans la régulation de trois grandes fonctions cellulaires : l'adhésion et la migration cellulaire, l'apoptose et le cycle cellulaire. Il a été montré un taux fortement élevé de *HEF1* dans les métastases cancéreuses, notamment dans les cancers du sein et les mélanomes. (Kim et al., 2006) Dans les cultures cellulaires, une augmentation de la concentration en protéine HEF1 a montré une promotion de la migration et de l'invasion cellulaire mais également une apoptose et un défaut mitotique entraînant un arrêt dans le cycle cellulaire. Ainsi, la surexpression de *HEF1* se ferait plutôt dans le processus métastatique plutôt que dans les étapes plus précoces du processus de tumorigenèse. Ceci s'explique par besoin de la cellule cancéreuse d'acquérir des mutations pouvant aller à l'encontre de la mort cellulaire dépendante de *HEF1* et donc pouvant alors mieux résister aux effets d'une élévation de la concentration de *HEF1*. Ainsi il a été montré que des tumeurs agressives présentant une surexpression de *HEF1* présentaient de multiples modifications géniques telles que l'activation de *RAS*, l'inhibition de *p16Ink4*, une

translocation *BCR-ABL* ou une transformation avec *HTLV-1*. Ce type de modifications fournit à la cellule cancéreuse un signal anti-apoptotique soutenu et donc permet de privilégier plutôt l'activité pro-invasive de la surexpression de *HEF1*. (Singh et al., 2007)

En étant localisé au niveau des jonctions d'adhésion focales, *HEF1* peut interagir avec de nombreux acteurs de la migration cellulaire. Cette migration cellulaire nécessite la coordination des acteurs de la polarité cellulaire, de l'actine et des microtubules du cytosquelette ainsi que d'une membrane dynamique en plus du rôle des jonctions d'adhésion focales. (Wozniak et al., 2004) L'interaction entre *HEF1* et *FAK* a été montrée comme essentielle dans l'initiation de la migration *in vitro* et de l'invasion *in vivo*. Après sa phosphorylation par *Src* et *FAK*, *HEF1* interagit avec la molécule adaptatrice *Crk* pour promouvoir la migration. Si la voie d'activation n'a pas été totalement décrite encore aujourd'hui il est probable qu'elle soit similaire à celle observée chez *p130Cas* faisant intervenir les GTPases *Rac* et *Rap*.

Le rôle de *HEF1* dans le processus métastatique ainsi que dans l'apoptose et le cycle cellulaire permet d'en faire une nouvelle cible moléculaire dans la thérapie ciblée contre le cancer. Les tumeurs privilégient les propriétés pro-invasives du gène pour se développer. Il s'agirait, au contraire, d'utiliser les propriétés pro-apoptotique de la surexpression de *HEF1* plutôt que celles pro-invasives pour lutter contre les cellules cancéreuses.

### 1.7.3. Pharmacomodulation du gène *HEF1*

Des études de cytotoxicité réalisées au sein du laboratoire ont montré un effet cytostatique irréversible de la molécule *A190* sur les deux lignées *NSCLC-N6-L16* et *A549* associé à un blocage en phase *G1* du cycle cellulaire et d'une mort par apoptose des cellules. Les effets de la molécule sont doses dépendants et la  $CI_{50}$  est de 39,4  $\mu$ M pour *NSCLC-N6-L16* et de 52,6  $\mu$ M pour *A549*.

De plus, une étude *in vivo* réalisé chez la souris nude *NMRI nu/nu* (*NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>™*, Janvier®) ayant subi une xéno greffe de la lignée *NSCLC-N6-L16*, issue d'une tumeur humaine primaire, a montré une diminution de la masse tumorale à la suite d'un traitement par *A190*. La molécule *A190* possède donc un effet cytostatique *in vitro* et un effet anti-tumoral *in vivo*.

Enfin, les premières études d'expression du gène *HEF1* au niveau de cellules de la lignée NSCLC-N6-L16 traitées ou non par A190 pendant 70 heures avec une quantité évaluée toutes les 10 heures ont montré une surexpression très nette du gène dans le groupe traité par rapport au groupe témoin entre 60 et 65 heures. (Moreau et al., 2008)

## 2. Problématique

La nouvelle notion d'altération principale (« *drivers* ») à l'origine du processus tumoral a permis de montrer que dans un type de cancer donné, comme le cancer du poumon non à petites cellules, les caractéristiques génétiques des tumeurs n'étaient pas toutes identiques et que des sous-groupes, autres qu'histologiques, pouvaient ressortir. Il est important désormais de rechercher et d'identifier pour chaque tumeur, et donc chaque patient, l'altération génétique caractéristique afin d'effectuer un classement selon les mutations principales observées : mutations *EGFR*, translocations *ALK*...

Devant les effets bénéfiques observés lors des études cliniques des molécules et autres agents biologiques développés ces dernières années afin d'inhiber ces oncogènes activés constitutivement selon diverses modifications génétiques, l'utilisation en traitement curatif de la thérapie ciblée paraît concevable dans les années à venir. (Figure 12) Bien entendu, des études à des stades moins avancés des cancers seront à réaliser pour permettre une caractérisation en traitement de choix.

La stratégie thérapeutique qui ressort de toutes ces observations est donc la caractérisation pour chaque malade de voie de signalisation majeure touchée par le processus de tumorigenèse dans la cellule cancéreuse clonale pour orienter le traitement de thérapie ciblée vers les inhibiteurs de cette voie. Il est également nécessaire de bien identifier l'acteur de la voie de signalisation touché le plus en amont : une thérapie ciblée utilisant les EGFR-TKIs ne semble pas la mieux adaptée dans le cas d'un patient présentant une tumeur où Ras serait constitutivement actif. Il s'agit d'une stratégie de thérapie à la carte où il sera proposé au patient un traitement basé non plus sur le seul type de cancer présenté mais sur les caractéristiques moléculaires de la tumeur présentée.

Les travaux décrits dans cette thèse présentent le gène *HEF1* comme étant une nouvelle cible moléculaire dans le cancer du poumon non à petites cellules et directement lié au gène *TP53*, déjà présenté comme cible moléculaire dans de nombreux types de cancers. La modulation conjointe de ces deux gènes par une molécule cytostatique : A190, présente la possibilité d'un déclenchement de l'apoptose dans le cas d'un carcinome épidermoïde et permet d'envisager le développement de traitements ciblés pour des patients ayant la même voie de signalisation affectées : la voie de signalisation du gène *HEF1*.

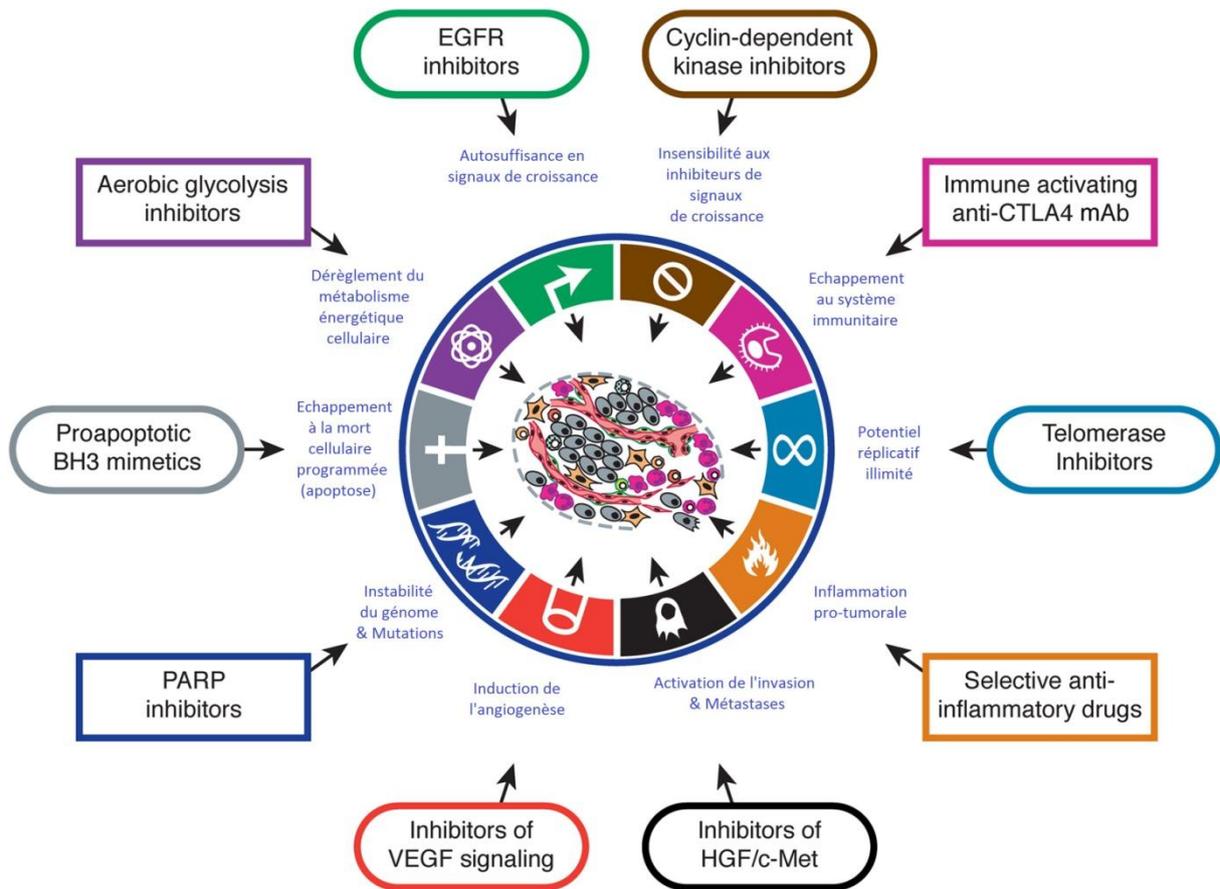


Figure 12 : La thérapie ciblée et les caractéristiques de la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011)

### 3. Approche expérimentale

#### 3.1.1. Modèles expérimentaux

Deux modèles expérimentaux ont été utilisés lors des différents travaux présentés dans cette étude. Un modèle propre au laboratoire issu d'une tumeur primaire de cancer du poumon non à petites cellules, la lignée NSCLC-N6-L16 et une lignée commerciale de référence pour l'étude de ce type de cancer du poumon, la lignée A549.

##### 3.1.1.1. Lignées cellulaires et entretien

La lignée NSCLC-N6-L16 est issue d'une biopsie prélevée avant tout traitement sur un patient de 67 ans atteint d'un cancer broncho-pulmonaire de type épidermoïde classé T2N0M0. (Figure 13) Pour l'obtenir, un fragment de la tumeur primaire préalablement mis en suspension dans du liquide physiologique auquel est ajouté un antibiotique et du sérum a été injecté en sous-cutané chez des souris *nude*. Ce transfert *in vivo*, a permis de stabiliser les caractéristiques phénotypiques de la lignée avant la mise en culture *in vitro* qui aboutirait à une mort cellulaire massive par apoptose si elle était effectuée directement. Pour éliminer l'éventuel mélange entre cellules humaines et murines, un clonage a été effectué et le clone NSCLC-N6-L16 a été sélectionné. La lignée est conservée depuis sa création en cryotube à -180°C. (Roussakis et al., 1991)

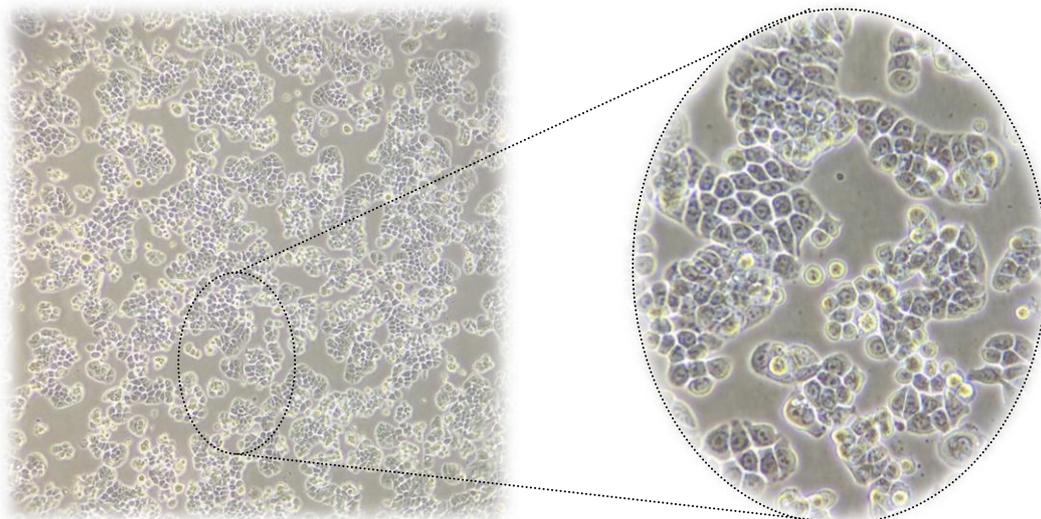
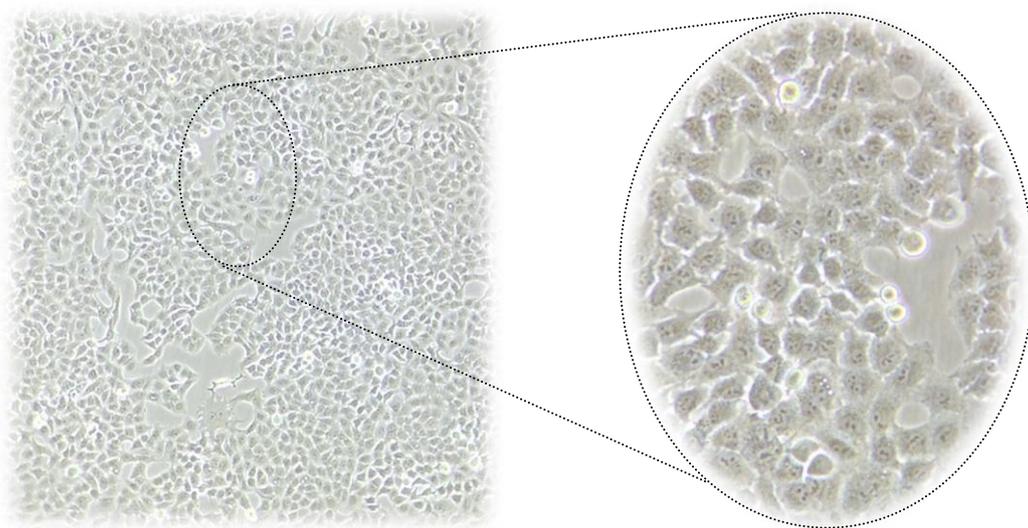


Figure 13 : Observation microscopique de la lignée NSCLC-N6-L16 (grossissements x100 et x400)

Cette lignée polyploïde possède 62 chromosomes. Les analyses cytogénétiques ont confirmé que ces chromosomes étaient tous d'origine humaine. Le temps de doublement est de 35

heures *in vitro* et de 12 jours *in vivo* après xénogreffe chez la souris *nude*. C'est une lignée moyennement différenciée, rarement kératinisée et hétérogène qui a permis l'isolement de quatre clones. Ceux-ci diffèrent par leur degré de différenciation, leur temps de doublement et leur chimiosensibilité. (Siavoshian et al., 1998) La lignée se rapproche fortement des tumeurs *in situ* par le fait qu'elle possède une mutation du gène *TP53* comme la majorité des cancers du poumon non à petites cellules. (Jacquot et al., 2003)

La lignée A549 est conservée dans la banque de lignées du National Cancer Institut (NCI) sous la référence Collection ATCC n°CCL-185. (Figure 14) Elle est issue d'un adénocarcinome pulmonaire prélevé chez un patient de 58 ans. (Giard et al., 1973) Cette lignée est communément utilisée par les laboratoires de recherches étudiant le cancer du poumon non à petites cellules. (Foster et al., 1998)



**Figure 14 : Observation microscopique de la lignée A549 (grossissements x100 et x400)**

Les cellules A549 présentent une morphologie de type épithéliale et se développent en monocouche. Il s'agit d'une lignée hypotriploïde qui possède 24% de cellules à 12 chromosomes et 22% de cellules à 64 chromosomes, les autres étant diploïdes. La lignée est tumorigène chez la souris *nude* et possède un gène *TP53* de type sauvage. (Bai et al., 1998) Elle possède un temps de doublement *in vitro* plus faible que celui des NSCLC-N6 d'environ 20 heures. Si la lignée conserve l'expression sauvage du gène *TP53* elle présente, au contraire, une perte totale de l'expression de *LKB1*.

Le gène *LKB1* (Liver Kinase B1) est une kinase sérine/thréonine présente au niveau des mitochondries, du cytoplasme et du noyau. *LKB1* joue un rôle dans le contrôle de la structure cellulaire, dans l'apoptose et dans l'homéostasie de cellule par une activation de l'AMPK (Activated Protein Kinase). Dans le cas du phénomène d'apoptose AMPK participera dans un premier temps à l'arrêt du cycle cellulaire en stabilisant p53. Dans un second temps elle participera à l'arrêt de la synthèse des macromolécules cellulaires, des acides gras ou des triglycérides provoquant une inhibition de la croissance cellulaire. (Hardie and Alessi, 2013)

Les deux lignées cellulaires, NSCLC-N6-L16 et A549 sont cultivées en petits flasques à bouchon filtrant (Falcon®) dans un milieu de culture constitué de Rosewal Park Memorial Institute (RPMI 1640, GIBCO™), de 5% de sérum de veau fœtal (SVF, GIBCO™), de 1% de glutamine (2mM, GIBCO™) et de 1% d'antibiotiques (pénicilline (100UI) et streptomycine (100 µg/mL), GIBCO™). Les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur avec une atmosphère contrôlée à 5% de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

Les cellules consomment des nutriments et produisent des métabolites. Il faut donc renouveler le milieu régulièrement, tous les deux à trois jours en général. Ces cellules sont adhérentes au support, il est donc nécessaire de passer par une étape de repiquage par la trypsine lors de ce renouvellement de milieu. Lors du repiquage, les cellules sont préalablement rincées avec du PBS (Phosphate-Buffered Salt solution, GIBCO™) puis mises en contact avec de la trypsine (GIBCO™) pendant cinq minutes à 37°C. L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de milieu de culture. Les cellules sont ensuite individualisées par aspiration/refoulement à la pipette pour la lignée A549, à la seringue pour la lignée NSCLC-N6-L16 qui a une adhérence plus forte. Après comptage en cellule de Malassez, une partie de la suspension cellulaire est transférée dans un nouveau flasque en quantité désirée. Le milieu de culture est changé une nouvelle fois deux heures après le repiquage pour la lignée NSCLC-N6-L16 qui consomme beaucoup de nutriments lors de leur adhésion au plastique des flasques. Pour conserver la lignée et avoir à disposition un stock de cellules, celles-ci pourront être congelées. Toutes ces opérations sont réalisées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire.

Pour la lignée NSCLC-N6-L16, afin de travailler sur un matériel cellulaire d'un phénotype équivalent au phénotype de la lignée primitive, le laboratoire s'oblige à utiliser pour toutes les expériences le matériel dérivant de culture cellulaire n'excédant pas 30 à 40 repiquages.

### 3.1.1.2. *Synchronisation des cellules*

Pour les études de prolifération cellulaire il est nécessaire de travailler avec des cellules synchronisées, c'est-à-dire des cellules qui se trouvent pour une grande majorité dans une même phase du cycle cellulaire. En effet, les gènes cibles étudiés sont exprimés à différents niveaux au cours du cycle cellulaire, il est donc difficile de conclure sur l'expression de ces cibles si les cellules se trouvent dans différentes phases du cycle.

Plusieurs stratégies sont utilisées pour la synchronisation des cellules dont l'utilisation de substances chimiques capable de bloquer les cellules dans une phase particulière du cycle cellulaire.

La vinorelbine est un agent antiprolifératif et antitumoral, un poison du fuseau mitotique, dont l'activité a été testée sur notre modèle NSCLC-N6-L16. (Roussakis et al., 1991) Cette molécule s'apparente au groupe des alcaloïdes de Vinca. L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux a mis en évidence le blocage des cellules en G<sub>2</sub>M à partir d'une concentration supérieure à 9,3 nM pour 36 heures de contact.

Pour synchronisation, les cellules NSCLC-N6-L16 sont mises en présence de la vinorelbine à la dose 0,01 µg/mL pendant 24 heures. Le surnageant comportant les cellules bloquées en phase de mitose du cycle cellulaire est alors prélevé puis centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans du milieu de culture sans vinorelbine. Toutes les cellules reprennent leur croissance en phase G1 du cycle cellulaire.

Plusieurs études réalisées au laboratoire ont cependant montré que la vinorelbine peut mettre en péril la viabilité cellulaire et ainsi perturber l'expression des gènes dont *HEF1*. Ces derniers résultats tentent à montrer que l'utilisation d'un agent chimique pour la synchronisation ne permet pas de conclure de façon certaine sur l'effet de la molécule d'intérêt mais plutôt d'un effet combiné de cette molécule étudiée et de celle utilisée pour la synchronisation des cellules. Après 24 heures de traitement par la vinorelbine les cellules deviennent trop sensibles et ne se présentent plus dans leur état basal. Elles entrent dans

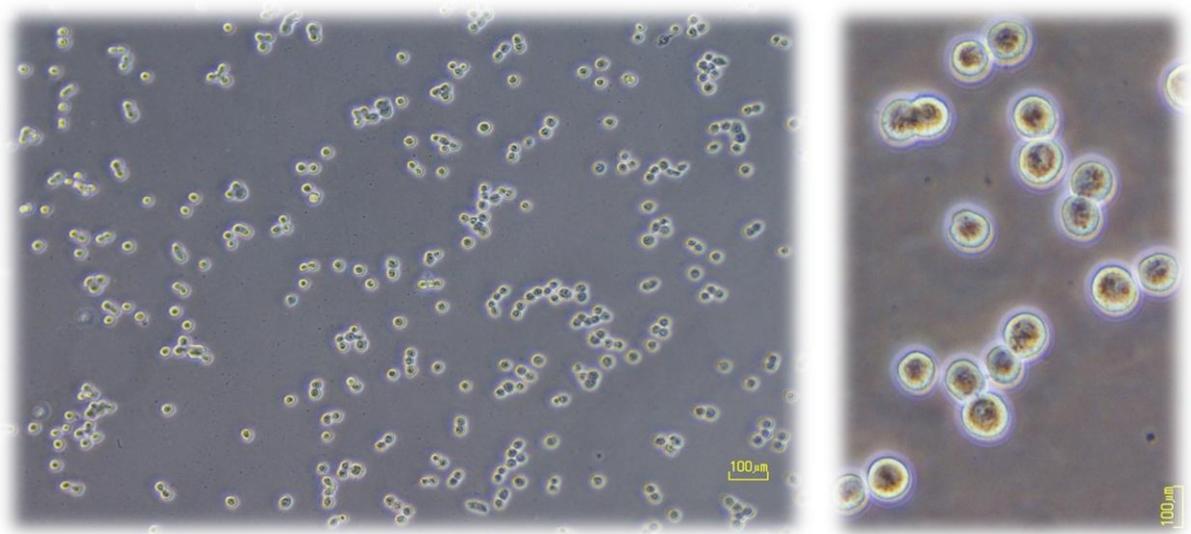
certains cas dans un processus d'apoptose. Ce processus étant particulièrement étudié dans notre recherche puisque sous le contrôle des cibles moléculaires *TP53* et *HEF1*, l'utilisation de la vinorelbine pour la synchronisation des cellules entraîne trop de biais pour notre étude.

D'autres stratégies consistent à priver les cellules d'un élément vital comme la thymidine. Dans ce cas les cellules ne pouvant plus répliquer leur ADN entrent alors en sénescence ce qui les synchronise. La réincorporation de l'élément nutritif dans le milieu permet aux cellules d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire de façon homogène. Cependant, dans ce cas également les cellules subissent des changements dans leur génotype pouvant être à l'origine de biais dans l'étude.

Pour éviter ce genre de biais une autre technique de synchronisation, basée sur les caractéristiques propres des cellules est possible. Il s'agit de la synchronisation des cellules pendant la phase M du cycle cellulaire. Cette synchronisation « naturelle » s'effectue comme suit. Lors de la mitose les microtubules des cellules se dépolymérisent pour libérer des dimères de tubuline qui sont ensuite utilisés dans la formation du fuseau mitotique. Pendant cette étape les cellules prennent une forme plus arrondie et n'adhèrent plus que faiblement au fond de la boîte de culture. Les cellules qui sortent de la mitose reconstituent leur cytosquelette et adhèrent de nouveau au support. Il est donc possible de facilement récupérer les cellules en mitose par simple agitation douce du flasque de culture, provoquant ainsi leur détachement et leur passage en suspension dans le milieu qui est ensuite prélevé. Les cellules ainsi récupérées sont isolées dans un nouveau flasque puis mises en culture dans les mêmes conditions. (Figure 15) Après avoir achevé leur mitose ces cellules reconstituent leur cytosquelette et adhèrent à nouveau au fond de la boîte dans les premières étapes de la phase G1 sans jamais n'avoir subi d'agression ou de stress susceptible de modifier leur génotype. Un meilleur rendement est observé pour des cellules ayant subi une trypsination environ 6 heures avant l'étape de synchronisation.

Idéalement les cellules synchronisées de cette manière sont utilisées directement après synchronisation et changement du milieu de culture une fois qu'elles ont à nouveau adhéré au fond des flasques ou des puits pour pouvoir commencer l'étude au début du cycle cellulaire. Cependant, elles peuvent être aussi conservées en entretien mais sur un nombre

réduit de repiquage à la trypsine avant qu'elles ne finissent par se désynchroniser de nouveau d'elles-mêmes. Le problème majeur de l'entretien de cellules synchronisées par synchronisation « naturelle » est qu'il n'est pas possible de suivre sans manipulations supplémentaires, comme la cytométrie de flux par exemple, la phase dans laquelle se trouve ces cellules.



**Figure 15 : Observations au microscope de figure mitotique dans la lignée NSCLC-N6-L16 après synchronisation naturelle (grossissement x100 et x400)**

Pour une large période d'observation de l'effet d'une molécule sur les cellules, comme ce qui a pu être réalisé au laboratoire (cinétiques jusqu'à 70 heures), un nombre important de cellules est nécessaire. Or, contrairement aux autres méthodes de synchronisation, le nombre de cellules synchronisées de manière naturelle comme décrit ci-dessus est assez faible par rapport au nombre total de cellules à disposition. Ainsi pour pouvoir réaliser ce type de manipulations nécessitant environ 250 000 cellules pour une surface de croissance de 9,4 cm<sup>2</sup> une étape d'entretien des cellules synchronisées fut obligatoire. Pour garder les cellules synchronisées et garder la possibilité d'un traitement en phase G1 du cycle cellulaire ces dernières ont été trypsinées au moment de la mitose, visible au microscope et prévisible grâce au calcul du temps de doublement de chaque lignée cellulaire. Cependant pas plus de deux trypsinations d'entretien n'ont été réalisées à chaque expérience, la troisième trypsination étant réalisée au moment de l'ensemencement des puits.

En dehors de ce cas, le nombre de conditions étudiées étant réduit il a été possible de lancer le traitement directement après la synchronisation. Les cellules étaient donc toutes en tout début de phase G1 au moment de l'incorporation du traitement au milieu de culture.

### 3.1.1.3. Traitement des cellules – la molécule A190

A190 est une triazine de synthèse produite et fournie au laboratoire par l'équipe du Professeur E. Antoniadou-Vyza du département de synthèse chimique de la Faculté de Pharmacie d'Athènes. (Figure 16) La dénomination chimique est 4,6-diamino-1,2-dihydro-1-(4''-chlorophenyl)-2-(1-tricyclo [3.3.1.1<sup>3,4</sup>] decyl-1,3,5-triazine). Elle est envoyée au laboratoire sous forme lyophilisée et peut être directement dissoute dans l'eau ou le milieu de culture des cellules.

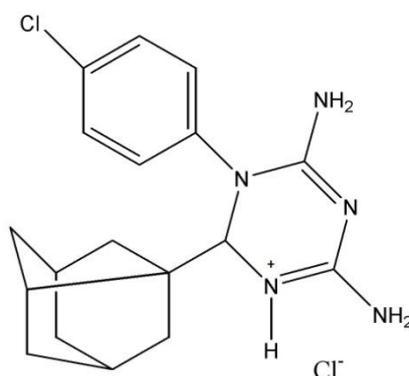


Figure 16 : Structure chimique de A190 (PM : 344,86)

Le traitement des lignées cellulaires NSCLC-N6-L16 et A549 par la molécule A190 se fait dans des plaques 6 puits (Flacon®). Les cellules après synchronisation sontensemencées à raison de 50 à 250 000 par puits dans 3 mL de milieu de culture. Pour chaque temps d'observation deux puits sont préparés : un puits servant de témoin et l'autre qui sera traité. Les cellules sont traitées par A190 à la  $Cl_{50}$  soit une dose de 39,4  $\mu$ M pour NSCLC-N6-L16 et une dose de 52,6  $\mu$ M pour A549. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée en  $CO_2$  à 5% pendant un temps donné.

## 3.1.2. Etude des cibles moléculaires

### 3.1.2.1. Extraction d'ARN messagers

L'extraction des ARN totaux était réalisée auparavant au laboratoire grâce à la technique classique utilisant le Trizol® et le chloroforme. Devant la toxicité de cette technique, une autre méthode d'extraction a été étudiée puis validée lors de ces études. Il s'agit du kit

Dynabeads® mRNA Direct™ (Ambion by Life Technologies) permettant l'extraction d'ARN messagers par l'intermédiaire de billes magnétiques. (Figure 17) Le principe est simple : les billes Dynabeads® sont recouvertes d'oligo (dT) pouvant s'hybrider de façon covalente aux queues poly-A situées en 3' de la plupart des ARN messagers. Les billes sont ensuite isolées sous l'action d'un aimant.

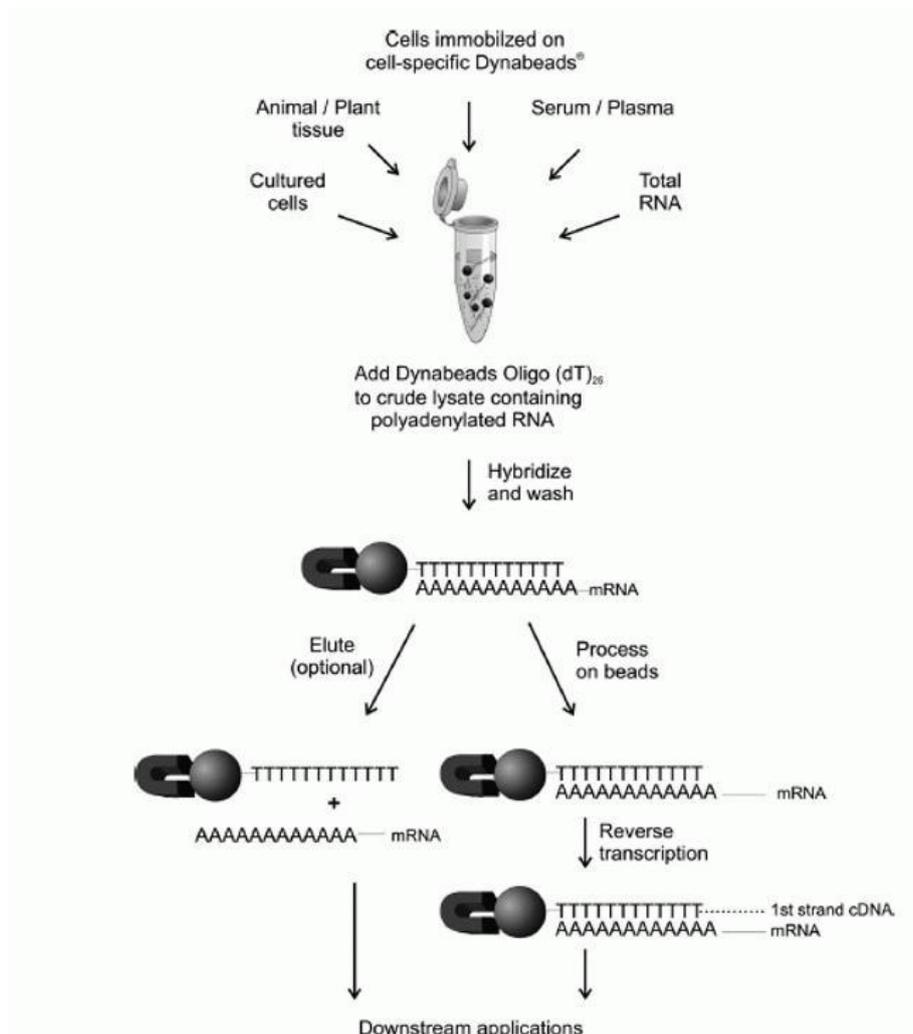


Figure 17 : Principe d'extraction d'ARN messagers (kit Dynabeads® mRNA Direct™ - Ambion by Life Technologies)

En plus du caractère non toxique de cette méthode, la pureté de l'extrait obtenu est optimisée contrairement à la méthode classique utilisant le Trizol®. En effet plus aucune trace de protéine n'est observée. De plus, aucun traitement *DNase* n'est nécessaire en aval de cette extraction puisque l'ADN ne contient pas de séquence poly-A. Cependant, les quantités récupérées en ARN extraits sont plus faibles que lors de l'utilisation du Trizol® mais restent suffisantes pour les manipulations suivantes.

Les quantités d'ARN messagers récupérées sont déterminées par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm. Les ARN messagers sont ensuite conservés à -80°C.

### 3.1.2.2. *La transcription inverse (reverse transcriptase)*

Les ADNc sont synthétisés à partir d'ARN totaux et d'amorces aléatoires. Chaque transcription inverse est effectuée sur une quantité voisine de 1 µg d'ARN dans un volume final de 10 µL d'eau de qualité « *RNase free* » contenant 2 µL d'amorces aléatoires (Random Primers (0,1 µg/mL), Promega®). Les ARN sont linéarisés à 65°C pendant 10 minutes puis immédiatement passés sur glace afin de conserver cette linéarisation. Après cette étape un mélange de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) (2 mM chaque), de tampon 1X M-MLV (Tris HCL 250 mM, KCL 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM et DTT 50 mM), 25 unités de *RNasin* ribonucléase inhibiteur recombinante et 200 U de M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) *reverse transcriptase* sont ajoutés aux échantillons d'ARN linéarisés. Ce mélange est complété avec de l'eau « *RNase free* » pour un volume réactionnel de 25 µL. Les échantillons sont incubés pendant 2 heures à 37°C. Les ADNc obtenus peuvent être directement testés par PCR ou conservés à -20°C.

### 3.1.2.3. *La PCR (Polymerase Chain Reaction)*

La technique de PCR mise au point par Mullis en 1985 permet l'amplification génique *in vitro* d'une séquence d'ADN connue. La PCR est basée sur la répétition de cycle de transitions de températures. Au préalable une étape de dénaturation initiale est effectuée. Cette étape consiste en un chauffage à 95°C pendant 5 minutes qui permet de dénaturer les ADN doubles brins mais aussi d'activer les polymérase de type « *Hot Start* » tout en inactivant d'autres enzymes qui pourraient être présentes dans la solution comme la transcriptase inverse. Chaque cycle est ensuite constitué de trois étapes : dénaturation – hybridation - élongation, répété n fois et permettant d'amplifier de façon exponentielle la séquence encadrée par les deux amorces.

Chaque amplification est réalisée à partir de 5 µL d'ADNc préparés lors de l'étape de transcription inverse. Ils sont mis en présence de 5 µL de tampons de réaction 5X (Promega®), 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (Promega®), 0,5 µL de dNTPs (10mM chaque, Promega®), de 0,9 µL de chacune des amorces sens et anti-sens (10mM, Sigma Genosys®) et de 0,25 µL d'enzyme *TAQ Hot Start* (Promega®) dans un volume final de 25 µL.

L'amplification est réalisée par thermocycleur (MJ Research®) dans les conditions suivantes : une première étape de déshybridation et d'activation de l'enzyme est réalisée à une température de 95°C pendant 5 minutes, se succèdent ensuite 30 cycles composés d'une étape de déshybridation de l'ADNc à 95°C pendant une minute, une étape d'hybridation des amorces à la  $T_M$  spécifique du couple d'amorces utilisées (généralement 60°C) et une étape d'élongation à 72°C pendant une minute. Une dernière étape d'élongation est réalisée à la suite des 30 cycles à 72°C pendant 5 min avant conservation des produits de PCR à 4°C.

La détection des produits de PCR est réalisée grâce au système FlashGel® (Lonza). La migration est réalisée à 70 Volt pendant 15 min. La taille des fragments amplifiés est évaluée par un marqueur de taille semi-quantitatif (FlashGel DNA QuantLadder 100 - 1500bp, Lonza).

### **3.1.2.4. La PCR quantitative**

La PCR quantitative est une application de la PCR reconnue comme la technique la plus sensible et la plus fréquemment utilisée pour la détection et la quantification de l'ARNm. Elle permet de suivre en continu le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néoformés.

Le système de fluorescence utilisé est le Sybr® Green qui est un agent intercalant. Il émet une fluorescence lorsqu'il se fixe à l'ADN double brin. Les différents dosages d'ARN messagers sont réalisés sur une plaque 96 puits. Une gamme étalon pour chacun des gènes testés est réalisée pour chaque expérimentation ainsi que des contrôles (test réalisé avec  $H_2O$  *RNase free*) pour vérifier les risques de contaminations et d'amplifications aspécifiques.

La préparation de chaque échantillon se fait en *duplica*. Les ADN complémentaires sont préalablement préparés de sorte à avoir une concentration finale de 0,002 µg/mL. 5 µL de cette dilution sont mis en présence du mix de réactifs contenant 10 pmol d'amorces sens du gène d'intérêt, 10 pmol d'amorces antisens du gène d'intérêt et 1X de Sybr® Green PCR mix (Eurogentec) dans un volume final de 25 µL. En parallèle ce même mélange est effectué avec les amorces du gène de référence. Tout est réalisé sur une plaque de 96 puits. Le protocole réalisé par l'appareil ABI Prism Sequence Detection System 5700 (Applied Biosystems) est le suivant : 15 secondes à 95°C pour la dénaturation, 30 secondes à 60°C pour l'hybridation et la synthèse.

Une fois le processus de PCR quantitative terminé, les résultats sont analysés par le logiciel GeneAmp® 5700 SDS. Le rapport gène cible sur gène d'intérêt est ensuite réalisé grâce à la méthode de calcul du  $2\Delta Ct$  afin de relativiser l'expression obtenue. Enfin, les données sont soumises à une étude statistique, faite par le logiciel XLSTAT 2010®.

Pour chaque gène, d'intérêt ou de référence, des amorces spécifiques sont sélectionnées à l'aide du logiciel primer3web version 4.0.0. Elles sont sélectionnées selon les exigences spécifiques de la PCR quantitative : une taille d'amplicons comprise entre 50 et 150pb et une température d'hybridation d'environ 60°C. De part l'utilisation du Sybr® Green une caractéristique supplémentaire est à vérifier : le risque d'hybridation des amorces sous forme de dimères est à éviter. (Tableau 5) Enfin le gène de référence est choisi parmi les gènes ubiquitaires selon un ordre de grandeur de taille similaire aux gènes d'intérêt étudiés. C'est le gène de la  $\beta$ -actine qui a été choisi ici.

Gènes	Amorce sens	Amorce anti-sens
HEF1	5'-CGCTGCCGAAATGAATAT-3'	5'-CCCTGTGTTCTGCTCTATGACG-3'
TP53	5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3'	5'-TCTGAGTCAGGCCCT TCTGT-3'
$\beta$ -actine	5'-ATTCCCTTGCCTTCTGGAT-3'	5'-CGTGAGGTCTGCCACTACAG-3'
LKB1	5'-TGGGGTCACCCTCTACAACA-3'	5'-CACCGTGAAGTCCTGAGTGT-3'

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées

### 3.1.3. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Pour identifier l'effet de différentes molécules sur le cycle cellulaire des cellules des deux lignées cellulaires étudiées une analyse par cytométrie en flux a été réalisée. Cette technique permet de caractériser le contenu en ADN des cellules de manière qualitative et quantitative après marquage à l'Iodure de Propidium et excitation par un faisceau LASER. Le contenu en ADN étant analysé grâce à l'émission de fluorescence de l'iodure de propidium fixé sur l'ADN à 585 nm.

Le marquage nucléaire est réalisé selon la méthode de Vindelov (Vindelov, 1977) dans les conditions suivantes. Après le traitement par différentes molécules des cellules synchronisées réalisé selon les méthodes décrites ci-dessus les cellules sont rincées au PBS puis marquées avec la solution de Vindelov. Le marquage se déroule en trois étapes : les cellules sont d'abord mises au contact d'une solution de glycine/NaOH (0,01 M) diluée au 1/2 dans du PBS et à laquelle est ajoutée 5  $\mu$ L de NP40 (0,1M) préalablement filtré pendant 3 minutes à température ambiante. S'ensuit une incubation de 2 minutes toujours à

température ambiante après ajout à la solution de 5  $\mu\text{L}$  de *RNAse* (1 mg/mL). Enfin 10  $\mu\text{L}$  d'Iodure de Propidium (3,2 mg/mL) sont ajoutés avant une dernière incubation de 10 minutes à 4°C et dans l'obscurité. L'analyse doit être réalisée très rapidement après le marquage.

Chaque suspension cellulaire est alors décollée au moyen d'une pipette pasteur par aspiration/refoulement puis filtrée à travers une membrane de nylon (50  $\mu\text{m}$ ) avant d'être analysée par cytométrie en flux (Accuri C6 FACScan). L'analyse porte sur au moins 30 000 noyaux (événements).

### 3.1.4. Etude de la capacité de liaison à l'ADN du mutant p53

Pour juger de la capacité ou non de mutant p53 à se lier à la séquence spécifique d'ADN afin d'exercer une activité facteur de transcription il est nécessaire d'extraire la fraction nucléaire des protéines des cellules des lignées étudiées. Pour cela le kit Nuclear Extract (Active Motif) a été utilisé après la préparation des cellules selon les conditions souhaitées.

Ce kit permet d'extraire les fractions nucléaire et cytoplasmique des protéines sans modification de leur activité. Les cellules sont tout d'abord rincées puis collectées dans une solution de PBS en présence d'inhibiteurs de phosphatases. Elles sont ensuite resuspendues dans une solution tampon hypotonique avant ajout d'un détergeant permettant le relargage des protéines cytoplasmiques dans le milieu. Après récupération des protéines de la fraction cytoplasmique par centrifugation, la fraction nucléaire est récupérée après lyse du noyau et solubilisée dans un tampon de lyse sans détergent en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases.

La concentration protéique de la fraction nucléaire est ensuite quantifiée à l'aide du kit ProStain™ Protein Quantification (Active Motif), il s'agit d'un dosage par fluorescence (excitation 488 nm – émission 635 nm). Les mesures sont réalisées à l'aide du spectrofluorimètre FP 6500 (Jasco).

Le kit TransAM™ p53 Transcription Factor Assay (Active Motif) fonctionne à la manière d'un test ELISA et permet de détecter et de quantifier la capacité des protéines p53 à se fixer à leur séquence consensus d'ADN pour l'activité facteur de transcription. (Figure 18) La réaction est réalisée sur une plaque à 96 puits dans le fond desquels sont immobilisées des

séquences d'oligonucléotides correspondant à la séquence consensus pour le site de liaison à l'ADN des protéines p53 (5'-GGACATGCCCGGGCATGTCC-3'). Les protéines p53 contenues dans les différents extraits nucléaires préparés en amont pouvant se lier à ces séquences sont détectées grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-p53. L'addition d'un second anticorps couplé à la peroxidase de raifort (HRP) permet une révélation colorimétrique quantifiable par spectrophotométrie.

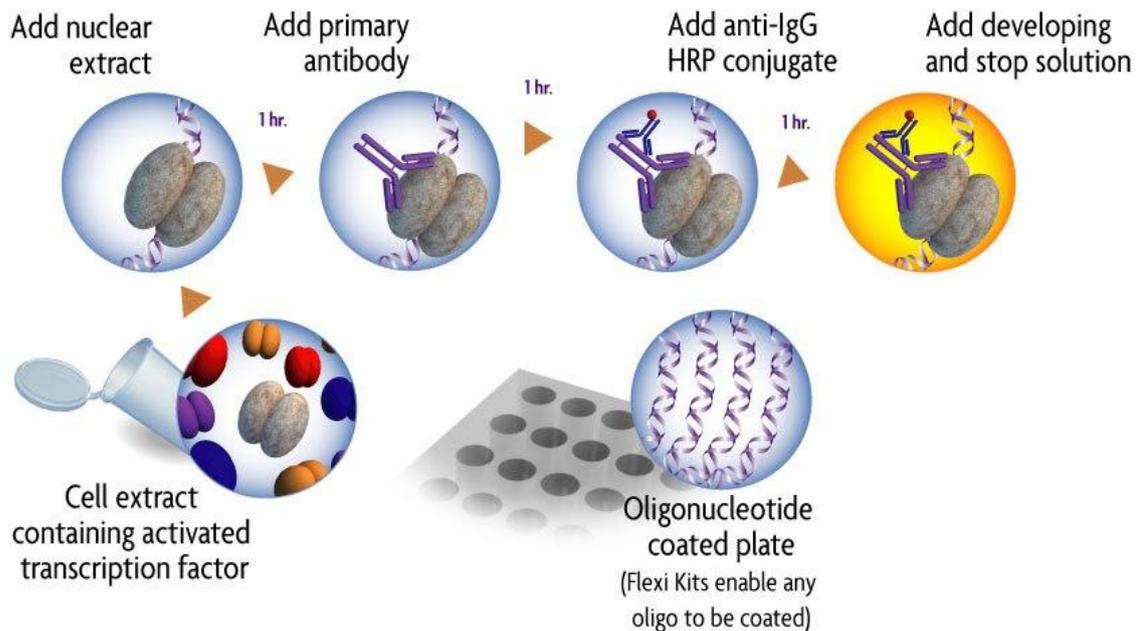


Figure 18 : Principe du kit TransAM™ Transcription Factor ELISAs (Active Motif)

### 3.1.5. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Développée par Gilmour et Lis entre 1984 et 1986 la technique Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) est une méthode utilisée pour étudier les interactions entre d'une part une protéine spécifique et d'autre part une région particulière de l'ADN génomique. Elle est donc particulièrement utilisée pour déterminer si une protéine facteur de transcription interagit avec un gène cible particulier. L'utilisation du formaldéhyde pour la fixation réversible protéine-ADN ou protéine-protéine ainsi que de la PCR pour détecter la présence d'un gène cible ont permis de développer une technique plus moderne de ChIP. (Carey et al., 2009) (Figure 19)

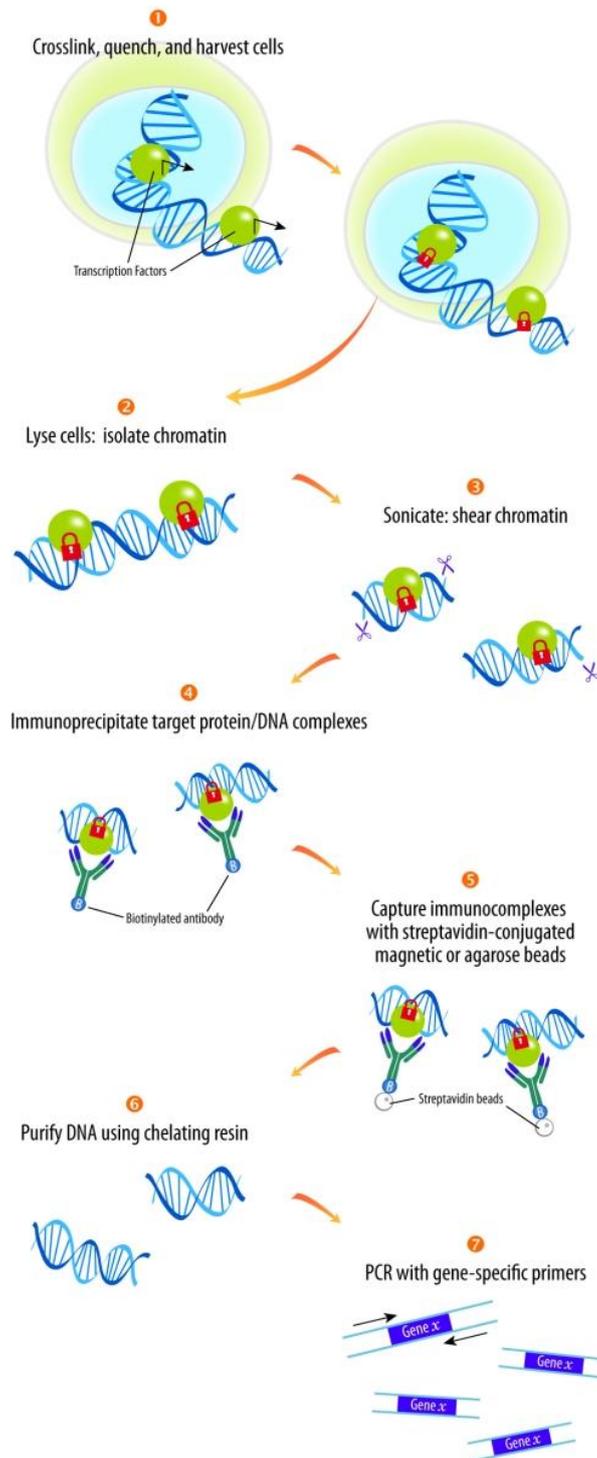


Figure 19 : Principe de la technique Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) (Dey et al., 2012) (R&D system™)

Toujours après le traitement dans les conditions souhaitées les cellules sont fixées dans une solution de formaldéhyde 1% pendant 15 minutes à température ambiante. Une solution de glycine est ensuite ajoutée pour neutraliser le formaldéhyde pendant 5 minutes, toujours à température ambiante. Après décrochage des cellules par grattage ces dernières sont culottées par centrifugation à 3 000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Les

expériences de CHIP sont ensuite réalisées selon les indications données dans le kit Pierce™ Agarose CHIP (Thermo Scientific). Les anticorps utilisés sont : un anticorps anti-p53 (PAb 240) (ThermoFisher Scientific ; MA5-15244), un anticorps anti-ARN Polymérase II et un anticorps anti-IgG de lapin (ces deux derniers étant inclus dans le kit).

Les séquences d'amorces utilisées pour l'amplification du gène HEF1 sont spécifiques à la séquence génomique (amorce sens : 5'-AATCATGGGGACGGGTCTTT-3', amorce anti-sens : 5'-TGACTAAGCCTGAAGTGGGG-3'). Les conditions de PCR ont quant à elles été modifiées par rapport à celles présentées ci-dessus pour une meilleure détection. Le volume réactionnel final de 50 µL comprend 18 µL d'ADN purifié, 10 µL de solution tampon 5X (Promega®), 8 µL de MgCL2 (Promega®), 1 µL de dNTPS (10 mM chaque) (Promega®), 0,28 µL de l'enzyme GoTaq® Hot Start Polymerase (500 U) (Promega®) et 1,78 µL de chaque amorce (10mM, Sigma Genosys®).

La détection des produits de PCR est réalisée grâce au système FlashGel® (Lonza). La migration est réalisée à 70 Volt pendant 15 min. La taille des fragments amplifiés est évaluée par un marqueur de taille semi-quantitatif (FlashGel DNA QuantLadder 100 - 1500bp, Lonza).

## 4. Résultats

### 4.1. Détermination du pic d'expression du gène *HEF1* dans la lignée NSCLC-N6-L16 sous l'effet de la molécule A190

Les premiers résultats d'étude de l'expression du gène cible *HEF1* sur la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16 réalisés au laboratoire avant mon arrivée montraient un pic de surexpression entre 60 et 65 heures. (Moreau et al., 2008) Or vu le temps de doublement de la lignée, environ 35 heures, il était raisonnable de penser qu'il s'agissait de la réaction des cellules après un cycle complet de division cellulaire et donc des cellules les plus résistantes. Mon premier objectif fut donc de rechercher les toutes premières modifications de l'expression du gène *HEF1*, lors du cycle cellulaire suivant la mise en contact de la molécule cytostatique A190.

Pour cela une large étude cinétique de l'expression du gène *HEF1* a été réalisée. (Figure 20) Des cellules de la lignée NSCLC-N6-L16 ont été synchronisées puis traitées par la molécule A190 juste à la sortie de mitose ; ainsi le temps t0 correspondait aux toutes premières étapes de la phase G1 et donc au début du cycle cellulaire. Une extraction des ARN messagers a ensuite été réalisée toutes les 5 heures pendant une période de 0 à 70 heures. L'expression du gène *HEF1* fut ensuite quantifiée par qPCR.

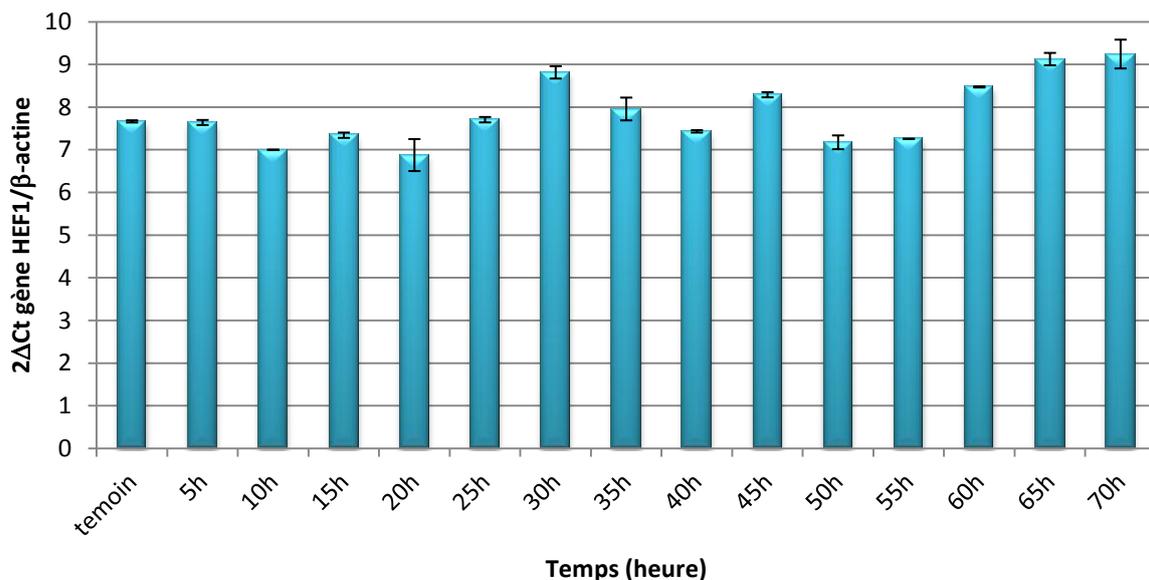


Figure 20 : Etude par RT-qPCR de l'expression de *HEF1* entre 0 et 70 heures sur NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées par A190 à la  $CI_{50}$  (39,4  $\mu$ M)

Grâce à cette première étude plusieurs temps d'exposition ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie : 10 heures, 15 heures, 30 heures et 45 heures. En effet une expression plus forte de *HEF1* est visible à 15, 30 et 45 heures. (Figure 20) Le temps 10 heures fut gardé comme témoin de part son lien avec le temps t = 45 heures. En effet, le temps de doublement de la lignée étant 35 heures, la surexpression à 45 heures de *HEF1* correspondrait donc à la phase G1 du second cycle cellulaire après traitement par A190. L'équivalence au premier cycle cellulaire serait donc 10 heures après traitement. Il est intéressant de noter que la surexpression qui avait été décrite entre 60 et 70 heures précédemment est toujours présente dans cette première étude cinétique.

Une deuxième étude cinétique fut donc lancée sur les différents temps sélectionnés : 10, 15, 30 et 45 heures. (Figure 21) Du fait de la baisse du nombre de temps d'étude il fut possible à partir de là, de faire la comparaison entre les cellules, toujours synchronisées, traitées et non traitées par A190. De plus, le repiquage n'étant plus nécessaire, la certitude d'être au tout début de la phase G1 au moment de la mise en contact avec A190 est encore plus grande et acquise. L'extraction des ARN messagers est une nouvelle fois réalisée aux différents temps d'intérêts puis l'expression du gène *HEF1* est quantifiée par qPCR après synthèse des ADNc par transcription inverse.

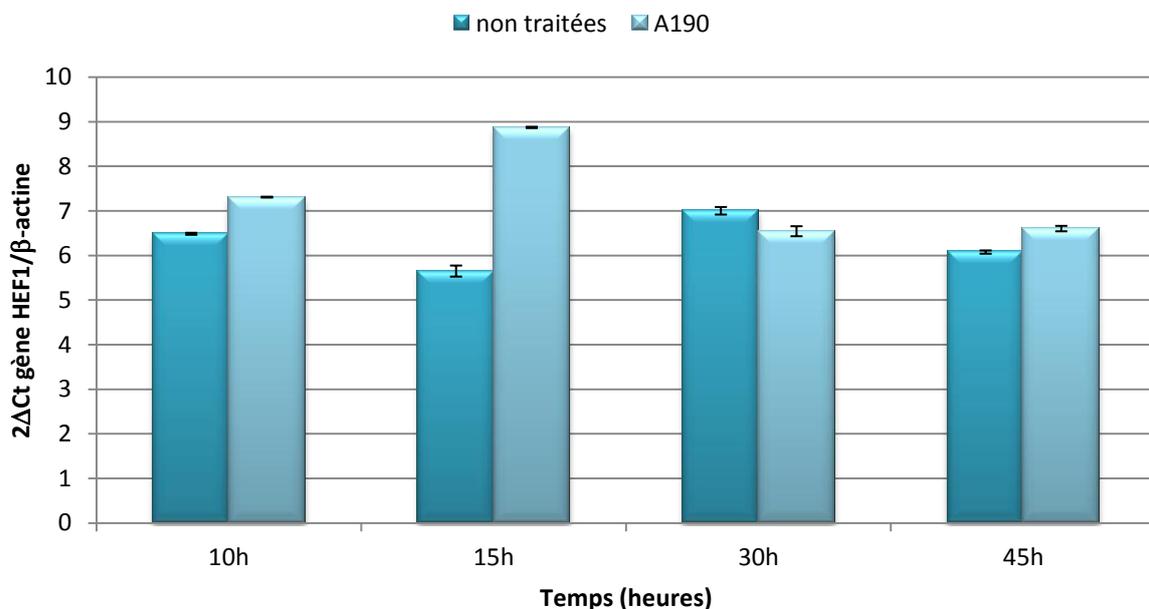


Figure 21 : Etude de l'expression de *HEF1* à 10, 15, 30 et 45 heures sur NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées ou non par A190 à la  $CI_{50}$  (39,4  $\mu$ M)

Un temps en particulier ressort de cette deuxième cinétique : en effet la différence la plus significative dans le sens d'une surexpression de *HEF1* dans le puits traité par rapport au puits témoin se retrouve après 15 heures d'exposition à la molécule A190.

Une troisième et dernière étude cinétique autour de 15 heures a donc été réalisée dans le but d'affiner la recherche du pic de surexpression de *HEF1* dans la lignée NSCLC-N6-L16 sous l'action de la molécule A190. L'expression du gène *HEF1* a été quantifiée par qPCR à 15, 16 et 17 heures dans la lignée NSCLC-N6-L16 avec comparaison entre les puits traités et les puits non traité par la molécule A190. (Figure 22)

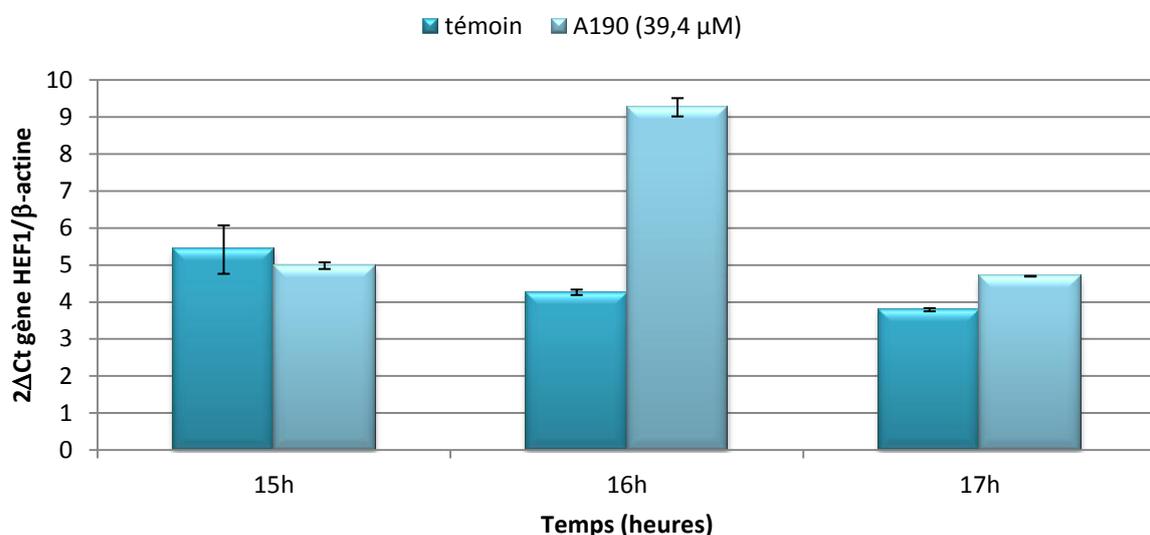


Figure 22 : Etude par RT-qPCR de l'expression de *HEF1* à 15, 16 et 17 heures sur L16 synchronisées traitées ou non par A190 à la  $CI_{50}$  (39,4 μM)

C'est ainsi que nous avons pu montrer qu'un traitement par A190 de la lignée NSCLC-N6-L16 entraînait une surexpression du gène *HEF1* après une exposition de 16 heures à la molécule.

#### 4.2. Etude comparative de l'expression des gènes *HEF1* et *TP53* sur les lignées cellulaires NSCLC-N6-L16 et A549

En plus de la surexpression du gène cible *HEF1*, un traitement par la molécule A190 de la lignée NSCLC-N6-L16 entraîne un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et une apoptose. L'effet cytostatique de la molécule est également visible dans la lignée A549.

Une étude a montré qu'en deçà d'un certain seuil et qu'au-delà d'un autre la voie de l'apoptose était privilégiée par *HEF1*. (Dadke et al., 2006) Cette donnée va dans le sens de

l'observation d'une part d'une surexpression de *HEF1* chez les cellules traitées par A190 et d'autre part d'une apoptose chez ces mêmes cellules. Il semble possible donc que l'apoptose observée passe par une activation de la voie apoptotique déclenchée par *HEF1*.

L'étape suivante de mes travaux de recherche pour cette thèse fut donc de chercher par quel mécanisme passait l'activation de *HEF1*. *TP53* étant le gène orchestrant l'apoptose il semblait logique d'étudier son expression en même temps que celle du gène *HEF1*. Une nouvelle étude par RT-qPCR a donc été faite sur cellules NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées ou non par A190 entre 15 et 17 heures pour voir le profil d'expression des deux gènes. (Figure 23)

Dans le même temps, une étude comparable a été réalisée sur la lignée A549 dans les mêmes conditions afin de juger des différences entre une lignée pour laquelle le gène *TP53* est muté (NSCLC-N6-L16) et une lignée pour laquelle le gène est sous sa forme sauvage (A549).

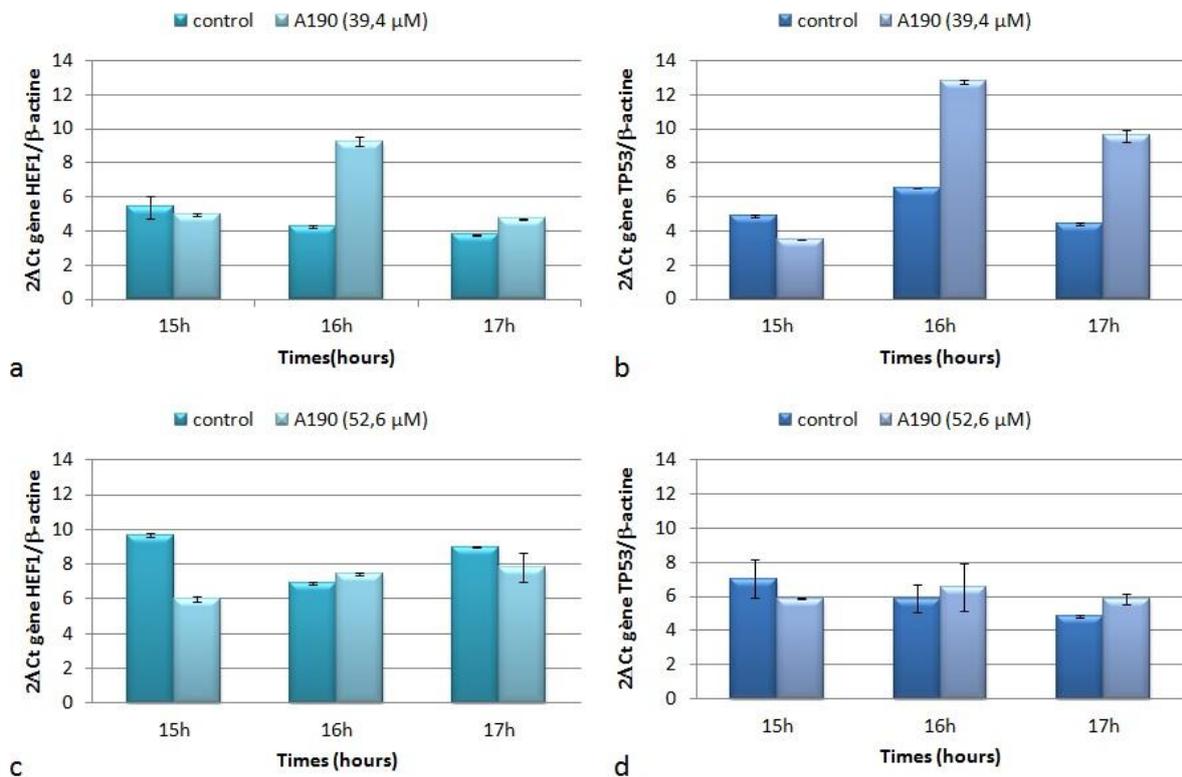


Figure 23 : Etude par RT-qPCR de l'expression des gènes *HEF1* (a et c) et *TP53* (b et d) dans les lignées NSCLC-N6-L16 synchronisées (a et b) et A549 synchronisées (c et d) traitées ou non par A190 à la  $CI_{50}$  pendant 15 à 17 heures

Cette étude a permis de montrer qu'un traitement par A190 entraînait une surexpression conjointe des gènes *HEF1* et *TP53* dans la lignée NSCLC-N6-L16 à exactement 16 heures. Une surexpression qui se poursuit dans le temps dans le cas de *TP53*.

Au contraire, dans la lignée A549, l'expression de *HEF1* reste basse dans les puits traités en comparaison des témoins même si l'expression basale semble plus importante que dans la lignée NSCLC-N6-L16. Pour le gène *TP53* aucune différence significative n'est à noter. De plus, l'absence de modifications significatives de l'expression du gène *TP53* entre puits traités et puits témoins tend vers une spécificité d'action de la molécule A190 sur les lignées *TP53* muté.

### 4.3. Vérification de l'expression du gène *LKB1* dans la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16

Il nous a semblé nécessaire de vérifier que le gène *LKB1* n'était ni modifié ni absent dans la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16. Ceci afin de pouvoir conclure de façon certaine que la surexpression observée à 16 heures de traitement par A190 du gène *HEF1* est bien due à ce traitement et non pas à un mécanisme découlant de la perte de *LKB1* comme c'est le cas pour A549.

L'étude de l'expression de *LKB1* a été réalisée dans deux conditions différentes. Tout d'abord sur un *pool* de cellules non synchronisées : l'expression du gène est testée par RT-PCR après extraction des ARN messagers dans les lignées NSCLC-N6-L16 et A549 mais également une lignée épithéliale saine NCTC 2544. (Figure 24) Cette lignée épithéliale humaine conservée sous la référence ICLC (Interlab Cell Line Collection) HL97002. Le dépositaire de cette lignée est le Professeur M. Ferro de l'Université de Gênes en Italie et elle n'est distribuée que sous son consentement. Elle est issue d'un kératinocyte sain et présentée comme un bon modèle cellulaire pour les études de cytotoxicité du tissu sain en comparaison avec les cellules cancéreuses. Elle sert ici de témoin positif de l'expression du gène *LKB1*. La deuxième étape fut de tester l'expression du gène, toujours par RT-PCR, dans les conditions de traitements par A190 donc sur cellules synchronisées traitées ou non par la molécule pendant 16 heures.

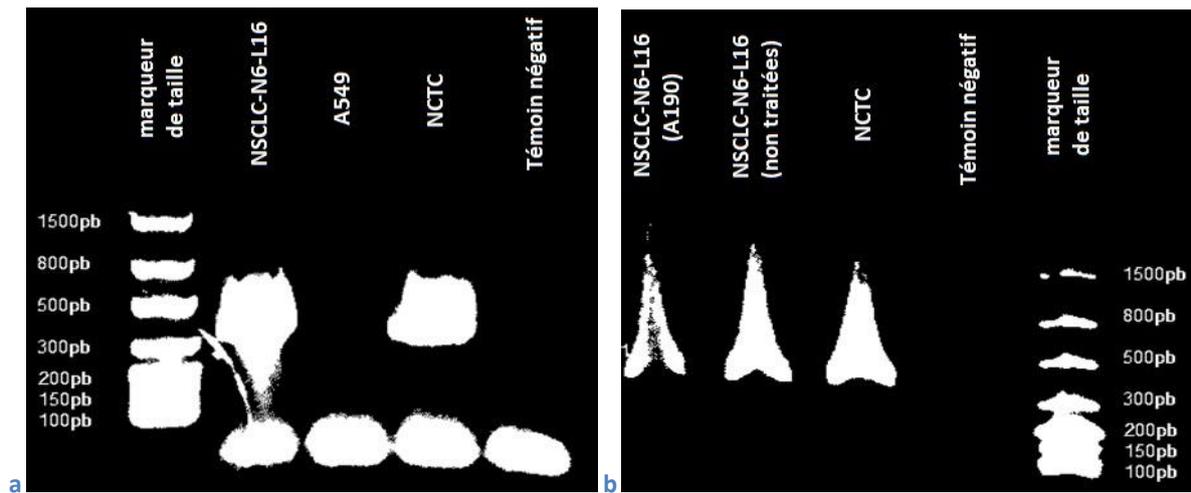


Figure 24 : Profil électrophorétique après amplification par PCR du couple d'amorces *LKB1* sur cellules non synchronisées (a) ou synchronisées traitées ou non par A190 (b)

La réalisation de ces diverses expériences confirme l'absence du gène dans la lignée A549. Au contraire, dans la lignée NSCLC-N6-L16, le gène *LKB1* est bien exprimé et ce quelles que soient les conditions.

#### 4.4. Etude par cytométrie en flux de l'effet de plusieurs molécules cytostatiques sur le cycle cellulaire

Après la confirmation de l'effet cytostatique de PRIMA-1 sur nos deux lignées cellulaires d'étude nous avons voulu comparer l'effet de cette molécule au niveau du cycle cellulaire de NSCLC-N6-L16 et A549 par rapport à celui de A190.

Tous les histogrammes ont été obtenus pour des cellules des lignées d'étude NSCLC-N6-L16 et A549 synchronisées en mitose de façon naturelle puis traitées ou non par les molécules cytostatique PRIMA-1 ou A190 à la  $CI_{50}$  correspondante pendant 16 heures. Les  $CI_{50}$  définies par une étude cytotoxique réalisée au laboratoire de PRIMA-1 sont de 27  $\mu$ M pour NCLC-N6-L16 et de 34  $\mu$ M pour A549. Trois profils ont été étudiés : tout d'abord une analyse sur la population entière de cellules puis une étude selon le statut apoptotique ou non apoptotique des cellules.

##### 4.4.1. Etude dans la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16

Les cellules étant synchronisées en phase de mitose en amont du traitement de 16 heures, l'histogramme du puits témoin montre donc le profil de cellules essentiellement en phase G1 du cycle cellulaire. Cependant une phase S semble se dessiner pour l'étude de la population entière de cellules. L'étude successive selon le statut apoptotique ou non des

cellules montre alors tout son intérêt. En effet, ce qui semble être une phase S correspond en réalité aux débris cellulaires des cellules mortes par apoptose. L'analyse de l'histogramme des seules cellules non apoptotiques montre bien la présence unique du pic en phase G1.

Cette fausse phase S dans le puits témoin correspond donc à un nombre important de débris cellulaires de cellules dont l'apoptose a été provoquée par une densité trop importante de cellules et donc une mort naturelle par mort cellulaire programmée pour cause de manque de nutriments.

La caractéristique polyploïde des cellules de la lignée NSCLC-N6-L16 est également visible sur les histogrammes avec la présence d'un second pic, moins important, représentant des cellules à 4n ADN. Ainsi il y a présence de deux pics G1, le premier pour les cellules à 2n ADN et le second pour les cellules à 4n ADN.

Le traitement par PRIMA-1 augmente la proportion de cellules en phase G1 du cycle cellulaire aussi bien pour les populations à 2n ADN qu'à 4n ADN. Le nombre de débris cellulaires est également moins important que dans le puits témoin : l'effet de la molécule provoquant une diminution de la densité cellulaire, l'inhibition de croissance suivie de la mort cellulaire par appauvrissement du milieu en éléments nutritifs sont moins marquées que pour les cellules non traitées. (Figure 25 – Tableau 6)

Le traitement par A190 semble, quant à lui, avoir un effet plus puissant que celui induit par PRIMA-1. En effet, si le blocage en phase G1 reste visible sur l'histogramme il est en revanche moins important du fait que les cellules ont déjà subi l'apoptose. En effet, seuls 27,1% de la population des cellules apoptotiques contre 45,4% pour PRIMA-1 sont dans la phase G1 du cycle cellulaire (29,2% pour le témoin). Ainsi la molécule possède la capacité de bloquer les cellules en phase G1 mais également de déclencher par la mort par apoptose des cellules.

	Population totale			Cellules non apoptotiques			Cellules apoptotiques		
	Témoin	PRIMA-1	A190	Témoin	PRIMA-1	A190	Témoin	PRIMA-1	A190
<b>G1 2n ADN</b>	26,6%	38,9%	23,4%	21,8%	22,0%	21,3%	29,2%	45,4%	27,1%
<b>G1 4n ADN</b>	10,9%	7,7%	6,2%	9,7%	10,5%	7,3%	10,7%	6,9%	5,7%

Tableau 6 : Tableau récapitulatif présentant le pourcentage de cellules de la lignée NSCLC-N6-L16 dans les phases G1 2n ADN et G1 4n ADN

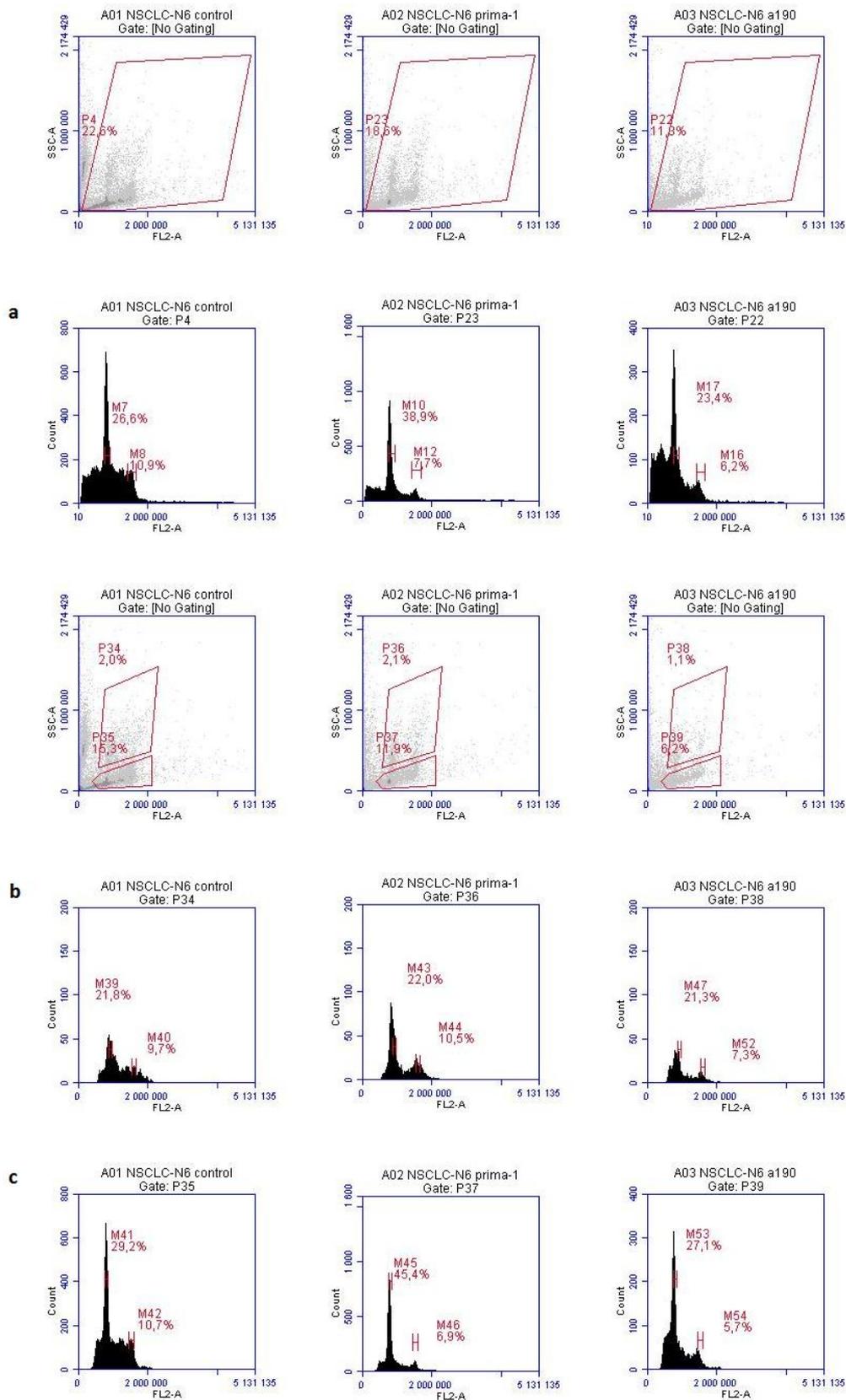


Figure 25 : Analyse comparée par cytométrie en flux des effets de deux molécules pro-apoptotiques, A190 et PRIMA-1, sur des cellules synchronisées de la lignée NSCLC-N6-L16 traitées à la  $CI_{50}$  pendant 16 heures (a : population totale des cellules – b : cellules non apoptotiques – c : cellules apoptotiques)

#### 4.4.1. Etude dans la lignée cellulaire A549

La fausse phase S est également visible dans le puits témoin de cette lignée cellulaire, d'autant plus que le temps de dédoublement est plus rapide pour A549 que pour NSCLC-N6-L16.

Comme pour la lignée NSCLC-N6-L16, un blocage en phase G1 est observé lors d'un traitement par la molécule PRIMA-1 (44% contre 40,1% pour le témoin) ou par la molécule A190 (47,1% contre 40,1%) pour la population de cellules A549 à 2n ADN. Le blocage des cellules à 4n ADN est moins marqué que pour la lignée précédente quel que soit le type de traitement. (Figure 26 – Tableau 7)

La différence entre les deux traitements se trouve une fois de plus au niveau de la population de cellules apoptotiques. En effet si le blocage en G1 est toujours visible dans le cas d'une exposition des cellules A549 à la molécule PRIMA-1 (48% contre 46,6% pour le témoin). La proportion de cellules dans cette même phase G1 pendant un traitement par A190 diminue nettement (34%) montrant ainsi une plus grande efficacité de la molécule : les cellules sont déjà mortes par apoptose dans ce cas.

	Population totale			Cellules non apoptotiques			Cellules apoptotiques		
	Témoin	PRIMA-1	A190	Témoin	PRIMA-1	A190	Témoin	PRIMA-1	A190
<b>G1 2n ADN</b>	36,6%	34,7%	36,3%	40,1%	44,0%	47,1%	46,6%	48,2%	34,0%
<b>G1 4n ADN</b>	11,2%	10,2%	9,2%	10,6%	8,4%	8,0%	11,7%	12,2%	10,0%

**Tableau 7 : Tableau récapitulatif présentant le pourcentage de cellules de la lignée A549 dans les phases G1 2n ADN et G1 4n ADN**

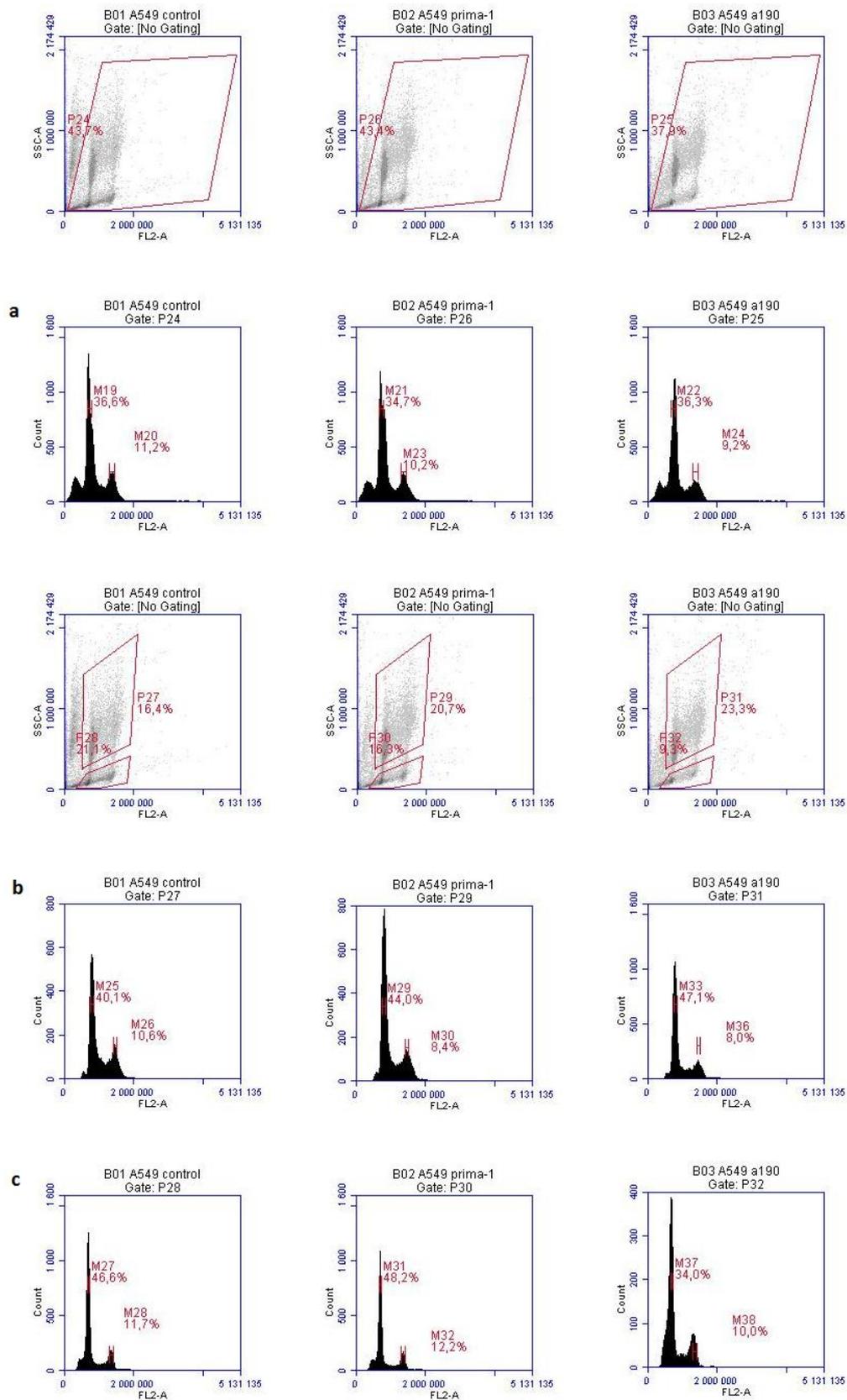


Figure 26 : Analyse comparée par cytométrie en flux des effets de différentes deux molécules pro-apoptotiques, A190 et PRIMA-1, sur des cellules synchronisées de la lignée A549 traitées à la  $CI_{50}$  pendant 16 heures (a : population totale des cellules – b : cellules non apoptotiques – c : cellules apoptotiques)

#### 4.5. Capacité des protéines mutées p53 à se fixer à la séquence consensus de l'ADN sous l'effet de A190

La capacité de liaison à l'ADN des protéines p53 mutées ou non selon la lignée cellulaire étudiée est quantifiée grâce au test TransAM™ p53 (Active Motif). L'étude a été réalisée sur les deux lignées NSCLC-N6-L16 et A549 non synchronisées pour avoir une quantité suffisante d'extrait de protéines nucléaires selon les indications du test. Les cellules ont été traitées ou non par les molécules PRIMA-1 ou A190 à la  $CI_{50}$  pendant 48 heures. Le contrôle positif est réalisé avec un extrait de protéines nucléaires venant de cellules dont la p53 a été activée par traitement avec  $H_2O_2$ .

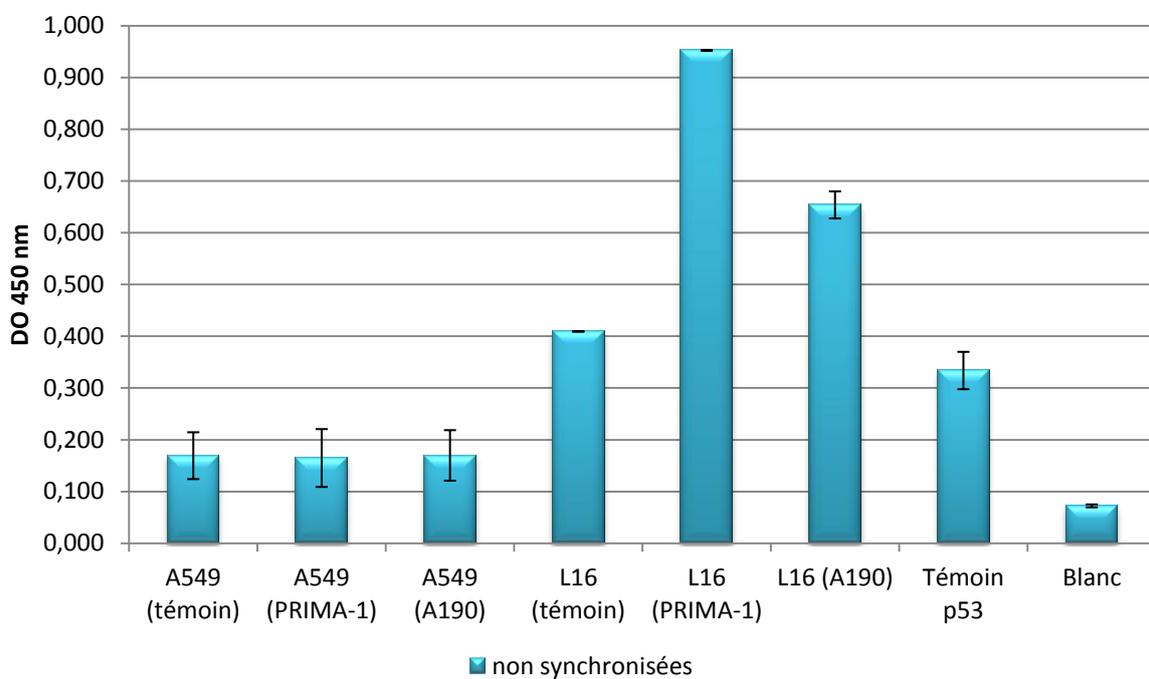


Figure 27 : Observation du degré de fixation de la protéine p53 sur sa séquence cible d'ADN dans les lignées cellulaires NSCLC-N6-L16 et A549 traitées ou non par PRIMA-1 ou A549 à la  $CI_{50}$

La possibilité de fixation des protéines sauvages p53 issues de la lignée cellulaire A549 est montrée grâce au puits témoin qui présente ainsi le niveau basal d'expression de la protéine et de son activité lorsque la cellule est au repos. L'ajout de la molécule PRIMA-1 ou de la molécule A190 ne modifie en rien le degré de fixation des protéines à leur séquence de liaison à l'ADN.

La situation est tout autre pour la lignée NSCLC-N6-L16. Le taux de fixation des protéines mutées issues de la lignée est déjà relativement élevé dans le puits témoin en comparaison

avec le témoin positif. Cependant, lorsque les cellules sont traitées par PRIMA-1, molécule connue pour sa capacité à restaurer la conformation des mutants 273His, le degré de fixation augmente de façon drastique. Il est en effet multiplié par un facteur 2,5. Bien qu'un peu moins impressionnant, lors du traitement par A190 nous montrons également une augmentation importante de la capacité des mutants p53 à se fixer sur la séquence consensus : le taux est multiplié par 1,6. (Figure 27)

#### 4.6. Essai ChIP afin d'identifier le lien entre le génome (*HEF1*) et le protéome (p53) : activité facteur de transcription

Dans le but de démontrer un lien définitif entre l'activation de p53 et l'expression du gène *HEF1* nous avons fixé toutes les interactions protéine-ADN présentes au niveau des cellules synchronisées de la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16 après un traitement de 16 heures par la molécule A190. Cette chromatine fixée subit ensuite une immunoprécipitation (IP) avec un anticorps spécifique à la protéine p53. Enfin, la présence du gène *HEF1* parmi toutes les séquences génomiques récupérées par IP fut testée par PCR. 10% de la chromatine totale fixée a été gardé pour chaque condition pour les témoins d'expression.

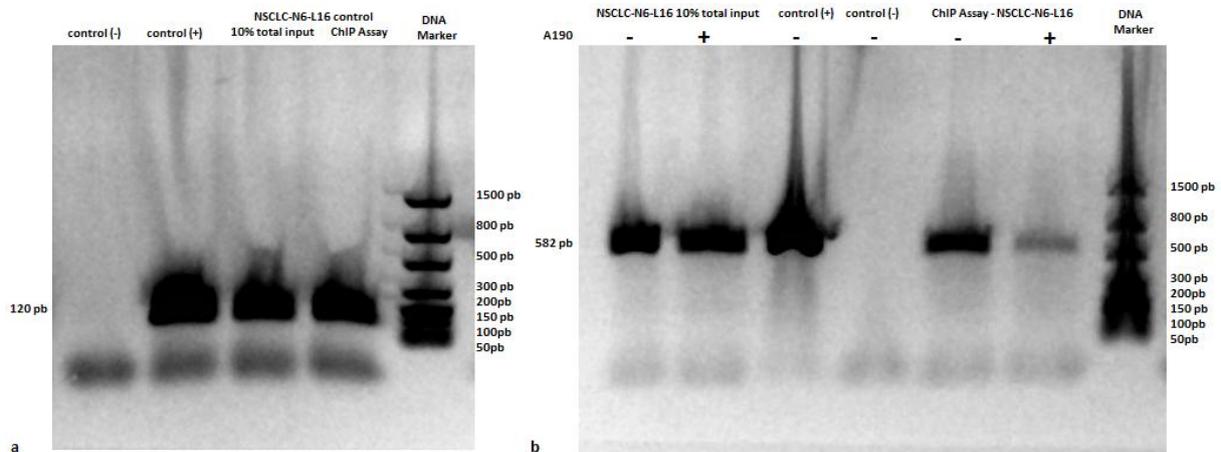


Figure 28 : (a) Témoins positifs de ChIP sur cellules NSCLC-N6-L16 synchronisées avec anticorps Anti-RNA Polymerase II et amorces spécifiques de GAPDH – (b) ChIP Assays sur cellules NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées ou non par A190 pendant 16 heures avec anticorps anti p53 et amorces spécifiques du gène *NEDD9/HEF1/Cas-L*

Le témoin positif de réaction a été réalisé sur la chromatine fixée, issue de cellules NSCLC-N6-L16 synchronisées mais non traitées, immunoprécipitées avec l'anticorps anti-ARN Polymérase II. La présence de la séquence génomique du gène cible est révélée par PCR réalisée avec des amorces spécifiques du promoteur de la GADPH (glycéraldéhyde-3-

phosphate déshydrogénase). La présence d'un produit de PCR à 120 pb permet de valider les différents essais ChIPs.

La présence d'un produit de PCR de 582 pb au niveau des témoins 10% chromatine totale confirme la présence du gène *HEF1* dans chacun des essais ChIP avant immunoprécipitation. La présence de ce même fragment au niveau des essais ChIP après immunoprécipitation témoigne d'un lien physique entre le gène *HEF1* et la protéine p53. (Figure 28)

#### 4.7. Étude de l'expression des gènes *PI3K*, *AKT* et *mTOR*

L'expression des trois oncogènes *PI3K*, *AKT* et *mTOR* a été étudiée par RT-qPCR dans la lignée cellulaire A549 sur cellules synchronisées, traitées ou non par A190 à la  $CI_{50}$ . Les temps d'expositions étudiés, de 15 à 17 heures, ont été choisis en fonction des résultats précédents obtenus par l'étude cinétique de l'expression du gène *HEF1* et présentés plus haut.

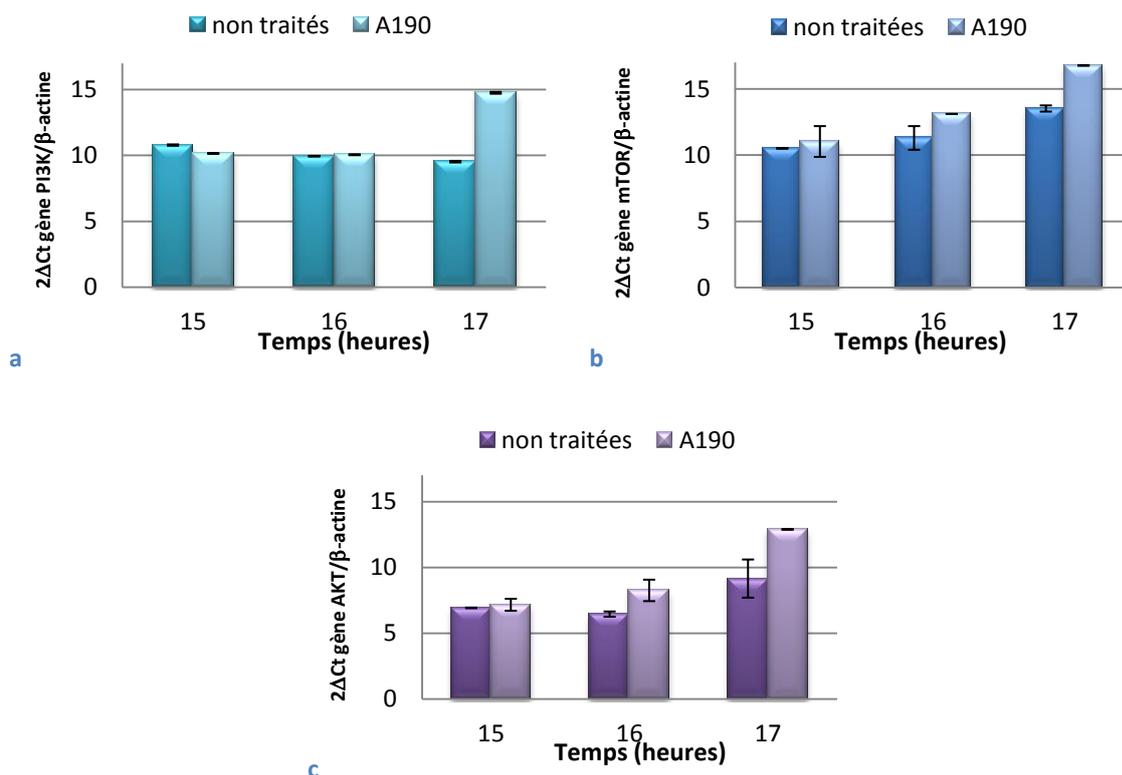


Figure 29 : Etude de l'expression des gènes *PI3K* (a), *mTOR* (b) et *AKT* (c) entre 15 et 16 heures sur A549 synchronisées traitées ou non à la  $CI_{50}$  (52,6  $\mu M$ )

Cette étude ne montre aucune modification significative de l'expression des gènes *PI3K*, *mTOR* et *AKT* à 15 heures ou 16 heures de traitements entre les puits traités et les puits

témoins. (Figure 29) En revanche une surexpression des trois gènes est visible après 17 heures de mise en présence avec la molécule A190 par rapport aux puits témoins.

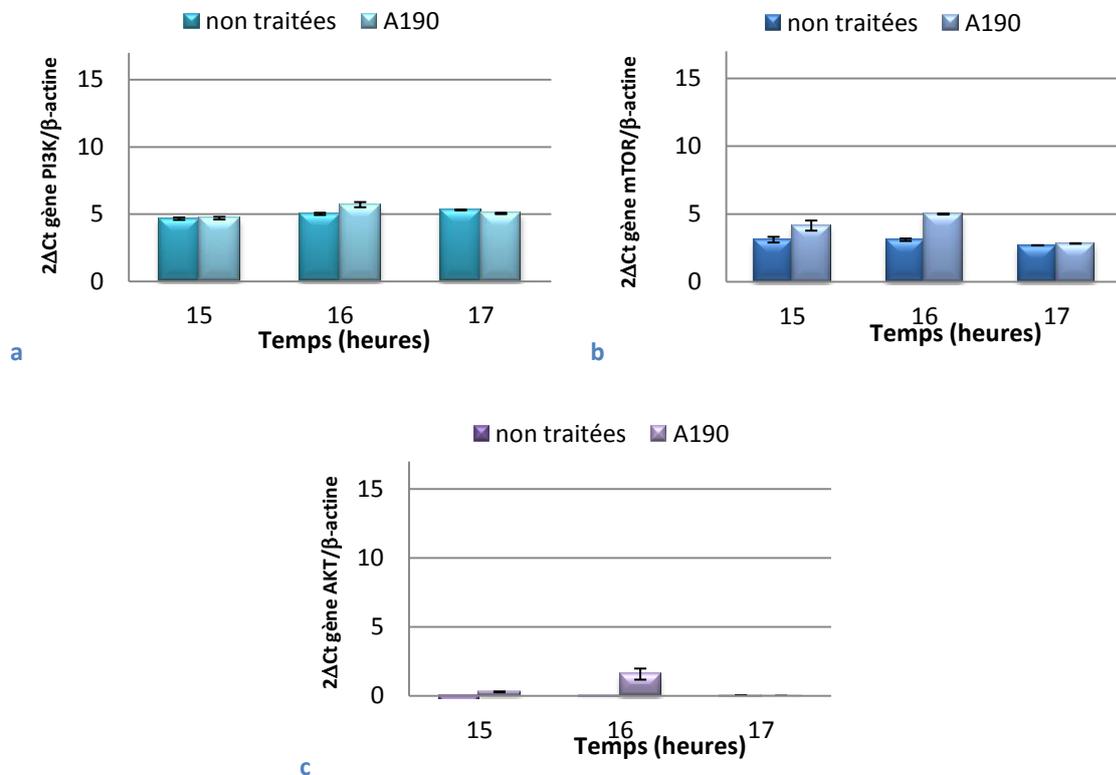


Figure 30 : Etude de l'expression des gènes *PI3K* (a), *mTOR* (b) et *AKT* (c) entre 15 et 16 heures sur NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées ou non à la  $CI_{50}$  (39,4  $\mu M$ )

La même étude a été réalisée pour la lignée NSCLC-N6-L16. Le profil d'expression des trois oncogènes est tout autre. (Figure 30) En effet, l'expression des gènes *PI3K* et *mTOR* est 2 à 3 fois plus faible que celle observée dans la lignée A549. Pour le gène *AKT* l'expression n'est pas supérieure au bruit de fond, le gène ne semble pas être exprimé dans cette lignée. De plus, aucune modification significative n'est visible entre les puits traités et les puits non traités.

## 5. Discussion

Le cancer du poumon non à petites cellules se caractérise par des tumeurs issues de cellules cancéreuses qui ont un temps de dédoublement très lent, avec bien souvent des cellules en phase G0, G1D ou G1DT du cycle cellulaire. L'absence de prolifération soutenue de ces cellules leur confère donc une résistance aux chimiothérapies classiques dirigées contre les acteurs de la prolifération. Dans 50% des cas une progression métastatique importante est montrée. Il s'agit alors de cancers au profil métastatique avec des cellules en prolifération qui par conséquent restent sensibles aux chimiothérapies classiques utilisées actuellement. Cependant, le terrain à soigner est tellement vaste que les chances de guérison par ce type de traitement restent faibles.

La nécessité de développer de nouveaux traitements ciblant de nouvelles cibles thérapeutiques est donc essentielle. Des cibles cette fois ne touchant pas les acteurs de la prolifération mais plutôt ceux capables d'inhiber la survie des cellules et d'induire l'apoptose. Dans cette optique la recherche s'est tournée depuis plusieurs années vers des stratégies de thérapie ciblée dirigées contre les gènes altérés des tumeurs. Ceci dans le but de mieux cibler les cellules cancéreuses et donc de mieux répondre aux caractéristiques de ces dernières pour un traitement toujours plus spécifique. Mais également dans le souci de préserver les cellules saines voisines afin de diminuer les effets indésirables et d'améliorer la qualité de vie des patients. L'objectif majeur de ces nouvelles stratégies de traitement est donc d'aller vers la proposition d'une thérapeutique de plus en plus personnalisée qui répond spécifiquement aux différentes altérations génétiques observées dans chaque tumeur et qui sont différentes selon les cas.

Le travail réalisé par notre laboratoire sur la molécule A190 s'ancre parfaitement dans cette recherche de thérapie ciblée au niveau du cancer du poumon. Des études antérieures ont montré que cette triazine avait une action antitumorale *in vivo* sans toxicité apparente. La molécule possède *in vitro* une activité cytostatique irréversible dans les deux lignées cellulaires NSCLC-N6-L16 et A549. Cette activité est associée à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire suivie par une mort par apoptose des cellules. Enfin, il a été démontré que l'induction de l'apoptose par le traitement A190 est provoquée par la surexpression du gène

*HEF1* lors de la phase G1 du cycle cellulaire. (Moreau et al., 2008) Nous présentons ainsi une nouvelle cible moléculaire dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules.

Le gène *HEF1* découvert en 1996 par l'équipe de Golémis est impliqué dans de nombreux processus cellulaires : prolifération, différenciation, motilité cellulaire et apoptose. (Law et al., 1996) Il s'agit d'un gène ubiquitaire mais qui est plus largement exprimé dans le poumon et les lignées cellulaires du poumon. (Malleter et al., 2010) L'expression du gène *HEF1* est faible en phase G1 et augmente en phase S pour atteindre un maximum en phase G2/M. La protéine native p105HEF1 et sa forme phosphorylée p115HEF1 sont alors clivées par des caspases en p55HEF1 et p65HEF1. La protéine p55HEF1 se concentre au niveau du centrosome où elle active RhoA et AuroraA deux enzymes essentielles au déroulement de la mitose avant migration vers le fuseau mitotique et favorise donc la prolifération cellulaire. La protéine p65HEF1 a quant à elle un rôle majeur dans l'apoptose : un clivage de cette protéine par les caspases 3 et/ou 7 donne lieu à la protéine p28HEF1 dont l'abondance déclenche la mort par apoptose.

La surexpression de ce gène est associée dans de nombreux types de cancers au développement métastatique des tumeurs. (O'Neill et al., 2007) Cependant, il a été démontré que la surexpression de *HEF1* au-delà d'un certain seuil pouvait être un facteur pro-apoptotique. Afin de promouvoir la prolifération cellulaire, *HEF1* doit être exprimé à un taux particulier dans la cellule, la surexpression ou l'extinction par siRNA du gène conduisant à l'apoptose. (Dadke et al., 2006) (Pugacheva and Golemis, 2006)

L'ensemble de ces travaux permet d'envisager le fait qu'un traitement par une molécule cytostatique capable d'induire une surexpression du gène *HEF1* pourrait provoquer le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses.

Nous avons montré par une étude plus approfondie du pic de surexpression du gène *HEF1* sous l'action de la molécule A190 par PCR quantitative que cette surexpression était la plus forte après 16 heures de traitement dans la lignée NSCLC-N6-L16. Le mécanisme utilisé pour déclencher l'apoptose sous contrôle de l'expression du gène *HEF1* restait à être étudié. Nous nous sommes alors interrogés sur le rôle possible dans cette situation du gène orchestrant le phénomène d'apoptose de façon générale : le gène *TP53*.

L'étude conjointe par PCR quantitative de l'expression des gènes *HEF1* et *TP53* sous traitement par la molécule A190 nous a permis de montrer que la surexpression du gène *HEF1* après 16 heures d'exposition au traitement s'accompagnait de façon simultanée à une surexpression du gène *TP53* dans la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16. Cette surexpression conjointe des deux gènes sous l'effet de la molécule A190 nous a donc permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle *TP53* serait facteur de transcription du gène *HEF1* dans le cas d'un carcinome épidermoïde (NSCLC-N6-L16) et participerait au blocage des cellules en phase G1 puis à leur apoptose.

Au contraire, la même étude réalisée au niveau d'un adénocarcinome (A549) n'a montré aucune modification significative que ce soit au niveau de l'expression du gène *HEF1* ou de celle du gène *TP53*. Le traitement par A190 ne modifie donc pas l'expression de ces deux gènes dans cette lignée, l'apoptose observée ne doit donc pas passer par la voie *HEF1*. Ces résultats montrent alors que la molécule A190 agit de façon spécifique sur les lignées cellulaires porteuses d'une mutation *TP53*.

Cependant, l'expression du gène *HEF1* dans la lignée A549 lorsqu'elle est non traitée est supérieure au niveau d'expression observé dans la lignée NSCLC-N6-L16. Ce constat confirme une étude bibliographique réalisée sur le gène *LKB1* qui nous a révélé que la perte d'expression de ce gène dans la lignée cellulaire A549 contribue fortement à la surexpression du gène *HEF1*. (Feng et al., 2012)

L'inactivation de *LKB1* a été observée dans de nombreuses tumeurs primaires d'adénocarcinomes pulmonaires ainsi que dans les lignées cellulaires dérivant de ce type de tumeurs. Il a été également montré une accélération du processus de tumorigenèse pulmonaire en cas d'inactivation de ce gène suppresseur de tumeurs. L'inactivation de *LKB1* est observée dans environ 34% des adénocarcinomes pulmonaires et dans 19% des carcinomes squameux. La comparaison avec d'autres gènes suppresseurs de tumeurs tels que *TP53* et *Ink4a/Arf* a permis de déterminer que la déficience en *LKB1* apparaissait plus rapidement que celles des autres gènes, qu'elle pouvait toucher un spectre plus large de types histologiques (adénocarcinomes, carcinomes squameux ou carcinomes à grandes cellules) et que le processus métastatique était plus fréquent comparé aux tumeurs présentant une perte de *TP53* ou *Ink4a/Arf*. Enfin, l'inactivation de *LKB1* est d'autant plus

fréquente dans les adénocarcinomes développés chez les fumeurs et coexiste très souvent avec des mutations *TP53*. (Ji et al., 2007)

Il nous a semblé important de confirmer l'expression du gène *LKB1* par RT-PCR au sein de la lignée NSCLC-N6-L16. Ceci nous permet de confirmer que la surexpression du gène *HEF1* observée à 16 heures de traitement par la molécule A190 ne peut être que la conséquence de ce traitement et non pas une induction contrôlée par l'absence du gène *LKB1* comme cela peut être le cas pour A549. Enfin, le fait qu'il n'y a pas de modifications significatives de l'expression du gène *HEF1* avec ou sans traitement par A190 dans la lignée A549 accentue l'idée d'une spécificité de la molécule A190 sur les lignées cellulaires qui présentent une mutation au niveau du gène *TP53*.

Le gène *TP53* est une cible moléculaire particulièrement intéressante et très étudiée. En effet, le gène *TP53* est très souvent altéré dans les cellules cancéreuses. Ces altérations donnent lieu à la traduction de protéines p53 mutées qui ont perdu leur fonction de « gardienne du génome » à l'origine de l'arrêt de la prolifération cellulaire ou de l'induction de l'apoptose dans des situations physiologiques. En plus de la perte de cette fonction les mutations au niveau de p53 sont à l'origine de modifications gain de fonction des protéines mutantes. Ces dernières acquièrent en effet la capacité d'activer la transcription de gènes favorisant la prolifération cellulaire et l'accumulation de mutations. Elles obtiennent ainsi une fonction oncogénique contribuant au processus de tumorigenèse. (Soussi and Lozano, 2005)

Avec un taux de mutation supérieur à 70%, le gène *TP53* fait partie des gènes les plus fréquemment mutés du cancer du poumon. C'est donc de façon naturelle que la recherche de nouveaux traitements dans ce cancer s'est dirigée vers l'étude de molécules capables de cibler les protéines mutées p53 dans le but de restaurer la fonction d'apoptose dans la population de cellules cancéreuses. De plus, la forte concentration de ces protéines mutées au sein des cellules cancéreuses en opposition au taux faible de la forme sauvage dans les cellules saines donne à ce type de molécule d'une part un grand nombre de protéines cibles et d'autre part une spécificité d'action. Deux types de stratégies existent : la restauration de fonction des protéines p53 mutée ou bien leur stabilisation par action sur ses divers partenaires.

Il a donc été montré la possibilité de restaurer l'activité facteur de transcription de protéines p53 mutantes grâce à l'action de petites molécules. Un exemple de ce type de molécule est PRIMA-1 (p53 Reactivation and Induction of Massive Apoptosis). (Bykov et al., 2002) Développée par un laboratoire suédois cette molécule présente une activité cytostatique dans les lignées cellulaires ayant le gène *TP53* muté. Au contraire, aucune activité toxique n'est révélée pour les lignées possédant la forme sauvage du gène. Il a été montré la capacité de cette molécule à restaurer la conformation spatiale sauvage de la partie centrale des protéines p53 mutées. Ce domaine central de la protéine, responsable de la liaison à l'ADN, ainsi à nouveau capable de se lier à l'ADN permet aux protéines mutantes p53 d'induire à nouveau l'expression de ces gènes cibles classiques impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (*p21*, *GADD45* et *14-3-3δ*) ou dans l'apoptose (*BAX*, *NOXA*). Les protéines mutantes p53 retrouvent leur rôle suppresseur de tumeur de *TP53*. La prolifération cellulaire est stoppée et les cellules entrent en sénescence ou meurent par apoptose selon le type de lignée. (Lambert et al., 2010)

L'activité de la molécule PRIMA-1 a été démontrée comme la plus importante au niveau des lignées cellulaires possédant une mutation de la région de liaison à l'ADN en 273His (Bykov et al., 2005) qui est justement le lieu de la modification génique observée dans notre lignée. En effet, une étude précédente a établi la présence d'une mutation en position 273His, conséquence d'une transition G→A au niveau du gène *TP53* dans la lignée cellulaire NSCLC-N6-L16. (Jacquot et al., 2003)

La molécule PRIMA-1 présente également une activité antitumorale *in vivo* testée chez la souris SCIN xénogreffée par la lignée Saos-2-His273, (Zache et al., 2008) qui a permis de développer des essais cliniques réalisés aujourd'hui avec la molécule dérivée de PRIMA-1 : APR 246. (Farnebo et al., 2010b)

Avant de qualifier la relation entre les gènes *TP53* et *HEF1*, nous avons voulu évaluer si, à la manière de PRIMA-1, la molécule A190 pouvait réactiver les protéines mutantes p53 273His présentes dans la lignée NSCLC-N6-L16.

Dans un premier temps, nous avons étudié comparativement par cytométrie en flux les effets pro-apoptotiques d'un traitement par A190 ou par PRIMA-1 au niveau du cycle cellulaire des deux lignées cellulaires NSCLC-N6-L16 et A549.

L'étude réalisée au niveau de la lignée A549 nous a permis de montrer grâce à l'analyse successive des populations non apoptotique d'une part et apoptotique d'autre part que les molécules PRIMA-1 et A190 sont capables de bloquer les cellules de cette lignée en phase G1 du cycle cellulaire. Mais aussi que la molécule A190 a un effet pro-apoptotique supérieur à celui de PRIMA-1 puisqu'elle permet de déclencher une apoptose des cellules plus rapidement.

L'analyse conjointe des deux populations non apoptotique et apoptotique au niveau de la lignée NSCLC-N6-L16 montre également un blocage des cellules en phase G1 du cycle cellulaire sous l'effet de PRIMA-1 et A190. De plus, l'effet pro-apoptotique de la molécule A190 est encore plus supérieur à celui observé avec PRIMA-1 sur cette lignée.

Nous montrons ainsi qu'un traitement par l'une ou l'autre des molécules entraîne un blocage de cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire dans les deux lignées NSCLC-N6-L16 porteuse d'un gène *TP53* muté et A549 qui présente un gène *TP53* sous forme sauvage. Cependant la surexpression de *TP53* n'étant observée qu'au niveau de la lignée NSCLC-N6-L16 il paraît vraisemblable que le blocage en G1 puis l'apoptose déclenchée par les deux types de traitements pro-apoptotiques ne passent pas par les mêmes voies de signalisation.

La protéine p53, dans son rôle de protection du génome des cellules, agit précisément dans la phase G1 du cycle cellulaire soit pour promouvoir les réparations de l'ADN soit pour initier la mort par apoptose. Ainsi il semblerait qu'un traitement par A190 des cellules NSCLC-N6-L16 pourrait restaurer l'activité des mutants p53 qui déclencherait dans un second temps l'apoptose des cellules cancéreuses par la voie du gène HEF1. L'apoptose visible au niveau de la lignée A549 serait quant à elle déclenché par une tout autre voie d'activation.

La confirmation de la capacité pour la molécule A190 de réactiver les mutants p53 273His en leur redonnant leur activité facteur de transcription comme PRIMA-1 a ensuite été réalisée. Un traitement par A190 ou PRIMA-1 ne montre aucune modification sur le degré de fixation des protéines sauvages p53 à leur séquence d'ADN spécifique. Ces protéines ont en effet une conformation normale, de ce fait les traitements n'ont aucun effet sur elles. Au niveau de la lignée NSCLC-N6-L16, les protéines p53 273His gardent une certaine capacité de fixation à l'ADN ce qui peut s'expliquer par le fait que ces protéines possèdent en partie une conformation sauvage qui semble suffisante pour la fixation. Cette donnée explique

d'ailleurs la possibilité pour les protéines mutantes de jouer un rôle d'oncogènes dans certaines tumeurs grâce à une activité facteur de transcription sur des acteurs de la prolifération cellulaire. Le plus fort taux de fixation des protéines mutantes par rapport aux protéines sauvages de la lignée A549 s'explique quant à lui par la plus forte concentration des protéines mutées dans les cellules cancéreuses qui échappent très souvent à leur dégradation par le protéasome. (Selivanova et al., 1997) Les tests de fixation des protéines p53 sur la séquence consensus de liaison à l'ADN ont donc montré que la molécule A190 était capable de restaurer cette fixation mais également de l'amplifier. Cette capacité est également montrée avec PRIMA-1 et directement liée à son activité transactivatrice. (Lambert et al., 2009) Tout comme PRIMA-1, dont un dérivé est aujourd'hui en essai clinique, A190 est donc capable de restaurer l'activité facteur de transcription de p53.

Grâce à la technique d'immunoprécipitation de chromatine nous avons pu établir qu'un lien direct existe entre la protéine p53 et le gène *HEF1*. Nous montrons donc par ces résultats que le gène *TP53* qui est un facteur de transcription pour de nombreux gènes possède un nouveau gène cible : le gène *HEF1*.

En conclusion, dans l'étude que nous exposons, nous montrons non seulement que la molécule A190 permet de restaurer l'activité facteur de transcription des protéines p53 273His mais également qu'une fois réactivées celles-ci deviennent capables d'induire la surexpression de *HEF1* sous le contrôle du gène facteur de transcription *TP53* lui-même surexprimé. Ces surexpressions sont spécifiques des protéines mutantes puisque A190 induit la surexpression conjointe de *TP53* et de *HEF1* seulement dans la lignée portant la mutation. L'absence de surexpression du gène *HEF1* dans la lignée cellulaire A549, porteuse d'une version sauvage du gène *TP53*, couplée à l'absence d'induction de *TP53* confirme la spécificité de l'activité sur les protéines mutant p53 273His. Enfin A190 induit le blocage en phase G1 et une mort apoptotique seulement dans la lignée NSCLC-N6-L16 où p53 est mutée. La surexpression de *HEF1* dans les cellules tumorales, nouveau gène cible des protéines p53 273His réactivées, engage alors les cellules vers l'apoptose.

Cette mort spécifique des cellules cancéreuses s'explique selon deux modalités. Soit les protéines p53 mutantes, réactivées lors du traitement, induisent la surexpression de *HEF1* en phase G1 du cycle au lieu de la phase G2/M ce qui déstabilise les sites d'adhésion focale

et initie l'anoikis. Soit le taux de protéine *HEF1* augmente et franchit le seuil. Dans les deux cas, la cellule reconnaît cette situation comme facteur déclencheur de l'apoptose.

Dans cette étude nous avons donc démontré que le traitement d'une lignée de cancer du poumon non à petites cellules par la molécule A190, permet la réactivation spécifique des protéines mutantes p53 273His. Celles-ci peuvent à nouveau se fixer à l'ADN et deviennent capables de jouer un rôle de facteur de transcription vis-à-vis du gène *HEF1* dans les cellules tumorales.

Le développement de telles molécules, capables de réactiver un gène suppresseur de tumeurs tel que *TP53*, muté dans plus de 50% des cas tous cancers confondus mais aussi d'agir sur une cible telle que *HEF1* particulièrement impliqué dans le processus de tumorigenèse, offre un espoir de développement de nouveaux traitements ciblés. (Figure 31) Ceux-ci permettront alors d'agir de manière très spécifique sur les cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines de l'organisme.

Une première étude réalisée au laboratoire sur l'expression des gènes *PI3K*, *AKT* et *mTOR* au niveau de nos deux lignées d'études montre l'importance de l'identification des voies touchées lors du processus de tumorigenèse. En effet nous avons pu montrer la surexpression de ces trois oncogènes dans la lignée A549 sous traitement par la molécule A190 pouvant alors supposer de leurs implications dans l'apoptose de ces cellules. En revanche, dans la lignée NSCLC-N6-L16, non seulement aucune surexpression n'est observée mais l'expression de ces gènes est montrée comme déjà très faible dans des conditions non traitées. Ainsi nous montrons bien ici que chaque tumeur est différente et ce même au sein d'un type de cancer particulier.

L'étude de nouvelles cibles moléculaires telles que les gènes *HEF1* et *TP53* dans le traitement du cancer du poumon en particulier et dans l'ensemble des types de cancer permet donc de comprendre l'utilité de la caractérisation des différents oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs modifiées au sein de chaque tumeur et donc pour chaque patient. (Figure 31) Cette caractérisation du profil génétique des tumeurs réalisée sur des biopsies permet en effet d'identifier les différentes voies de signalisation mutées dans les cellules cancéreuses et de cibler le ou les gènes correspondants permettant de proposer aux patients une thérapie à la carte.

A chaque tumeur correspond un profil de modifications géniques particulier qui entraînera la proposition d'un traitement adéquat.

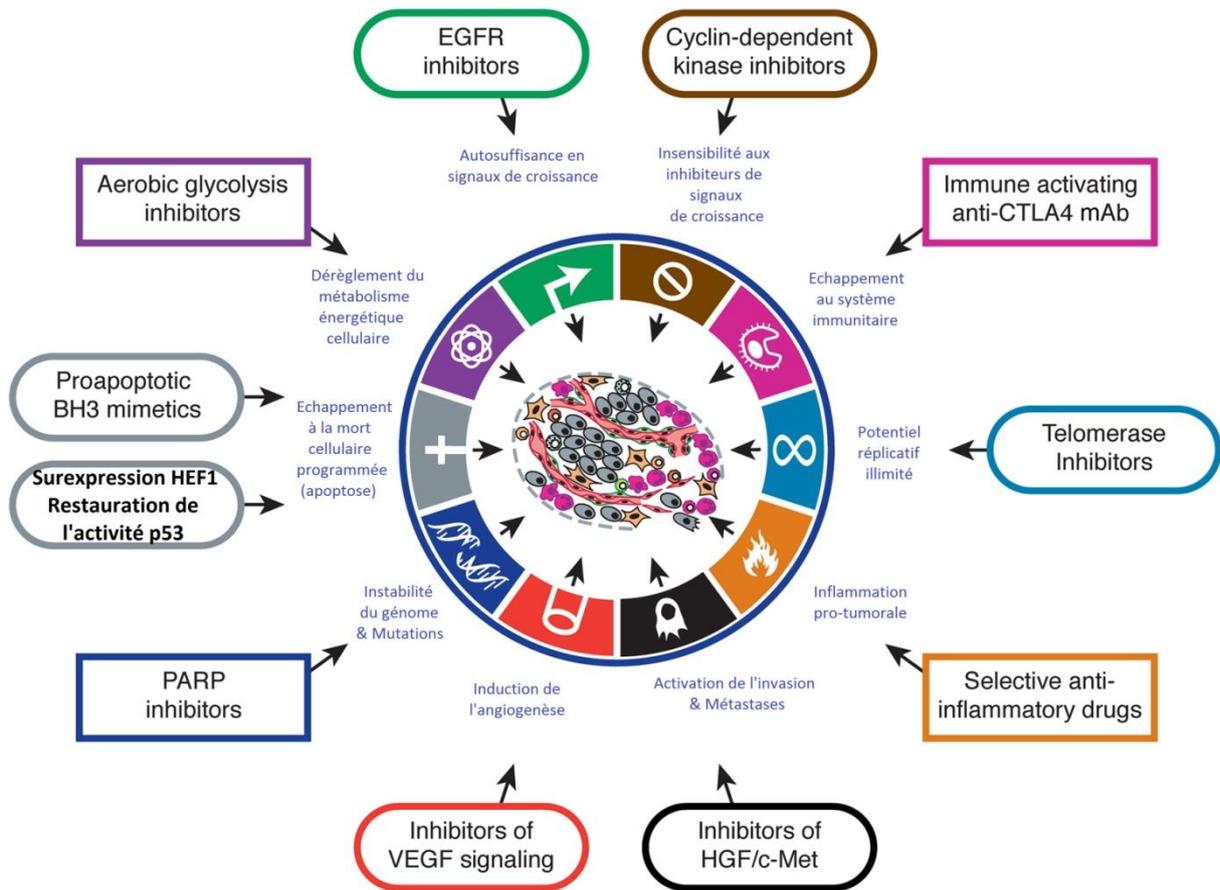


Figure 31 : La thérapie ciblée et les caractéristiques de la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011) Schéma complété par nos résultats

## Liste des Figures

Figure 1 : Les différentes étapes de la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse (©Pr. C. Roussakis – Cours Oncologie) .....	17
Figure 2 : Les 6 caractéristiques de la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011) .....	18
Figure 3 : Les différentes voies de l'apoptose (Nature Reviews - Molecular Cell Biology).....	21
Figure 4 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans le processus de tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011).....	26
Figure 5 : Estimation du nombre de nouveaux cas de cancer et du nombre de décès par cancer au niveau mondial selon le niveau de développement économique (Jemal et al., 2011).....	34
Figure 6 : Les multiples voies de signalisation impliquées dans la thérapie ciblée dans le cancer du poumon non à petites cellules (Favoni and Alama, 2013) .....	53
Figure 7 : Schéma synthétique décrivant les différentes voies d'activation de p53 dans les cas physiologique ou tumoral (Mogi and Kuwano, 2011).....	56
Figure 8 : Voie de signalisation de l'activité apoptotique de p53 et les nouvelles petites molécules capables de restaurer cette voie dans les tumeurs humaines (Wiman, 2006) .....	59
Figure 9 : Structures chimiques de petites molécules identifiées comme capables de réactiver l'activité de mutants p53 ou induisant l'apoptose préférentiellement dans les cellules tumorales exprimant des mutations TP53 (Wiman, 2006).....	61
Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines structuraux de la protéine HEF1 (Singh et al., 2007) .....	62
Figure 11 : Modifications post-traductionnelles de HEF1 et représentation de ses différentes isoformes (O'Neill and Golemis, 2001) .....	64

Figure 12 : La thérapie ciblée et les caractéristiques de la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011).....	68
Figure 13 : Observation microscopique de la lignée NSCLC-N6-L16 (grossissements x100 et x400).....	69
Figure 14 : Observation microscopique de la lignée A549 (grossissements x100 et x400).....	70
Figure 15 : Observations au microscope de figure mitotique dans la lignée NSCLC-N6-L16 après synchronisation naturelle (grossissement x100 et x400).....	74
Figure 16 : Structure chimique de A190 (PM : 344,86).....	75
Figure 17 : Principe d'extraction d'ARN messagers (kit Dynabeads® mRNA Direct™ - Ambion by Life Technologies).....	76
Figure 18 : Principe du kit TransAM™ Transcription Factor ELISAs (Active Motif) .....	81
Figure 19 : Principe de la technique Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) (Dey et al., 2012) (R&D system™).....	82
Figure 20 : Etude par RT-qPCR de l'expression de <i>HEF1</i> entre 0 et 70 heures sur NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées par A190 à la $CI_{50}$ (39,4 $\mu$ M) .....	84
Figure 21 : Etude de l'expression de <i>HEF1</i> à 10, 15, 30 et 45 heures sur NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées ou non par A190 à la $CI_{50}$ (39,4 $\mu$ M) .....	85
Figure 22 : Etude par RT-qPCR de l'expression de <i>HEF1</i> à 15, 16 et 17 heures sur L16 synchronisées traitées ou non par A190 à la $CI_{50}$ (39,4 $\mu$ M) .....	86
Figure 23 : Etude par RT-qPCR de l'expression des gènes <i>HEF1</i> (a et c) et <i>TP53</i> (b et d) dans les lignées NSCLC-N6-L16 synchronisées (a et b) et A549 synchronisées (c et d) traitées ou non par A190 à la $CI_{50}$ pendant 15 à 17 heures .....	87
Figure 24 : Profil électrophorétique après amplification par PCR du couple d'amorces <i>LKB1</i> sur cellules non synchronisées (a) ou synchronisées traitées ou non par A190 (b) .....	89

Figure 25 : Analyse comparée par cytométrie en flux des effets de deux molécules pro-apoptotiques, A190 et PRIMA-1, sur des cellules synchronisées de la lignée NSCLC-N6-L16 traitées à la  $Cl_{50}$  pendant 16 heures (a : population totale des cellules – b : cellules non apoptotiques – c : cellules apoptotiques) ..... 91

Figure 26 : Analyse comparée par cytométrie en flux des effets de différentes deux molécules pro-apoptotiques, A190 et PRIMA-1, sur des cellules synchronisées de la lignée A549 traitées à la  $Cl_{50}$  pendant 16 heures (a : population totale des cellules – b : cellules non apoptotiques – c : cellules apoptotiques) ..... 93

Figure 27 : Observation du degré de fixation de la protéine p53 sur sa séquence cible d'ADN dans les lignées cellulaires NSCLC-N6-L16 et A549 traitées ou non par PRIMA-1 ou A549 à la  $Cl_{50}$  ..... 94

Figure 28 : (a) Témoins positifs de CHIP sur cellules NSCLC-N6-L16 synchronisées avec anticorps Anti-RNA Polymerase II et amorces spécifiques de GAPDH – (b) CHIP Assays sur cellules NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées ou non par A190 pendant 16 heures avec anticorps anti p53 et amorces spécifiques du gène *NEDD9/HEF1/Cas-L* ..... 95

Figure 29 : Etude de l'expression des gènes *PI3K* (a), *mTOR* (b) et *AKT* (c) entre 15 et 16 heures sur A549 synchronisées traitées ou non à la  $Cl_{50}$  (52,6  $\mu$ M) ..... 96

Figure 30 : Etude de l'expression des gènes *PI3K* (a), *mTOR* (b) et *AKT* (c) entre 15 et 16 heures sur NSCLC-N6-L16 synchronisées traitées ou non à la  $Cl_{50}$  (39,4  $\mu$ M) ..... 97

Figure 31 : La thérapie ciblée et les caractéristiques de la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011) Schéma complété par nos résultats ..... 106

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : 7ème édition de la Classification TNM du Cancer du Poumon (Goldstraw et al., 2007) (Chheang and Brown, 2013) .....	42
Tableau 2 : Classification des sous catégories TNM par stade (Goldstraw et al., 2011) .....	43
Tableau 3: Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs altérés/surexprimés dans le cancer du poumon non à petites cellules (Favoni and Alama, 2013).....	47
Tableau 4 : Altérations génétiques principales des tumeurs selon leur type histologique dans le cancer du poumon non à petites cellules (driver genetic alteration) (Gadgeel, 2013) .....	50
Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées .....	79
Tableau 6 : Tableau récapitulatif présentant le pourcentage de cellules de la lignée NSCLC-N6-L16 dans les phases G1 2n ADN et G1 4n ADN .....	90
Tableau 7 : Tableau récapitulatif présentant le pourcentage de cellules de la lignée A549 dans les phases G1 2n ADN et G1 4n ADN .....	92

## Bibliographies

Adams, J.M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* *17*, 2481–2495.

Adams, J., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* *26*, 1324–1337.

D'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194–198.

Alberg, A.J., Wallace, K., Silvestri, G.A., and Brock, M.V. (2013). Invited Commentary: The Etiology of Lung Cancer in Men Compared With Women. *Am. J. Epidemiol.* *177*, 613–616.

Allen, M.S., Darling, G.E., Pechet, T.T.V., Mitchell, J.D., Herndon II, J.E., Landreneau, R.J., Inculet, R.I., Jones, D.R., Meyers, B.F., Harpole, D.H., et al. (2006). Morbidity and Mortality of Major Pulmonary Resections in Patients With Early-Stage Lung Cancer: Initial Results of the Randomized, Prospective ACOSOG Z0030 Trial. *Ann. Thorac. Surg.* *81*, 1013–1020.

Andreassen, T., and Vogt, C. (2014). Screening for livmorhalskreft i endring. *Tidsskr. Den Nor. Legeforening* *134*, 1122–1123.

Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* *31*, 9–18.

Baba, A.I., and Cătoi, C. (2007). COMPARATIVE ONCOLOGY.

Bai, F., Matsui, T., Ohtani-Fujita, N., Matsukawa, Y., Ding, Y., and Sakai, T. (1998). Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G1 phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *FEBS Lett.* *437*, 61–64.

Basu-Roy, U., Basilico, C., and Mansukhani, A. (2013). PERSPECTIVES ON CANCER STEM CELLS IN OSTEOSARCOMA. *Cancer Lett.* *338*, 158–167.

Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*.

Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A., and Bossard, N. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012 - Google Scholar.

Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 611–622.

Brauer, R.R., Watson, I.R., Wu, C.-J., Mobley, A.K., Kamiya, T., Shoshan, E., and Bar-Eli, M. (2014). Why is melanoma so metastatic? *Pigment Cell Melanoma Res.* *27*, 19–36.

Briknarová, K., Nasertorabi, F., Havert, M.L., Eggleston, E., Hoyt, D.W., Li, C., Olson, A.J., Vuori, K., and Ely, K.R. (2005). The Serine-rich Domain from Crk-associated Substrate (p130cas) Is a Four-helix Bundle. *J. Biol. Chem.* *280*, 21908–21914.

Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 701–713.

Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 671–682.

Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., and Selivanova, G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.* *8*, 282–288.

Bykov, V.J.N., Zache, N., Stridh, H., Westman, J., Bergman, J., Selivanova, G., and Wiman, K.G. (2005). PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* *24*, 3484–3491.

Carey, M.F., Peterson, C.L., and Smale, S.T. (2009). Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harb. Protoc.* *2009*, pdb.prot5279.

Cary, L.A., Han, D.C., Polte, T.R., Hanks, S.K., and Guan, J.-L. (1998). Identification of p130Cas as a Mediator of Focal Adhesion Kinase-promoted Cell Migration. *J. Cell Biol.* *140*, 211–221.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011). State-specific trends in lung cancer incidence and smoking--United States, 1999-2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* *60*, 1243–1247.

Chheang, S., and Brown, K. (2013). Lung Cancer Staging: Clinical and Radiologic Perspectives. *Semin. Interv. Radiol.* *30*, 99–113.

Cornfield, J., Haenszel, W., Hammond, E.C., Lilienfeld, A.M., Shimkin, M.B., and Wynder, E.L. (1959). Smoking and lung cancer: recent evidence and a discussion of some questions. *J. Natl. Cancer Inst.* *22*, 173–203.

Cummings, K.M., Dresler, C.M., Field, J.K., Fox, J., Gritz, E.R., Hanna, N.H., Ikeda, N., Jassem, J., Mulshine, J.L., Peters, M.J., et al. (2014). E-cigarettes and cancer patients. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *9*, 438–441.

Dadke, D., Jarnik, M., Pugacheva, E.N., Singh, M.K., and Golemis, E.A. (2006). Deregulation of HEF1 impairs M-phase progression by disrupting the RhoA activation cycle. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1204–1217.

Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J.M., Baysson, H., Bochicchio, F., Deo, H., Falk, R., Forastiere, F., Hakama, M., et al. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* *330*, 223.

Davies, M., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* *29*, 5545–5555.

Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M., and Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* *274*, 430–432.

Dey, B., Thukral, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupta, S., Manghani, C., and Rani, V. (2012). DNA–protein interactions: methods for detection and analysis. *Mol. Cell. Biochem.* *365*, 279–299.

Doll, R., and Hill, A.B. (1954). The Mortality of Doctors in Relation to Their Smoking Habits. *Br. Med. J.* *1*, 1451–1455.

Eccles, S.A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 685–696.

Egle, A., Harris, A.W., Bath, M.L., O'Reilly, L., and Cory, S. (2004). VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* *103*, 2276–2283.

Eklof, V., Wikberg, M.L., Edin, S., Dahlin, A.M., Jonsson, B.-A., Oberg, A., Rutegard, J., and Palmqvist, R. (2013). The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* *108*, 2153–2163.

Evan, G.I., and d'Adda di Fagagna, F. (2009). Cellular senescence: hot or what? *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 25–31.

Farnebo, M., Bykov, V.J.N., and Wiman, K.G. (2010a). The p53 tumor suppressor: A master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *396*, 85–89.

Farnebo, M., Bykov, V.J.N., and Wiman, K.G. (2010b). The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *396*, 85–89.

Favoni, R.E., and Alama, A. (2013). Preclinical strategies targeted at non-small-cell lung cancer signalling pathways with striking translational fallout. *Drug Discov. Today* *18*, 11–24.

Feldser, D.M., and Greider, C.W. (2007). Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* *11*, 461–469.

Feng, Y., Wang, Y., Wang, Z., Fang, Z., Li, F., Gao, Y., Liu, H., Xiao, T., Li, F., Zhou, Y., et al. (2012). The CRTC1-NEDD9 Signaling Axis Mediates Lung Cancer Progression Caused by LKB1 Loss. *Cancer Res.* *72*, 6502–6511.

Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L., and Audus, K.L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp. Cell Res.* *243*, 359–366.

Gadgeel, S.M. (2013). New targets in non-small cell lung cancer. *Curr. Oncol. Rep.* *15*, 411–423.

Gelmon, K., Dent, R., Mackey, J.R., Laing, K., McLeod, D., and Verma, S. (2012). Targeting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes. *Ann. Oncol.* *23*, 2223–2234.

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* *51*, 1417–1423.

Gilks, C.B. (2014). Mutations in oncogenes: Context matters. *Gynecol. Oncol.* *134*, 1–2.

Ginsberg, R.J., and Rubinstein, L.V. (1995). Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* *60*, 615–623.

Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D.J., Groome, P.A., Rami-Porta, R., Postmus, P.E., Rusch, V., Sobin, L., International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee, et al. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *2*, 706–714.

Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J.R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A.G., and Shepherd, F.A. (2011). Non-small-cell lung cancer. *The Lancet* *378*, 1727–1740.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* *86*, 353–364.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hardie, D.G., and Alessi, D.R. (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol.* *11*, 36.

Haupt, S., and Haupt, Y. (2004). Manipulation of the tumor suppressor p53 for potentiating cancer therapy. *Semin. Cancer Biol.* *14*, 244–252.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.

Husgafvel-Pursiainen, K., Boffetta, P., Kannio, A., Nyberg, F., Pershagen, G., Mukeria, A., Constantinescu, V., Fortes, C., and Benhamou, S. (2000). p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res.* *60*, 2906–2911.

Ischia, J., Patel, O., Bolton, D., Shulkes, A., and Baldwin, G.S. (2014). Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous urological tissues. *BJU Int.* *113*, 40–47.

- Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L.G.G.C., Masucci, M., Pramanik, A., and Selivanova, G. (2004). Small molecule RITA binds to p53, blocks p53–HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat. Med.* *10*, 1321–1328.
- Jacquot, C., Moreau, D., Tomasoni, C., Juge, M., Coiffard, L., Roussis, V., and Roussakis, C. (2003). Proliferation arrest in G1 phase of a non-small cell lung cancer cell line (NSCLC-N6) treated by an original compound methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate (VT1) independently of the p53/p21 cascade. *Int. J. Oncol.* *23*, 495–501.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* *61*, 69–90.
- Ji, H., Ramsey, M.R., Hayes, D.N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M.C., Shimamura, T., Perera, S.A., et al. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* *448*, 807–810.
- Jiang, B., and Liu, L. (2009). Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. In *Advances in Cancer Research*, George F. Vande Woude and George Klein, ed. (Academic Press), pp. 19–65.
- Johnson, D.H., Fehrenbacher, L., Novotny, W.F., Herbst, R.S., Nemunaitis, J.J., Jablons, D.M., Langer, C.J., DeVore, R.F., Gaudreault, J., Damico, L.A., et al. (2004). Randomized Phase II Trial Comparing Bevacizumab Plus Carboplatin and Paclitaxel With Carboplatin and Paclitaxel Alone in Previously Untreated Locally Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* *22*, 2184–2191.
- Kalandidi, A., Katsouyanni, K., Voropoulou, N., Bastas, G., Saracci, R., and Trichopoulos, D. (1990). Passive smoking and diet in the etiology of lung cancer among non-smokers. *Cancer Causes Control* *1*, 15–21.
- Kawai, T., Hiroi, S., Nakanishi, K., and Meeker, A.K. (2007). Telomere Length and Telomerase Expression in Atypical Adenomatous Hyperplasia and Small Bronchioloalveolar Carcinoma of the Lung. *Am. J. Clin. Pathol.* *127*, 254–262.
- Kim, M., Gans, J.D., Nogueira, C., Wang, A., Paik, J.-H., Feng, B., Brennan, C., Hahn, W.C., Cordon-Cardo, C., Wagner, S.N., et al. (2006). Comparative Oncogenomics Identifies NEDD9 as a Melanoma Metastasis Gene. *Cell* *125*, 1269–1281.
- Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K., and Cheresch, D.A. (1998). CAS/Crk Coupling Serves as a “Molecular Switch” for Induction of Cell Migration. *J. Cell Biol.* *140*, 961–972.
- Klymkowsky, M.W., and Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher’s conceptual friend and foe. *Am. J. Pathol.* *174*, 1588–1593.
- Kridel, R., Sehn, L.H., and Gascoyne, R.D. (2012). Pathogenesis of follicular lymphoma. *J. Clin. Invest.* *122*, 3424–3431.

- Lam, W.K., White, N.W., and Chan-Yeung, M.M. (2004). Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa [State of the Art]. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* *8*, 1045–1057.
- Lambert, J.M.R., Gorzov, P., Veprintsev, D.B., Söderqvist, M., Segerbäck, D., Bergman, J., Fersht, A.R., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J.N. (2009). PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* *15*, 376–388.
- Lambert, J.M.R., Moshfegh, A., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J.N. (2010). Mutant p53 reactivation by PRIMA-1MET induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. *Oncogene* *29*, 1329–1338.
- Law, S.F., Estojak, J., Wang, B., Mysliwiec, T., Kruh, G., and Golemis, E.A. (1996). Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 3327–3337.
- Law, S.F., Zhang, Y.Z., Klein-Szanto, A.J., and Golemis, E.A. (1998). Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3540–3551.
- Law, S.F., O’Neill, G.M., Fashena, S.J., Einarson, M.B., and Golemis, E.A. (2000). The Docking Protein HEF1 Is an Apoptotic Mediator at Focal Adhesion Sites. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5184–5195.
- Lee, P.N. (2013). The effect of reducing the number of cigarettes smoked on risk of lung cancer, COPD, cardiovascular disease and FEV1 – A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *67*, 372–381.
- Li, S.S.-C. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem. J.* *390*, 641–653.
- Liu, X., Elia, A.E.H., Law, S.F., Golemis, E.A., Farley, J., and Wang, T. (2000). A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *EMBO J.* *19*, 6759–6769.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes.
- Malleter, M., Jacquot, C., Moreau, D., Tomasoni, C., Tsvetanova, M., Chinou, I., Juge, M., Pineau, A., Le Pape, P., and Roussakis, C. (2010). A novel large regulator RNA, B2, partially overlaps the HEF1/NEDD9/Cas-L gene. *Int. J. Mol. Med.* *25*, 897–903.
- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G.N., and Ueno, N.T. (2012). Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *136*.
- Mogi, A., and Kuwano, H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 583929.

Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., and Adjei, A.A. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin. Proc. Mayo Clin.* *83*, 584–594.

Moreau, D., Jacquot, C., Tsita, P., Chinou, I., Tomasoni, C., Juge, M., Antoniadou-Vyza, E., Martignat, L., Pineau, A., and Roussakis, C. (2008). Original triazine inductor of new specific molecular targets, with antitumor activity against nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *123*, 2676–2683.

Nagy, J.A., Chang, S.-H., Shih, S.-C., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the Tumor Vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* *36*, 321–331.

Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group, Cell, Lung, Cancer, Collaborative, and Group (1995). Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ* *311*, 899–909.

Okada, M., Nishio, W., Sakamoto, T., Uchino, K., Yuki, T., Nakagawa, A., and Tsubota, N. (2005). Effect of tumor size on prognosis in patients with non-small cell lung cancer: The role of segmentectomy as a type of lesser resection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *129*, 87–93.

O'Neill, G.M., and Golemis, E.A. (2001). Proteolysis of the Docking Protein HEF1 and Implications for Focal Adhesion Dynamics. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5094–5108.

O'Neill, G.M., Seo, S., Serebriiskii, I.G., Lessin, S.R., and Golemis, E.A. (2007). A new central scaffold for metastasis: parsing HEF1/Cas-L/NEDD9. *Cancer Res.* *67*, 8975–8979.

Papadatos-Pastos, D., Soultati, A., and Harries, M. (2013). Targeting Brain Metastases in Patients with Melanoma. *BioMed Res. Int.* *2013*.

Patel, O., Shulkes, A., and Baldwin, G.S. (2006). Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1766*, 23–41.

Pignon, J.-P., Tribodet, H., Scagliotti, G.V., Douillard, J.-Y., Shepherd, F.A., Stephens, R.J., Dunant, A., Torri, V., Rosell, R., Seymour, L., et al. (2008). Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *J. Clin. Oncol.* *26*, 3552–3559.

Ploegh, H. (2014). *Cell Biology of the B Cell Receptor* (Elsevier Science).

Pugacheva, E.N., and Golemis, E.A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat. Cell Biol.* *7*, 937–946.

Pugacheva, E.N., and Golemis, E.A. (2006). HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 384–391.

Rahman, T., Tabassum, S., Jahan, M., Nessa, A., and Ashrafunnessa, null (2013). Detection and estimation of human papillomavirus viral load in patients with cervical lesions. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.* *39*, 86–90.

Raica, M., Cimpean, A.M., and Ribatti, D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur. J. Cancer* 45, 1924–1934.

Roussakis, C., Gratas, C., Audouin, A.F., Le Boterff, J., Dabouis, C., Andre, M.J., Moyon, E., Vo, N.H., Pradal, G., and Verbist, J.F. (1991). Study of in vitro drug sensitivity on a newly established cell line from a primary bronchial epidermoid carcinoma of human origin (NSCLCN6). *Anticancer Res.* 11, 2239–2244.

Sankaranarayanan, R., Swaminathan, R., Brenner, H., Chen, K., Chia, K.S., Chen, J.G., Law, S.C., Ahn, Y.-O., Xiang, Y.B., Yeole, B.B., et al. (2010). Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population-based study. *Lancet Oncol.* 11, 165–173.

Saracci, R., and Riboli, E. (1989). Passive smoking and lung cancer: current evidence and ongoing studies at the International Agency for Research on Cancer. *Mutat. Res. Toxicol.* 222, 117–127.

Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Nichelatti, M., Molinari, F., De Dosso, S., Saletti, P., Martini, M., Cipani, T., Marrapese, G., Mazzucchelli, L., et al. (2009). Multi-Determinants Analysis of Molecular Alterations for Predicting Clinical Benefit to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 4.

Selivanova, G., Iotsova, V., Okan, I., Fritsche, M., Ström, M., Groner, B., Grafström, R.C., and Wiman, K.G. (1997). Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat. Med.* 3, 632–638.

Shaw, A.T., Camidge, D.R., Engelman, J.A., Solomon, B.J., Kwak, E.L., Clark, J.W., Salgia, R., Shapiro, G., Bang, Y.-J., Tan, W., et al. (2012). Clinical activity of crizotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring ROS1 gene rearrangement. *ASCO Meet. Abstr.* 30, 7508.

Siavoshian, S., Boesch, S., Pondaven, P., More, M.T., Riou, D., Dabouis, G., André, M.J., and Roussakis, C. (1998). Cloning of a human cancer cell line (NSCLC-N6) and comparative study of the clones in vitro. *Anticancer Res.* 18, 193–200.

Sideris, M., and Papagrigoriadis, S. (2014). Molecular Biomarkers and Classification Models in the Evaluation of the Prognosis of Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 34, 2061–2068.

Singh, M.K., Cowell, L., Seo, S., O'Neill, G.M., and Golemis, E.A. (2007). Molecular basis for HEF1/NEDD9/Cas-L action as a multifunctional coordinator of invasion, apoptosis and cell cycle. *Cell Biochem. Biophys.* 48, 54–72.

Solomon, B., Varella-Garcia, M., and Camidge, D.R. (2009). ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 4, 1450–1454.

Soussi, T., and Lozano, G. (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 834–842.

Soussi, T., and Wiman, K.G. (2007). Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell* 12, 303–312.

Spigel, D.R., Ervin, T.J., Ramlau, R., Daniel, D.B., Goldschmidt, J.H., Blumenschein, G.R., Krzakowski, M.J., Robinet, G., Clement-Duchene, C., Barlesi, F., et al. (2011). Final efficacy results from OAM4558g, a randomized phase II study evaluating MetMab or placebo in combination with erlotinib in advanced NSCLC. ASCO Meet. Abstr. 29, 7505.

Sugikawa, E., Hosoi, T., Yazaki, N., Gamanuma, M., Nakanishi, N., and Ohashi, M. (1999). Mutant p53 mediated induction of cell cycle arrest and apoptosis at G1 phase by 9-hydroxyellipticine. *Anticancer Res.* 19, 3099–3108.

Swisher, S.G., Roth, J.A., Nemunaitis, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Connors, D.G., El-Naggar, A.K., Fossella, F., Glisson, B.S., et al. (1999). Adenovirus-Mediated p53 Gene Transfer in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 763–771.

Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669.

Tang, N., Song, W.-X., Luo, J., Haydon, R.C., and He, T.-C. (2008). Osteosarcoma Development and Stem Cell Differentiation. *Clin. Orthop.* 466, 2114–2130.

Tejpar, S., Celik, I., Schlichting, M., Sartorius, U., Bokemeyer, C., and Cutsem, E.V. (2012). Association of KRAS G13D Tumor Mutations With Outcome in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With First-Line Chemotherapy With or Without Cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 30, 3570–3577.

Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., von Pawel, J., Thongprasert, S., Tan, E.H., Pemberton, K., Archer, V., et al. (2005). Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *The Lancet* 366, 1527–1537.

Turke, A.B., Zejnullahu, K., Wu, Y.-L., Song, Y., Dias-Santagata, D., Lifshits, E., Toschi, L., Rogers, A., Mok, T., Sequist, L., et al. (2010). Pre-existence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* 17, 77–88.

Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.

Vindelov, L.L. (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 24, 227–242.

Vineis, P., Airoidi, L., Veglia, P., Olgiati, L., Pastorelli, R., Autrup, H., Dunning, A., Garte, S., Gormally, E., Hainaut, P., et al. (2005). Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 330, 277.

Wei, M.C., Zong, W.-X., Cheng, E.H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science* 292, 727–730.

Whitrow, M.J., Smith, B.J., Pilotto, L.S., Pisaniello, D., and Nitschke, M. (2003). Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: Epidemiological evidence from the medical literature. *Respirology* 8, 513–521.

Wiman, K.G. (2006). Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ.* 13, 921–926.

Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1692, 103–119.

Wynder, E.L., and Graham, E.A. (1950). Tobacco Smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma. A study of six hundred and eighty-four proved cases. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 253, 2986–2994.

Yang, J., Hammond, D., Driezen, P., Fong, G.T., and Jiang, Y. (2010). Health knowledge and perception of risks among Chinese smokers and non-smokers: findings from the Wave 1 ITC China Survey. *Tob. Control* 19, i18–i23.

Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33.

Youlden, D.R., Cramb, S.M., and Baade, P.D. (2008). The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 3, 819–831.

Zache, N., Lambert, J.M.R., Wiman, K.G., and Bykov, V.J.N. (2008). PRIMA-1MET inhibits growth of mouse tumors carrying mutant p53. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* 30, 411–418

## **Annexe 1 : Communications**

### **Communications Orales :**

**Bénédicte ROUSSEAU** (2013) La restauration de l'activité facteur de transcription de mutants p53 induit la surexpression du gène NEDD9/HEF1/Cas-L dans le cancer du poumon non à petites cellules. Journées Scientifiques Ecole Doctorale Biologie Santé – La Chapelle Sur Erdre (44)

**Bénédicte ROUSSEAU** (2014) Transcription factor activity restoration of mutant p53 induce over-expression of NEDD9/HEF1/CAS-L gene in NSCLC. Merimee Joint Meeting – Saint Jacques de Compostelle (Espagne)

### **Posters :**

**Bénédicte ROUSSEAU**, Christophe TOMASONI, Catherine JACQUOT, Christos ROUSSAKIS (2012) Surexpression conjointe des gènes HEF1 et TP53 dans les lignées cellulaires NSCLC-N6 (TP53 muté) et A549 (TP53 sauvage) sous l'action d'une triazine à effet cytostatique. Journées Scientifiques Ecole Doctorale Biologie Santé – Talmont Saint Hilaire (85)

**Bénédicte ROUSSEAU**, Catherine JACQUOT, Julie LE PALABE, Marine MALLETER, Christophe TOMASONI, Tifenn BOUTARD, Vehary SAKANYAN, Christos ROUSSAKIS (2014) TP53 facteur de transcription pour le gène NEDD9/HEF1/Cas-L : cibles potentielles dans le traitement du Cancer du Broncho-pulmonaire Non à Petites Cellules (CBNPC) 8<sup>ème</sup> Journées Cancéropôle Grand Ouest – Les Sables d'Olonne (85)

## Annexe 2 : Publications

1. Malleter M, Jacquot C, **Rousseau B**, Tomasoni C, Ducourneau D, Tourette P, et al. Study of antiproliferative effects of synthetic substances against lens epithelial cell line (SRA 01/04). *J Ocul Pharmacol Ther.* juin 2012;28(3):299-306. (IF : 1,42)
2. Malleter M, Jacquot C, **Rousseau B**, Tomasoni C, Juge M, Pineau A, et al. miRNAs, a potential target in the treatment of Non-Small-Cell Lung Carcinomas. *Gene.* sept 2012;506(2):355-9. (IF : 2,246)
3. Bazin M-A, Boderio L, Tomasoni C, **Rousseau B**, Roussakis C, Marchand P. Synthesis and antiproliferative activity of benzofuran-based analogs of cercosporamide against non-small cell lung cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry.* nov 2013;69:823-32. (IF : 3,432)
4. Sakanyan V, Angelini M, Le Béhec M, Lecocq MF, Benaiteau F, **Rousseau B**, et al. Screening and discovery of nitro-benzoxadiazole compounds activating epidermal growth factor receptor (EGFR) in cancer cells. *Sci Rep.* 2014;4:3977 (IF : 5,078)
5. Boutard T, **Rousseau B**, Couteau C, Tomasoni C, Simonnard C, Jacquot C, et al. Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO UV blockers and CeO<sub>2</sub>. *Materials Letters.* 2013;108:13-16. (IF : 2,37)
6. Jacquot C, **Rousseau B**, Carbonnelle D, Chinou I, Malleter M, Tomasoni C, et al. Cucurbitacin-D-induced CDK1 mRNA Up-regulation Causes Proliferation Arrest of a Non-small Cell Lung Carcinoma Cell Line (NSCLC-N6). *Anticancer Res.* sept 2014;34(9):4797-806. (IF : 1,872)
7. **Rousseau B**, Jacquot C, Le Palabe J, Malleter M, Tomasoni C, Boutard T, Sakanyan V et Roussakis C. TP53 transcription factor to NEDD9/HEF1/Cas-L gene : potential targets in Non Small Cell Lung Cancer treatment. 2014 acceptée avec correction *Scientific Report* (groupe Nature) (IF : 5,078)

***TP53* transcription factor to *NEDD9/HEF1/Cas-L* gene: potential targets in  
Non-Small Cell Lung Cancer treatment**

*Bénédicte ROUSSEAU<sup>1</sup>, Catherine JACQUOT<sup>1</sup>, Julie LE PALABE<sup>1</sup>, Marine MALLETER<sup>2</sup>,  
Christophe TOMASONI<sup>1</sup>, Tifenn BOUTARD<sup>1</sup>, Vehary SAKANYAN<sup>1</sup>, Christos ROUSSAKIS\*<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>IICiMED/EA 1155 - Département Cancer du Poumon et Cibles Moléculaires, UFR Sciences Pharmaceutiques - 9 rue Bias - BP53508 - 44035 NANTES CEDEX 1 - FRANCE

<sup>2</sup>UMR INSERM U 1085 Groupe "Death receptors and tumor escape" - Université de Rennes 1 Campus Santé - Bâtiment 5 - 2 avenue du Prof Léon Bernard - 35043 RENNES - FRANCE

<sup>3</sup>IICiMED/EA 1155 - Département Cancer du Poumon et Cibles Moléculaires, UFR Sciences Pharmaceutiques - 9 rue Bias - BP53508 - 44035 NANTES CEDEX 1 – FRANCE - tel. +33 643 115 298 - fax. +33 253 484 150 - christos.roussakis@univ-nantes.fr

**Key Words:** Non-small cell lung cancer; Molecular targets; p53; NEDD9/HEF1/Cas-L; apoptosis

## **ABSTRACT**

Lung cancer is a serious public health problem. Although there has been significant progress in chemotherapy, non-small cell lung cancer still is resistant to current treatments, primarily because of the slow rate of cell development. Thus the important of finding new molecules directed against targets other than proliferation actors. Considering the high proportion of mutant proteins in tumor cells, and the *TP53* gene's high rate of mutation in all cancers, and in NSCLCs in particular, it is a perfect target. Certain new molecules have been shown to be able to restore the activity of mutated p53 protein, for example PRIMA-1, which reactivates His273 mutant p53. In a previous study we presented triazine A190, a molecule with a cytostatic activity which blocks cells in the G1 phase and induces apoptosis. Here, we show that A190 not only restores mutant p53 activity, but also induces an overexpression of the *NEDD9* gene, leading to apoptotic death. These finding might offers hope for the development of new targeted therapies specific to tumor cells which spare healthy cells.

## INTRODUCTION

Regular progress is being made in chemotherapy, including for non-small cell lung cancer (NSCLC), which shows significant amelioration when treated with cis-platine in association with older, conventional, molecules. However NSCLC remains a major public health problem and remission for this type of cancer is rare, and the response rate to treatment and the five-year survival rate are both low<sup>12</sup>.

There is a need to develop new strategies to treat NSCLC. Thanks to improving knowledge about the carcinogenesis process, treatment strategies are becoming more directed, for example, strategies targeting oncogenes which are over-expressed in NSCLC, such as Ras, Myc, Bcl2, EGFR; or inactivated tumor suppressor genes like Rb, *TP53*, *i.e.* strategies which involve inhibiting oncogenes or reactivating tumor suppressor genes<sup>3</sup>.

This is the goal of the therapy developed targeting the *TP53* gene. The high mutation rate of *TP53* in NSCLC makes it an ideal target in the development of new strategies. *TP53* is mutated in 50% of human cancer and in more than 70% of lung cancer<sup>4</sup>. These mutations cause the loss of function of the wild type protein p53, which normally plays a major role in tumor suppression. Certain hot spots, such as residue 273, are more affected than other. A number of studies have shown that a long inactivation of *TP53* is needed for significant tumor growth and that the restoration of *TP53* function can stop this growth and induce tumor regression<sup>5</sup>.

In recent years various reactivation strategies have been proposed which try to replace the mutated gene or to modulate the functions of the protein. However all have had problems, such as difficulties in administration or the secondary effects on the wild type *TP53*<sup>6</sup>. An approach specifically targeting, through pharmacomodulation, the mutated form of the protein only would seem apposite as it would not affect healthy cells, which contain a wild type form of the protein.

At present only a few molecules in development do have of the above-mentioned properties<sup>78</sup>. One of these is the PRIMA-1 molecule (P53 Reactivation and Induction of Massive Apoptosis)<sup>9</sup>. Developed by a Swedish lab, it has a significant cytostatic effect on cell lines with a mutated *TP53*, and it is not toxic in wild type *TP53* gene cell lines, as it has the

capacity to restore the wild type spatial conformation of the central domain of mutated p53 proteins, or to create new interaction p53-DNA. These proteins then increase their binding DNA capacity and especially their effectiveness as a transcription factor. The mutated p53 can induce all the standard gene targets and rediscover their tumor suppressor role. Cell proliferation ceases and the cells die through apoptosis or senescence depending on the cell line<sup>10</sup>. PRIMA-1 seems particularly active on cells lines with a mutation on the binding DNA domain of p53 protein, primarily the His273 p53 mutant<sup>11</sup>. It also exhibits antitumor activity *in vivo* in SCID mice xenografted with Saos-2-His273 cells<sup>12</sup>. A derivate of PRIMA-1, APR-246, is today in phase I of clinical trials<sup>13</sup>.

In a similar vein, our laboratory is developing a new molecule, A190, which can restore the transcription factor activity of mutated p53 proteins in a NSCLC cell line. Like PRIMA-1, A190 exhibits an *in vivo* antitumor activity without apparent toxicity. In a previous work, we reported on tumor regression on nude mice xenografted with NSCLC-N6-L16. In addition, A190, which is also cytostatic, induces in the G1 phase a blocking of the cell cycle and apoptosis<sup>14</sup>. We showed that none of this activity was a result of the activation of the wild type *TP53* gene. Indeed, the NSCLC-N6-L16 cell line carries the His273 p53 mutant, therefore the protein is inactive, and the mutant does not induce p21 expression, a major factor for G1 blocking<sup>15</sup>.

The reactivation of mutant p53 by A190 causes an original cell reaction and induces the expression of a new target: NEDD9/HEF1/Cas L, a gene, discovered in 1996 by Golemis, which is involved in numerous cellular functions, including migration, mitosis, differentiation and apoptosis<sup>16,17</sup>.

In the present paper, we provide strong evidence that in the presence of A190 the His273 p53 mutated protein recovers its capacity to bind DNA and enable the overexpression of *NEDD9*, which leads to apoptosis. We demonstrate that *NEDD9* is a target gene for the His273 p53 mutated protein reactivated by treatment, which thus becomes a transcription factor for the *NEDD9* gene.

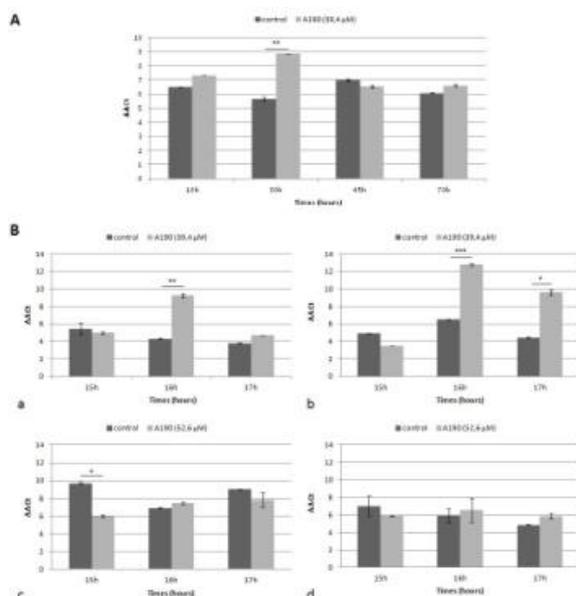
## RESULTS

### *Measure of kinetic expression of NEDD9 gene in synchronized NSCLC-N6-L16 cells*

All qPCR analysis was carried out on synchronized cells. The expression of *NEDD9* varies over the cell cycle,<sup>18</sup> it is thus necessary to study cells that are in the same cell cycle phase in order to accurately measure the effect of A190 on the expression of *NEDD9*.

An initial kinetic study was carried out. NSCLC-N6-L16 synchronized cells were combined with A190 from 0 to 70 hours. Every 5 hours, RNA messengers were extracted and the expression of *NEDD9* was quantified by qPCR. The results permitted the identification of the most interesting time points for a second kinetic study (data not show). As a result, several time points were selected: 10 hours, 15 hours, 30 hours and 45 hours. For all points, the expression of *NEDD9* was higher in treated NCSLS-N6-L16 cells than in controls cells. However, for one time point the difference was more significant: after 15 hours of treatment significant overexpression was visible in comparison with the control group.

### *Measure of comparative kinetic expression of NEDD9 and TP53 genes in synchronized NSCLC-N6-L16 cells*



(Fig. 1)

Based on the above-mentioned results, a third, more precise, study was done around 15 hours of treatment in order to precisely identify the point of the *NEDD9* overexpression and

to compare the expression of *NEDD9* and the *TP53*, an important factor in apoptosis. This was carried out on both NSCLC-N6-L16 and A549 cell lines treated with A190 at IC50 (Fig. 1).

A190 induces significant overexpression of both *NEDD9* and *TP53* genes in synchronized NSCLC-N6-L16 cells with an expression 2 times higher than control in treated cells for both genes. This overexpression is exactly the same after 16 hours of treatment by A190 (Fig. 1). Although the overexpression of *NEDD9* is only visible at 16 hours, *TP53* overexpression is still in evidence after 17 hours of treatment.

In contrast, in the A549 cell line, the expression of *NEDD9* remains low for the treated cells in comparison with control cells at almost all time points. However, the basal expression in non-treated cells is higher for A549 than NSCLC-N6-L16. For all A549 samples treated with A190 there is also no significant difference in the expression of *TP53* (Fig. 1).

***Flow cytometry analysis of the effect of PRIMA-1 and A190 on cell cycle:***

All histograms were obtained from synchronized in mitosis NSCLC-N6-L16 or A549 cells treated by PRIMA-1 or A190, or not, at IC50 for 16 hours. The IC50 for PRIMA-1 for both cell lines was prepared in our lab: the IC50 are 27  $\mu$ M for NSCLC-N6-L16 and 34  $\mu$ M for A549. First we looked at the entire population of cells, then a study on the state of apoptosis of the cells was carried out.

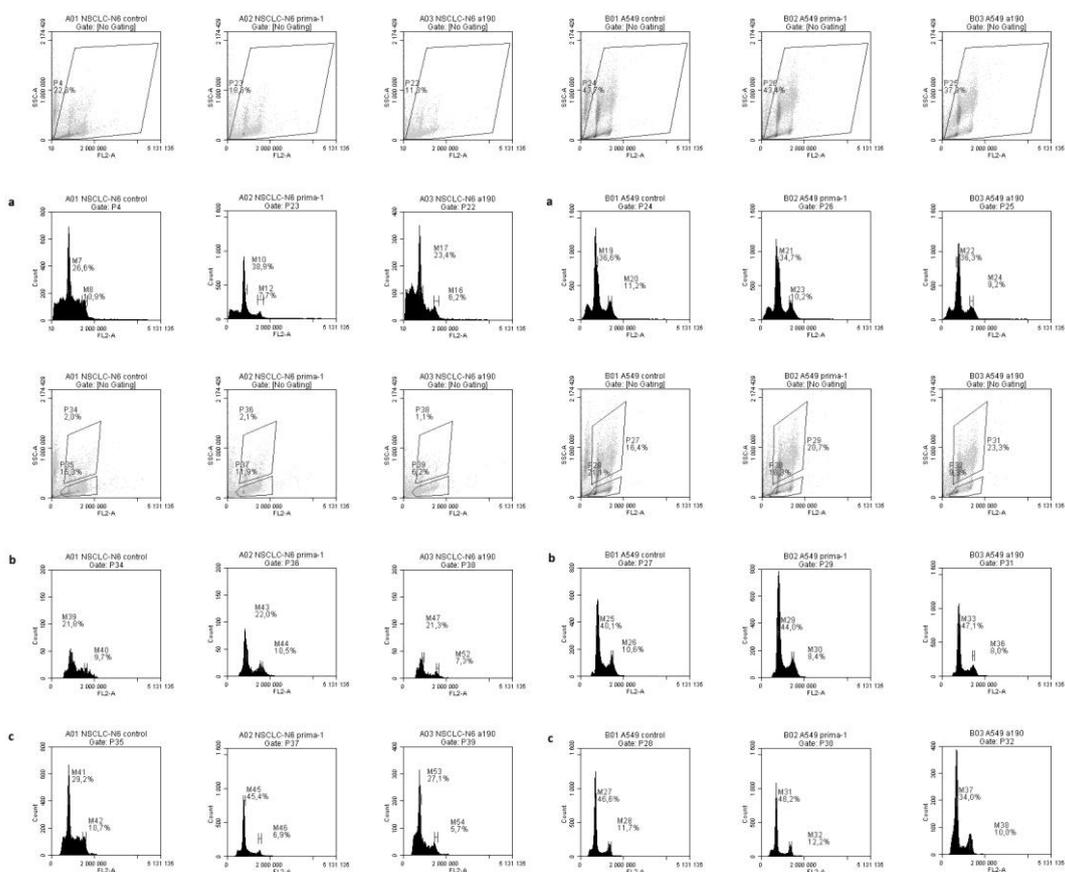
***The NSCLC-N6-L16 cell line:***

Cells were synchronized 16 hours beforehand, during mitosis, thus the control-cells histogram shows cells essentially in G1 phase of the cell cycle, some cells do, however, appear in S phase in the entire population study (Fig. 2). The successive analysis of cells according to their state of apoptosis showed that this S phase is not real and corresponds, in fact, to cell debris from cells having died through apoptosis. It can be seen on the histograms for non-apoptotic cells (Fig. 2), that only blocking in the G1 phase is visible. NSCLC-N6-L16 is a polyploidy cell line,<sup>19</sup> which is why there are cells either with 2n DNA or 4n DNA in the G1 phase.

This false S phase in the control cells is caused by a lot of cell debris due to an over-high density of cells in the wells and the mortality of the cells by apoptosis through lack of nutrients.

When treated by PRIMA-1, the proportion of cells in the G1 phase increased for both cells with 2n and 4n DNA. The amount of cell debris is lower; the cell density is also lower compared to the control (Fig. 2).

A190 has a more powerful effect than PRIMA-1. Blocking in the G1 phase of the cell is still visible but only a few cells are countable on the histograms: only 27.1% of the apoptotic population remain in the G1 phase, whereas with PRIMA-1 there is still 45.4% (29.2% for the control). This shows that most cells had already suffered an apoptotic death: A190 does have a blocking effect but can also induce the destruction of cells by apoptosis (Fig. 2).



(Fig. 2)

(Fig. 3)

**The A549 cell line:**

The false S phase is also apparent for the A549 cell line, even more so because of the more rapid doubling time of A549 compared to NSCLC-N6-L16 (Fig. 3).

As for the NSCLC-N6-L16 cell line, there is blocking in the 2n DNA population in the G1 phase of A549 cells when treated by either PRIMA-1 (44% of cells are in G1 phase against 40.1% for the control) or A190 (47.1% against 40.1% for the control). However, the effect on the 4n DNA population is less significant than in the NSCLC-N6-L16 cell line for both treatments.

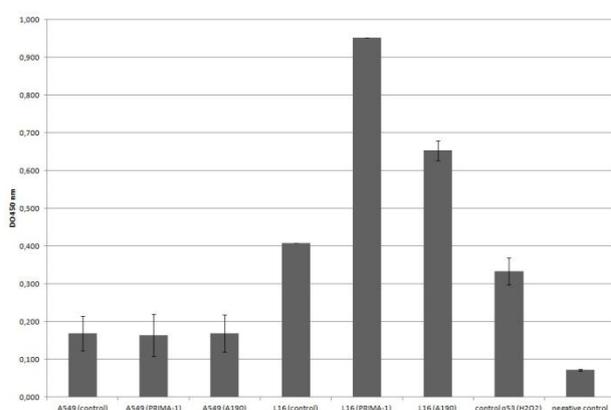
The difference between the two molecules is once again visible in the apoptotic population. While blocking in G1 phase is still higher for cells treated by PRIMA-1 than in control cells (48% against 46.6%) the proportion of cells blocked in the G1 phase is significantly lower for the cells exposed to A190 (only 34%). This shows the greater efficacy of the molecule: the cells already being dead through apoptosis in this case.

#### ***Restoration of the fixation to DNA of His273 mutated p53 protein after treatment by A190:***

This assay was carried out with the Active Motif kit TransAM p53 in 96 well-plates in which an oligonucleotide containing a p53 consensus binding site had been immobilized. The assay was carried out with both cell lines treated with A190 molecule and PRIMA-1 at IC50 (Fig. 4).

An already relatively-high fixation of the p53 protein on the consensus sequence can be observed in control-cells. However, when treated with PRIMA-1, known for its capacity to restore the wild conformation of 273His mutated p53, the fixation of the protein in NSCLC-N6-L16 cells increases dramatically: by a factor of 2.5. Similarly, when treated with A190, the fixation of 273His mutated p53 protein increased considerably, by a factor of 1.6.

In contrast, in the A549 cell line, while the fixation of wild type p53 proteins is observed for the control-cells, treatment by neither PRIMA-1 nor A190 modifies the degree of binding of the protein.



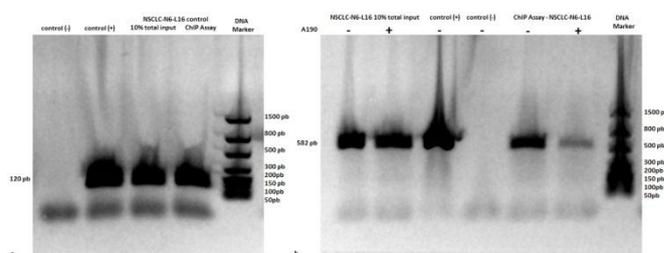
(Fig. 4)

***ChIP assays to identify links between the genome (NEDD9) and the proteome (p53): transcription factor-DNA binding interactions.***

In order to demonstrate a definitive link between p53 activation and *NEDD9* expression a cross-linked chromatin from NSCLC-N6-L16 cells treated for 16 hours with A190 was prepared. This chromatin was then immunoprecipitated (IP) with antibody specific to p53. Finally, the IP genomic DNA was analyzed to measure the amount of *NEDD9* DNA using PCR with primers specific to the gene. A 10% total input sample of cross-linked chromatin was kept from every test as a control.

Positive control was carried out with NSCLC-N6-L16 cross-linked chromatin immunoprecipitated with Anti-RNA Polymerase II antibody and the IP genomic DNA was analysed using PCR with primers specific to the GAPDH promoter close to the transcription start site. In these controls we found a 120 pb fragment, which corresponds to a positive control for assay technique and reagent integrity (Fig. 5).

For the 10% total input sample we found a 582 pb fragment, which confirms the presence of *NEDD9* in the cross-linked chromatin of each test. The presence of the same fragment in NSCLC-N6-L16 cell ChIP assays demonstrates a physical link between *NEDD9* and p53 (Fig. 5).



(Fig. 5)

## DISCUSSION

There are 37 000 new cases of lung cancer per year in France, with a survival rate under 14% after 5 years (<http://www.e-cancer.fr>). In order to develop new therapeutic strategies for treatment it would seem necessary to create new molecules specifically targeting the genes altered in tumor cells and thus sparing healthy cells. This would also allow the development of more personalized treatments for patients, whose altered genes are not systematically the same. The *TP53* gene is a very interesting target as in abnormal cells mutated p53 proteins lose their “guardian of the genome” function, a function in charge of halting proliferation and of the induction of apoptosis. In addition some mutations can lead to gain of function for these denaturalized proteins, which become oncoprotein. They then promote cell proliferation, accumulation of mutations in the cells and the tumor transformation process<sup>20</sup>.

*P53* is one of the most frequently mutated genes in cancer cells and particularly in lung cancer cells where more than 70% have a *TP53* mutation. The discovery of new treatments for these cancers has naturally turned to molecules able to target mutated p53 protein. In addition, His273 is a hot spot and most frequently mutated in lung cancer<sup>21</sup>.

PRIMA-1 is one of the rare examples of molecules in development able to restore the activity of His273 p53 mutant proteins by restoring the wild type conformation<sup>9</sup>. The mutant p53 can then induce some classical genes targets of p53. For example, genes involved in cell cycle arrest (p21, GADD45 and 14-3-3d) or apoptosis (Bax, Noxa) can then be expressed again in tumor cells. Cell proliferation is halted and the cells die by apoptosis or senescence depending on the cell line<sup>10</sup>.

Our research into A190 with ties in with this interest in targeted therapy. In previous work we have shown that A190 has *in vivo* antitumor properties without apparent toxicity. *In vitro* it exhibits irreversible cytostatic activity on both cell lines: NSCLC-N6-L16 and A549. This activity is linked to the blocking of the cell line in the G1 phase followed by apoptosis<sup>14</sup>. A further study established the His273 mutation by transition G->A on the *p53* gene in the NSCLC-N6-L16 cell line<sup>15</sup>. Finally, we demonstrated that apoptosis induced by A190 treatment in both cell lines is provoked by an overexpression of *NEDD9*, specifically in the G1 phase of the cell cycle<sup>14</sup>.

*NEDD9* is involved in many cell processes and its role in apoptosis induction is particularly well documented. It is a ubiquitous gene and heavily expressed in lung and lung cell lines<sup>22</sup>. Its overexpression is associated with many types of cancer and it seems to be a spread factor in the development of metastases<sup>23</sup>. However it had been demonstrated that overexpression beyond a certain threshold is a pro-apoptotic factor. To promote proliferation *NEDD9* must be at a precise level in cells; if it is overexpressed, or silenced by siRNA, it leads to apoptosis<sup>2417</sup>.

The aim of the present study is to evaluate whether, like PRIMA-1, A190 can reactivate His273 p53 mutated protein and at the same time to investigate further the link between this reactivation of p53 and the overexpression of *NEDD9* gene.

In NSCLC-N6-L16 cells we show, by quantitative PCR, an overexpression of *NEDD9* gene after 16h of treatment with A190. In the same samples of RNA extract we observe an overexpression of p53 at the same time point: 16h. We did the same with an A549 cell line where no significant difference in the expression of *NEDD9* or *TP53* can be noted. However the expression in non-treated A549 cells is higher than in non-treated NSCLC-N6-L16.

It has been previously reported that A549 cell lines lack *LKB1* and this absence presumably contributes to the upregulation of *NEDD9*. Testing for the presence of *LKB1* in NSCLC-N6-L16 cells showed expression of the gene in the cell line (data not shown), implying that the overexpression of *NEDD9* after 16 hours can only be a consequence of a treatment by A190. The fact that there is no significant modification of the *NEDD9* gene expression with or without treatment in A549 cells prove the specificity of A190's effect to cell lines with a mutated *TP53*.

The cytostatic and pro-apoptotic effects of A190 and PRIMA-1 on the cell cycle of both cell lines, NSCLC-N6-L16 and A549, were first examined and compared using flow cytometry analyses.

It is possible to detect apoptotic cells which still contain apoptotic bodies using flow cytometry: this is called the sub G1 peak.<sup>2728</sup> This peak occurs just before G1 and is made up of cells that have not yet discharged their apoptotic bodies. We differentiated two populations of cell in our analysis: an apoptotic population and a non-apoptotic population.

Analysis of both apoptotic and non-apoptotic cell populations in A549 show that both PRIMA-1 and A190 molecule are able to block cells in the G1 phase of the cell cycle. A190 has a higher pro-apoptotic capacity than PRIMA-1. The sub G1 apoptotic population is lower after treatment with A190 than with PRIMA-1, which means that, when treated with A190, the cells are already dead and there are fewer cells where the apoptotic bodies are still within the cell.

Analysis of NSCLC-N6-L16 also shows a blocking in the G1 phase of the cell cycle induces by both PRIMA-1 and A190 in both populations of cells: apoptotic and non-apoptotic. In fact the higher pro-apoptotic effect of A190 compared to that of PRIMA-1 is even more pronounced in this cell line: there are fewer cells in the sub G1 peak, which means that apoptotic bodies were released into the media and are therefore no longer visible.

Treatment by either molecule induces a blocking in the G1 phase of the cell cycle in both cell lines: NSCLC-N6-L16, which has a mutated TP53 and A549, which has a wild type TP53. As overexpression of TP53 is only seen in NSCLC-N6-L16, it seems likely that the blocking in G1 and the apoptosis brought about by both pro-apoptotic treatments are not lead by the same signaling pathway.

With these results in mind, we then investigated whether A190 also reactivates His273 p53 mutated protein. With A549 cells no modification in p53 protein fixation on DNA was revealed with A190 or with PRIMA-1. This follows from the fact that A548 has the wild type copy of the protein: being in its normal conformation the treatment cannot affect the protein. In NSCLC-N6-L16 cells, p53 proteins are mutated to His273, but they seem to retain their fixation to DNA capacities, having a partially wild type conformation. In addition, mutant proteins accumulate in cells, which explains the already high proportion of fixation in control cells<sup>29</sup>. Above all this test demonstrates the ability of A190 not only to restore the fixation to DNA of His273 p53 mutants but to greatly intensify this fixation. PRIMA-1 also exhibits this ability, related to its transactivation capability<sup>30</sup>. Thus, like PRIMA-1, which has a derivate at the clinical trial phase, A190 is able to restore the functions of p53.

Finally, we demonstrated a physical link between *NEDD9* and the p53 protein, a results allowing us to identify *NEDD9* as a new target for the transcription factor p53.

In conclusion the present paper not only shows that the A190 molecule can restore the functions of His273 mutated p53 protein, but also that once reactivated it can induce an overexpression of *NEDD9*, which is controlled by the transcription factor function of p53 whose gene, *TP53*, is also overexpressed. This overexpression is specific to mutated proteins since A190 only induces a joint overexpression of *TP53* and *NEDD9* in cell lines including the mutation. The absence of overexpression of *NEDD9* in the A549 cell line, with a wild type *TP53* gene, coupled with the absence of induction of T53 confirm this specific activity to His273 mutated p53 protein. Finally, A190 only provokes a blockage in the G1 phase of the cell cycle and apoptotic death in the NSCLC-N6-L16 cell line when p53 is mutated. The overexpression of *NEDD9* on tumor cells, a new target gene of reactivated His273 p53 mutated protein, then lead cells to apoptosis.

This apoptosis of the cancer cells can be explained in two ways: either p53 mutated proteins, reactivated by treatment, induce the overexpression of *NEDD9* in the G1 phase of the cell cycle instead of the G2/M phase and this disrupts the normal cell cycle; or the levels of *NEDD9* protein increase and cross the threshold. In both cases, the cell recognizes this as a trigger factor for apoptosis.

In this paper, we have demonstrated that the treatment of a non small cell lung cancer cell line using the A190 molecule allows the specific reactivation of His273 mutated p53 protein. These can then again bind to the DNA and become able to play a transcription factor role for *NEDD9* in tumor cells.

An interesting subject for future research would be to investigate whether, like PRIMA-1, the A190 molecule induces the intrinsic pathway of apoptosis. To this end we are currently carrying out qPCR analysis on the Bax and Bcl2 genes. We would like to confirm these results *in vivo* on nude mice xenografted with the NSCLC-N6-L16 cell line in which we already demonstrated the antitumor activity of the A190 molecule.

The development of such molecules, able to reactivate a tumor suppressor gene like *TP53*, which is mutated in more than 50% of cancer cases, and which can also act on a target like *NEDD9*, which is particularly involved in the carcinogenesis process, offers hope for the development of new targeted therapies. These therapies would then allow a very specific action on tumor cells while sparing healthy cells in the body.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell lines and cultures*

Two cell lines, A549 and NSCLC-N6, were used in this study originating from an adenocarcinoma and an epidermoid lung cancer, respectively. NSCLC-N6 is a cell line derived from a NSCLC of a previously untreated patient (moderately differentiated classified as T2N0M0)<sup>19</sup>. The A549 line was obtained from the ATCC (reference CCL-185)<sup>31</sup> and is known to have a wild type p53 gene, while NSCLC-N6 has a mutant p53 gene, similar to tumors *in situ*.

The cell lines were cultured in RPMI-1640 enriched with 100 IU penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine and 5% fetal bovine serum. Cell culture plates were maintained in humidified incubators at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. NSCLC-N6 has a cell doubling time of 48h *in vitro*, and A549 24h.

### *Cells synchronisation in the M phase*

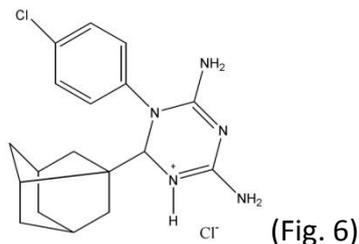
M phase synchronization was chosen as all synchronization methods using biochemical agents can cause genotypic cell modifications plus a double cytotoxicity: cytotoxicity from the molecules plus cytotoxicity from the treatment studying the experiment and so may cause bias.

During mitosis, cell shape and adhesion change dramatically. Mitosis induces a depolymerisation of the microtubules<sup>3233</sup> and a loss of the cytoskeleton and adhesion to the support. Meaning the cells lie at the bottom of the culture flask throughout mitosis. It is therefore easy to isolate them by slightly stirring the culture medium, taking the cells out and suspending them. The cells are then salvaged by slow centrifugation and placed in a new culture flask.

### **A190**

A190 (4,6-diamino-1,2-dihydro-1-(400-chlorophenyl)-2-(1-tricyclo[3.3.1.1<sup>3,4</sup>] decyl-1,3,5-triazine) is a product of chemical synthesis (Fig. 6). It was selected from more than 200 analogs using pharmacological assays. It is under international patent (Patent PCT:

GR02/00036). The pure compound is dried and can be dissolved in water. The IC<sub>50</sub>s for A190 are 39.4  $\mu$ M in NSCLC-N6 and 52.6  $\mu$ M in A549.



### ***Extraction of total RNA***

Total RNA was extracted from NSCLC-N6 and A549 cell lines using the Dynabeads<sup>®</sup> mRNA Direct<sup>™</sup> Kit (Ambion by Life Technologies). The isolation protocol relies on base pairing between the polyA residues at the 3' end of most mRNA and the oligo (dT) residues covalently coupled to the surface of the Dynabeads<sup>®</sup>. The quality and concentration of purified RNA were assessed using UV absorbance at 260/280 nm and samples were run on 1% agarose gel in order to assess their quality. RNA was stored at – 80 °C.

### ***CDNA synthesis***

RT was carried out with 1  $\mu$ g of RNA in 10  $\mu$ l with 0.125  $\mu$ g/ $\mu$ l random primers and RNase-free water. This mixture was denatured at 65°C for 10 min then kept on ice. Subsequently, it was completed to a final volume of 25  $\mu$ l with a mix containing 8 mM of dNTP mix, 1X of M-MLV 5X reaction buffer, 25 units of recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (Promega), and 200 units of M-MLV RT (Promega) and RNase-free water. In order to check whether the samples were contaminated by genomic DNA, the same mix was made with RNA without the reverse transcriptase. Following this step, samples were incubated for 2 h at 37°C. cDNAs were stored at -20°C. After reverse transcription, cDNAs were used as a template for specific qPCR.

### ***Quantitative real-time RT-PCR***

Real-time RT-PCR was carried out in a final volume of 25  $\mu$ l with 1  $\mu$ l 1:20 dilution of diluted cDNA mixture, 10 pmol gene-specific forward and 10 pmol reverse primer in 1X SYBR Green PCR master mix (Eurogentec) with the following protocol: 15 sec at 95 °C for denaturation, 30 sec at 60°C for annealing and extension on a ABI Prism Sequence Detection System 5700

(Applied Biosystems). The primers were designed using Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). All primer sequences were controlled with a dimmers finder to reduce the risk of unspecific hybridization of Sybr-green (<https://www.operon.com/oligos/toolkit.php>).

The primers sequences are *NEDD9*: forward 5'-CGCTGCCGAAATGAATAT-3', reverse 5'-CCCTGTGTTCTGCTCTATGACG-3' (10 mM, Sigma Genosys); *TP53*: forward 5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3', reverse 5'-TCTGAGTCAGGCCCT TCTGT-3' (10 mM, Sigma Genosys). The relative expression of each gene was normalized to that of human  $\beta$ -actin: forward 5'-ATTCCCTTGCCTTCTTGAT-3', reverse 5'-CGTGAGGTCTGCCACTACAG-3' (10 mM, Sigma Genosys). Normalization was carried out using the  $\Delta\Delta$ Ct method. Nontemplate control sample was used for each PCR to check the genomic DNA contaminations of the cDNA template. Analysis of the results was carried out using GenAmp 5700 SDS (Applied Biosystems) software.

### ***Cell cycle analysis***

For DNA staining, 200 10<sup>3</sup> cells were cultured in 9.4 cm<sup>3</sup> petri dish in the absence, as well as in the presence, of A190. DNA staining was carried out using Vindelov's technique<sup>34</sup>. The solution (0.01 M glycine/NaOH; 0.96 mM propidium iodide ; 0.1 M Nonidet P40; 700 IU ribonuclease A/I; 0.3 M NaCl ; diluted 1:2 (v/v) in PBS) was put into flasks, which were then shaken and left in a dark environment at 4°C for 15 min. The cell suspension thus obtained was filtered on nylon mesh (50  $\mu$ m) and analyzed. The DNA content of at least 30,000 nuclei was measured on a Accuri C6 FACScan.

### ***Sequence specific DNA binding of p53-His273***

To quantify p53 activation a nuclear extract was made using a Nuclear Extract Kit (Active Motif). Protein was quantified using a ProStain™ Protein Quantification Kit (Active Motif) and the activation of p53 was studied using the Trans AM™ p53 Transcription Factor Assay Kits (Active Motif). Trans AM™ p53 Transcription Factor Assay Kits contain a 96-well plate with an immobilized oligonucleotide that contains a p53 consensus binding site (5'-GGACATGCCCGGGCATGTCC-3'). P53 contained in nuclear extract specifically binds to this oligonucleotide. The primary antibody used in the TransAM p53 Kit recognizes an accessible

epitope on p53 protein upon DNA binding. Addition of a secondary HRP-conjugated antibody provides a sensitive colorimetric readout easily quantified by spectrophotometry.

### ***Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)***

After treatment cells were fixed in a 1% Formaldehyde solution for 15 min at room temperature. Glycine was then added for an additional 5 min at room temperature to neutralize the formaldehyde. Cells were then pelleted at 3000 xg for 5 minutes at room temperature. The ChIP assays were done using a Thermo Scientific Pierce Agarose ChiP Kit. The following antibodies were used: p53 Antibody (PAb 240) (ThermoFisher Scientific; MA5-15244), Anti-RNA Polymerase II antibody and Normal Rabbit IgG (both included in the kit).

To amplify the HEF1 gene the following primers sequences were used: forward 5'-AATCATGGGGACGGGTCTTT-3', reverse 5'-TGA CTAAGCCTGAAGTGGGG-3' (10 mM, Sigma Genosys). PCR was carried out in a final volume of 50 µl with 18 µl of purified DNA mixture, 10 µL of 5X buffer (Promega), 8 µL of MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1 µL of dNTP Mix 10mM (Promega), 0,28 µL of GoTaq® Hot Start Polymerase 500u (Promega) and 1,78 µL of each primers (1:10). Detection of PCR products was then analyzed using the FlashGel® System by Lonza.

1. Ettinger, D. S. Overview and state of the art in the management of lung cancer. *Oncol. Williston Park N* **18**, 3–9 (2004).
2. Lilenbaum, R. C. *et al.* Single-agent versus combination chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: the cancer and leukemia group B (study 9730). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 190–196 (2005).
3. Favoni, R. E. & Alama, A. Preclinical strategies targeted at non-small-cell lung cancer signalling pathways with striking translational fallout. *Drug Discov. Today* **18**, 11–24 (2013).
4. Mogi, A. & Kuwano, H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 583929 (2011).
5. Wiman, K. G. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* **29**, 4245–4252 (2010).
6. Bouchet, B. P., Caron de Fromentel, C., Puisieux, A. & Galmarini, C. M. p53 as a target for anti-cancer drug development. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **58**, 190–207 (2006).
7. Wang, W. & El-Deiry, W. S. Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr. Opin. Oncol.* **20**, 90–96 (2008).
8. Athar, M., Elmets, C. A. & Kopelovich, L. Pharmacological activation of p53 in cancer cells. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 631–639 (2011).
9. Bykov, V. J. N. *et al.* Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.* **8**, 282–288 (2002).
10. Lambert, J. M. R., Moshfegh, A., Hainaut, P., Wiman, K. G. & Bykov, V. J. N. Mutant p53 reactivation by PRIMA-1MET induces multiple signaling pathways converging on apoptosis. *Oncogene* **29**, 1329–1338 (2010).
11. Bykov, V. J. N., Issaeva, N., Selivanova, G. & Wiman, K. G. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* **23**, 2011–2018 (2002).
12. Zache, N., Lambert, J. M. R., Wiman, K. G. & Bykov, V. J. N. PRIMA-1MET inhibits growth of mouse tumors carrying mutant p53. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* **30**, 411–418 (2008).
13. Farnebo, M., Bykov, V. J. N. & Wiman, K. G. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 85–89 (2010).
14. Moreau, D. *et al.* Original triazine inductor of new specific molecular targets, with antitumor activity against nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **123**, 2676–2683 (2008).

15. Jacquot, C. *et al.* Proliferation arrest in G1 phase of a non-small cell lung cancer cell line (NSCLC-N6) treated by an original compound methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate (VT1) independently of the p53/p21 cascade. *Int. J. Oncol.* **23**, 495–501 (2003).
16. Law, S. F. *et al.* Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3327–3337 (1996).
17. Law, S. F., O'Neill, G. M., Fashena, S. J., Einarson, M. B. & Golemis, E. A. The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5184–5195 (2000).
18. Law, S. F., Zhang, Y. Z., Klein-Szanto, A. J. & Golemis, E. A. Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3540–3551 (1998).
19. Roussakis, C. *et al.* Study of in vitro drug sensitivity on a newly established cell line from a primary bronchial epidermoid carcinoma of human origin (NSCLCN6). *Anticancer Res.* **11**, 2239–2244 (1991).
20. Soussi, T. & Lozano, G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 834–842 (2005).
21. Brambilla, E. & Brambilla, C. p53 and lung cancer. *Pathol. Biol. (Paris)* **45**, 852–863 (1997).
22. Malleter, M. *et al.* A novel large regulator RNA, B2, partially overlaps the HEF1/NEDD9/Cas-L gene. *Int. J. Mol. Med.* **25**, 897–903 (2010).
23. O'Neill, G. M., Seo, S., Serebriiskii, I. G., Lessin, S. R. & Golemis, E. A. A new central scaffold for metastasis: parsing HEF1/Cas-L/NEDD9. *Cancer Res.* **67**, 8975–8979 (2007).
24. Pugacheva, E. N. & Golemis, E. A. HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. *Cell Cycle Georget. Tex* **5**, 384–391 (2006).
25. Feng, Y. *et al.* The CRTC1-NEDD9 Signaling Axis Mediates Lung Cancer Progression Caused by LKB1 Loss. *Cancer Res.* **72**, 6502–6511 (2012).
26. Ji, H. *et al.* LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* **448**, 807–810 (2007).
27. Ormerod, M. G., Collins, M. K., Rodriguez-Tarduchy, G. & Robertson, D. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *J. Immunol. Methods* **153**, 57–65 (1992).
28. Fournel, S. *et al.* Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS Lett.* **367**, 188–192 (1995).

29. Selivanova, G. & Wiman, K. G. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* **26**, 2243–2254 (2007).
30. Lambert, J. M. R. *et al.* PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* **15**, 376–388 (2009).
31. Giard, D. J. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417–1423 (1973).
32. Sawin, K. E. & Endow, S. A. Meiosis, mitosis and microtubule motors. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **15**, 399–407 (1993).
33. Suzuki, K. & Takahashi, K. Reduced cell adhesion during mitosis by threonine phosphorylation of beta1 integrin. *J. Cell. Physiol.* **197**, 297–305 (2003).
34. Vindelov, L. L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **24**, 227–242 (1977).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank J. Perrot and C. Chedeville and M. Grivois for their helpful discussions and technical assistance. B. Rousseau was supported by “Ligue Nationale contre le Cancer”.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

B.R. wrote the main manuscript text, C.J. and C.R. contributed to the writing, B.R. and C.T. prepared figures 1-6. B.R., C.J., J.L.P., M.M., T.B., C.T., V.S. and C.R. reviewed the manuscript.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1: Chemical structure of the triazine A190.

Figure 2: Expression of *NEDD9/HEF1/Cas-L* (a and c) or *TP53* (b and d) tested by qRT-PCR on synchronized NSCLC-N6-L16 cells (a and b) or synchronized A1549 cells (c and d) treated or not with A190 at IC50 from 15 to 17 hours. The results are expressed as a ratio of mRNA quantity of the genes tested and of b-actin (control gene). The values are mean  $\pm$  S.D. ( $n=8$  for each group).

Figure 3: Flow cytometry analysis of the comparative effects of different cytostatic molecules on synchronized NSCLC-N6-L16 cells treated at IC50 for 16 hours (a: total cells - b: non-apoptotic cells - c: apoptotic cells).

Figure 4: Flow cytometry analysis of the comparative effects of different cytostatic molecules on synchronized A549 cells treated at IC50 for 16 hours (a: total cells - b: non-apoptotic cells - c: apoptotic cells).

Figure 5 : Observation of the degree of fixation of p53 to DNA in NSCLC-N6-L16 or A549 cells treated or not by PRIMA-1 or A190 at IC50. The values are mean  $\pm$  S.D. from triplicate samples.

Figure 6 : (a) ChIP assays control on synchronized NSCLC-N6-L16 with Anti-RNA Polymerase II Antibody and ChIP Positive Control Primers (GAPDH promoter) – (b) ChIP assays on synchronized NSCLC-N6-L16 treated or not by A190 with p53 antibody and *NEDD9/HEF1/Cas-L* specific primers

# Thèse de Doctorat

Bénédicte ROUSSEAU

**TP53 facteur de transcription pour le gène NEDD9/HEF1/Cas-L :  
nouvelles cibles potentielles du traitement du Cancer du Poumon  
« Non à Petites Cellules »**

**TP53 transcription factor to NEDD9/HEF1/Cas-L gene: new potential targets in  
Non Small Lung Cancer Treatment**

## Résumé

De par le taux élevé à la fois de son incidence et de sa mortalité le cancer du poumon reste un problème de santé publique majeure. Les traitements classiques proposés restent très peu efficaces à l'exception de la chirurgie dans les stades les moins avancés. En effet, la chimiothérapie classique, basée sur des molécules dirigées contre les acteurs de la prolifération cellulaire n'est pas adaptée au cas des cancers du poumon non à petites cellules, représentant 70% des cas, qui présentent des cellules à temps de doublement très lent. Aussi, la recherche s'oriente depuis plusieurs années vers des traitements plus ciblés et dirigés contre des acteurs autres que ceux de la prolifération cellulaire. Dans ce contexte, le *screening in vitro* de nouvelles molécules a été réalisé au laboratoire et a conduit à la sélection de la triazine A190. Cette molécule cytotatique et pro-apoptotique a permis d'identifier une nouvelle cible moléculaire: le gène NEDD9/HEF1/Cas-L qui est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, motilité et apoptose). Les travaux présentés dans cette thèse montrent que la surexpression observée du gène HEF1 lors d'un traitement par A190 de la lignée NSCLC-N6-L16 issu d'un carcinome épidermoïde est sous le contrôle du facteur de transcription TP53 lui-même surexprimé et préalablement restauré par la molécule A190. Par conséquent, cette cible moléculaire (NEDD9/HEF1/Cas-L) pourrait potentiellement devenir une cible thérapeutique dans le traitement de carcinomes épidermoïdes ayant cette voie de signalisation affectée. Ceci s'ancrerait dans la tendance actuelle de proposer un traitement personnalisé.

## Mots clés

Cancer du Poumon Non à Petites Cellules – Cibles Moléculaires – p53 – NEDD9/HEF1/Cas-L – Apoptose – Thérapie Ciblée – Voie de signalisation – Cycle cellulaire

## Abstract

Due to the high rate to both its incidence and its mortality lung cancer remains a major public health problem. The proposed classical treatments remain far from effective except for the surgery in the least advanced stages. Indeed, the classical chemotherapy, based on molecules directed against the actors of the cellular proliferation, is not adapted to the case of the Non Small Cell Lung Cancer, accounting for 70% of the cases, which present cells with a very slow doubling time. That is why research has been directed for several years towards treatments more targeted and directed against actors other than those of the cellular proliferation. In this context, an *in vitro* screening of new molecules was carried out at the laboratory and led to the selection of the A190 triazine. This cytostatic and pro-apoptotic molecule allowed to identify a new molecular target the NEDD9/HEF1/Cas-L gene which is involved in many cellular functions (proliferation, differentiation, motility and apoptosis). The studies presented in this thesis show that the over expression of gene HEF1, observed during a treatment by A190 of the cell line NSCLC-N6-L16 outcome from an epidermoid cell carcinoma, is under the control of the transcription factor TP53 itself over expressed and beforehand restored by the A190 molecule. Consequently, this molecular target (NEDD9/HEF1/Cas-L) could potentially become a therapeutic target in the treatment of epidermoid cell carcinoma having this affected signalization pathway. This would be anchored in the current trend to propose a personalized treatment.

## Key Words

Non Small Cell Lung Cancer – Molecular Target – p53 – NEDD9/HEF1/Cas-L – Apoptosis – Target Therapy – Signalisation Pathway – Cell Cycle