



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact de la perte d'expression de PTEN sur la réponse au cetuximab et l'induction de l'angiogenèse par un modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou

Jihane Mriouah

## ► To cite this version:

Jihane Mriouah. Etude de l'impact de la perte d'expression de PTEN sur la réponse au cetuximab et l'induction de l'angiogenèse par un modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10099 . tel-01746329

**HAL Id: tel-01746329**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746329>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT**

---

**Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE**

**Mention : « Sciences de la vie et de la Santé »**

par **Jihane MRIOUAH**

**ETUDE DE L'IMPACT DE LA PERTE D'EXPRESSION DE PTEN SUR LA REPONSE AU  
CETUXIMAB ET L'INDUCTION DE L'ANGIOGENESE PAR UN MODELE  
CELLULAIRE DE  
CARCINOME EPIDERMOÏDE DE LA TETE ET DU COU**

Le 8 Novembre 2010

**Membres du jury :**

Rapporteurs : Monsieur Joseph Abecassis	Docteur, EA 3430 - CLCC Strasbourg.
Monsieur Christophe Borg	Professeur, Inserm U645 - CHU Besançon.
Examineurs : Madame Simone Niclou	Docteur, CRP Santé Luxembourg. Luxembourg.
Monsieur Philippe Bécuwe	Professeur, EA 4421 - SiGReTO Nancy Université
Monsieur Jean-Louis Merlin	Professeur, EA 4421 - SiGReTO Nancy Université
Madame Béatrice Faivre	Docteur, EA 4421 - SiGReTO Directeur de thèse

A mes Grands-parents,  
Vous vivants et passés qui avez su me guider et être un repère.

When roots turn to dust, in who you are you have to trust,  
From roots, good decisions you have to take.  
From dust, gold you have to make.

## REMERCIEMENTS

### **Messieurs les Docteur Abecassis et Professeur Borg,**

Je tiens à vous remercier pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation objective et minutieuse de mon travail de thèse.

En vos qualités de rapporteurs, je vous suis reconnaissante pour le regard expert et critique que vous avez porté sur ce travail de thèse, qui le valorise.

### **Madame le Docteur Simone Niclou,**

Votre présence dans ce jury m'honore et votre point de vue, forgé par la pratique de la Recherche dans un contexte différent de celui des laboratoires français est très enrichissant. Merci de votre participation à ce jury de thèse.

### **Monsieur le Professeur Bécuwe,**

Merci de votre participation à ce jury. Bien au delà, vous avez suivi de loin mon travail de thèse depuis le tout début. Les échanges que nous avons pu avoir, bien que ponctuels, ont toujours été très intéressants. Votre rigueur et votre exigence scientifiques ont été d'une aide précieuse tout au long de ma formation.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance aux brillants membres de votre équipe, notamment Stéphanie Grandemange qui a donné un peu de son temps pour résoudre des problèmes auxquels je faisais fasse. J'ai également eu le plaisir de travailler pendant quelques temps avec Vanessa Minig. Que ce soit avec elles, Bérénice, Nadège, ou Marie, toutes les collaborations auxquelles j'ai participé avec votre équipe ont été très riches et fructueuses. Merci.

### **Madame le Docteur Faivre,**

Béatrice, je vous remercie pour la grande liberté que vous m'avez laissée tout au long de ce travail, ainsi que pour votre recul dont je manque souvent. Votre point de vue, original permet le débat d'idées et a toujours été pour moi l'occasion de me situer et d'apprendre.

En tant que Directrice de ces travaux, la devise que vous vous efforcez d'appliquer dans

l'encadrement des étudiants a été pour moi une grande source d'enseignements. En « apprenant à me passer de vous », j'ai beaucoup appris sur ce dont je suis capable et sur ma façon d'envisager la Recherche. Je vous suis reconnaissante pour les leçons que j'ai tiré de vos méthodes de travail.

Telle une locomotive à pleine vitesse pendant ma thèse, j'ai parfois manqué certains aiguillages. Je vous remercie d'avoir pris le rôle de rail me fournissant un parcours instructif et permettant d'arriver à destination, en aillant grandi sur la route.

**Monsieur le Professeur Merlin,**

Jean-Louis, bien qu'assez distant, vous avez toujours gardé un œil sur mon travail, initié au sein de votre équipe, où j'ai été contaminée par la Biologie Cellulaire et l'Oncologie. Tantôt encourageant, tantôt avec une remarque piquante où tantôt à mettre la pression, vous avez toujours un regard pertinent et acéré mais très constructif. J'ai beaucoup appris en évoluant à vos côtés et ceux de votre équipe, grâce à votre esprit d'analyse et votre capacité à toujours voir de l'avant. Merci pour votre enthousiasme parfois sceptique, et toujours contagieux.

**Madame le Docteur Pinel,**

Sophie, quitter la fac de pharma pour te rejoindre à la fac de médecine a été un événement plus que positif. Grâce à toi, ce déménagement s'est révélé être un bond pour moi. Dans ton bureau, où nos longs bavardages nous gardaient parfois plus tard que prévu, j'ai toujours trouvé des discussions stimulantes, inspirantes et pleines de lucidité. Travailler avec toi m'a fait avancer, tant sur le plan Scientifique que sur le plan Humain. L'intransigeance dont tu fais preuve vis à vis de ton travail comme celui des autres est une force qui n'est pas toujours facile à porter mais qui est une grande qualité. Merci pour le temps, l'écoute intelligente que tu as toujours su m'accorder et les conseils que tu m'as prodigués.

**Monsieur le Docteur Boura,**

Cher Cédric... devais-je te remercier en tant que collègue ou en tant qu'ami ? Il faudrait faire une case entre les deux. Je te suis très reconnaissante de m'avoir supportée ces années, et il y en a plus d'un qui pourrait témoigner que ce n'est pas toujours une sinécure ! Grâce à tes talents de conciliateur hors paire, et ton caractère si facile à vivre bien que pas exempt de mauvaise foi, tu as rendu les moments pénibles plus faciles à dépasser. Comme tu as parfois rendu les moments faciles plus pénibles en me tapant sur les nerfs, mais tu as toujours subi les attaques de bonne guerre.

Tu as été un confident et un souffre-douleur méritant. Travailler avec toi m'a fait prendre conscience de mes limites, de mes erreurs et de mes faiblesses mais aussi de mes forces. Ta présence tout le long de ma thèse a été une grande chance pour moi, même si tu es parfois un peu boulet, avec toi dans les parages, les journées finissaient toujours par être drôles ! Merci pour ta patience exemplaire et ton attention.

### **Carole,**

Bien plus qu'une technicienne pour moi. Une formatrice et un repère. Tu m'as appris tellement... Avec ton savoir-faire, ta méthode, ta rigueur et ta patience, tu as fait de moi l'étudiante maladroite qui ne savait rien faire en sortant de la fac... l'étudiante toujours maladroite qui savait faire ! Oui je crains que je n'aurais jamais ton calme Carole. Merci de m'avoir aidée à me sentir prête à me lancer pour une thèse.

Bien au delà de nos échanges professionnels ; ce sont nos discussions complices, le ton réconfortant qu'elles ont, ton humour et ta grande ouverture d'esprit qui me manqueront toujours. Dans tous les labos où je serai amenée à passer, je tendrai l'oreille pour guetter le bruit de tes talons, martelant le rythme de tes pas rapides et déterminés. Merci pour ce que tu m'as apporté, merci pour ce que tu représentes.

### **A l'équipe de l' « UBT »,**

La grande Marie, toujours là pour voir mes boulettes avec ton regard de lynx ! Qui vont bien avec tes mains expertes. La petite Marie, pleine de vie, qui a vite fait sa place dans l'équipe. Anne-Sophie, intègre et intelligente, bourreau de travail, te voir évoluer a été comme voir une chenille devenir papillon, et ta capacité de travail et de dévouement m'ont toujours fait complexer !

Les « filles » ça a été un grand plaisir de travailler avec vous, d'apprendre auprès de vous, de parler avec vous et de rigoler avec vous.

### **A l'équipe de Pharma (2007-2009),**

Accompagnée par toi Alexandre, j'ai commencé ma thèse avec le chercheur le plus minutieux et le technicien le plus obsessionnel qui soit ! Alex, merci de m'avoir inculqué ce sens du détail, et d'avoir cadré mes débuts. Commencer avec toi a été déterminant. Merci Géraldine, pour ta bonne humeur quotidienne, ton efficacité redoutable et ta curiosité stimulante. Merci à Paulo pour les moments sympathiques qu'on a échangés et le plaisir de voir tes petits yeux de mec en retard. Merci à Isabelle, pour ta disponibilité et la collection de Bob l'Eponge de ton fils. Merci enfin à Madame

Beaud, qui m'a gentiment guidée lors de mon A.T.E.R. pas des plus brillants mais qui a été une expérience intéressante à vivre.

### **Dans la famille Minirouiah je demande...**

Le père. Papa, sans toi je n'en serai pas là. Travailler les annales du bac de Maths le mercredi et samedi après midi, c'était pas toujours une partie de plaisir... Mais ça a forgé ma persévérance et m'a insufflé une force de travail. Ton accompagnement tout au long de ma scolarité m'a permis d'avancer, malgré les doutes et les difficultés. Et puis, t'avoir vu tard le soir, penché à griffouiller toutes ces feuilles blanches de formules mathématiques ou de pensées, je crois que ça a contribué à me donner le goût d'étudier. Grâce à ton esprit brillant et nos discussions animées, tu m'as transmis la croyance en la Connaissance. Papa, merci d'avoir fait de moi la personne assoiffée de savoir que je suis.

La mère. Maman, tout en semant la sensibilité, et une créativité dans mon esprit, tu as également activement creusé mon appétit de savoir. Avec toi apprendre était un jeu, et je me souviendrai toujours de ce jour lointain, où assis par terre dans votre chambre, tu nous avait expliqué ce qu'est une éclipse, en faisant danser une orange, éclairée d'une lampe torche, autour de ton poings.... La Scientifique que je suis aujourd'hui est peut être née grâce à cela.

Le crew. Les Minirouhia, Julie et Ben. Tant de fous rires, tant de conneries où on a été complices, tant de courses, de jeux, de bagarres,... Avec vous avoir un frère et une sœur signifie quelque chose. Je vous admire, tous les deux. Pleins de courage, dévoués, et tous les deux brillants. Vous m'inspirez, vous me poussez à faire mieux... toujours mieux. Je suis la sœur aînée la plus chanceuse de la Terre, d'avoir un frère et une sœur plus jeunes sur qui je peux compter en toute circonstance, qui sont des modèles pour moi et qui me rendent plus forte. Si on me demandait de dessiner la vie idéale, vous seriez tout près de moi, vous habiteriez le même immeuble ou le même « block » et ça pourrait être n'importe où dans le monde, parce que mon foyer... c'est vous.

### **Dans la famille Grivet je demande...**

La Grand-mère. Mamy, je veux être aussi forte et vivante que tu l'es, aussi clairvoyante et maline que toi. Avec ton foutu caractère, tu es une personne très importante de ma vie. Tu es constante, tu es un repère quand les temps sont troubles. Merci de l'exemple que tu m'as donné, celui d'une femme forte au caractère indépendant. Et je sais que quelqu'un te manque en lisant ces lignes car



mon Papy lui aussi est un repère et c'est dans ses valeurs de droiture, de dévouement et du Bien Commun que j'ai été élevée.

La tatie. Sandrine, tu pourrais être ma sœur. Tu as toujours été là quand j'en ai eu besoin. De ma période de révision du bac où j'ai allègrement squatté ton appart rue des Jardiniers, jusqu' à l'automne dernier où tu m'as fait une place... Toujours là. On a partagé de folles soirées, de grandes discussions et de bonnes rigolades. Et quand je serai pétée de thunes aux States, je te rendrai la pareille.

Presque de la famille et tellement plus qu'un ami, quelqu'un qu'on ne peut pas mettre dans les cases... Tout ce que je pourrai dire ne serait pas assez pour t'exprimer ma reconnaissance... Mon Bot Aka bichon aka la biche aka c\*\*\*\*\*.

Parce que cette thèse, tu y as participé, au sens propre comme au sens figuré. Tu m'as accompagnée tout le long, avec les hauts et les bas, depuis mon master 2. Toujours là pour assurer, des choses du quotidien, des conversations réconfortantes, des bons moments. Tu as toujours été d'une aide précieuse, un soutien permanent et sans faille. Te rencontrer est une des meilleures choses qui me soit jamais arrivées. Tu m'as fait grandir et tu es pour beaucoup dans la personne que j'arrive à être aujourd'hui. Merci pour tout ce que tu m'as apporté : les fous rires, la confiance, le réconfort, le générosité et la passion qui t'animent. Tu es un moteur et un refuge, tu m'inspires, tu recharges mes batteries. Je suis heureuse d'avoir passé ces années et que tu sois toujours là. Tu es la seule personne sur qui je puisse compter quoi qu'il arrive, tu es une famille à toi tout seul.... Bichon, merci pour tout. Tu es irremplaçable.

Maguie et Pascal, depuis des années, et quoi qu'il ait pu se passer, vous avez été une famille pour moi. Vous avez le cœur sur la main et votre gentillesse est admirable. Je tiens à vous remercier sincèrement d'avoir été présents pour moi, quand j'en avais besoin. C'est toujours un grand plaisir de partager des moments en famille avec vous car j'ai toujours senti en faire partie. Vous êtes des modèles de droiture et de générosité.

### **Et les coupains et coupines...**

Ma Greluche !! Haha, toi tu sais... Tu sais que t'as intérêt à me rejoindre vite fait parce que tu vas

me manquer ! Merci pour les moments qu'on passe ensemble, merci de m'apprendre comme tu le fais. Ta culture, tes connaissances, ton humour, ton intelligence ont nourri pas mal de mes soirées et j'adore m'embarquer dans nos conversations, qu'on parle de littérature ou qu'on médise, on s'amuse et j'ai énormément appris de toi. Merci d'avoir été là ces derniers mois, encore plus que ces dernières années.

Mon CHOUCHOU et mon Nissa qui me manquez tellement, ma Punkie, mon Zizien, ma Typiak, Zozo, le cousin, la Cé, Marie, le Dabz, Guillaume,... Vous mes amis, vous m'avez fait grandir. Merci d'avoir été là, merci d'être – chacun de vous - les personnes pleines de passions que vous êtes. Le talent, l'humour, la générosité,... vous êtes une richesse ! Je vous dois tellement de bons moments, de rigolades, de discussions, de confessions, de beaux souvenirs. Merci de m'avoir fait oublier ma thèse, d'avoir ouvert mes yeux à tellement de choses, et apporté vos différences. Ju, merci d'avoir été le complice, l'initiateur, et le confident. Merci à vous tous qui me soutenez.

Enfin, je voudrais adresser un remerciement spécial à celle qui a peuplé mes jours et mes nuits. Je n'imagine pas un jour sans elle. Elle me fait vibrer, me fait me sentir en vie, me procure les émotions les plus intenses. Avec la caféine, elle m'a tenue éveillée, m'a stimulée, m'a réconfortée, m'a accompagnée... la Musique.

Merci en particulier à ces 90 bpm qui me retournent depuis quelques années et auxquels je consacre du temps, avec tant de plaisir... 90 inépuisables beats par minutes. Cette culture pour laquelle je me passionne, qui me surprend, me touche, me parle, ouvre des portes. Merci à Rimeshot, pour ce que cette expérience m'a apporté, m'a appris et m'a amené à connaître.

Merci au passé qui m'a amené où j'en suis et qui continuera de dérouler tandis que le future est déjà là, prometteur.

« Savoir sans agir n'est pas savoir »  
*Mishima Yukio – La Mer de la Fertilité –*

## TABLE DES MATIERES

### Revue bibliographique

<u>Partie I : Les tumeurs HNSCC</u> .....	p2
1- La réalité clinique : un tableau complexe .....	p2
1- 1) Données épidémiologiques et carcinogénèse .....	p2
1- 2) Prise en charge thérapeutique: état des lieux et futures directions .....	p4
2- Le challenge des thérapies ciblées et rationnel scientifique .....	p13
<u>Partie II : EGFR, ses voies de signalisation activées et les stratégies de blocage</u> .....	p14
1- Le récepteur à l'EGF, la partie émergée de l'iceberg.....	p14
1- 1) A la surface, la famille des récepteurs HER.....	p14
a. Portrait de famille .....	p14
b. Un travail en famille.....	p18
c. Du milieu extracellulaire au noyau .....	p19
1- 2) EGFR, le chef de famille.....	p21
a. Rôle, valeur pronostique dans les tumeurs de la tête et du cou .....	p21
b. Stratégies d'inhibition.....	p23
- Ac monoclonaux.....	p23
- TKI.....	p25
2- Les voies de signalisation activées par EGFR : la partie immergée de l'iceberg.....	p25
2- 1) La voie Pi3K/AKT .....	p26
2- 2) La voie des MAP Kinases.....	p27
2- 3) La voie de la Phospholipase C $\gamma$ -1.....	p28
2- 4) La voie des STAT.....	p28
3 - PTEN, le gardien du temple.....	p29

3- 1) Expression et valeur pronostique dans les tumeurs de la tête et du cou.....	p29
3- 2) Contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire.....	p31
3- 3) Contrôle de la progression du cycle cellulaire et de la croissance.....	p32
3- 4) Contrôle du potentiel invasif et migratoire des cellules.....	p36
3- 5) Rôle nucléaire de PTEN.....	p38
3- 6) Lien avec l'angiogénèse.....	p40
4- Implication dans la Résistance aux thérapies ciblées.....	p43
5- Le cetuximab.....	p46
5- 1) La molécule, ses indications, son utilisation.....	p46
5 - 2) Mécanismes d'action.....	p46
5 - 3) Effet antitumoral du cetuximab, données précliniques.....	p47
a. Effets antiprolifératifs du cetuximab décrits <i>in vitro</i> .....	p48
b. Effets <i>in vivo</i> du cetuximab observés.....	p49
<b><u>Partie III : L'angiogénèse tumorale : la tumeur architecte de son devenir.....</u></b>	<b>p51</b>
1 – Généralités sur l'angiogénèse tumorale.....	p51
1- 1) Le switch angiogénique.....	p51
1- 2) Les phases précoces de l'angiogénèse.....	p52
2 – L'angiogénèse dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.....	p55
2 – 1) Rôle du VEGF dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou .....	p55
2 – 2) Les facteurs régulateurs de l'angiogénèse.....	p56
2 – 3) Effet anti-angiogénique des anti-EGFR.....	p58
<b><u>Objectifs.....</u></b>	<b>p60</b>
<b><u>Travaux personnels.....</u></b>	<b>p62</b>

<b><u>Partie I : Effets antiprolifératifs du cetuximab</u></b> .....	p63
1- Introduction.....	p64
2- Matériel .....	p65
2- 1) Lignées cellulaires .....	p65
2- 2) Exposition des cellules au cetuximab.....	p65
2- 3) Stimulation des cellules à l'EGF.....	p65
3- Méthodes.....	p65
3- 1) Conditions de culture et de traitements.....	p65
a. Entretien des lignées cellulaires.....	p65
b. Préparation des cellules pour l'expérimentation.....	p66
c. Exposition des cellules au cetuximab et à l'EGF.....	p66
3- 2) Caractérisation moléculaire de la lignée cellulaire tumorale.....	p67
a. Génotypage <i>KRAS</i> .....	p67
b. Fonctionnalité des voies de signalisation activées par EGFR.....	p67
3- 2) Evaluation de l'effet du cetuximab .....	p70
a. Effet sur l'activation des voies de signalisation intracellulaire.....	p70
b. Effet sur la répartition dans les phases du cycle cellulaire.....	p70
c. Effet sur la viabilité cellulaire.....	p71
d. Effet sur la prolifération cellulaire.....	p71
4- Résultats.....	p72
4- 1) Caractérisation moléculaire de la lignée.....	p72
a. Statut <i>KRAS</i> .....	p72
b. Voies de signalisation.....	p72
4- 2) Evaluation de l'effet du cetuximab.....	p73
a. Sur les voies de signalisation intracellulaire.....	p73
b. Sur la répartition dans les phases du cycle cellulaire.....	p73
b. Sur la croissance cellulaire.....	p75
5- Discussion.....	p75

<b><u>Partie II : Rôle de PTEN</u></b> .....	p78
1- Introduction.....	p79
2- Matériel.....	p80
2- 1) Lignées cellulaires.....	p80
2- 2) Silencing transitoire de PTEN.....	p80
a. Séquences oligonucléotidique de siRNA.....	p81
b. Transfection transitoire.....	p81
2- 3) Silencing stable.....	p82
a. Séquence utilisée.....	p82
b. Plasmide/ insertion de la séquence.....	p82
c. Amplification/Extraction de l'ADN plasmidique.....	p82
d. Transfection / Sélection.....	p83
e. Traitements des cellules.....	p83
2- 4) Xénogreffes et suivi de croissance <i>in vivo</i> .....	p83
3- Méthodes.....	p84
3.1 ) Transfection transitoire.....	p84
3- 2) Protocole d'exposition au cetuximab.....	p84
3- 3) Transfection stable : génération des clones PTEN déficients.....	p84
a. Insertion de la séquence dans le plasmide / Amplification de l'ADN plasmidique.....	p84
b. Extraction de l'ADN plasmidique .....	p85
c. Transfection .....	p85
d. Sélection des cellules transfectées.....	p86
3- 4) Caractérisation des clones déficients PTEN.....	p86
a. Morphologie.....	p86
b. Courbes de croissance <i>in vitro</i> .....	p86
c. Exposition des lignées au cetuximab et aux inhibiteurs spécifiques.....	p87
d. Courbes de croissance <i>in vivo</i> .....	p88

4- Silencing transitoire : Réponse cellulaire au cetuximab	
en fonction du statut de PTEN.....	p88
4- 1) Choix des conditions expérimentales.....	p88
4- 2) Cinétique de l'inhibition par siRNA.....	p88
4- 3) Impact de la perte d'expression de PTEN sur les voies de signalisation.....	p89
4- 4) Impact de la perte d'expression de PTEN sur le cycle cellulaire.....	p91
4- 5) Impact de la perte d'expression de PTEN sur la croissance cellulaire.....	p92
4- 6) Conclusion/discussion.....	p93
5- Modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou PTEN-déficient.....	p95
5- 1) Sélection, expression de PTEN.....	p95
5- 2) Morphologie cellulaire.....	p96
5- 3) Croissance cellulaire <i>in vitro</i> .....	p96
5 – 4) Voies de signalisation.....	p97
5 – 5) Réponse aux thérapies ciblées.....	p99
5 – 6) Courbe de croissance <i>in vivo</i> .....	p100
5 – 7) Conclusion/discussion.....	p101

**Partie III : Etude de l'angiogenèse**.....p105

1- Introduction .....	p106
2- Matériel .....	p107
2 – 1) Modèle d'explants aortiques .....	p107
2 – 2) Production et caractérisation des milieux conditionnés.....	p107
2 – 3) Analyse par microscopie photonique à transmission.....	p108
2 – 4) Analyse par microscopie de fluorescence.....	p108
3- Méthodes.....	p108
3 – 1) Mise en culture des explants aortiques.....	p108
3 – 2) Milieux conditionnés.....	p108
a. Production.....	p109
b. Caractérisation.....	p109
3 – 3) Activité angiogénique.....	p110



4- Modifications du micro-environnements par le cetuximab et la perte d'expression de PTEN : impact sur l'induction de l'angiogenèse tumorale.....	p110
4 – 1) Analyse morphologique et quantitative du bourgeonnement aortique .....	p110
a. Culture des anneaux aortiques dans les milieux témoins.....	p110
b. Culture des anneaux aortiques dans les milieux conditionnés cellules Cal 27...	p111
c. Culture des anneaux aortiques dans les milieux conditionnés cellules siPTEN.	p113
4 – 2) Composition des milieux conditionnés.....	p115
a. Dosage du VEGF.....	p116
b. Détection d'autres facteurs.....	p116
5- Discussion.....	p119

<b><u>DISCUSSION GÉNÉRALE – PERSPECTIVES</u></b> .....	p123
--	------

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Liste des Figures

#### **Introduction**

- Figure 1 : Modèle de progression génétique de la tumorigenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou
- Figure 2 : Illustration de la classification TNM des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou pour les lésions de la lèvre et de la langue.
- Figure 3 : Voies de signalisation ciblées dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou
- Figure 4 : Les récepteurs HER et leurs ligands
- Figure 5 : Activation des voies de signalisation intracellulaires par les récepteurs de la famille HER
- Figure 6 : Représentation schématique des principaux sites de phosphorylation des récepteurs HER et protéines associées
- Figure 7 : Schématisation de la structure des récepteurs HER
- Figure 8 : Images de fluorescence par hybridation *in situ* et de marquage immuno-histochimique d'EGFR dans des échantillons de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou
- Figure 9 : Schématisation des stratégies d'inhibition des récepteurs HER
- Figure 10 : Signalisation activée par EGFR dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou
- Figure 11 : Altérations fréquentes touchant les voies de signalisation activées par EGFR dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou
- Figure 12 : Rôle de PTEN dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire
- Figure 13 : Protéines impliquées dans la régulation (A) et rôle de PTEN (B) dans la progression dans le cycle cellulaire
- Figure 14 : Lien entre PTEN et le complexe mTORC1 via TSC 1 et 2
- Figure 15 : Schématisation de l'association de PTEN au complexe d'adhésion cellulaire  $\beta$ -caténine/E-cadhérine
- Figure 16 : Schématisation du rôle de PTEN dans sa localisation nucléaire
- Figure 17 : Marquage et quantification de la densité microvasculaire de tumeurs cérébrales
- Figure 18 : Illustration du mécanisme de résistance au trastuzumab dans les carcinomes mammaires déficients pour l'expression de PTEN
- Figure 19 : Illustration du phénomène d'internalisation et de la translocation nucléaire d'EGFR suite

à la liaison avec le cetuximab

Figure 20 : Structure schématique des anticorps thérapeutiques

Figure 21 : Représentation des phases précoces de l'angiogenèse

Figure 22 : Image du réseau vasculaire normal et tumoral prise en microscopie de fluorescence

## **Travaux personnels :**

### **Partie I : Effets antiprolifératifs du cetuximab sur la lignée cellulaire Cal 27.....p47**

Figure I.1 : Recherche des mutations activatrices de *KRAS* dans les lignées cellulaires de carcinome épidermoïde de la tête et du cou

Figure I.2 : Expression des protéines des voies de signalisation activées par EGFR dans les cellules Cal 27, évaluée par western blot

Figure I.3 : Mesure semi- quantitative de l'effet du cetuximab sur pEGFR, pAKT, pERK par Bioplex Protein Array

Figure I.4 : Histogrammes représentatifs de la distribution des cellules Cal 27 dans le cycle cellulaire

Figure I.5 : Effet du cetuximab et de l'EGF sur la viabilité et le nombre de cellules Cal 27

### **Partie II : Rôle de PTEN dans la croissance cellulaire et la réponse au cetuximab des cellules Cal 27.....p62**

Figure II.1 : Schématisation et composition en oligonucléotides de la structure de la séquence codant pour le shRNA dirigé contre PTEN

Figure II.2 : Carte du plasmide RNA-Ready pSIREN-RetroQ

Figure II.3 : Représentation schématique des mécanismes d'action de U0126 et de la perifosine

Figure II.4 : Expression de PTEN dans les cellules Cal 27 et Cal 33, 48h après transfection transitoire avec les séquences n°2, 4, 5

Figure II.5 : Cinétique de l'inhibition d'expression de PTEN dans les cellules Cal 27 et Cal 33

Figure II.6 : Schéma de la procédure expérimentale

Figure II.7 : Mesure par BPA des niveaux d'expression de pEGFR, pAKT et pERK ½ dans les Cal 27 transfectées exprimés en unités de fluorescence

Figure II.8 : Expression de PTEN et des protéines activées par EGFR dans les cellules Cal 27 transfectées par siRNA

Figure II.9 : Effet du cetuximab et de l'inhibition de l'expression de PTEN sur la viabilité et la prolifération cellulaire des cellules Cal 27 transfectées de façon transitoire

Figure II.10 : Expression de la protéine PTEN par les différents clones obtenus avec les deux agents de transfection ICAfectine (ICA) ou Jet-PEI (PEI) et après sélection à la puromycine

Figure II.11 : Morphologie des lignées cellulaires Cal 27 modifiées par transfection stable

Figure II.12 : Effet de l'inhibition de la protéine PTEN sur la viabilité et la prolifération cellulaire dans les différentes lignées de cellules Cal 27 cultivées pendant 10 jours

Figure II.13 : Expression de pERK ½ dans les cellules Cal 27 et Cal 27 transfectées par shRNA

Figure II.14 : Mesure par BPA des niveaux d'expression de pEGFR et pAKT après traitement par des inhibiteurs spécifiques

Figure II.15 : Effet du cetuximab sur la viabilité des différentes lignées cellulaires Cal 27 transfectées par shRNA

Figure II.16 : Effets des inhibiteurs U0126 (inhibiteur de MEK1/2), de perifosine (inhibiteur de pAKT) et de leur association avec le cetuximab sur la viabilité des cellules Cal 27

Figure II.17 : Croissance tumorale des différentes lignées cellulaires injectées en situation sous-cutanée chez les souris nude

Figure II.18 : Schéma représentatif de l'action de GSK3 dans le contrôle de la synthèse de glycogène.

**Partie 3 : Etude de l'angiogenèse tumorale induite par les cellules Cal 27 : impact du silencing de PTEN et cetuximab.....p86**

Figure III.1 : Schéma de la procédure expérimentale

Figure III.2 : Membranes du kit Proteome Profiler Array traitées au moyen du logiciel du GelDoc 2000

Figure III.3 : Images d'anneaux aortiques traitées avec le logiciel AngioQuant montrant le réseau vasculaire permettant de calculer les paramètres quantitatifs

Figure III.4 : Images par microscopie de fluorescence d'anneaux aortiques après 6 jours de culture dans les différents milieux conditionnés

Figure I.5 : Images par microscopie à la lumière transmise d'anneaux aortiques après 6 jours de culture dans les différents milieux conditionnés

Figure III.6 : Image de deux anneaux aortiques à 5 jours de cultures dans les milieux conditionnés par les cellules Cal 27 en microscopie à contraste de phase

Figure III.7 : Variation des paramètres quantitatifs caractéristiques du bourgeonnement aortique

Figure III.8 : Image de deux anneaux aortiques à 5 jours de cultures dans les milieux conditionnés par les cellules siPTEN en microscopie à contraste de phase.

Figure III.9 : Concentrations de VEGF dans les différents milieux conditionnés

Figure III.10 : Variation des facteurs impliqués dans la régularisation de l'angiogenèse détectés dans

les différents milieux conditionnés

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

4E-BP1: eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1  
5-FU : 5-Fluorouracil  
ADCC : antibody dependent cellular toxicity  
AFA : alcool formolé acétique  
AKT : protéine kinase B  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
ATU : Autorisation Temporaire d'utilisation  
BPA : Bioplex Protein Assay  
Cellules NK : cellules "Natural Killers"  
CT: Chimiothérapie  
DAG: Diacylglycerol  
DNA-PK : DNA-protein kinase  
DMSO : dimethylsulfoxyde  
EDTA: acide éthylène diamine tetra acétique  
EGF: epidermal growth factor  
EGFR: epidermal growth factor receptor  
ERK: Extracellular signal-regulated kinases  
FACS : fluorescence activated cell sorter  
FAK: Focal adhesion kinase  
FGF: Fibroblast growth factor  
FISH: Fluorescent *in situ* hybridization  
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor  
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2  
HDR : Homologous recombination-Directed Repairs  
HER: Human Epidermal Growth Factor Receptor  
HGF: Hepatocyte growthfactor  
HIF: Hypoxia Inducible Factor  
HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma  
HPV: human papillomavirus  
ICA: ICAfectin  
IGF1R : Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Receptor

IgG : Immunoglobuline G  
IL- : Interleukine-  
iNOS : inducible Nitric Oxyde Synthase  
PEI: polyethyleneimine  
mAb : monoclonal Antibody  
MAPK : Mitogen-activated protein kinases  
MEC: Matrice extra-cellulaire  
MEK : MAP kinase kinase  
MMAC1 : most mutated anti cancers 1  
MMP : matrix metalloprotease  
mTOR : mammalian target of rapamycin  
MTT : methyl thiazol tetrazolium  
NaCl : chlorure de sodium  
NTr : cellules non transfectées  
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis  
pAKT : AKT phosphorylé  
PARP : poly ADP-ribose polymerase  
PBS : phosphate buffer saline  
PCR-RFLP : Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism  
PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor  
pEGFR: EGFR phosphorylé  
pERK: ERK phosphorylé  
pH: potential Hydrogène  
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase  
PLC: phospholipase C  
pMEK : MEK phosphorylé  
PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride  
PTEN: phosphatase and tensin homolog  
RISC: RNA induced silencing complex  
RNase: ribonuclease  
RT: radiothérapie  
SDS: sodium dodecyl sulfonate  
SH2: Src homology 2

shRNA: short hairpin RNA

SiRNA: small interference RNA

STAT : signal transduction and activator of transcription

SVF: serum de veau foetal

TBS-Tween (TBST) : tris-buffered saline tween

TGF- $\alpha$ : transforming growth factor

TIMP-1: tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1

TKI: tyrosine kinase inhibitor

TSC : Tuberous sclerosis complex

VADS : voies aérodigestives supérieures

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VPF : vascular permeability factor



# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Partie I : Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou**

### 1- La réalité clinique : un tableau complexe

#### 1- 1) Données épidémiologiques et carcinogénèse

Les cancers de la tête et du cou représentaient en 2008 la septième cause de décès par cancer dans le monde (J. Ferlay, [GLOBOCAN 2008](#)). En terme d'incidence, la France se place tristement en tête des pays pour ce type de cancers, qui cause 2,7% de l'ensemble des décès par cancer (données recueillies en 2005, rapportée par l'Institut National du Cancer dans « La situation du Cancer en France en 2009 »).

Les cancers de la tête et du cou incluent des tumeurs malignes survenant à différents sites anatomiques des Voies Aéro-digestives Supérieures (VADS) dont le plus fréquent est la cavité buccale (44% des tumeurs des VADS, suivie de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx). Le type histologique épidermoïde représente 90% des carcinomes des VADS ([Ragin CCR et al, 2007](#)).

Les principaux facteurs de risque des tumeurs des VADS sont bien connus. La consommation de tabac est reconnue comme tel par le Centre International de Recherche sur le Cancer (*CIRC-IARC International Agency for Research on Cancer*) depuis 1986 et la consommation d'alcool depuis 1988. En tant que premiers tissus exposés, les voies aéro-digestives supérieures subissent des lésions par brûlures chroniques lorsque le tabac est fumé. Par ailleurs, les éléments cancérigènes propres au tabac (nitrosamines, benzopyrènes,...) et à l'alcool (ethanol, esters de phorbols,...) agissent localement et directement sur les cellules épithéliales. Ainsi, les composants cancérigènes du tabac peuvent-ils notamment endommager l'ADN, diminuant les mécanismes de réparations et favorisant les altérations génétiques ([Johnson N et al, 2001](#)). L'éthanol quant à lui provoque des zones d'hyperprolifération cellulaire en augmentant la division et la régénération cellulaire ([Salaspuro MP et al, 2003](#)).

Toutefois, environ 25% des cas de tumeurs de la cavité orale surviennent chez des patients n'ayant aucun passé de tabagisme et de consommation d'alcool ([Ragin CCR et al, 2007](#)). Il est tentant de rapprocher cette donnée avec un facteur récemment reconnu comme facteur de risque indépendant: l'infection par le Papilloma Virus Humain (HPV) dont la prévalence dans les localisations oropharyngées est de 20 à 30% ([Kreimer AR et al, 2005](#)). Le risque accru de survenue d'une tumeur oropharyngée suite à l'infection par HPV provient du potentiel de transformation et de promotion de la croissance cellulaire que confère le virus. Le génome du Papilloma Virus Humain code pour

les protéines précoces E1 à E7 (pour « early open reading frame ») dont trois sont reconnues oncogéniques: E5, E6 et E7. Elles sont en effet en mesure d'inhiber les fonctions de suppresseurs de tumeur de p53, pRb et de diminuer la synthèse de la cycline D1, qui contrôle la progression du cycle cellulaire de la phase G<sub>1</sub> à la phase S (Ragin CCR et al, 2007).

La nature moléculaire de la carcinogenèse des tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou est associée au concept de champ de cancérisation, avancé par D.P. Slaughter en 1953. Ce terme définit le caractère diffus et multiple des lésions précancéreuses qui se forment le long des voies aéro-digestives supérieures puis qui constituent des zones où les altérations génétiques peuvent s'accumuler (Ridge JA, 2007). Un modèle plus détaillé est proposé depuis 2005 par Braakhuis et collaborateurs : la phase initiale du processus est la formation d'une unité clonale caractérisée par des altérations génétiques (Braakhuis et al, 2005). Au cours du temps, sous l'effet de molécules cancérogènes ou par acquisition de capacités prolifératives, cette unité clonale s'étend et forme ainsi le champ de cancérisation, pouvant atteindre plus de 10 cm de diamètre. Une illustration du modèle est présentée dans la figure 1.

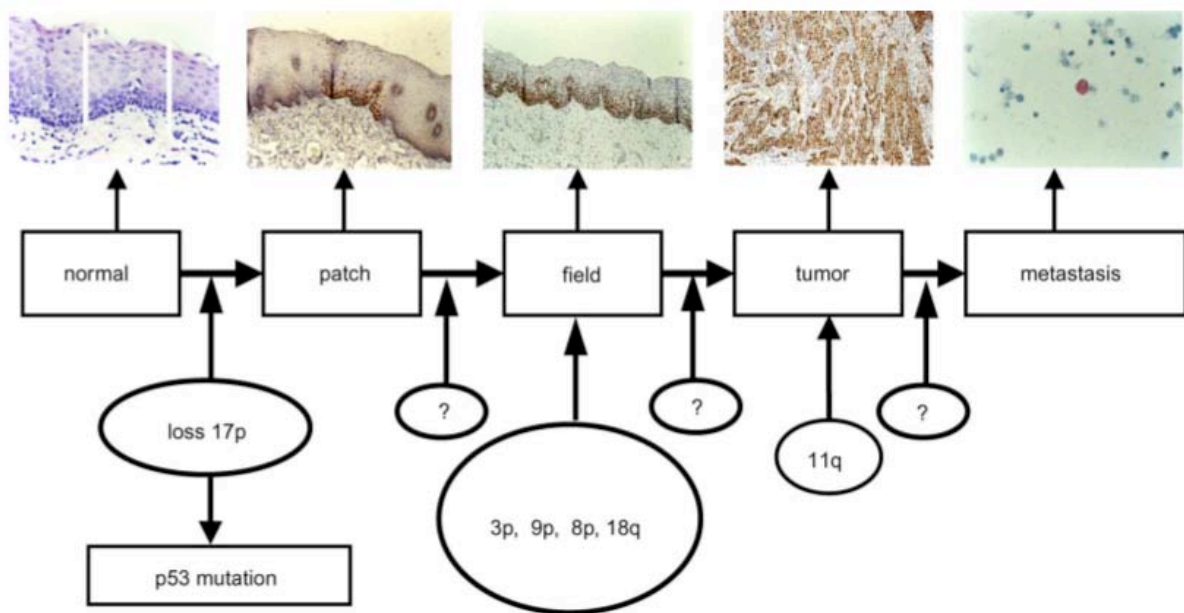


Figure 1 : Modèle de progression génétique de la tumorigenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Le « patch » est une zone en une unité clonale de cellules mutées (entre autres p53). L'étape suivante est l'expansion de cellules comportant des altérations génétiques (activation d'oncogènes, perte de suppresseur de tumeurs...) qui constituent le « champ de cancérisation » à partir duquel va se former la tumeur. Selon Braakhuis et collègues (2005).

D'un point de vue clinique, un tel modèle de carcinogenèse implique que le champ de cancérisation existe toujours suite à l'exérèse d'une tumeur primaire, qui en émane. Ceci se manifeste d'ailleurs par la récurrence très fréquente des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, qui se développe dans 20 à 30% des cas de tumeurs de grades III et IV dites avancées, et ce, malgré un contrôle local des marges chirurgicales évaluées par examen histologique après résection. Ce phénomène de récurrence explique l'importante mortalité induite par les tumeurs des VADS, suite auxquelles le taux relatif de survie à 5 ans des patients est inférieur à 50%.

Tandis que pour le cancer du sein la mortalité a diminué (en moyenne annuelle) de 0,4% entre 1980 et 2000, et de 1,3% entre 2000 et 2005 ; selon Cripps et collègues, le taux relatif de survie à 5 ans n'a pas évolué en plus de 30 ans pour les patients atteints de cancer des VADS (Cripps et al, 2010). Nonobstant le diagnostic tardif de ces pathologies, pour lesquelles deux-tiers des patients sont diagnostiqués en stade III et IV (voir classification TNM en annexe), un tel constat souligne la nécessité d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients. Du fait d'un processus de carcinogenèse très particulier, le défi thérapeutique à relever pour ce type tumoral est dans un premier temps un contrôle locorégional plus important afin de diminuer les risques de récurrences. Pour ce faire, la chirurgie et/ou la radiothérapie, sont associées à la chimiothérapie. Parmi les agents anti-cancéreux administrés de façon adjuvantes, la nouvelle génération de molécules, dite des thérapies ciblées, offre des perspectives encourageantes.

## 1- 2) Prise en charge thérapeutique : état des lieux et futures directions

### a. Etat des lieux

Le caractère diffus et hétérogène des tumeurs des VADS rend difficile leur diagnostic, qui doit faire état de la localisation précise, d'une description des lésions (extension, limites, morphologie...) et des aires ganglionnaires éventuelles (Figure 2 et classification TNM en annexe). Palpation, échographie, examen radiologique, imagerie par résonance magnétique ou scanner (systématique pour les tumeurs de grade III et IV) sont les outils diagnostics utilisés pour permettre d'établir ces paramètres (Référentiels de prise en charge des cancers en région centre : tumeurs cervico-faciales – mars 2009). Ils entrent dans le bilan pré-thérapeutique ou bilan d'extension.

Lèvres et cavité buccale

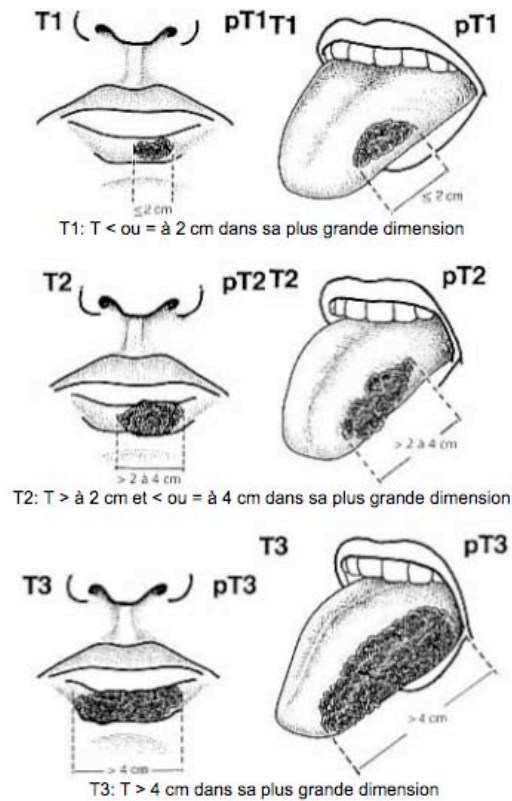


Figure 2 : Illustration de la classification TNM des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou pour les lésions de la lèvre et de la langue. (Atlas UICC, Springer Paris, 2005). Voir « Classification TNM » en annexe.

Suite à cet examen, le choix entre la chirurgie et la radiothérapie ou leur association est fait en tenant compte du site anatomique de la tumeur, du stade d'extension et de l'histologie. L'état de santé général du patient est un élément déterminant dans le choix de la stratégie thérapeutique, les patients sont qualifiés comme « jeunes, vulnérables et fragiles ». Par ailleurs, un curage ganglionnaire est pratiqué par nécessité ou par précaution ([Référentiels de prise en charge des cancers tête et cou ONCOPACA - juillet 2008](#)).

Pour les tumeurs classées en grades I et II, la chirurgie et la radiothérapie ont une efficacité similaire et donnent de bons résultats. Le taux de guérison est de 70% pour les tumeurs de grade II et 90% pour les tumeurs de grade I ([Haddad RI et al, 2008](#)). Pour les tumeurs avancées, l'association de la chirurgie avec la radiothérapie est complétée par la chimiothérapie pour tenter d'améliorer les résultats thérapeutiques. C'est pour ce type de tumeurs que les efforts pour améliorer les résultats cliniques doivent se concentrer.

En situation curative, l'ajout de la chimiothérapie a pour but d'améliorer le contrôle local des tumeurs et la survie des patients. Les agents anti-cancéreux qui peuvent être utilisés dans ce cadre pour le traitement des tumeurs des VADS sont le platine, le 5-fluoro uracile (5-FU), les taxanes et le cetuximab.

La difficulté majeure de la prise en charge des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou provient de la diversité anatomique et de la nature de l'extension qu'ils présentent au moment du diagnostic. Le choix d'un protocole thérapeutique est alors déterminé par l'état de santé du patient et est toujours orienté vers une préservation maximale de la qualité de vie des patients. La vue d'ensemble présentée ici est fournie par l'analyse de plusieurs référentiels cliniques. Outre l'hétérogénéité des tumeurs des VADS, on peut noter une hétérogénéité dans les recommandations faites aux médecins oncologues via ces référentiels. Il n'y a donc pas de prise en charge thérapeutique type mais une analyse précise de nombreux paramètres qui motiveront l'application d'un protocole thérapeutique, avec le souci constant d'une protection de la qualité de vie du patient.

En 2006, une méta-analyse, recueillant les résultats de 32 essais cliniques (soit 10225 patients dont la majorité avaient des tumeurs de grade III et IV) comportant un bras radiothérapie seule et un bras radiothérapie associée, rapporte une prolongation de la survie globale dans le bras radio-chimiothérapie. Avec, plus particulièrement, un bénéfice de 24 mois pour l'association avec le 5-FU et 16,8 mois pour l'association avec les agents à base de platine ([Budach W et al, 2006](#)).

Néanmoins, ces chimiothérapies classiques ont de nombreux effets indésirables qui ont un impact dramatique sur la qualité de vie des patients. Notamment, immédiatement après administration des sels de platine, des nausées et vomissements importants peuvent apparaître et plus tardivement des thrombopénies et troubles neurologiques. Le 5-FU peut induire une toxicité cardiaque (risques augmentés d'angor et d'infarctus du myocarde) d'autant plus difficile à gérer lorsque les patients sont âgés (et fumeurs). Une leuco-neutropénie, une alopecie, une anémie sont des effets qui peuvent être observés suite à des thérapies à base de taxanes.

Dans le cadre des thérapies des tumeurs des VADS, il est capital de considérer l'aspect handicapant des moyens thérapeutiques mis en œuvre. Dans la recherche d'amélioration des résultats, préserver la qualité de vie des patients est un enjeu majeur. En effet, ils se voient administrer des traitements invasifs. La radiothérapie a des conséquences sévères, y compris à long terme : douleurs aiguës, mucosites qui peuvent d'ailleurs obliger l'interruption de la radiothérapie et favoriser une reprise tumorale, xerostomie persistant plusieurs mois voire des années, terrains fragilisés conduisant à des infections buccales... ([Bornstein M et al, 2001](#)). Les patients qui subissent une radio-chimiothérapie,

souffrent des toxicités additionnées des rayons et des chimiothérapies (cités plus haut).

C'est dans ce contexte que le cetuximab a fait son apparition dans les années 2000, notamment avec l'essai clinique mené par l'équipe de Bonner ([Bonner et al, 2006](#)) démontrant une amélioration du contrôle régional tumoral pour des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou avancés, ainsi qu'une prolongation de la survie sans progression et de la survie globale des patients sous cetuximab en association à la radiothérapie. L'essai clinique rapporte ainsi, sur une cohorte de 424 patients dont les tumeurs sont de grades III et IV (inclus dans un bras radiothérapie exclusive et un bras cetuximab + radiothérapie), que la durée médiane du contrôle loco-régional est de 24,4 mois dans le bras cetuximab + radiothérapie contre 14,9 dans le bras radiothérapie seule. La survie globale quant à elle, pour un suivi médian de 54 mois au total, est de 49 mois avec l'ajout de cetuximab contre 29,3 pour les patients n'ayant reçu que la radiothérapie. Dans cette étude, la survie sans progression, paramètre important pour juger de l'efficacité d'un traitement, est de 12,4 mois contre 17,1 avec le cetuximab.

Le travail de l'équipe de James Bonner a été suivi de la mise sur le marché du cetuximab en association avec la radiothérapie, notamment pour l'amélioration apportée sur le contrôle locorégional des tumeurs avancée (grades III et IV). Par ailleurs, le cetuximab représente une avancée importante en terme de qualité de vie pour les patients. En effet, les résultats de l'étude menée par Bonner suggèrent une meilleure préservation laryngée. L'effet indésirable majeur du cetuximab est une éruption cutanée plus ou moins étendue selon les patients, mais qui semble corrélée à l'efficacité de la molécule. Ce que confirme Bonner tout récemment, en publiant en janvier 2010, le suivi à 5 ans de cette étude. L'analyse rapporte que le régime cetuximab + radiothérapie offre une augmentation de 9% de la survie globale ([Bonner JA et al, 2010](#)). Cet article montre que la sévérité de l'éruption cutanée acnéiforme, qui par ailleurs disparaît en général une semaine après l'arrêt du traitement, est corrélée à la survie globale (qui est 2,5 fois plus élevée pour les patients qui ont développé une éruption acnéiforme sévère).

Ainsi, l'ajout de la chimiothérapie, qui peut potentialiser l'effet de la radiothérapie, a pour objectif d'augmenter le contrôle local en marge de la lésion d'origine. Mais des échecs à ces traitements peuvent survenir : chimiorésistance (adaptation génétique de la tumeur, phénotype Multi Drug Resistance, pharmacogénomique...) ou radiorésistance (systèmes de réparation de l'ADN, mutations de gènes suppresseurs de tumeurs, hypoxie...) sont des phénomènes fréquemment observés dans les tissus tumoraux. Les recours cliniques, le cas échéant, se trouvent dans l'augmentation des doses, dans la fréquence d'administration ou du nombre de cures. Mais ces

modifications de protocole favorisent l'émergence de clones plus agressifs au sein du tissu pathologique. Par ailleurs les effets indésirables de la chimiothérapie conventionnelle, additionnés à la toxicité de la radiothérapie, sont très lourds à supporter pour les patients.

Afin de contourner ces écueils, d'améliorer les résultats des traitements et conserver une qualité de vie des patients, de nouvelles approches sont en cours de développement.

#### b. Futures directions

En ce qui concerne les schémas thérapeutiques, des modifications du mode d'administration représentent une possibilité d'optimisation des résultats thérapeutiques.

Ainsi, la chimiothérapie concomitante à la radiothérapie est encore en essais cliniques à l'heure actuelle, de même que la chimiothérapie d'induction (Etude NCT00609284 et NCT01086826). Certaines études montrent une chute du taux de métastases distantes suite à la chimiothérapie d'induction à base de 5-FU et de platine, sans affecter la survie globale. Un essai clinique de phase II complète ces observations par l'étude de la chimiothérapie d'induction à base de docetaxel et cisplatine en plus de la chimiothérapie concomitante. Une réponse complète est observée pour près de la moitié des patients inclus dans l'étude (44%) et une réponse partielle pour 9% d'entre eux. Cependant le problème majeur lié à ce protocole de chimiothérapie est une importante toxicité, qui soulève la question de la faisabilité d'un tel schéma thérapeutique chez des patients souvent fragilisés par des expositions chroniques à l'alcool et au tabac ([Mencobi M et al, 2009](#)).

La chimiothérapie métronomique représente également une option dont les résultats sont variables d'un type tumoral à l'autre et d'une molécule utilisée à l'autre. Le principe de ce protocole de traitement introduit un changement de paradigme dans l'administration des agents anti-cancéreux, prônant l'utilisation de faibles doses continues et reste à documenter sur le plan clinique ([Scharovsky OG et al, 2009](#)). Appliquée au paclitaxel, la chimiothérapie métronomique a été étudiée en 2007 dans les tumeurs de la tête et du cou par une étude portant sur une petite cohorte, mais n'a pas fourni de résultats satisfaisants ([Caballero M et al, 2007](#)), d'autres investigations doivent être conduites pour conclure sur l'intérêt de la chimiothérapie métronomique dans les tumeurs de la tête et du cou.

D'autres stratégies thérapeutiques concernent les agents anti-cancéreux, la liste des nouvelles molécules ne cesse de s'allonger, depuis le début des années 2000, notamment dans la catégorie des thérapies ciblées. Ces drogues représentent donc autant de drogues pouvant potentiellement compléter ou remplacer les chimiothérapies classiques (Figure 3).



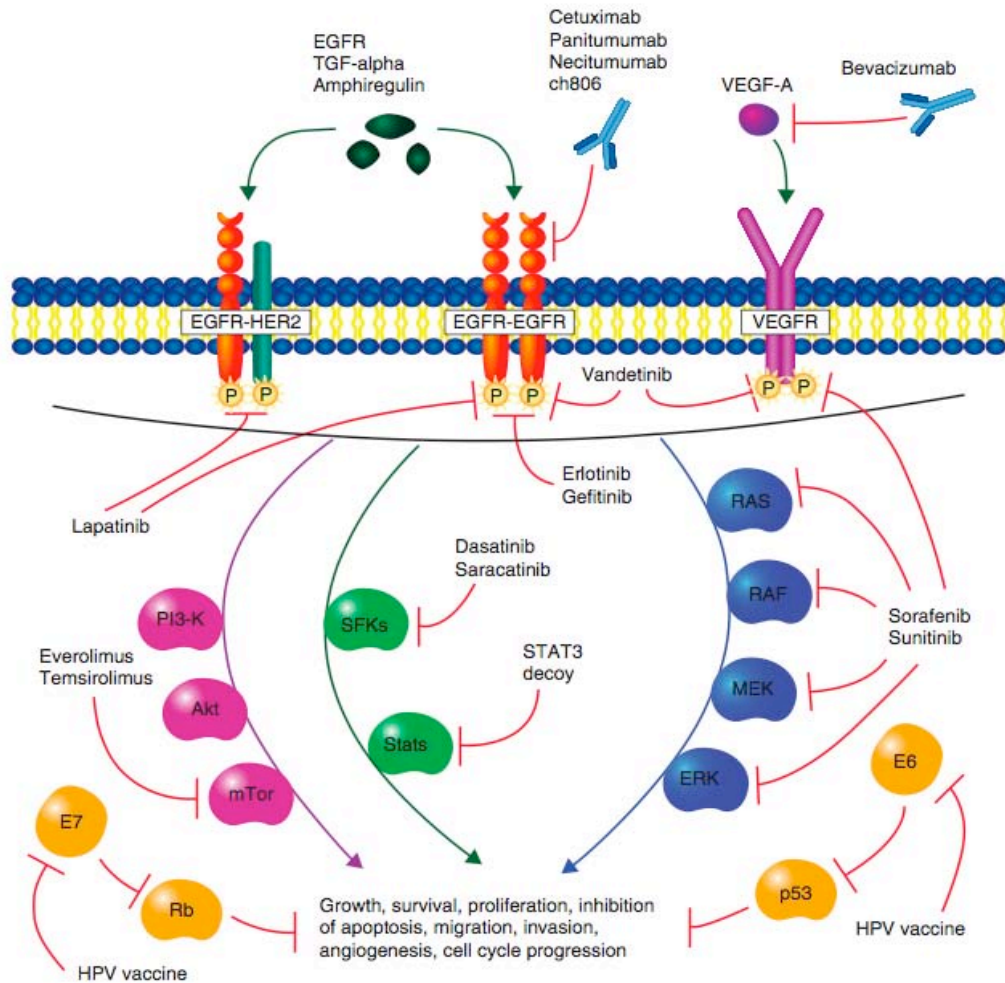


Figure 3 : Voies de signalisation ciblées dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Les agents présentés par Fung et Grandis dans ce schéma sont actuellement en essais cliniques (2010).

Le terme de thérapie ciblée désigne l'utilisation d'inhibiteurs qui sont spécifiquement dirigés contre le tissu tumoral. Il s'agit de composés chimiques ou biologiques élaborés pour abolir l'activité de diverses protéines-clés du développement oncogénique: récepteurs, kinases intracellulaires, facteurs de transcription (...), dont les fonction et expression anormalement élevées dans les tissus tumoraux en font des cibles de choix. L'objectif de ces thérapies ciblées est donc double : bloquer les processus de prolifération, de résistance à la mort cellulaire, d'angiogenèse (...), mais également viser spécifiquement le tissu tumoral en se basant sur la présence surnuméraire de la cible.

Contrairement aux chimiothérapies conventionnelles qui affectent des mécanismes cellulaires ubiquitaires (intercalants de l'ADN, poisons du fuseau, ...), les molécules de la classe des thérapies ciblées sont des agents anti-cancéreux qui affaibliront ou détruiront préférentiellement les cellules

tumorales suivant des mécanismes basés sur la biologie du cancer, qui est de mieux en mieux connue. Cette notion de ciblage de la tumeur est à l'origine d'une diminution considérable de la gravité et de l'intensité des effets indésirables.

Le tableau I résume les essais cliniques en cours avec les molécules de la classe des thérapies ciblées. Les cibles mentionnées et les mécanismes d'action de certains inhibiteurs seront plus amplement exposés dans la partie II de cette introduction.

Tableau I : Thérapies ciblées en essais dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

<b>Nom de la molécule</b>	<b>Cible</b>	<b>Type de molécule</b>	<b>Etude en cours</b>
Panitumumab	EGFR	mAb, IgG2 100% humaine	- Phase III dans les cancers récurrents et métastatiques : RT ± Panitumumab - Phase III dans les cancers localement avancés : RT + Cisplatine vs RT + Panitumumab
Zalutumumab	EGFR	mAb, IgG1 100% humaine	Phase III dans les cancers localement avancés : RT + Cisplatine vs RT + Cisplatine + Zalutumumab
Nimotuzumab	EGFR	mAb, IgG1 humanisée	Phase II dans les cancers localement avancés: essai CT/RT + Nimotuzumab
Gefitinib	EGFR	TKI	Phase II dans les cancers localement avancés inopérables : RT + Iressa
Erlotinib	EGFR	TKI	- Phase II dans les cancers localement avancés : RT + Docetaxel + Erlotinib - Phase II dans les cancers récurrents et métastatiques.
Lapatinib	EGFR et HER2	TKI	- Phase II dans les cancers localement avancés : RT + Lapatinib - Phase II dans les cancers récurrents et métastatiques
Vandetanib	EGFR et VEGFR	TKI	- Phase II dans les cancers localement avancés en association avec le docetaxel

Bevacizumab	VEGF	mAb, IgG1 humanisé	Phase II dans les cancers localement avancés et récurrents/métastatiques en association avec le cetuximab
Sorafenib	VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- $\beta$	TKI	Phase II en association avec le cetuximab dans les cancers localement avancés et récurrents/métastatiques
Sunitinib	VEGFR, PDGFR, Kit	TKI	- Phase II dans les cancers récurrents/métastatiques - Phase I : Sunitinib + Cetuximab + RT
Dasatinib	Src kinases	TKI	Phase II dans les cancers récurrents/métastatiques
Saracatinib	Src kinases	TKI	Phase II dans les cancers récurrents/métastatiques
Rad001	mTOR	TKI	Phase II dans les cancers localement avancés
Temsirolimus	mTOR	TKI	Phase II dans les cancers récurrents/métastatiques

Thérapies ciblées en cours d'évaluation pour les traitements des cancers de la tête et du cou dans des essais cliniques de phases II et III : Source <http://clinicaltrials.gov/>. RT : radiothérapie. CT : chimiothérapie. mAb : anticorps monoclonal. IgG : immunoglobuline G. TKI : inhibiteur de tyrosine kinase.

## 2- Le challenge des thérapies ciblées et rationnel scientifique

Les aberrations génétiques (amplification de gène codant pour des oncogènes, perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs...) et les dérégulations des voies de signalisation intracellulaires qui se produisent au sein des cellules tumorales sont fréquentes et nombreuses. Les cellules tumorales ont ainsi recours à diverses voies pour éviter l'apoptose, contourner l'inhibition d'un récepteur par un agent de thérapie ciblée ou pour modifier leur micro-environnement en faveur de l'angiogénèse. Ces divers mécanismes biologiques peuvent être à l'origine de phénomènes de résistance aux thérapies ciblées. Ainsi, l'utilisation de ce type de molécules crée plusieurs défis.

En particulier, il semble exister des sensibilités variables aux diverses thérapies ciblées, qui déterminent donc des sous-groupes de patients répondeurs ou non répondeurs. Ainsi, un grand nombre d'équipe de recherche concentrent leurs travaux sur l'identification de biomarqueurs prédictifs de l'efficacité des thérapies ciblées, dont l'usage généralisé ne fournit pas les résultats optimaux.

Il est tentant de penser que l'expression d'une grande quantité de cible pourrait assurer de l'efficacité des molécules des thérapies ciblées, cependant, de façon paradoxal, ce concept ne se vérifie pas dans la pratique. La biologie tumorale représente un ensemble complexe où les interactions moléculaires sont nombreuses. Aussi, l'identification de causes moléculaires de résistance aux thérapies ciblées pourrait permettre de caractériser a priori, les patients qui ne bénéficieront pas du traitement, afin d'éviter un échec thérapeutique. Par exemple : les mutations activatrices de *KRAS* dans le cancer colorectal métastatique ont été validées comme un marqueur de la non réponse au cetuximab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR.

L'identification de biomarqueurs est donc essentielle. Ils devraient, en plus de permettre de prédire l'efficacité des molécules de thérapies ciblées, indiquer si l'association à d'autres molécules est pertinente ou bien encore définir une période optimale pour le traitement (après résection pour empêcher le phénomène de rechute, de façon concomitante avec la radiothérapie lorsqu'il s'agit de radiosensibilisant,...).

Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, la surexpression du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor) a l'utilisation d'anti-EGFR, dont le cetuximab. Mais la réponse de ce type tumoral au cetuximab s'est avérée modeste ([Cohen EE, 2008](#)).

La 2<sup>nd</sup>e partie de cette introduction bibliographique s'appuiera sur les connaissances actuelles de la biologie des cancers, en particulier les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, et évoquera

quelques mécanismes de résistance aux thérapies ciblées connus dans d'autres types tumoraux, pour exposer les axes de recherche visant à l'identification de biomarqueurs potentiels.

## **Partie II : EGFR, ses voies de signalisation activées et les stratégies de blocage**

### 1- Le récepteur à l'EGF, la partie émergée de l'iceberg

#### 1- 1) A la surface, sa famille : les récepteurs HER

##### a. Portrait de famille

Les récepteurs HER (Human Epithelial Receptors) ou ErbB sont une famille qui compte quatre protéines transmembranaires à activité tyrosine kinase intracellulaire (sauf ErbB3) dans laquelle chaque membre a son rôle à jouer.

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ou HER1, est activé par de nombreux ligands autocrines et paracrines dont les six plus importants sont l'EGF, HB-EGF (heparin binding EGF), le TGF- $\alpha$  (Transforming growth factor), les amphirégulines (AR), l'héreguline et la betacelluline. Le TGF- $\alpha$  et les amphirégulines sont les principaux ligands impliqués dans les mécanismes autocrines (Hynes NE & Lane HA, 2005). La figure 4 expose le schéma de liaison des ligands aux membres de la famille HER. L'expression et le rôle de HER1 seront détaillés dans les paragraphes qui suivent.

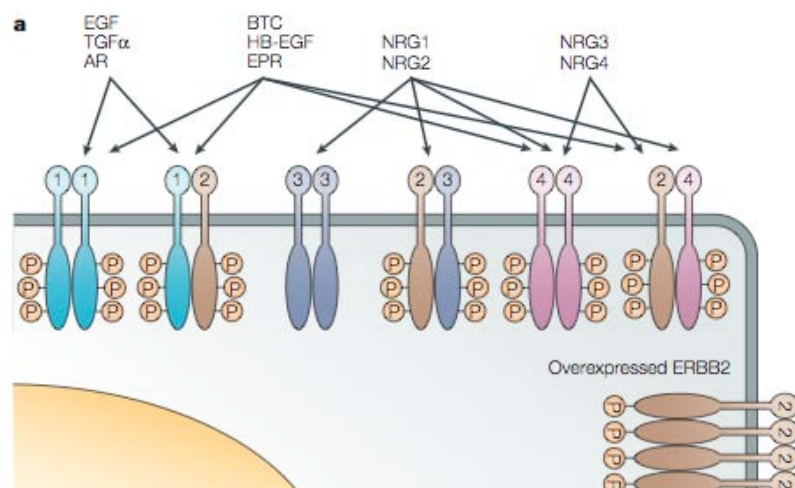


Figure 4 : Les récepteurs HER 1, 2, 3 et 4 et leurs ligands. AR : amphiréguline. BTC : bétacelluline. HB-EGF : heparin-binding EGF. EPR : épiréguline. NRG : neurégulines. Les tumeurs qui surexpriment HER2 montrent une homodimérisation et activation constitutive de celui-ci. Issu de Hynes NE et Lane HA (Nature reviews 2005).

En situation physiologique, la liaison des facteurs de croissance pour lesquels ils ont une affinité est suivie de leur dimérisation (hétéro ou homodimérisation) et provoque leur autophosphorylation. Cette dimérisation induit un changement de conformation qui se répercute au niveau intracellulaire et permet l'interaction avec des protéines adaptatrices. Leur activation déclenche une cascade de phosphorylations de protéines impliquées dans les voies de signalisation dépendantes des HER. Ces voies de signalisation intracellulaires sont les voies Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT, PLC $\gamma$  et STATs qui comptent des effecteurs biologiques cytoplasmiques et nucléaires (Yarden & Sliwkowski, 2001).

La figure 5 représente cette séquence d'évènement de façon schématique.

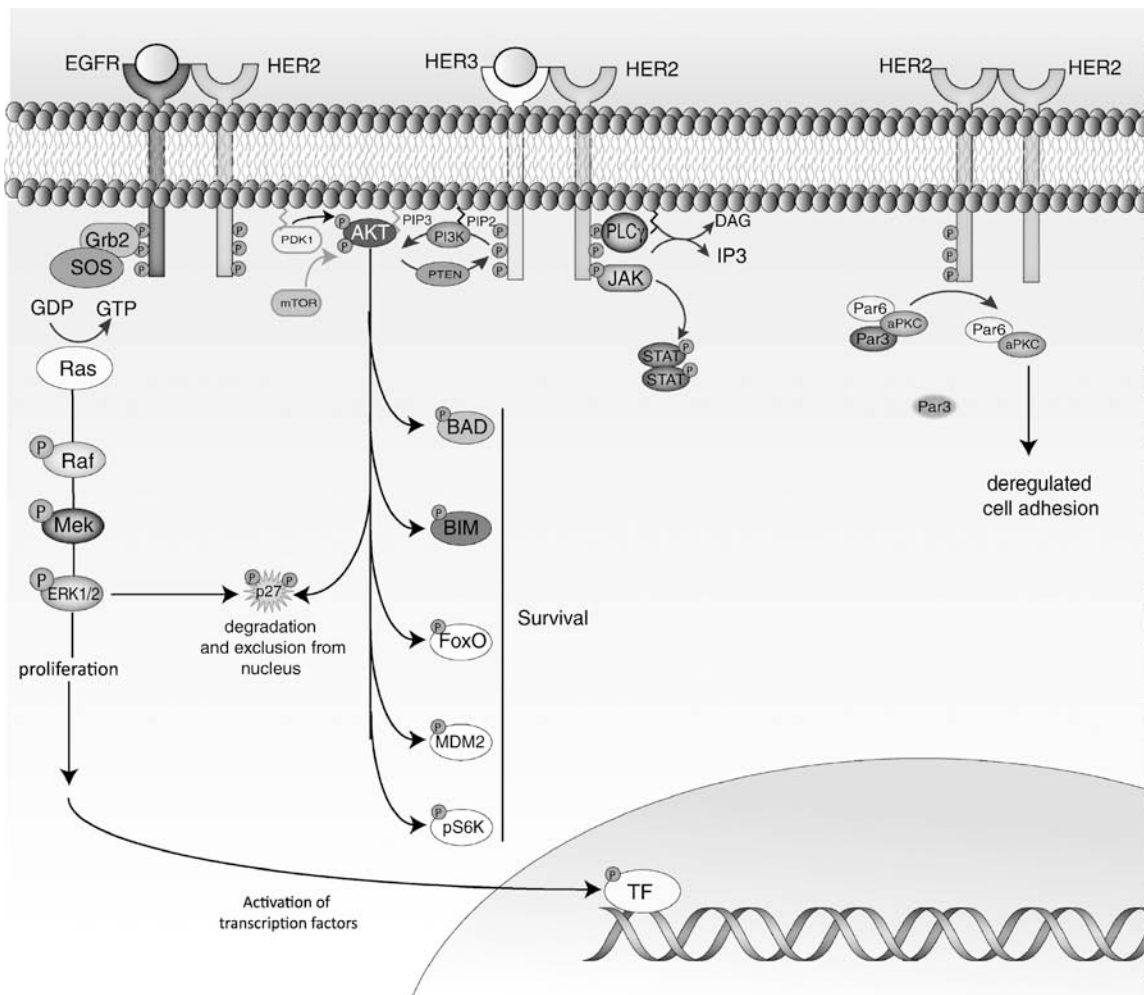


Figure 5 : Activation des voies de signalisation intracellulaires par les récepteurs de la famille HER. A gauche est représentée la voie des MAP kinases, au centre la voie PI3K/AKT et à droite l'activation de la PLC $\gamma$  et des STATs. Par Kruser TJ & Wheeler DL (2010)

Dans les cellules saines, ces différentes étapes sont régulées par des retro-contrôles négatifs et l'activité de phosphatases. Plus en amont, le premier niveau de régulation concerne le récepteur même puisqu'il est normalement soumis à une endocytose. L'intensité, la durée et la spécificité de la transduction du signal par les récepteurs tyrosine kinase peuvent en effet être régulées négativement par l'endocytose induite par le ligand. L'internalisation clathrine-dépendante provoque une ubiquitination du récepteur qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Huang F et al, 2006).

HER2 n'a pas de ligands propres connus, il ne peut donc pas initier de signalisation intracellulaire induite par stimulation (Britten CD, 2004). Mais il est surtout décrit pour son rôle de pilier dans le réseau créé par les récepteurs HER, leurs ligands et les voies de signalisation qu'ils activent car il est le partenaire préférentiel des autres récepteurs de la famille (Bubliil & Yarden, 2007). En revanche, il a été montré que présent en forte concentration, il peut s'autoactiver suite à une homodimérisation.

Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, HER2 serait surexprimé dans 20 à 40% des cas. Mais l'amplification du gène codant pour HER2 n'est trouvée que dans 5 à 10% des cas (Bei R et al, 2004). En 2007, une étude portant sur près de 90 échantillons de tumeurs des VADS suggère une valeur pronostique de HER2. Dans ce cadre, la surexpression de HER2 est corrélée à une diminution de la survie sans progression (Cavalot A et al, 2007). Ce résultat doit toutefois être considéré prudemment ; en effet pour une population de patients différente, la surexpression de HER2 a au contraire été associée à une amélioration de la survie (Tse GM et al, 2009). Aux vues de ces résultats contradictoires, il convient d'être attentif au sous-groupe de patients concernés (origine ethnique, grades et sites anatomiques) pour conclure sur l'impact de la surexpression de HER2 dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

Par ailleurs ces travaux ont été menés au moyen d'une technique d'immuno-histochimie. Bien que communément utilisée pour l'évaluation du niveau d'expression de ce type de marqueur, cette méthode semi quantitative peut être soumise à une qualité variable des anticorps utilisés ou une absence de standardisation dans les protocoles expérimentaux. Cependant, l'amplification du gène codant pour HER2 ne corrélant pas à la surexpression de la protéine dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ; l'usage de la FISH (Fluorescent In Situ Hybridisation) pour évaluer le niveau d'expression de HER2 est exclue.

Si HER2 n'est pas actuellement identifié comme un marqueur indépendant dans les tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou, il n'en est pas moins un acteur de la progression tumorale en tant



que partenaire le plus fréquent dans les hétérodimères de cette famille de récepteurs.

HER3 peut lier l'heréguline, les neurégulines et les facteurs de différenciation neuronaux. La particularité de HER3 est qu'il est dépourvu d'activité tyrosine kinase intrinsèque (« kinase dead »), mais peut agir comme un amplificateur de l'activité de son partenaire de dimérisation notamment parce que sa structure intracellulaire contient plusieurs motifs pouvant interagir et activer la phosphatidylinositol-3-Kinase (Britten CD, 2004 - Voir figure 6). Outre la variabilité qu'introduit la technique d'immuno-histochimie elle-même, l'absence d'anticorps fiable dirigé contre cette protéine rend la quantification relative de HER3 problématique. Néanmoins, la surexpression de HER 3 est rapportée dans 20 à 80% des tumeurs cervico-faciales testées (Morgan S & Grandis J, 2009).

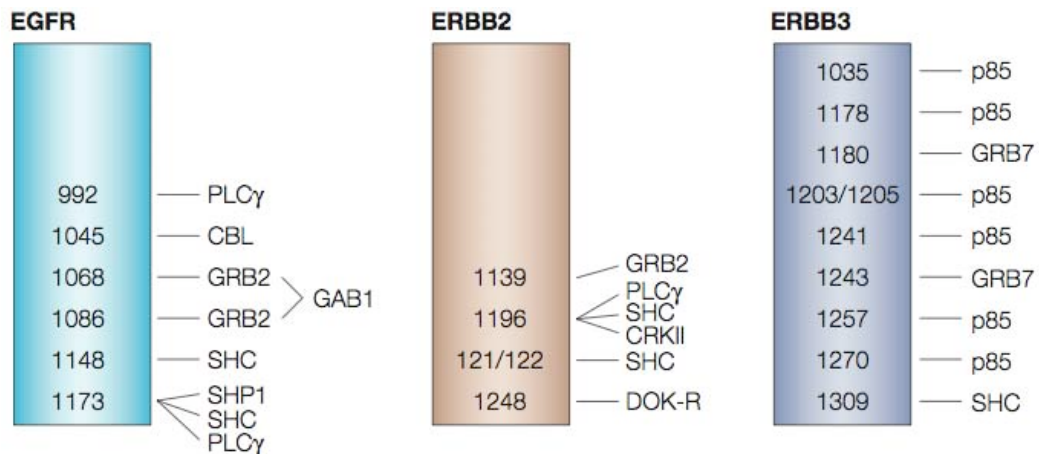


Figure 6 : Représentation schématique des principaux sites de phosphorylation des récepteurs HER et protéines associées. A noter : HER3 comporte 6 sites de couplage à l'unité p85 de la protéine PI3K, ce qui en fait le plus puissant activateur de la voie PI3K/AKT des récepteurs HER. (Hynes NE et Lane HA, 2005)

Enfin HER4 a pour ligands l'épiréguline, l'heréguline, les neurégulines et les facteurs de différenciation neu. HER4 est le membre de la famille dont le rôle dans les processus cancéreux est le moins bien connu. Son expression est mise en évidence dans 26 à 69% des cancers épidermoïdes de la tête et du cou mais il ne semble pas avoir de rôle significatif dans la progression tumoral, l'angiogenèse ou l'invasion (Morgan S & Grandis J, 2009). Le rôle de HER4 dans le cancer est en discussion. Sa contribution dans le développement neural, la plasticité neuronale et les systèmes nerveux est plus documentée ; avec semble-t-il, une implication dans la susceptibilité à la schizophrénie (Carmen Bichmeier et al, 2009, Chong VZ et al, 2008 ).

### b. Un travail en famille

Les récepteurs HER fonctionnent donc en duo. La façon dont les couples se constituent est déterminée par la nature du ligand et la proximité physique entre les partenaires au sein de la membrane plasmique. La dynamique de ce pas de deux est bien décrite.

Les interactions entre membres de la famille HER se créent grâce à des changements de conformation du domaine extracellulaire qui est formé de quatre sous-domaines. Les sous-domaines I et III reconnaissent les motifs spécifiques du ligand. Le sous-domaine II est le « bras de dimérisation » et le IV est également impliqué dans la dimérisation (Linggi B & Carpenter G, 2006). Le récepteur non lié à un ligand est dans une conformation dite « enchaînée » selon un mécanisme d'auto-inhibition. Cette conformation résulte d'interactions moléculaires entre les sous-domaines III et IV qui masquent le bras de dimérisation (Voir représentation figure 7). Le ligand lève cette conformation, en libérant le sous-domaine II, le rendant disponible pour une association. Il n'intervient pas dans la formation du dimère, sa liaison est nécessaire à la dimérisation mais pas suffisante (Bouyain S et al, 2005, Dawson JP et al, 2007).

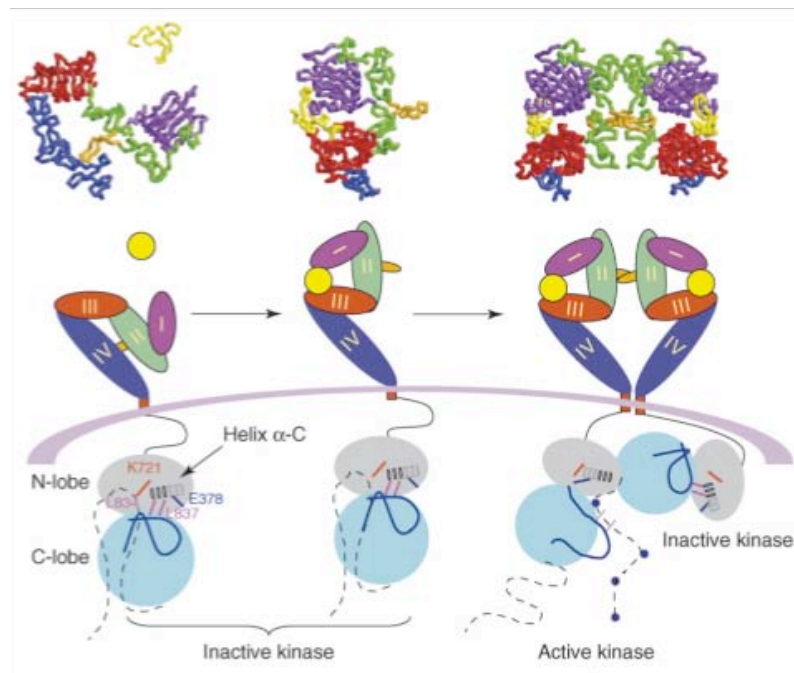


Figure 7 : Schématisation de la structure des récepteurs HER. Domaine I: ectodomaine (violet). Domaine II : bras de dimérisation (vert). Domaines III (rouge) et IV (bleu). Ligand : jaune. D'après Bulbil EM et Yarden Y (2007).

HER2 qui n'a pas de possibilité de lier de facteurs de croissance, présente en fait une conformation qui d'emblée ressemble à la conformation activée des autres récepteurs. Cet état, ainsi que sa colocalisation avec les autres membres de la famille HER, dans des radeaux lipidiques au sein de la membrane plasmique, peuvent expliquer sa position de partenaire le plus fréquent (Nagy P et al, 2002). Avant que de plus amples travaux de biochimie structurale ne viennent éclaircir certains points, il était tentant d'expliquer l'état d'activation constitutive des récepteurs parfois observée dans les cancers par des altérations dans la conformation enchaînée.

Le variant III de l'EGFR en est un exemple : le récepteur se trouve tronqué d'une partie de son domaine de liaison au ligand. Ce variant très fréquemment trouvé dans le cancer du poumon non à petites cellules, est présent dans environ 40% des tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou. Le variant III d'EGFR est activé de façon constitutive et induit une résistance au cisplatine et au cetuximab (Sok JC et al, 2006). Mais en 2007, le travail de Dawson et collègues a montré que des mutations dans les structures maintenant la conformation enchaînée ne suffisaient pas à produire une activation indépendante du ligand.

Les interactions entre membres de la famille HER, induites par la nature du ligand, sont déterminantes pour la cascade d'activations des protéines de la signalisation intracellulaire. A titre d'exemple, il a été montré que les homodimères d'EGFR pouvaient lier Shc, Cbl et Grb2 à leur domaine intracellulaire selon le site de phosphorylation, tandis qu'un hétérodimère EGFR-HER4 ne lie que Shc (Yarden & Sliwkowski, 2001 – Voir figure 6). De même, l'amplitude et la durée du signal intracellulaire activé par les dimères, sont conditionnées par la composition de ceux-ci. Elles sont notamment prolongées avec la présence de HER2, qui diminue le taux d'internalisation du complexe ligand-récepteur et favorise le recyclage (Britten CD, 2004), ou avec la présence de HER3 qui est l'activateur le plus efficace de la voie PI3K/AKT.

### c. Du milieu extracellulaire au noyau

De même que le domaine extracellulaire est dans une conformation auto-inhibée, le site catalytique du récepteur est dans une conformation inactive. Les rapprochements qui s'opèrent lors de la dimérisation induisent une augmentation de la concentration locale en récepteurs qui est à l'origine d'une activation des kinases et leur autophosphorylation (Zhang X et al, 2005).

L'autophosphorylation offre alors un site « d'amarrage » aux protéines contenant des domaines SH2 (Src Homology 2) ou PTB (Phospho-Tyrosine Binding). Il s'agit de protéines adaptatrices telles que Grb2 (Growth Factor Bound-protein 2) permettant d'activer la voie des MAPK ou d'activer des

enzymes permettant de générer des seconds messagers comme PI3K ou PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ). Ces associations physiques et les modifications de conformation sont l'événement qui déclenche une cascade de phosphorylation intracellulaire aboutissant à l'activation de facteurs de transcriptions comme cMyc ou Jun (Sweeney C et al, 2001).

En plus de ces voies de signalisation qui transmettront le signal extracellulaire de la membrane au noyau, un mécanisme de translocation nucléo-cytoplasmique des récepteurs HER a été mis en évidence. La localisation nucléaire d'EGFR a été démontrée dans différentes lignées cellulaires comme dans des échantillons de cancers oraux, de même que sa liaison au promoteur de la cycline D1 (Lin SY et al, 2001). Toutefois il semble que l'EGFR nucléaire requiert la présence de STAT3 pour cette liaison, stimulée par l'EGF *in vitro*. Les auteurs démontrent également l'activation de la transcription de la NO synthase inductible (iNOS) par EGFR nucléaire en présence de STAT3. Ce résultat est confirmé sur des échantillons de tumeurs du sein dont l'étude révèle une association de l'expression de iNOS à la diminution de la survie des patients dans cette cohorte (Lo HW et al, 2005). De la même façon, une corrélation du niveau élevé d'EGFR nucléaire avec un fort index de prolifération cellulaire et une absence de réponse clinique a été mise en évidence pour les tumeurs de la tête et du cou (Psyrrri A et al, 2005).

Les mécanismes d'action d'EGFR nucléaire sont encore méconnus, posant de nombreuses questions : la liaison à l'ADN est-elle directe, les complexes impliquant STAT3 sont-ils formés dans le cytoplasme et cotransloqués, comment a lieu l'activation de la transcription par ces complexes...

En revanche, une séquence d'adressage nucléaire a été caractérisée dans la protéine EGFR par Lo et collaborateurs. La même étude démontre l'interaction d'EGFR, via cette séquence, avec les protéines du complexe d'importation nucléaire et avance l'existence d'un système de transport nucléo-cytoplasmique d'EGFR impliquant l'endosome (Lo HW et al, 2006).

## 1- 2) EGFR, le chef de famille.

### a. Rôle et valeur pronostique dans les tumeurs de la tête et du cou

HER1, ou EGFR, est le mieux décrit des récepteurs de la famille, il a également un rôle déterminant dans les cancers car sa surexpression est commune dans les carcinomes de type épidermoïdes. Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, elle a été mise en évidence dès 1993, ainsi que la surexpression du TGF $\alpha$ , suggérant une boucle d'activation autocrine qui, de plus, a un impact négatif sur la survie des patients (Grandis J & Tweardy DJ, 1993).

L'équipe de Dassonville conforte ces données, en montrant sur une cohorte d'une centaine de patients, que la surexpression d'EGFR représente un facteur pronostic indépendant corrélant à une survie sans progression et globale écourtées (Dassonville O et al, 1993). Ce résultat est confirmé plus tard par plusieurs études dont une de plus grande ampleur (155 échantillons de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou de grade III et 113 de grade IV), qui classe, après marquage immuno histochimique et quantification automatisée, les patients en fonction de l'expression tumorale d'EGFR. Pour ceux dont elle était la plus élevée, la survie globale, la survie sans progression, mais également le contrôle loco-régional étaient tous trois significativement diminués (Ang KK et al, 2002, Hitt R et al, 2005). La fluorescence par hybridation *in situ* est une technique plus reproductible et qui peut être appliquée plus facilement à un usage clinique que l'immuno-histochimie (Images rapportées dans la figure 8). Or la valeur pronostique de l'amplification du gène *EGFR* mesurée par FISH a également été rapportée (Chung CH et al, 2006, Temam S et al, 2007).

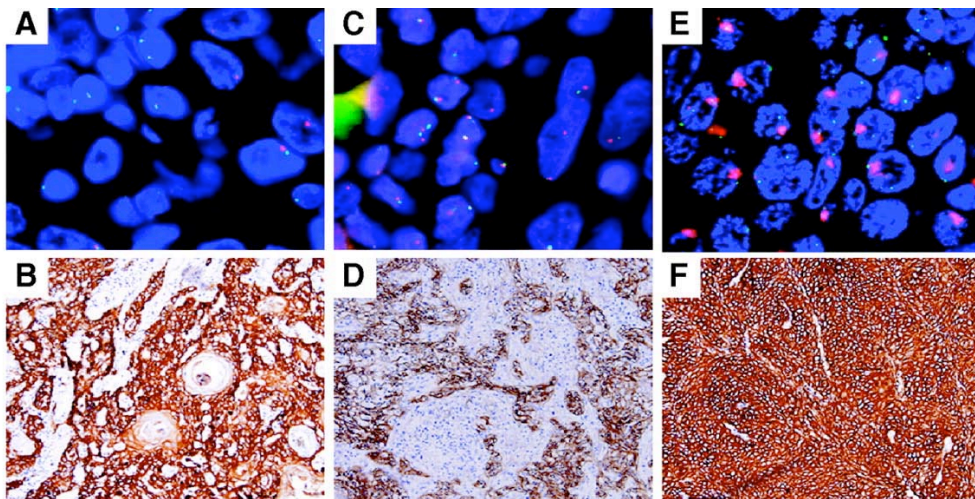


Figure 8 : Images de fluorescence par hybridation *in situ* et de marquage immuno-histochimique d'EGFR dans des échantillons de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. analyses of head

and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). La FISH montre (A) un nombre de copies d'*EGFR* réduit, (C) un nombre normal de copies d'*EGFR* et, (E) une amplification d'*EGFR*. (B, D, and F) Marquage de la protéine EGFR en IHC. Images réalisées et rapportées par Temam S et collaborateurs (2007).

La valeur pronostique d'une forte expression d'EGFR dans les tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou explique sans doute la valeur pronostique de la présence d'EGFR dans le noyau, qui n'est qu'une localisation subcellulaire d'un récepteur présent en grande quantité. Si ce résultat ne représente pas une réelle avancée par rapport aux études précédentes, l'étude approfondie du lien entre EGFR nucléaire et l'expression de la cycline D1 et de la production de monoxyde d'azote devraient apporter des informations intéressantes pour la compréhension des rôles biologiques d'EGFR. En effet, la surexpression de la cycline D1 - qui contrôle le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire - semble être un marqueur de radio-résistance (Milas L et al, 2002). Quant à l'induction d'expression de la NO synthase, elle pourrait jouer un rôle dans la promotion de l'angiogenèse et la progression tumorale du fait de la production de monoxyde d'azote, qui régule ces phénomènes (Jenkins DC et al 1995, Fukumura D et al, 1997).

De telles investigations sont d'autant plus pertinentes que le mauvais pronostic, en particulier un risque élevé de rechute, peut être lié au phénomène de radiorésistance qui est à l'origine d'un mauvais contrôle loco-régional. En effet, il a été montré *in vivo* qu'il existe une relation inverse entre la réponse à la radiothérapie et l'expression d'EGFR, du fait d'un faible taux d'apoptose induite par les radiations dans ces cellules. Par ailleurs, il est à noter qu'une phosphorylation du récepteur, qui évoque son activation, a pu être observée après radiothérapie au sein des tumeurs dont l'expression d'EGFR était la plus élevée (Akimoto T et al, 1999). De plus, des travaux suggèrent que l'expression d'EGFR est la cause de cette radio-résistance qui peut être levée par traitement avec un inhibiteur spécifique de l'EGFR : le C225 (Liang K et al, 2003, Milas L et al, 2004).

La chimiothérapie adjuvante dans le traitement des tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou a pour but de favoriser le contrôle local et de diminuer le risque de récurrence. La surexpression du récepteur à l'EGF est donc montrée comme un mauvais pronostic pour la survie sans progression des patients, mais a également une valeur prédictive pour l'inefficacité de la radiothérapie. Ces données font d'EGFR une cible de choix en vue d'améliorer la prise en charge thérapeutique des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, qui le surexpriment.

## b. Stratégies d'inhibition d'EGFR

Les agents anti-EGFR font partie des thérapies ciblées. Deux approches ont été développées pour inhiber de façon spécifique l'EGFR : l'utilisation d'agents biologiques, les anticorps monoclonaux et l'utilisation d'agents chimiques, les inhibiteurs de (l'activité) tyrosine kinase. Ces deux stratégies d'inhibition sont représentées dans la figure 9.

### - Les anticorps monoclonaux

Au milieu des années 90 sortent les premières publications qui testent l'efficacité de l'anticorps monoclonal M225, élaboré par ImClone (Etats-Unis) pour cibler le récepteur à l'EGF. Cet anticorps murin se lie de façon spécifique à la partie extracellulaire du récepteur et empêche la fixation des ligands naturels et la phosphorylation du récepteur. Il est cependant vite amélioré, remplacé par le C225, un anticorps chimérique (dont la partie humaine représente 60% de l'immunoglobuline). L'anticorps chimérique est en effet mis au point pour diminuer les réactions immunogènes en vue d'une application clinique. Par ailleurs le C225 a une affinité plus importante pour EGFR que son équivalent murin (Goldstein NI et al, 1995). Entre 1995 et 2000, les essais précliniques *in vitro* et *in vivo* se multiplient, démontrant l'effet antitumoral de la molécule dans différents types tumoraux. Le C225 acquiert sa dénomination commune internationale : cetuximab (nom commercial Erbitux®). Les mécanismes d'action du cetuximab sont multiples, ils seront détaillés plus loin.

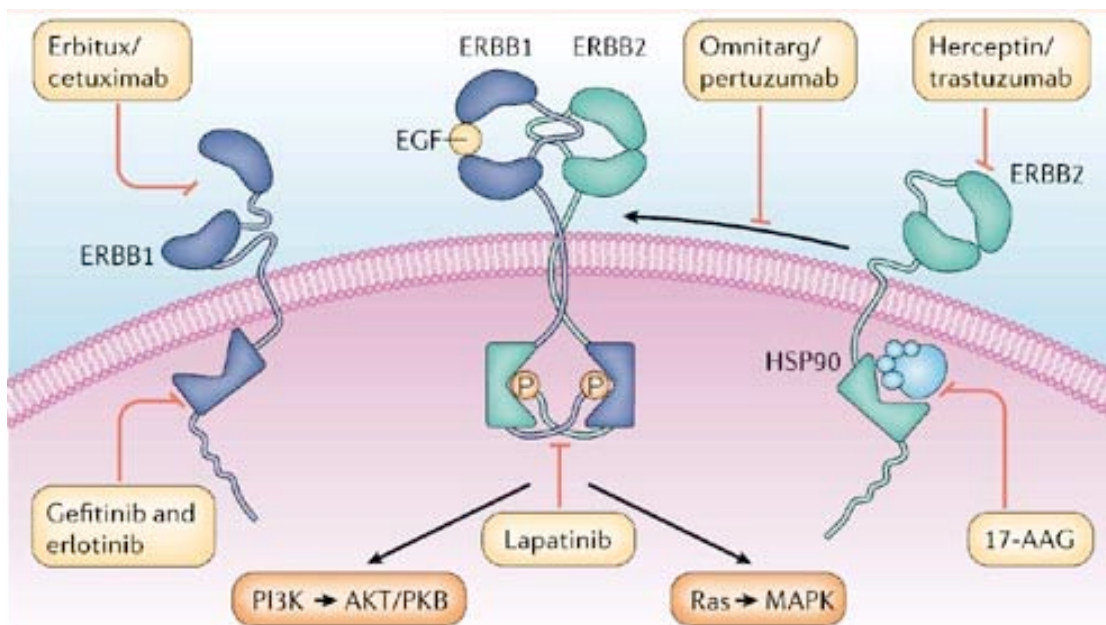


Figure 9 : Schématisation des stratégies d'inhibition des récepteurs HER. (Citri A et Yarden Y, 2006)

Depuis les enthousiasmants résultats précliniques et la mise sur le marché du cetuximab, d'autres anticorps monoclonaux ciblant EGFR sont apparus. L'industrie a notamment élaboré ces dernières années des anticorps monoclonaux 100% humanisés au moyen de procédés biologiques complexes (Phage-display, transgénèse). Parmi eux, deux anti-EGFR sont en pleine expansion : le panitumumab (une immunoglobuline de type 2 - Vectibix®, Amgen, Etats-Unis) et le zalutumumab (une immunoglobuline de type 1 – HuMax-EGFR®, GenMab, Pays-Bas).

En Europe, depuis décembre 2007, le panitumumab est indiqué en monothérapie pour les tumeurs colorectales métastatiques *KRAS* sauvages après échec des chimiothérapies standard. Le zalutumumab n'a pour l'instant qu'un statut équivalent de l'ATU aux Etats-Unis (« Fast track status »), pour le traitement des tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou en cas d'impasse thérapeutique. *In vitro et in vivo*, le zalutumumab montre une plus grande efficacité à inhiber la prolifération cellulaire que le panitumumab (Schneider-Merck T et al, 2009).

La preuve d'une réelle différence clinique entre panitumumab et cetuximab n'a pas été apportée. Tout récemment l'équipe de Hecht a analysé de façon rétrospective l'efficacité du panitumumab sur deux études de phase II liées, réunissant 388 patients souffrant de cancer colorectal métastatique (Hecht et al, 2010). Les auteurs montrent que les résultats en terme de survie sont identiques à ceux obtenus sous cetuximab, par ailleurs le statut *KRAS* a la même valeur prédictive. Enfin, le niveau d'expression d'EGFR, tout comme pour le cetuximab, n'est pas corrélé à l'efficacité du traitement. Dans ce contexte, les résultats des essais de phase III actuellement conduits sur les tumeurs de la tête et du cou (voir tableau I) prévus pour 2012, sont très attendus.

Ces anticorps totalement humains (panitumumab et zalutumumab) visent à diminuer les phénomènes immunogènes pour prolonger la demie-vie des anti-EGFR dans l'organisme. Une réduction des manifestations cutanées (observées sous cetuximab) est également présagée. Cependant si l'éruption cutanée est un effet indésirable, elle est le seul marqueur prédictif de l'effet des thérapies anti-EGFR identifié jusqu'à présent. On peut dès lors s'interroger sur la pertinence de leur usage clinique en absence d'autres marqueurs d'efficacité.

De nouveaux anticorps monoclonaux dirigés contre EGFR continuent d'émerger. Parmi eux, l'anticorps chimérique Ch806 (Panousis C et al, 2005) a été testé dans une étude de phase I concluante. L'analyse de sa liaison à l'EGFR a établi qu'il reconnaît préférentiellement un épitope exposé uniquement par les récepteurs surexprimés mutants ou sauvages. Par ailleurs cette étude montre l'incorporation tumorale de l'anticorps à des doses 10 à 20 fois inférieures à celle observées classiquement par les anticorps monoclonaux chimériques anti-EGFR, ce qui peut être lié d'après les auteurs, à la préférence pour le tissu tumoral par rapport à la peau ou au foie. Ceci fait donc de



l'anticorps Ch806 un très bon candidat pour de plus amples développements. En particulier pour le traitement des tumeurs où le variant III de l'EGFR est présent en quantité comme les glioblastomes (30 à 60%), les tumeurs du poumon non à petite cellule (15 à 40%), et les tumeurs de la tête et du cou (40%). (Scott AM et al, 2007).

#### - Les inhibiteurs de tyrosine kinase

Deux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant la partie intracellulaire d'EGFR se font la part belle dans les traitements anti-tumoraux : le gefitinib (Iressa®, AstraZeneca, Etats-Unis) et l'erlotinib (Tarceva®, GenenTech, Etats-Unis). Il s'agit de petites molécules qui s'administrent par voie orale. Dans la cellule, elles entrent en compétition avec l'ATP au niveau du site catalytique tyrosine kinase du récepteur, empêchent ainsi sa phosphorylation.

Le gefitinib est un inhibiteur réversible de l'activité d'EGFR. *In vitro*, le gefitinib est un agent potentialisateur des chimiothérapies conventionnelles (Ciardello F et al, 2000). Ces molécules ne présentent pas une spécificité stricte pour EGFR comme celle des anticorps monoclonaux.

L'erlotinib présente également une affinité pour d'autres tyrosines kinases comme les kinases de la famille Src et le récepteur IGF1-R, mais de moindre mesure que pour l'EGFR. *In vitro*, l'erlotinib s'est montré efficace dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, notamment par une capacité à bloquer le cycle cellulaire en phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>. Ses effets *in vivo* sur la croissance de xénogreffe de tumeur épidermoïde de la tête et du cou ont justifié le passage de cette molécule aux essais cliniques (Soulières D et al, 2004)

Cependant, en situation clinique ces molécules n'ont pas trouvé leur place pour le traitement des carcinomes des voies aérodigestives et peinent à dépasser la phase II. Les résultats de ces inhibiteurs ne sont pas convaincants pour ce type tumoral (Cohen EE et al, 2010).

## 2 - Les voies de signalisation activées par EGFR : la partie immergée de l'iceberg

Du fait de la phosphorylation de multiples résidus tyrosine, EGFR est en mesure de stimuler différentes voies de signalisation de façon spécifique du ligand et du type de dimère dans lequel il est impliqué (Figure 10). De plus, il existe de nombreux phénomènes de transactivation entre ces voies. Ensemble, ces mécanismes aboutissent à une diversité d'effets biologiques qui sont en faveur de la croissance tumorale et de la dissémination : prolifération, survie cellulaire, invasion et angiogenèse tumorale sont les processus activés par EGFR via l'activité des voies de signalisation.

Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent montrer des altérations dans l'expression des protéines composant ces voies, responsables de suractivations constitutives (Figure 11).

Les paragraphes qui suivent exposent le fonctionnement des voies de signalisation d'EGFR et décrivent quelques unes des altérations trouvées dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, ainsi que leurs conséquences.

## 2-1) La voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est la voie de la survie cellulaire. Elle intègre les signaux extérieurs de survie ou d'apoptose provenant de divers récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR, IGF1-R, PDGFR, Intégrines...). La protéine kinase B, ou AKT, en est le pivot du fait de sa capacité à phosphoryler un grand nombre de substrats.

La PI3K est une enzyme responsable de la formation d'un second messager : le PIP3 (Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate). Celui-ci va activer différents acteurs moléculaires dont la PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1) qui, par phosphorylation, active AKT. Cette protéine kinase a un rôle central dans la signalisation induite par les récepteurs des facteurs de croissance. L'activité d'AKT favorise la survie cellulaire par l'inactivation de substrats pro-apoptotiques comme BAD ou la pro-caspase 9 et les facteurs de transcription FOXO qui régulent l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (Roy S et al, 2008). Son action inhibitrice sur mTOR via la phosphorylation du complexe TSC 1/TSC 2 favorise la croissance cellulaire (Huang JH et Maning BD, 2009).

Les perturbations de cette voie de signalisation sont des événements fréquents dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Les amplifications du gène *PIK3CA* (qui code pour la PI3K) ou la suractivation fonctionnelle d'AKT sont trouvés dans environ 50% des cas. Plusieurs travaux ont montré que la suractivation d'AKT, mesurée par le niveau d'expression de sa forme phosphorylée, est associée à un mauvais pronostic dans les cancers oraux (Pedrero JMG et al 2005, Amorphimoltam P et al, 2004, Massarelli E et al, 2005, Yu Z et al, 2007).

Outre la survie cellulaire, la voie Pi3K/AKT est impliquée dans la régulation de l'angiogenèse notamment par une augmentation de la transcription et de la sécrétion de VEGF, et une stabilisation du facteur de transcription HIF1 $\alpha$ .

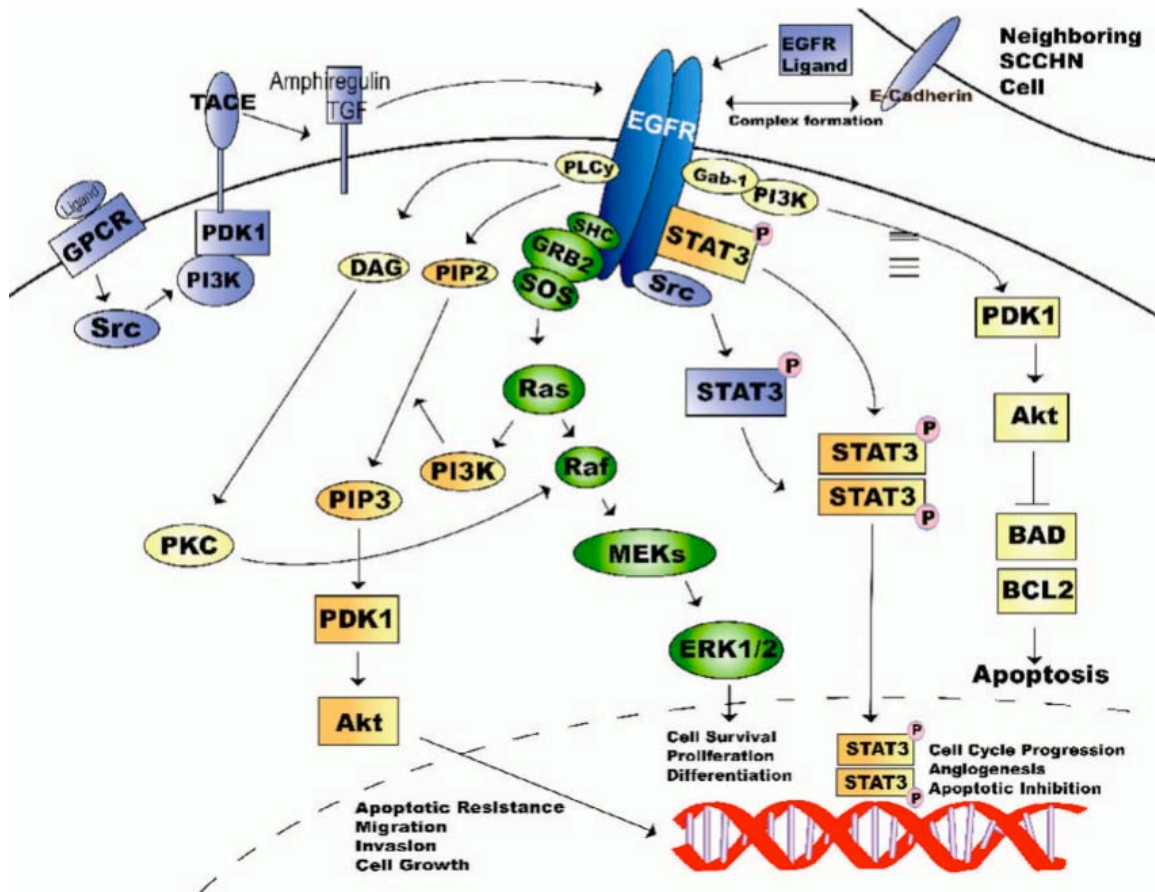


Figure 10 : Signalisation activée par EGFR dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. (Morgan S & Grandis JR, 2009)

## 2-2) La voie des MAP Kinases

La voie des MAP kinases est classiquement décrite comme la voie de la prolifération, la transduction dont elle est responsable aboutit à l'activation de nombreux gènes codant pour des facteurs de croissance (activation autocrine) et pour les médiateurs de la progression du cycle cellulaire. La protéine Ras est activée par le complexe Sos/Grb2 qui reconnaît et est activé par l'EGFR phosphorylé. A leurs tours les protéines kinases Raf, MEK et ERK ½ sont activées. ERK ½ est donc l'effecteur le plus en aval de la voie de signalisation, avant l'activation des facteurs de transcription (Chang F et al, 2003).

La voie des MAPK a connu récemment une mise en avant dans leur rôle dans le cancer puisque la présence de mutations activatrices dans le gène *KRAS* dans les tumeurs colorectales métastatiques a été validée comme un facteur prédictif d'un échec du traitement par cetuximab (Lièvre A et al, 2008). Bien que la suractivation de la voie des MAPK, en particulier ERK ½ soit rapportée dans les

carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, elle ne semble pas liée à une résistance aux anti-EGFR (Albanell J et al, 2001). De plus les mutations activatrices de *KRAS* sont des évènements relativement rares dans ce type de tumeurs, puisqu'elles surviennent dans moins de 6% des cas (Weber A et al, 2003).

### 2-3) La voie de la phospholipase C $\gamma$ -1

Cette enzyme catalyse la génération de di-acyl-glycérol (DAG) et d'inositol-1,4,5-triphosphate à partir du phosphatidyl-inositol-3-phosphate. Ces seconds messagers sont respectivement impliqués dans la régulation des flux de calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C. La PLC $\gamma$ -1 est activée par l'EGFR activé via l'interaction entre les domaines SH2. Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, la capacité invasive des cellules semble être en partie régulée par l'activation de PLC $\gamma$ -1 par EGFR (Thomas SM 2003). Les travaux de l'équipe qui a rapporté cette fonction de la PLC $\gamma$ -1 *in vitro*, montre par ailleurs que l'activation d'EGFR favorise l'interaction entre la PLC $\gamma$ -1 et la protéine c-Src, une kinase impliquée dans la régulation de la mobilité cellulaire (Nozawa H et al 2008).

### 2-4) La voie des STAT

L'EGFR activé peut également, par son domaine SH2 phosphorylé, recruter et activer la voie de signalisation des STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) indépendamment de Jak (Janus kinase). Les protéines Stats activées forment des dimères qui sont transloquées dans le noyau où elles exercent leur activité de facteur de transcriptions. Leurs gènes cibles codent pour des facteurs de croissance et des cytokines. Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, un niveau d'expression de Stat3 supérieur au niveau exprimé dans la muqueuse normale a été mis en évidence. Une suractivation de Stat3 dépendante d'EGFR est également rapportée, avec notamment une activité de liaison à l'ADN qui est 8 à 10 fois plus importante dans le tissu tumoral que dans le tissu sain. Le traitement de xénogreffes de carcinome épidermoïde de la tête et du cou par une construction antisens de Stat3 induit une augmentation du taux d'apoptose (Song JI et Rubin Grandis J, 2000). D'autres travaux menés dans un modèle de mélanome montrent par ailleurs que Stat3 activé induit une transcription du VEGF et stimule l'angiogénèse tumorale (Niu G et al, 2002).

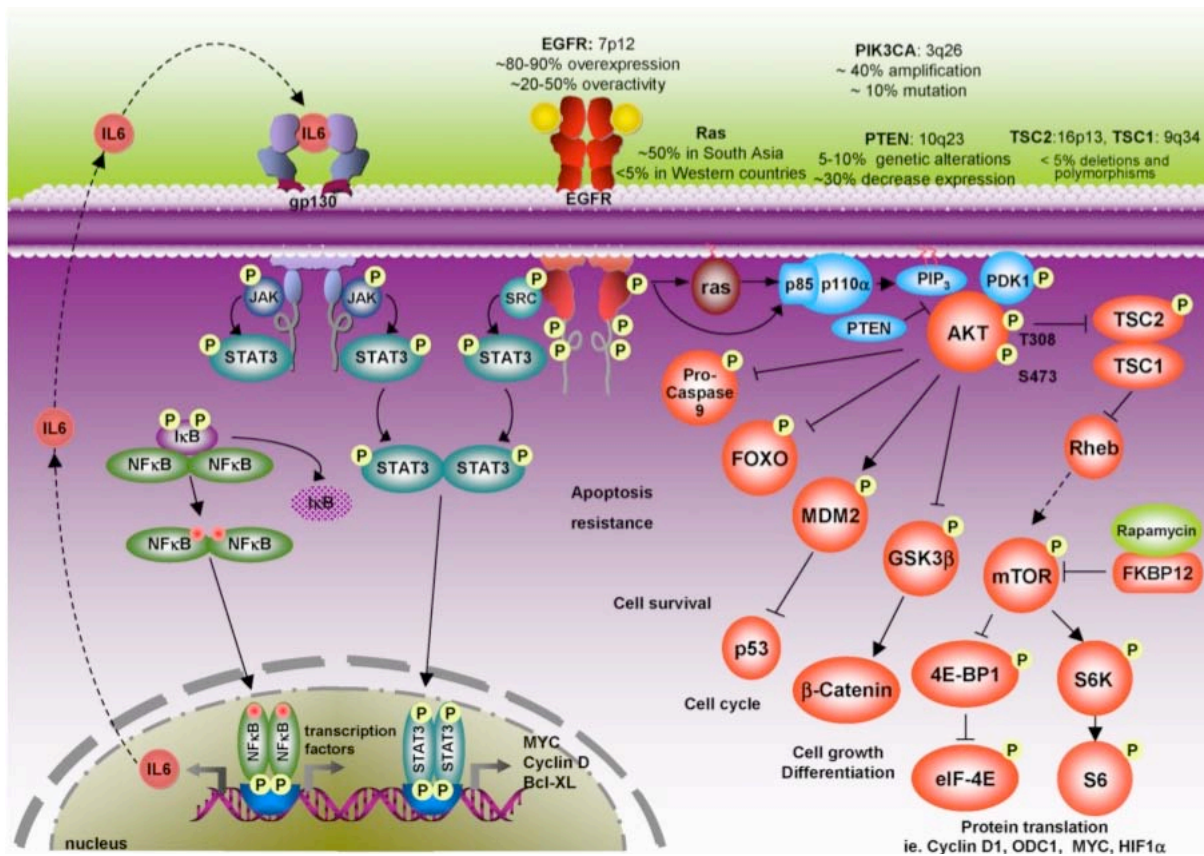


Figure 11 : Altérations fréquentes touchant les voies de signalisation activées par EGFR dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou d'après Molinolo et collaborateurs (2009).

### 3- PTEN, le gardien du temple

#### 3- 1) Expression et valeur pronostique dans les tumeurs de la tête et du cou

Suite à la découverte du gène suppresseur de tumeur à la toute fin des années 90, un certain engouement s'est créé autour de *PTEN*. Ce gène, parmi les plus mutés dans les cancers (aussi désigné par MMAC1 pour Most Mutated Anti Cancer 1), code pour une protéine phosphatase à double spécificité : elle a pour substrat des tyrosines ou des serines/thréonines phosphorylées.

Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, son rôle a été analysé avec, pour première approche, la détection de mutations inactivatrices ou de délétions complètes du gène. Un certain nombre d'études tendaient alors à montrer que l'inactivation de *PTEN* ne faisait pas partie des événements communs dans ce type tumoral, du fait que la perte d'expression se faisait selon un mécanisme monoallélique, laissant une copie du gène (Okami K et al, 1998, Henderson YC et al, 1998, Chen Q et al, 2000).

Ali et collaborateurs rapportent en effet que ces altérations génétiques se trouvent dans seulement 10% des cas (Ali I et al 1999). Au contraire, des mutations inactivatrices dans le gène *PTEN* sont détectées dans 23% dans 52 échantillons analysés dans une autre étude (Poetsh M et al 2002). Il semble que la disparité des chiffres, ainsi que la difficulté à évaluer la fréquence de la perte de fonction de *PTEN* tiennent à la nature des événements génétiques recherchés (perte d'hétérozygotie, mutations non-sens,...).

Mais il a été assez rapidement montré que l'approche génétique n'offrait pas un tableau réaliste du rôle de l'expression *PTEN* dans les tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou, par des travaux qui s'intéressaient à l'expression de la protéine.

Ainsi, Lee et collaborateurs (Lee JI et al, 2001) s'intéressent à l'expression de la protéine *PTEN* sur un petit nombre d'échantillons dans une étude par immuno-histochimie (41 tumeurs de la langue). En attribuant un score en fonction de l'intensité du marquage, ils classent 29% des échantillons en « *PTEN* négatifs », 65% en « *PTEN* faible » et 6% en « *PTEN* élevé ». En plus de montrer que la perte d'expression de *PTEN* n'est pas un événement si rare dans les tumeurs de la tête et du cou, cette étude en fait un facteur pronostic. En effet, à 5 ans, 65% des patients pour qui les tumeurs sont *PTEN* positives sont vivants, tandis qu'ils ne sont que 33% parmi ceux dont les tumeurs n'expriment pas la protéine. La valeur pronostique de *PTEN* s'applique également à la survie sans progression puisque la survenue d'une tumeur secondaire, d'une métastase ou du décès est un événement significativement plus fréquent dans le groupe de patients dont les tumeurs sont « *PTEN* négatives » (75% vs 41% dans le groupe *PTEN* positif). Les auteurs expliquent une telle différence avec les résultats avancés antérieurement par l'existence des régulations épigénétiques (hyperméthylation du promoteur de *PTEN* fréquente) et post-traductionnelles pour l'expression de *PTEN* (Kim SM et al 2010).

Des résultats similaires établissent que la perte d'expression de *PTEN* surviendrait dans 23% de tumeurs laryngées (Guney et al, 2007) et plus récemment sur une cohorte plus importante (140 patients), cette perte d'expression est même évaluée à 69% des échantillons analysés (Patje et al, 2010).

Ces diverses données font de la perte d'expression de *PTEN* un événement qui survient dans 20 à 69% des tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou (Figure 11).

### 3- 2) Contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire

L'activité lipide-phosphatase de PTEN a rapidement été caractérisée en plus de son activité protéine-phosphatase. Les phosphatidyl-inositol-phosphates sont les premiers substrats identifiés de PTEN (Maehama T et Dixon JE, 1998). Puis plusieurs études démontrent dans différents types cellulaires, que le rôle de PTEN est d'antagoniser l'action de la PI3K en évitant l'accumulation de PIP3, ceci permettant de limiter l'activation d'AKT et de ses substrats dont BAD, un inhibiteur de l'apoptose (Figure 12). Ces différents travaux font de PTEN, via son activité lipide-phosphatase, un élément déterminant dans l'inhibition de la survie cellulaire (Myers MP et al 1998, Stambolic V et al, 1998, Dahia 1999, Li J et al, 1998).

L'action de PTEN n'a pas seulement une valeur fonctionnelle, mais s'inscrit également dans le temps. Le niveau basal d'AKT phosphorylée est plus important dans les lignées cellulaires PTEN déficientes et la durée du signal est également prolongée dans ces cellules. Ainsi dans des lignées de carcinomes mammaires exprimant PTEN, la phosphorylation d'AKT provoquée par l'EGF n'est plus détectée au bout d'une heure, tandis que dans celles déficientes pour PTEN, elle est toujours détectée 4h après la stimulation. Il semble par ailleurs que la phosphatase est moins efficace à bloquer le signal induit par un ligand que le signal basal et que ces phénomènes sont sensibles au taux d'expression de PTEN, établi par la présence d'un ou des deux allèles du gène codant pour la protéine (Sun H et al 1999, Lu Y et al 1999).

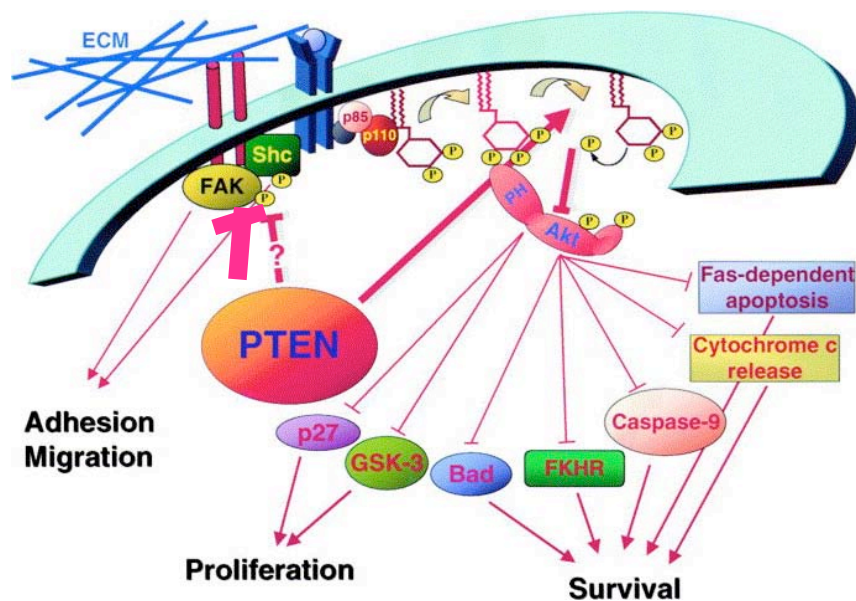


Figure 12 : Rôle de PTEN dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (D'après Di Cristofano A et Pandolfi PP, 2000).

PTEN limite donc la survie des cellules tumorales en empêchant une activation massive d'AKT. En corollaire, il a longtemps été considéré que la perte d'expression de PTEN et les mécanismes d'activation constitutive d'AKT avaient les mêmes conséquences sur la tumorigenèse et ne se distinguent pas. Cette redondance explique, d'après To et collaborateurs, que les mutations de *PTEN* et de *RAS* soient observées comme mutuellement exclusives (To MD et al, 2005).

Cependant, les phénotypes relatifs à la perte d'expression de PTEN et à l'activation constitutive d'AKT permettent de penser que PTEN a des fonctions bien distinctes qui ne se limitent pas à la régulation de la voie PI3K/AKT.

Quant à l'action inhibitrice de PTEN sur la voie des MAP Kinases, elle semble moins directe. Les effecteurs des MAP Kinases tels que ERK ½ ou des facteurs de transcription comme ETS-2 ne semblent pas être des substrats directs de PTEN, bien que leur inactivation a été observée suite à la réintroduction de PTEN dans des lignées cellulaires naturellement déficientes pour son expression. La phosphatase agirait plus en amont de MEK, vraisemblablement au niveau de Ras. Toutefois, d'après les différents travaux analysant l'action de PTEN sur l'activation des MAP Kinases, il ressort que cette régulation est dépendante du ligand et du récepteur impliqué et semble plus en lien avec la voie de l'IGF-1R ou des intégrines (Weng LP et al, 2001, Weng LP et al 2002, Gu J et al, 1998).

PTEN exerce donc son action de produit d'un gène suppresseur de tumeur en antagonisant AKT et favorisant la survenue de l'apoptose.

### 3- 3) Contrôle de la progression du cycle cellulaire et de la croissance

Le contrôle que PTEN exerce sur la prolifération et de la survie cellulaire n'est pas uniquement le résultat de l'action limitative des voies de signalisation PI3K/AKT et MAP Kinases. PTEN a en effet la capacité intrinsèque de ralentir la progression dans le cycle cellulaire au niveau de la transition vers la phase S et ainsi de favoriser une éventuelle entrée des cellules en apoptose.

Il a été décrit *in vitro* que la transfection de PTEN induit un arrêt en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>, accompagné d'une diminution de la population cellulaire en phase S, conduisant à réduction de la croissance cellulaire (lignées cellulaires de glioblastome et de cancer du sein). Différents travaux précisent le mode d'action de PTEN dans le contrôle de la transition G<sub>1</sub>/S en impliquant la protéine p27, un inhibiteur du complexe cycline E/cdk2. Ce complexe autorise en principe l'entrée en phase S (Figure 13). Il a été montré que l'expression de PTEN est associée à une augmentation de l'expression de p27 de deux à quatre fois (par rapport aux niveaux détectés dans les cellules PTEN déficientes). Le recrutement de cet inhibiteur au sein du complexe cycline E/cdk2 est par ailleurs significativement plus importante (Li D et Sun H, 1998, Cheney IW et al 1999).



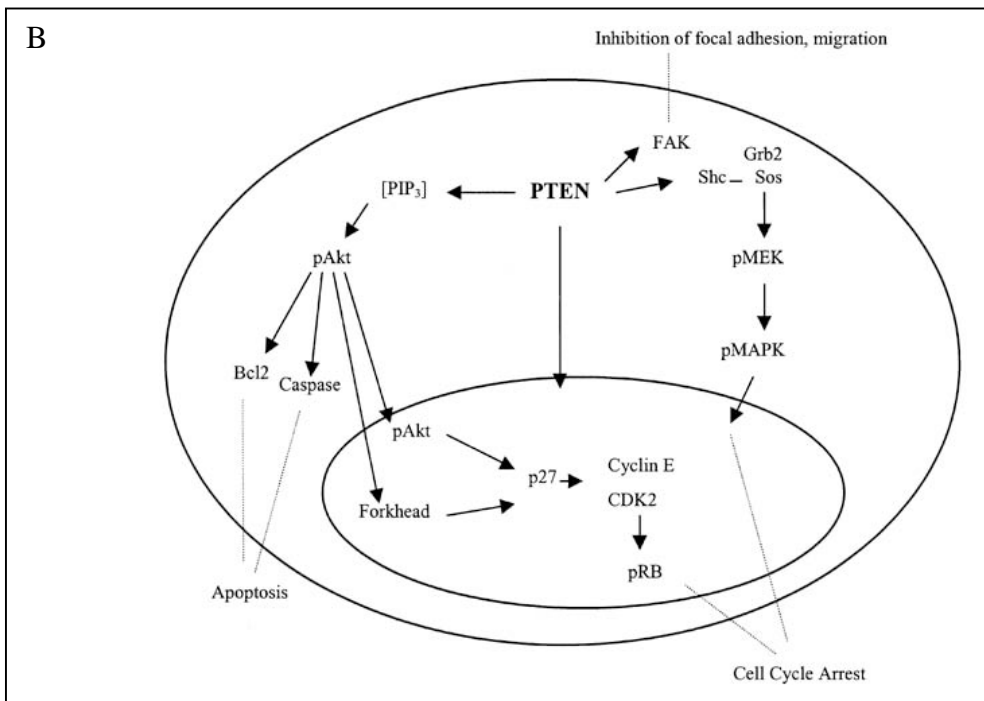
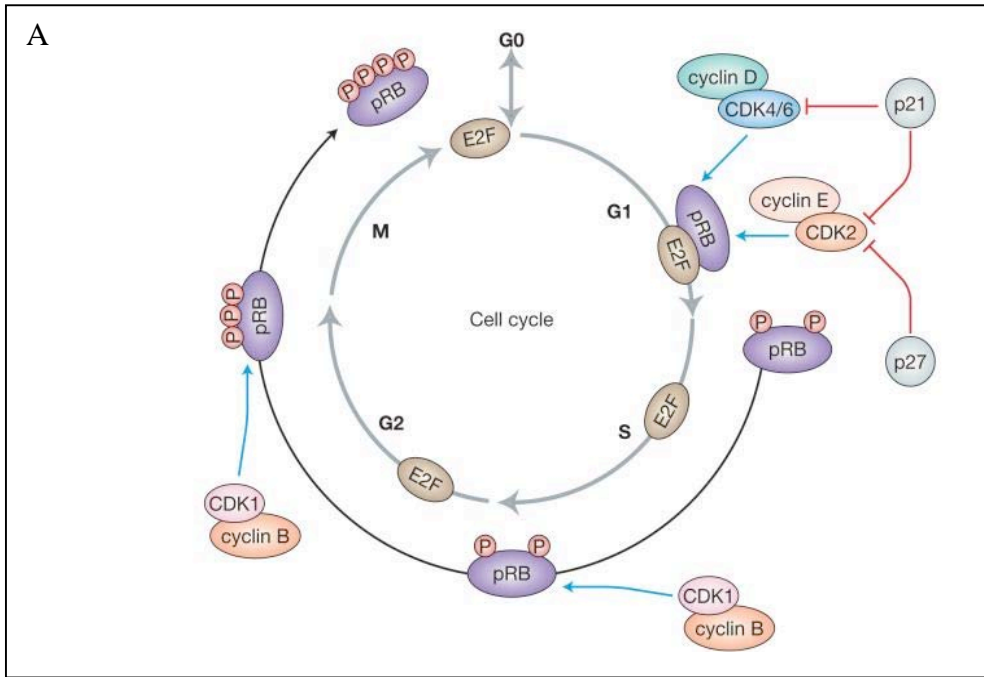


Figure 13 : Protéines impliquées dans la régulation (A) et rôle de PTEN (B) dans la progression dans le cycle cellulaire. (A : Abukhdeir AM et Ho Park B, 2009 - B : Wu et al, 2003). pRB : retinoblastoma protein.

En plus de ce complexe, l'avancée en phase S requiert la localisation nucléaire du complexe cycline D<sub>1</sub>/cdk4. Or plusieurs travaux décrivent une diminution du niveau d'expression de la cycline D<sub>1</sub> ainsi qu'un blocage de sa localisation nucléaire en présence de PTEN (Radu A et al, 2003). Par ces différents mécanismes, les cellules se voient donc bloquées au niveau de la transition G<sub>1</sub>/S. Une étude *in vitro* similaire ajoute que le rôle de PTEN s'inscrit dans le temps puisque la perte de son expression est associée à une entrée précoce en phase S, réduisant la durée totale du cycle cellulaire de 5 à 10% (Sun H, 1999).

Cet arrêt en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> médié par PTEN n'est pas nécessairement suivi par l'apoptose. Le devenir des cellules dont l'entrée en phase S est retardée est notamment déterminé par les facteurs de croissance et signaux de survie en présence. En effet, Weng et collègues (Weng L et al, 2001) proposent que l'effet inhibiteur de PTEN sur la croissance cellulaire est dû à son contrôle sur le cycle cellulaire, tandis que l'apoptose est un phénomène sous la dépendance d'AKT dont l'action est déterminée par la quantité de facteurs de croissance.

Ces différentes observations *in vitro* indiquent que PTEN restreint la croissance cellulaire par différents modes d'action. Ainsi, PTEN agit tel un chef d'orchestre du développement tissulaire : contrôlant la progression dans le cycle cellulaire, limitant l'activation des signaux de survie. De façon tout à fait complémentaire, PTEN semble également avoir un rôle dans la régulation de la taille des cellules et le développement des organes.

Ce sont notamment des travaux menés sur la *Drosophile* qui ont révélé cette fonction de PTEN, dont la surexpression provoquait une réduction significative de la taille des organes et des cellules. La voie de signalisation PI3K/AKT et PTEN sont des composants cellulaires conservés chez les mammifères (Scanga SE et al, 2000, Gao X et al, 2000). L'action de PTEN dans le contrôle de la taille cellulaire est trouvée de façon assez similaire chez l'Homme dans le syndrome de Lhermitte-Duclos qui est une manifestation de la maladie de Cowden. Cette pathologie génétique, due à des mutations de *PTEN*, est notamment associée à un risque accru de développement de tumeurs. Le syndrome de Lhermitte-Duclos se caractérise par une dysplasie du cervelet. Il a été établi *in vivo* que la perte d'expression de PTEN est un événement suffisant au développement de ce syndrome (Kwon CH et al, 2001), mettant ainsi en relief le rôle de PTEN dans le contrôle du développement de l'organe.

L'influence de PTEN sur la taille des cellules, pourrait participer aux processus tumorigènes liés à sa perte d'expression. En effet, avant de progresser dans le cycle cellulaire et proliférer, les cellules doivent atteindre une taille seuil et accumuler le matériel protéique nécessaire.

Cette fonction de PTEN est intéressante à souligner alors que son lien avec mTOR reçoit de plus en plus d'arguments. En effet, mTOR (mammalian Target of Rapamycin) est une kinase qui active la

synthèse protéique par la phosphorylation de ses substrats : p70S6Kinase (qui phosphoryle la protéine ribosomale p70S6) et 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1). L'activité de mTOR est régulée par AKT et les complexes TSC 1 et 2 (Tuberous sclerosis complex). La perte d'expression de PTEN et le blocage du complexe protéique C1 de mTOR (aussi appelé Raptor pour Regulatory Associated Protein), de même que des mutations dans les gènes TSC1 montrent des similarités dans les phénotypes associés, notamment en ce qui concerne la taille des cellules (hypertrophie des cellules du système nerveux central) et des perturbations du cycle cellulaire (Rosner M et al, 2009, Backman SA et al, 2002, Uhlmann EJ et al, 2002). Si ces différents acteurs de la croissance cellulaire semblent connectés, la façon dont le réseau s'articule est encore floue (Figure 14).

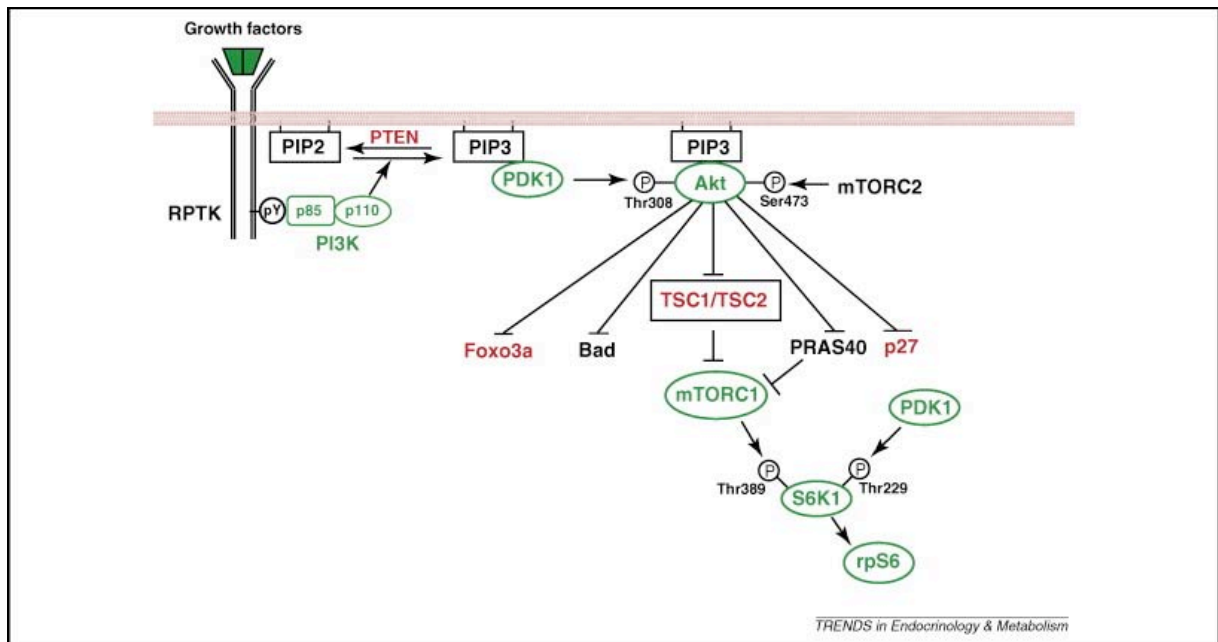


Figure 14 : Lien entre PTEN et le complexe mTORC1 via TSC 1 et 2. mTOR : mammalian target of rapamycin. TSC : Tuberous sclerosis complex. (Reddy P et al, 2009).

### 3- 4) Contrôle du potentiel invasif et migratoire des cellules

La perte d'expression de PTEN dans les tumeurs est un événement qui a un fort impact dans les phases tardives de cancérisation en favorisant la mobilité cellulaire ou l'invasion des cellules tumorales, premières étapes du processus métastatique. La dissémination des cellules cancéreuses et l'apparition de foyers secondaires sont des phénomènes complexes qui impliquent le tissu tumoral, son environnement physique (matrice extracellulaire, vascularisation,...) et chimique (pH, pression partielle en oxygène...).

Les intégrines sont le maillon entre la matrice extracellulaire (MEC) et les phénomènes intracellulaires. Ces protéines kinases membranaires activent elles aussi la voie MAP Kinases par l'intermédiaires des FAK (Focal Adhesion kinase) et des kinases de la famille Src, à la suite de leur liaison avec des protéines de la MEC (fibronectine, collagène...). Des expériences de reconstitution de l'expression de PTEN *in vitro* dans des lignées cellulaires de gliome et de cancer du sein ont abouti à une réduction significative de la migration cellulaire induite par les intégrines. Il a alors été montré que la déphosphorylation des FAK et des Src par PTEN empêche l'activation des MAP Kinases à l'origine de la mobilité cellulaire (Gu J et al, 1998, Dey N et al, 2008, Gu J et al, 1999).

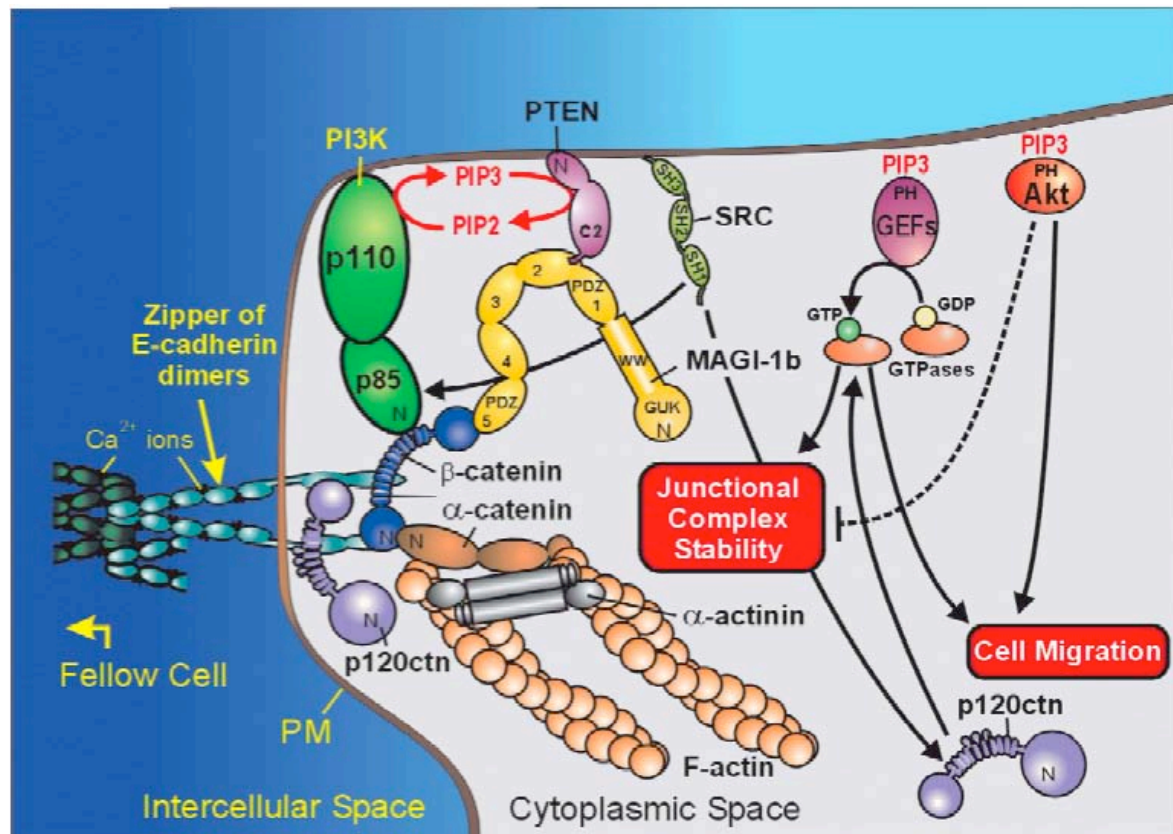


Figure 15 : Schématisation de l'association de PTEN au complexe d'adhésion cellulaire  $\beta$ -caténine/E-cadhérine. Schéma de synthèse proposé par Kotelevets et collègues qui suggèrent que le recrutement de PTEN par la protéine MAGI-1b au niveau de la jonction d'adhérence et la réduction du pool de PIP3 agissent au niveau des points de contacts entre cellules et favorisent l'invasion tumorale cellulaire (Kotelevets L et al, 2004).

En maintenant les protéines liées à la signalisation des intégrines dans leur état non phosphorylé, PTEN a également un rôle crucial dans la stabilisation des complexes d'adhésion cellulaire  $\beta$ -caténine/E-cadhérine et ce, en lien avec le cytosquelette, l'association physique de PTEN aux complexes ayant été mise en évidence *in vitro*. L'activation des FAK et Src induit des réarrangements de l'actine corticale et déstabilise ces complexes d'adhésion. Or la formation de ces points d'adhésion à la MEC empêche la mobilité cellulaire (Gu J et al 1999, Dey N et al, 2008, Kotelevets L et al, 2004).

Ceci a notamment été démontré par des expériences de restauration de l'expression de PTEN dans des cellules cultivées dans des conditions d'agitation qui empêchent leur adhésion. La réexpression de PTEN, dans ces conditions, amène les cellules à l'anoïkis (Lu Y et al 1999).

Ces résultats concernant la diminution de la migration et la survenue de l'anoïkis sont confirmés *in vitro* par d'autres études qui montrent également que l'expression de PTEN est associée à une diminution de la synthèse de l'ARN messager codant pour la MMP-2 et de son activité, ainsi que la MMP-9. Ces métalloprotéases jouent un rôle clé dans la dégradation de la MEC et les processus d'invasion (Koul D et al 2001, Furukawa K et al, 2006).

Les lignées cellulaires n'exprimant pas PTEN peuvent aussi se montrer indépendantes des facteurs de croissance, ce qui participe à la résistance à l'anoïkis. Un travail récent très complet démontre que même en l'absence de facteurs de croissance dans le milieu de culture, la prolifération de cellules dont le gène *PTEN* est totalement délété reste très importante, contrairement à ce qui est observé dans les cellules exprimant PTEN de façon hétéro ou homoallélique. Cette prolifération est, de façon attendue, associée à une forte activation d'AKT. Ces travaux montrent également que les cellules déficientes en PTEN n'entrent pas en apoptose lorsque l'état de confluence est dépassé (contrairement à celles exprimant PTEN), établissant ainsi que leur survie n'est pas dépendante de l'adhésion, c'est à dire résistance à l'anoïkis. En revanche, n'ayant pas formé de colonies sur agar, ni de tumeur *in vivo*, les auteurs en concluent que la perte de PTEN confère aux cellules tumorales un phénotype pro-métastatique (potentiel invasif, mobilité, résistance à l'anoïkis), qui à lui seul n'est pas suffisant à la formation de foyers tumoraux secondaires. Ce phénotype correspondrait à un

phénomène de dormance tumorale , qui caractérise la présence de cellules tumorales distantes asymptomatique, terrain de développement des métastases après traitement d'un site primaire (Vittolo et al , 2009).

L'équipe de Vitolo achève son étude par un traitement à la doxorubicine. Ils montrent alors que la perte d'expression de PTEN est un événement qui sensibilise à la chimiothérapie. Cet effet sensibilisateur n'est pas observé avec le traitement au paclitaxel, un poison du fuseau. Les auteurs mentionnent la différence de mécanisme de ces deux agents. En effet, la doxorubicine est un intercalant de l'ADN et provoque des dommages fatals aux cellules. Or le rôle de PTEN dans le maintien du génome via des mécanisme de réparation de l'ADN a depuis peu reçu un éclairage en lien avec cette observation. Cette fonction de PTEN est notamment liée à sa localisation nucléaire

### 3- 5) Rôle nucléaire de PTEN

La localisation nucléaire de PTEN a été mise en évidence et donne aux fonctions de PTEN précédemment citées un relief particulier. PTEN retarde la transition G<sub>1</sub>/S du cycle cellulaire, contrôle la taille cellulaire, limite la survie et la prolifération cellulaire et n'est pas inerte face à l'action d'agents anti-cancéreux qui induisent des dommages à l'ADN. Tout ceci s'accorde à la mise en oeuvre de la capacité de PTEN à stabiliser le génome et à son implication dans la réparation de l'ADN.

La localisation nucléaire de PTEN a été observée de façon précoce suite à sa caractérisation, cependant peu de crédit y a été accordé dans un premier temps, présumé comme un possible artefact dû aux techniques de fixation tissulaire et d'immuno-histochimie utilisées. En 2000, Gimm et collaborateurs (Gimm O et al, 2000) publient leurs résultats, obtenus sur des carcinomes thyroïdiens, fournissant une preuve de la localisation nucléaire de PTEN, tout en supputant l'existence de mécanismes de tumorigenèse liés à celle-ci et non encore caractérisés pour cette protéine.

Les arguments pour soutenir une fonction particulière de PTEN due à sa présence dans le noyau se multiplient par la suite. D'abord, une étude réalisée sur une centaine d'échantillons de mélanomes suggère que la répartition nucléo-cytoplasmique de PTEN a un rôle pronostique dans la progression tumorale des mélanomes (Whiteman et al, 2002). Puis rapidement, les capacités de PTEN à réguler la transition G<sub>1</sub>/S étant connues, quelques équipes se sont intéressées au lien qui pourrait exister entre la localisation nucléaire de PTEN et l'arrêt en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> qu'il peut induire dans les modèles cellulaires.

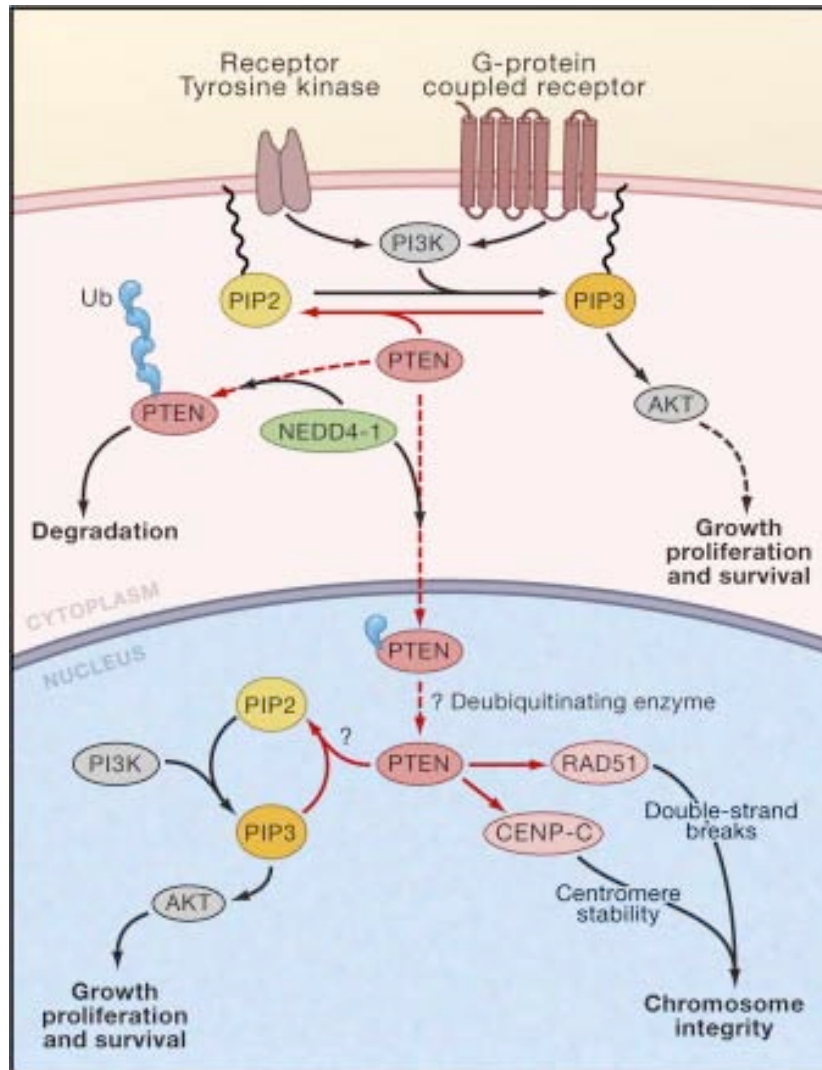


Figure 16 : Schématisation du rôle de PTEN dans sa localisation nucléaire selon Baker SJ (2007). NEDD4-1 est une ubiquitine ligase. Il a été montré que la poly- ubiquitinylation de PTEN promeut sa dégradation, tandis que sa mono- ubiquitinylation orienterait PTEN vers le noyau.

Il a effectivement été exposé que la localisation de PTEN varie pendant les phases du cycle, avec une coïncidence entre la localisation nucléaire et la phase  $G_0G_1$  (Ginn-Pease ME 2003). Pour appuyer ces observations, l'équipe de Chung confirme que la localisation nucléaire de PTEN est nécessaire pour induire l'arrêt en  $G_0G_1$ , tandis que sa localisation cytoplasmique, via le contrôle de l'activation d'AKT, est plus impliquée dans l'apoptose (Chung JH et al 2005).

Outre ce rôle de PTEN nucléaire en lien avec les autres fonctions connues de plus longue date, une action tout à fait intéressante de la protéine a été décrite pour la première fois récemment dans le maintien de la stabilité du génome.

Tout d'abord, c'est le lien entre PTEN et les complexes de réparation de l'ADN qui a été montré. La perte d'expression de PTEN empêche la constitution du complexe protéique de contrôle de l'ADN en phase G<sub>1</sub>, médiée par la protéine CHK1. En absence de PTEN fonctionnel, celle-ci est phosphorylée au niveau du résidu serine 280 par AKT activée, ce qui favorise l'ubiquitination et la séquestration de CHK1 dans le cytoplasme. Ainsi, dans les cellules PTEN déficientes, CHK1 n'est pas en mesure de recruter les acteurs de la réparation de l'ADN au niveau nucléaire et les cassures de l'ADN s'accumulent ([Puc J et al, 2005](#)).

En plus de l'implication de PTEN dans le recrutement des protéines de contrôle de la qualité de l'ADN en G<sub>1</sub>, Shen et collègues fournissent une belle démonstration du rôle de PTEN dans la stabilité des chromosomes. Leur étude montre que la perte d'expression de PTEN dans des cellules embryonnaires murines résulte en des aberrations chromosomiques telles qu'une accumulation des cassures doubles brins aléatoires, des fusions, des translocations et une fragmentation plus fréquentes des centromères. Cette équipe démontre de plus qu'en interagissant physiquement avec la protéine d'organisation du centromère CENP-B, PTEN intervient dans l'assemblage des kinétochores. Ces phénomènes suggèrent de ce fait qu'en l'absence de PTEN, les mécanismes de réparation de l'ADN impliquant le système HDR (Homologous recombination-Directed Repairs) sont altérés. Ils montrent en effet que PTEN régule positivement l'expression de la protéine Rad51 appartenant au système HDR. Leurs résultats sont argumentés par l'observation de phénomènes d'aneuploïdies associés à la perte d'expression de PTEN dans les carcinomes mammaires ([Shen WH et al, 2007](#)).

### 3- 6) Lien de PTEN avec l'angiogénèse

Si la migration et l'anoïkis sont des points clés dans les processus de dissémination des cellules tumorales, celle-ci est principalement favorisée par l'angiogénèse qui, dans un contexte tumoral, crée des vaisseaux particulièrement perméables et désorganisés.

Un lien entre le niveau d'expression de PTEN et la vascularisation a pu être observé dans différents modèles, *in vivo* et *in vitro* ainsi que dans des analyses d'échantillons tumoraux. Ainsi, Giri et Ittman décrivent en 1999 que des échantillons de tumeurs de prostate n'exprimant pas PTEN montrent une importante densité microvasculaire ([Giri D et Ittman M, 1999](#)). Ce lien entre la perte d'expression de PTEN et une importante densité microvasculaire a été confirmé par des études *in vivo* dans des modèles de gliomes et de cancers de la prostate ([Abe T et al, 2003](#), [Fang J et al, 2007](#)). Dans une étude de 2001, les auteurs montrent que la reconstitution de l'expression de PTEN dans la



lignée cellulaire de gliome U87 (qui présente une délétion du gène *PTEN*) n'induit pas de différence dans le taux de prolifération *in vitro* mais une nette diminution de la croissance tumorale en situation orthotopique. Leurs résultats établissent que la différence du taux de croissance tumorale *in vivo* est liée à une activité angiogénique multipliée par deux dans les tumeurs issues des cellules U87, par rapport aux tumeurs où *PTEN* est réexprimé (Résultats présentés dans la figure 17). Par ailleurs la corrélation entre un niveau d'expression de pAKT élevé avec la densité microvasculaire amène les auteurs à conclure que l'inhibition de l'angiogenèse par *PTEN* est médiée par le contrôle de la voie PI3K/AKT (Wen S et al, 2001).

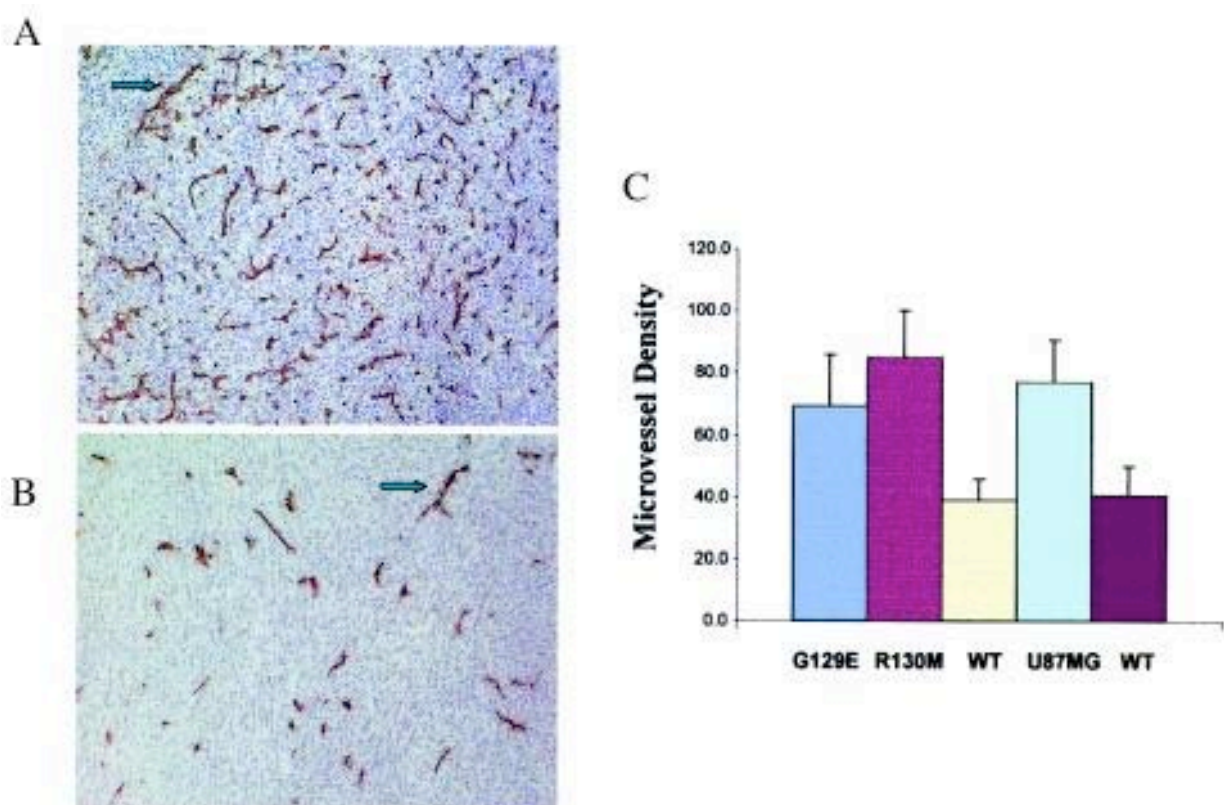


Figure 17 : Marquage et quantification de la densité microvasculaire de tumeurs cérébrales. Le modèle est établi par Wen et collègues par xélogreffe cellulaire sous-cutanée et qui évaluent l'angiogenèse par un marquage IHC au moyen d'un anticorps anti-CD31. La photo A représente le résultat pour la tumeur formée par les cellules U87MG parentales tandis que B représente la tumeur formée par les cellules U87MG où l'expression de *PTEN* est rétablie (G129E). Les auteurs ont également procédé à un comptage des vaisseaux ainsi marqués (C). R130M : cellules U87MG exprimant un mutant spécifique de *PTEN* n'ayant pas d'activité phosphatase. Wen S et al, 2001.

De nombreux travaux établissent que le contrôle de l'angiogenèse par PTEN est médié par son action inhibitrice de l'expression du facteur de transcription inductible par l'hypoxie HIF-1 et du VEGF, conduisant à la diminution de la densité microvasculaire, ainsi qu'à une normalisation de l'architecture vasculaire tumorale et d'une réduction de la perméabilité vasculaire (Fang J et al, 2007, Hu et al 2005, Zhong H et al, 2000). *In vitro*, l'action majeure de la voie PI3K/AKT sur l'expression de HIF-1 et du VEGF est précisée : la réexpression de PTEN dans divers modèles (gliome, prostate, ovaire, foie) produit les mêmes effets que l'inhibition de la PI3K (par la wortmaninn et le LY294002), c'est à dire la diminution de l'expression du VEGF (Jiang BH et al, 2001, Pore N et al, 2003, Ueda S et al 2006, Fang J et al, 2007). L'étude de Zundel établit que cet effet est dépendant de la stabilisation de HIF1- $\alpha$  en condition normoxique, faisant de PTEN un régulateur de la survie lorsque la concentration d'oxygène tissulaire vient à diminuer, avant que les mécanismes induits par l'hypoxie ne soient mis en place (Zundel W et al, 2006). Il semble que la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  soit régulée par son interaction avec la sous-unité  $\beta$ , dotée d'un site putatif de phosphorylation par AKT. Li Y. et collaborateurs, montrent en effet une interaction physique entre pAKT et HIF-1 $\beta$ . PTEN, par son inhibition de pAKT conduirait donc à limiter la stabilisation du facteur HIF-1 dans un état fonctionnel (Li Y et al 2005).

Tian et collègues montrent tout récemment, par une approche expérimentale *in vitro* utilisant les milieux conditionnés (milieux produits par des cellules tumorales transfectées en culture), que l'expression de PTEN dans les cellules tumorales a pour effet une diminution de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales cultivées dans ces milieux. La régulation négative de l'expression de HIF-1 et du VEGF par PTEN est également décrite dans ces travaux. Les cellules tumorales expriment des constructions de PTEN différentes, dont une qui prive la protéine de son site d'activité phosphatase. Celle-ci produit cependant les mêmes effets que la protéine PTEN intacte, suggérant que PTEN pourrait exercer un contrôle de l'angiogenèse en partie par un mécanisme indépendant de la voie PI3K/AKT (Tian T et al, 2010).

Outre VEGF, d'autres médiateurs de l'angiogenèse ont été rapportés comme des cibles d'un contrôle par PTEN. Parmi eux, le facteur tissulaire est un récepteur glycoprotéique transmembranaire, activateur de l'hémostase et également un médiateur des phénomènes angiogéniques et thrombotiques associés au cancer. Il participe à l'angiogenèse tumorale via la signalisation cellulaire qu'il induit (Belting M et al, 2004). D'après des données récentes, l'expression du facteur tissulaire est stimulée par l'EGF via le facteur de transcription AP1, activé par la kinase JNK1, en aval de l'activation des MAPK et de façon indépendante de l'hypoxie. L'expression de

PTEN dans une lignée cellulaire de gliome permet d'atténuer l'expression du facteur tissulaire stimulée par l'EGF (Rong Y et al, 2009).

Le rôle de PTEN sur le versant endothélial de l'angiogenèse ne sera pas détaillé ici. Cependant il est intéressant de préciser que le récepteur au VEGF exprimé par les cellules endothéliales conduit à l'activation des mêmes voies de signalisation que EGFR activé. Aussi le rôle de PTEN dans les cellules endothéliales est-il tout aussi important dans le contrôle des mécanismes de survie et de prolifération cellulaire.

Un peu plus de 10 ans après la caractérisation de PTEN, l'ensemble des données accumulées brosse cependant un tableau disparate de son rôle dans les processus tumorigènes selon les modèles et les outils expérimentaux utilisés. Le recours à des méthodes de transfection permettant la restauration ou l'inhibition de l'expression de la protéine de façon transitoire ou durable ne semble pas sans influence dans les résultats obtenus. De même que la quantité de protéine PTEN exprimée peut avoir une conséquence sur les phénomènes établis expérimentalement. En effet, la complexité des effets de PTEN dans la croissance cellulaire s'inscrit dans des processus dynamiques qui sont influencés par le micro-environnement et l'intensité des stimuli que la protéine doit intégrer. Néanmoins, il ressort de ces nombreux travaux que les fonctions de suppresseurs de tumeur de PTEN s'illustrent de bien des façons dans une logique de maintien de l'intégrité du génome et de transmission idoine de l'information génétique aux cellules filles. Cette protéine a pour fonction de ralentir la progression du cycle cellulaire, permettant aux cellules d'intégrer les signaux provenant du microenvironnement, tout en régissant l'intégrité de l'ADN. PTEN semble ainsi constituer un point de contrôle majeur de la vie et de la destinée de la cellule.

#### 4- Implications dans la résistance aux thérapies ciblées

PTEN est donc un poste d'aiguillage cellulaire. Selon les facteurs de croissance en présence dans le milieu extracellulaire tumoral ou au contraire selon les signaux de mort cellulaire, la présence de la phosphatase PTEN fonctionnelle dans le tissu tumoral peut orienter les cellules vers la prolifération ou vers l'apoptose.

La perte d'expression de PTEN est un événement assez fréquent au sein d'un grand nombre de carcinomes qui conduit à un découplage entre les récepteurs aux facteurs de croissance, notamment EGFR, et la signalisation cellulaire. Ceci est particulièrement décrit dans le cadre d'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR qui perdent alors leur effet dans les cellules PTEN déficientes, du fait d'une suractivation constitutive de la signalisation cellulaire en aval d'EGFR.

Alors que le concept des thérapies ciblant EGFR semblait prometteur, les inhibiteurs de tyrosine kinase, comme le cetuximab, ont rapidement montré leurs limites en clinique. Aussi les mécanismes de résistance ont-ils été explorés, et la perte d'expression ou de fonctionnalité de PTEN ont été mis en évidence parmi ces mécanismes.

La résistance aux anti-EGFR, en particulier le cetuximab, induite par la perte d'expression de PTEN a été largement étudiée *in vitro*. Ainsi, dans le cancer du sein, il a été démontré que l'expression de PTEN a une valeur pronostique dans le traitement par le trastuzumab (anticorps monoclonal anti-HER2) en association avec les taxanes (Nagata et al, 2004). Les études menées sur des modèles cellulaires de cancers du sein, de la prostate, du poumon (non à petites cellules), et colorectal, établissent que l'absence de la protéine PTEN fonctionnelle est liée à un phénomène de résistance au cetuximab (Bianco et al, 2003, Janmaat et al, 2003, Jhaver et al, 2008, Bouali S et al, 2009, Sos ML et al, 2009, Kim SM et al, 2010).

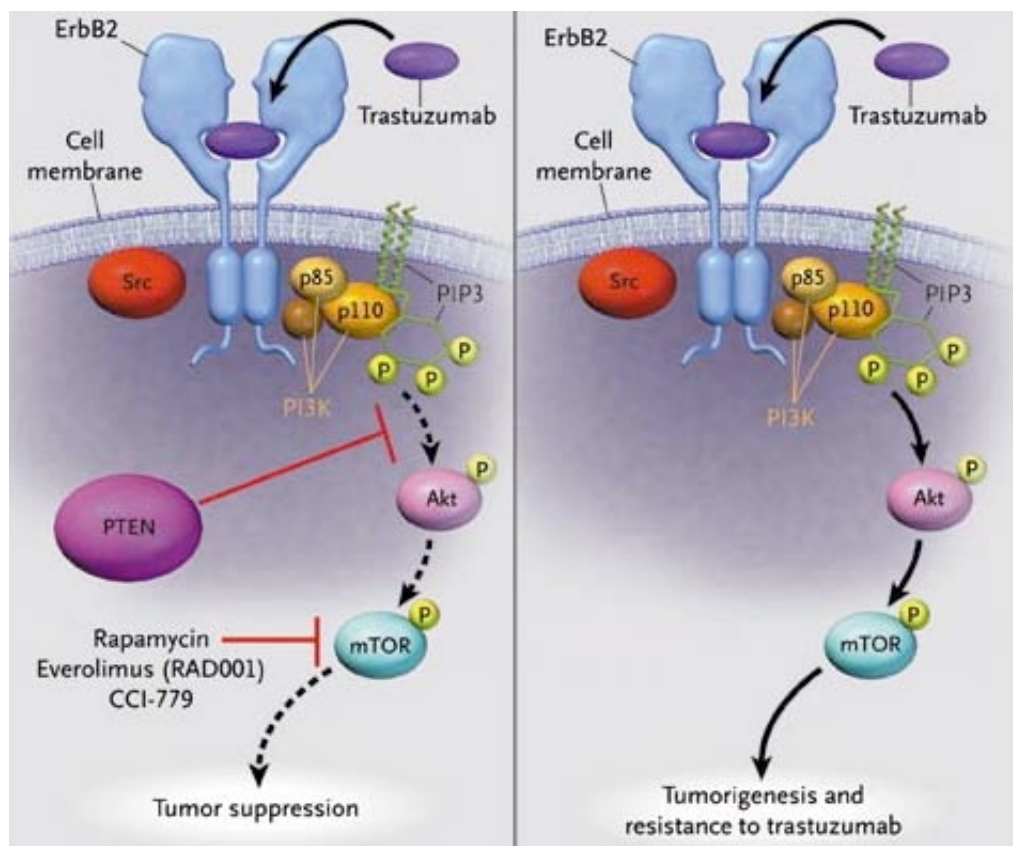


Figure 18 : Illustration du mécanisme de résistance au trastuzumab dans les carcinomes mammaires déficients pour l'expression de PTEN. Schéma proposé par Pandolfi PP (2004).

Toutes ces études convergent pour démontrer une activation constitutive d'AKT, indépendamment du récepteur à l'EGF, du fait de l'absence de protéine PTEN fonctionnelle. Par ailleurs le niveau d'activation d'AKT dans ces cellules reste élevé lors du traitement par cetuximab. Bianco et collègues précisent que la réexpression de PTEN dans des modèles déficients de cancers du poumon non à petites cellules comme de cancers du sein a pour effet de rétablir en partie la dépendance d'AKT à EGFR et donc la sensibilité cellulaire au cetuximab. Dans leur étude, Jhawer et collaborateurs concluent qu'il serait possible de stratifier les lignées cellulaires de cancers colorectaux selon leur statut PI3K/PTEN afin de prédire la réponse au cetuximab, suggérant ainsi la possibilité de faire classer les patients en sous-populations selon un profil de réponse potentielle à ce traitement. Ces résultats sont appuyés par une étude menée sur une petite cohorte de patients souffrant de cancer colorectal métastatique dans lesquels l'absence d'expression de PTEN concorde avec une absence de réponse au cetuximab (Frattini M et al, 2007).

La suractivation d'AKT induite par la perte d'expression de PTEN peut être ciblée. La périfosine (octadecyl-[1,1-diméthyl-4-piperidyl]- phosphate) est un dérivé d'alkylphospholipide capable de perturber la signalisation impliquant les phospholipides membranaires. Sans avoir une spécificité stricte, il est décrit comme un inhibiteur efficace de l'activation d'AKT. Aujourd'hui en phase III d'essai clinique dans le traitement du myélome multiple, son utilisation *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate déficientes pour PTEN montre un effet additif à celui du cetuximab et permet de contourner le phénomène de résistance (Li X et al, 2006).

En ce qui concerne les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, bien que la perte de PTEN et la suractivation de la voie PI3K/AKT (éventuellement par d'autres mécanismes) ont également été démontrées (Pedrero JM et al, 2005, Lee J et al, 2001), peu d'études se sont intéressées au lien qui pourrait exister entre ces événements et la résistance au cetuximab, malgré son indication dans ce type de cancers. Seuls les travaux récents de Yamatodani et collègues (Yamatodani T et al, 2009) rapportent un effet modeste du cetuximab dans des lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, associé à une suractivation d'AKT et de ERK ½.

Le rôle de la perte d'expression ou de fonctionnalité de PTEN dans l'acquisition de résistance aux thérapies ciblées a été largement démontré *in vitro* dans divers types tumoraux et corroboré par l'analyse d'échantillons de tumeurs issus de patients traités (Nagata Y et al, 2004, Sos SM et al, 2009, Frattini M et al, 2007). Mais dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, malgré des données qui justifieraient de telles investigations, l'influence d'une déficience de PTEN dans les réponses modestes au cetuximab observées dans ce type tumoral n'a jamais été étudiée.

## 5- Le cetuximab

### 5- 1) La molécule, ses indications, son utilisation

Le cetuximab (Erbix<sup>TM</sup>) est un anticorps monoclonal murin humanisé de type IgG1, les parties variables sont donc d'origine murine tandis que les régions constantes sont humaines.

Il reconnaît de façon spécifique la partie extracellulaire du récepteur à l'EGF et empêche la liaison du ligand. Il est indiqué dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques porteurs du gène *KRAS* de type sauvage et exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), en association à une chimiothérapie ou en monothérapie après échec d'un traitement à base d'oxaliplatine et d'irinotecan ou en cas d'intolérance à l'irinotecan. Il a également l'AMM pour le traitement des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou, en association avec la radiothérapie dans les cas de maladie localement avancée. Pour le traitement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou récidivant et/ou métastatique, il peut être prescrit en association avec la chimiothérapie à base de platine en première intention et en monothérapie en 2<sup>e</sup> ligne.

Le cetuximab est administré par injection intraveineuse, de façon hebdomadaire à raison de 250 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle, après une dose initiale de 400 mg/m<sup>2</sup>. La durée du traitement est celle de l'administration de la radiothérapie. Lorsque le cetuximab est en monothérapie, le traitement est arrêté lorsqu'une réponse est obtenue ou en cas d'intolérance de la part du patient. Selon ce schéma, la concentration plasmatique de cetuximab atteint un niveau de base de 40 à 85 µg/mL à la 3<sup>e</sup> semaine de cure. La demie-vie moyenne du cetuximab dans l'organisme est d'environ 112h.

### 5- 2) Mécanismes d'action

Le cetuximab se lie de façon spécifique à l'EGFR au niveau du site de liaison au ligand. Avec une affinité 10 fois plus importante que l'EGF, il empêche la liaison des ligands naturels (Li S et al, 2005). Le blocage de l'autophosphorylation induite par le cetuximab empêche l'activation des voies de signalisation dépendantes de l'EGFR. Ainsi, le cetuximab exerce ses effets anti-tumoraux par le blocage de l'activation des voies de signalisation de survie et prolifération cellulaires par l'EGFR stimulé. Par ailleurs, il a été montré que la fixation du cetuximab au récepteur est suivie de son internalisation, une partie des récepteurs endocytés sont dégradés par le lysosome, une autre est recyclée à la membrane. Récemment, Liao et collègues ont précisé qu'en plus de ces routes dans le trafic cellulaire, le cetuximab conduit l'EGFR vers le réticulum endoplasmique où il est redirigé vers le noyau. Les effets biologiques de la translocation nucléaire d'EGFR suite à la liaison du

cetuximab ne sont pas connus (Liao HJ et Carpenter G, 2009).

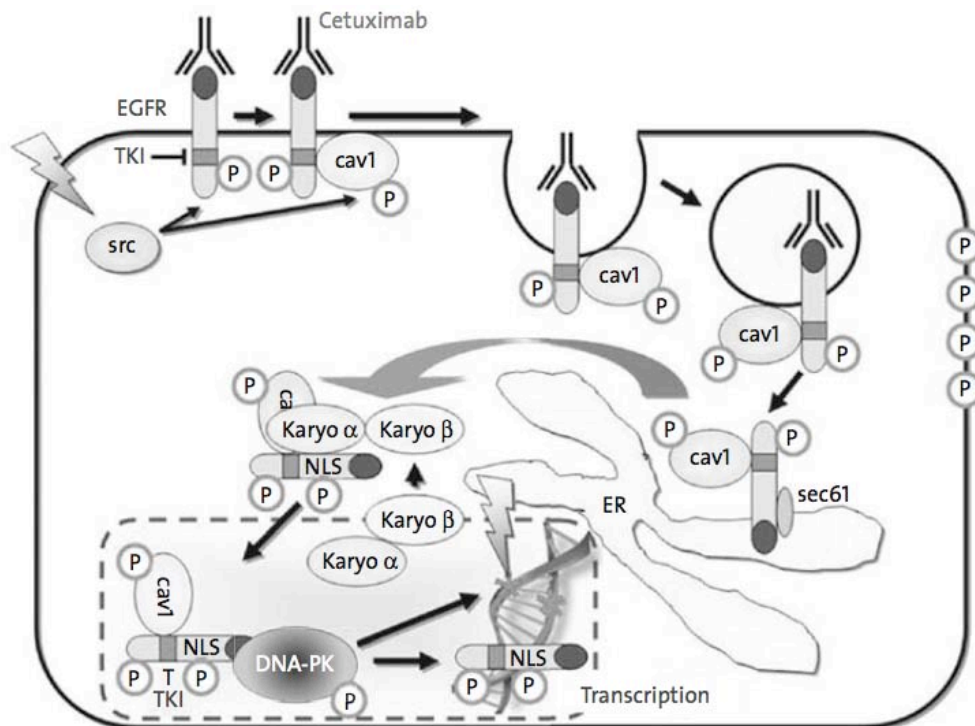


Figure 19 : Illustration du phénomène d'internalisation et de la translocation nucléaire d'EGFR suite à la liaison avec le cetuximab. Selon Dittmann K et collègues, l'incubation des cellules avec le cetuximab stabilise le complexe EGFR-cavéoline 1 (cav1), ce qui bloque l'acheminement au noyau. Les cavéoles contenant EGFR sont transportées vers l'appareil de Golgi et le reticulum endoplasmique. Dans le noyau, EGFR nucléaire interagit avec la DNA-PK (Dittmann K et al, 2010).

### 5 -3) Effet antitumoral du cetuximab, données précliniques

Les effets antitumoraux du cetuximab ont été largement étudiés *in vitro*. Le cetuximab a donc été décrit comme un agent cytostatique et dans certains cas, comme un cytotoxique qui conduit à une inhibition de la croissance cellulaire variable d'un modèle à l'autre. Il a cependant été observé que lors de son utilisation *in vivo*, le recrutement du système immunitaire et l'inhibition de l'angiogenèse induits par le cetuximab produisaient un effet antitumoral global plus important que ce qui est observé *in vitro*.

#### a. Effets anti-prolifératifs décrits *in vitro*

L'apoptose induite par le cetuximab est donc rapportée dans quelques travaux, mais ne semble pas être l'effet majeur à l'origine de l'inhibition tumorale. Il semble que le cetuximab implique l'apoptose dépendante de la voie des caspases. *In vitro*, l'activation des caspases 3, 8 et 9, suivie du clivage de PARP, est rapportée dans une étude menée dans une lignée cellulaire de cancer du colon, 8 à 16h après l'exposition au cetuximab (Liu B et al, 2000). Cependant l'apoptose n'est pas observée dans toutes les lignées cellulaires de carcinomes de type épithélial. Ainsi par cytométrie en flux, Kawaguchi et collègues mettent en évidence l'apoptose induite par le cetuximab dans 4 lignées sur 7 de carcinome épidermoïde de l'œsophage (Kawaguchi Y et al, 2006).

De la même façon, dans des lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou variablement sensibles au cetuximab, Huang et collègues ne montrent la survenue de l'apoptose que dans une seule des 4 lignées cellulaires utilisées. Ils montrent alors que les modifications du ratio Bax/Bcl2 induites par le cetuximab sont à l'origine du phénomène apoptotique et que l'inhibition de la croissance cellulaire est évaluée de 20 à 75% dans ce type cellulaire. Au contraire de l'apoptose, quelle que soit leur sensibilité, toutes les lignées cellulaires montrent un blocage du cycle cellulaire en G<sub>1</sub> d'ampleur variable, mais significative dès 24h de traitement. Ce blocage implique une régulation positive de l'expression et de l'association de l'inhibiteur p27<sup>kip1</sup> au complexe cycline E/Cdk2 qui régule la transition vers la phase S (Huang SM et al 1999). De façon similaire, Wu et collaborateurs montrent également un phénomène apoptotique à 48h d'exposition au cetuximab dans une lignée cellulaire de cancer du colon, précédé du blocage en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire (Wu X et al 1995). En effet, l'inhibition du complexe cycline E/Cdk 2 médiée par p27<sup>kip1</sup> induite par le cetuximab et conduisant au blocage des cellules en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> a été décrite dans plusieurs travaux *in vitro* menées sur des lignées cellulaires de divers types tumoraux (poumon non à petites cellules Raben D et al, 2005, Colon Jhaver M et al, 2008, prostate Peng D et al 1996 ; A431 Fan Z et al, 1997). Ce blocage provoque donc une déplétion de cellules en phase S. Une étude *in vitro* dans une lignée cellulaire de cancer du pancréas complète ces observations en mettant en évidence une diminution de la synthèse d'ADN consécutive à l'exposition au cetuximab (Overholser JP et al, 2000).

L'ensemble de ces données établit donc le cetuximab a un effet cytostatique, tandis que l'effet cytotoxique n'est pas systématique, et lorsqu'il survient, il est la conséquence d'un blocage du cycle cellulaire en phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>.



Si le cetuximab ne produit pas un phénomène apoptotique majeur, il est en revanche un agent radiosensibilisateur. Notamment Huang et collaborateurs, évoquent que la radiosensibilisation des lignées cellulaires de carcinome épidermoïde de la tête et du cou par le cetuximab est due à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub>. Ces auteurs mentionnent la possible implication de la protéine DNA-PK, un enzyme médiant les mécanismes de réparation de l'ADN, dans ce phénomène. Ce que confirment Dittmann et collègues en 2005. Suite à l'irradiation *in vitro*, la présence d'un complexe EGFR/DNA-PK est observée dans le noyau (Figure 19). Le cetuximab immobilise le complexe dans le cytoplasme et empêche l'action de la protéine kinase, maintenant les dommages à l'ADN infligés par les irradiations (Dittmann K et al, 2005).

L'effet chimiosensibilisant du cetuximab est également bien documenté et a conduit aux essais cliniques qui ont abouti à la mise sur le marché du cetuximab en association avec la radio ou la chimiothérapie. L'effet synergique du cetuximab avec le 5-FU a donc été montré *in vitro*, de même qu'avec la doxorubicine et le paclitaxel (Overholser JP et al, 2000, Baselga J et al, 1993, Lynch TJ et al 2010, Sung FL et al, 2005, Herbst RS et al, 2005), et avec les traitements à base de platine (Vermorken JB et al, 2008) y compris pour le traitement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. La combinaison du cetuximab aux irradiations permet d'obtenir des résultats drastiques *in vivo*, notamment sur les modèles de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Les travaux de l'équipe de Harari montrent que l'apoptose radio-induite peut être multipliée par 10 *in vitro* suite à l'exposition au cetuximab. *In vivo*, la radiothérapie ou le traitement au cetuximab seuls provoquent une régression tumorale transitoire (30 à 60 jours) mais la combinaison de ces modalités thérapeutiques permet une régression tumorale complète en 3 mois (Harari PM et al, 2001, Liang K et al, 2003, Milas L et al, 2004).

#### b. Effets du cetuximab observés *in vivo*

Cependant, *in vivo* l'effet antitumoral du cetuximab en monothérapie est plus marqué. Ainsi, dès 1995, l'utilisation du cetuximab pour le traitement d'un modèle de xénogreffe de tumeur épidermoïde par Goldstein aboutit à une inhibition de 35% de la croissance tumorale sans montrer de cytotoxicité (Goldstein NI et al, 1995). Dans un contexte *in vivo*, le cetuximab peut donc montrer une action anti-tumorale qui dépasse ce qui a été observé dans certains travaux *in vitro*. Deux mécanismes majeurs sont maintenant connus pour être mis en jeu au sein de l'organisme lors du traitement au cetuximab: le phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et l'inhibition de l'angiogénèse.

L'activation des cellules Natural Killer et monocytes par le cetuximab se fait par l'interaction entre la partie constante Fc de l'anticorps monoclonal et le récepteur FcγRIII qu'expriment les cellules NK et les monocytes. La présence de cytokines potentialise l'activation des cellules immunitaires par le cetuximab, conduisant à la lyse des cellules tumorales. L'ADCC montre cependant des résultats très variables d'un individu à l'autre. Mais certaines études soulignent l'importance du phénomène dans l'action antitumorale du cetuximab puisqu'il ne semble pas dépendant des phénomènes de résistances liés aux perturbations moléculaires des cellules tumorales telles que les mutations activatrices KRAS et l'expression d'EGFR muté (Roda JM et al, 2007, Lopez-Abeitero et al, 2007, Kurai et al, 2007, Kimura et al, 2007, Kawaguchi et al, 2007).

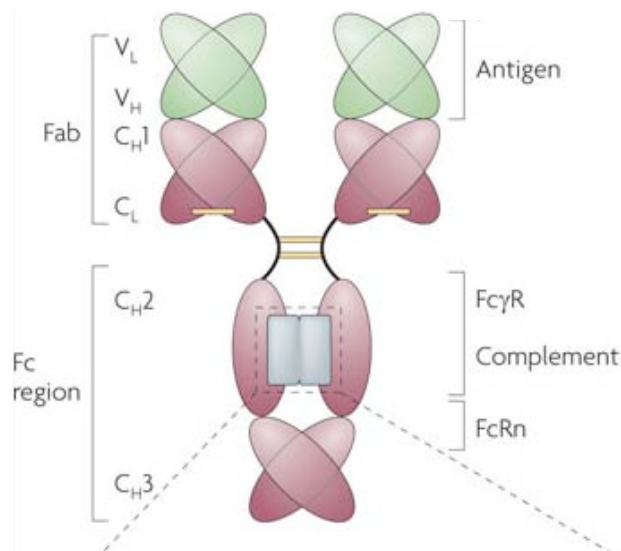


Figure 20 : Structure schématique des anticorps thérapeutiques. En vert est représenté l'antigène. V désigne les parties variables, C les parties constantes. Dans la région Fc est représenté le site d'interaction avec le récepteur FcγRIII des cellules du système immunitaire. D'après Chan AC et Carter PJ (2010).

Parmi les effets anti-tumoraux que le cetuximab développe *in vivo*, les preuves d'un effet anti-angiogénique ont été amenées. La partie III de cette introduction bibliographique permettra d'établir le lien entre l'inhibition d'EGFR et de sa signalisation dépendante avec l'action anti-angiogénique du cetuximab.

### **Partie III : L'Angiogenèse tumorale : la tumeur architecte de son devenir**

#### 1 – Généralités sur l'angiogenèse tumorale

##### 1-1) Le switch angiogénique

L'angiogenèse tumorale désigne le phénomène de formation de néo-vaisseaux induit par une masse tumorale. Cette tumeur est avasculaire en dessous d'un volume seuil (2 à 3 mm<sup>3</sup>). La croissance tumorale assurée par la prolifération et la survie cellulaires est supportée par un apport en oxygène et en nutriments par diffusion aux cellules, permettant le maintien de leur métabolisme. À mesure que le volume tumoral augmente, la diffusion des éléments nutritifs dans le milieu interstitiel ne parvient plus à alimenter toutes les zones de la tumeur. Le micro-environnement est donc modifié dans ces zones ischémiques (changement des pressions partielles en gaz, modification du pH,...). L'hypoxie notamment est un puissant déclencheur de l'angiogenèse.

En situation physiologique, les tissus ne nécessitent pas de néovascularisation (excepté les organes génitaux féminins et les tissus blessés). Une pression négative s'exerce sur l'endothélium, bloquant les processus de formation de nouveaux vaisseaux. Cette pression négative résulte en fait d'une régulation fine décrite comme une balance moléculaire complexe entre facteurs pro et anti-angiogéniques. Le terme de switch angiogénique désigne la phase au cours de laquelle les événements moléculaires tumoraux font pencher la balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Ce phénomène peut intervenir à différents stades de la tumorigenèse et sous l'effet d'événements variables d'un type tumoral à l'autre (Bergers G & Benjamin L, 2003). L'augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques peut être une conséquence d'activation d'oncogènes. De même la perte ou diminution d'expression des facteurs anti-angiogéniques peut résulter de la perte d'expression des gènes suppresseurs de tumeur ou du fait de pertes de mécanismes de régulation intracellulaire (Folkman J, 2006).

Le micro-environnement tumoral est un inducteur majeur du switch angiogénique. Parmi les modifications de sa composition, la diminution de la pression partielle en oxygène est le signal le mieux caractérisé jusqu'à présent. La situation hypoxique favorise la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , qui active la transcription de nombreux facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF et le PDGF, et d'autres gènes selon un mécanisme adaptatif.

## 1- 2) Les phases précoces de l'angiogenèse

Le système de régulation de l'angiogenèse est complexe et les composants moléculaires en sont nombreux, l'angiogenèse pouvant être stimulée ou réprimée par de multiples facteurs, eux-mêmes sécrétés par les cellules tumorales mais également les cellules périvasculaires, les cellules endothéliales (mécanisme autocrine), les macrophages ou encore fibroblastes associés aux tumeurs.

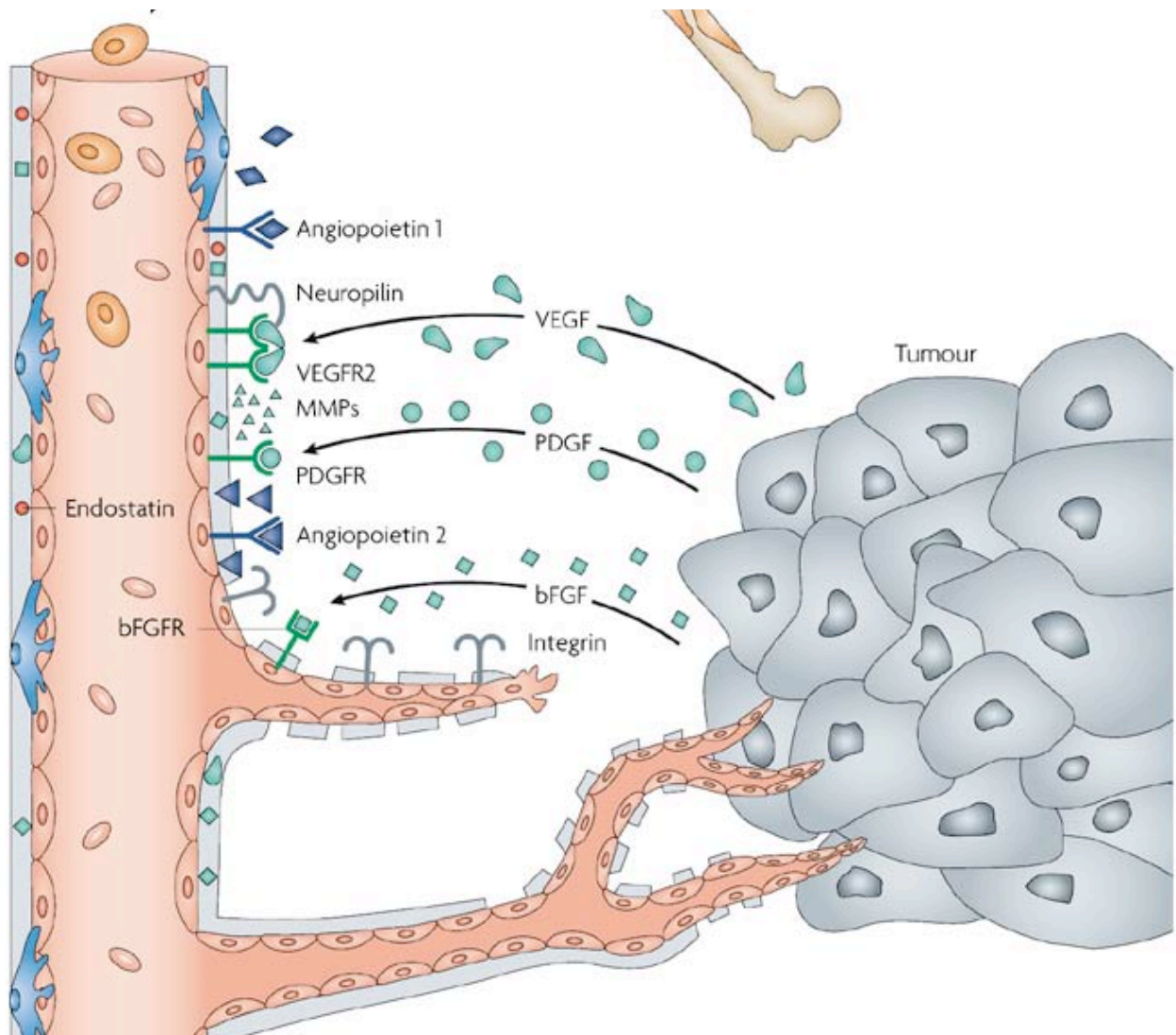


Figure 21 : Représentation des phases précoces de l'angiogenèse. L'angiopoïétine est impliquée dans la destabilisation des cellules murales vasculaires. Celle-ci rend les cellules endothéliales plus accessibles au VEGF et au PDGF qui stimulent leur prolifération et leur migration. Schéma proposé par Folkman J (2007).

La séquence des événements précoces est décrite comme dépendante du VEGF. Le facteur de croissance, dont la synthèse et la libération par les cellules tumorales sont anormalement élevées, provoque une vasodilatation associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les cellules murales qui couvrent l'endothélium, principalement les péricytes, sont alors déstabilisées sous l'action de l'angiogoiétine 2. L'expression et la sécrétion de protéases par les cellules tumorales induisent par ailleurs une dégradation locale de la matrice extracellulaire qui favorise la migration des cellules endothéliales dont la prolifération est stimulée par le VEGF.

Les étapes précoces de l'angiogenèse, classiquement décrites ainsi, aboutissent au bourgeonnement des vaisseaux préexistants. Cependant, si le VEGF est le facteur déterminant du bourgeonnement, la mise en place d'une néovascularisation est placée sous l'égide de nombreux facteurs pro-angiogéniques et rapidement la dépendance au VEGF peut être moins marquée. L'angiogenèse tumorale peut être initiée à différents stades de la tumorigenèse et remodelée sous l'action de facteurs dépendant du type tumoral, les différences en terme de densité vasculaire notamment peuvent être importantes d'un type tumoral à l'autre ([Bergers G & Benjamin L, 2003](#), [Hlatky L et al, 2002](#)).

Par ailleurs, une fois que l'angiogenèse est induite, le réseau vasculaire tumoral ne devient pas quiescent et stable contrairement à ce qui est observé dans la situation non pathologique. L'architecture vasculaire tumorale est donc caractérisée par une forte irrégularité, les capillaires sont dilatés, tortueux et peuvent présenter des culs-de-sac. La fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux est également perturbée, l'absence de différenciation entre veinules et artérioles donne lieu à un flux sanguin anarchique non orienté. De plus, la structure des parois vasculaires est altérée, du fait d'une couverture périvasculaire (assurée notamment par les péricytes) moins abondante, ainsi que des jonctions interendothéliales plus lâches ([Fukumura D et Jain RK, 2008](#)).

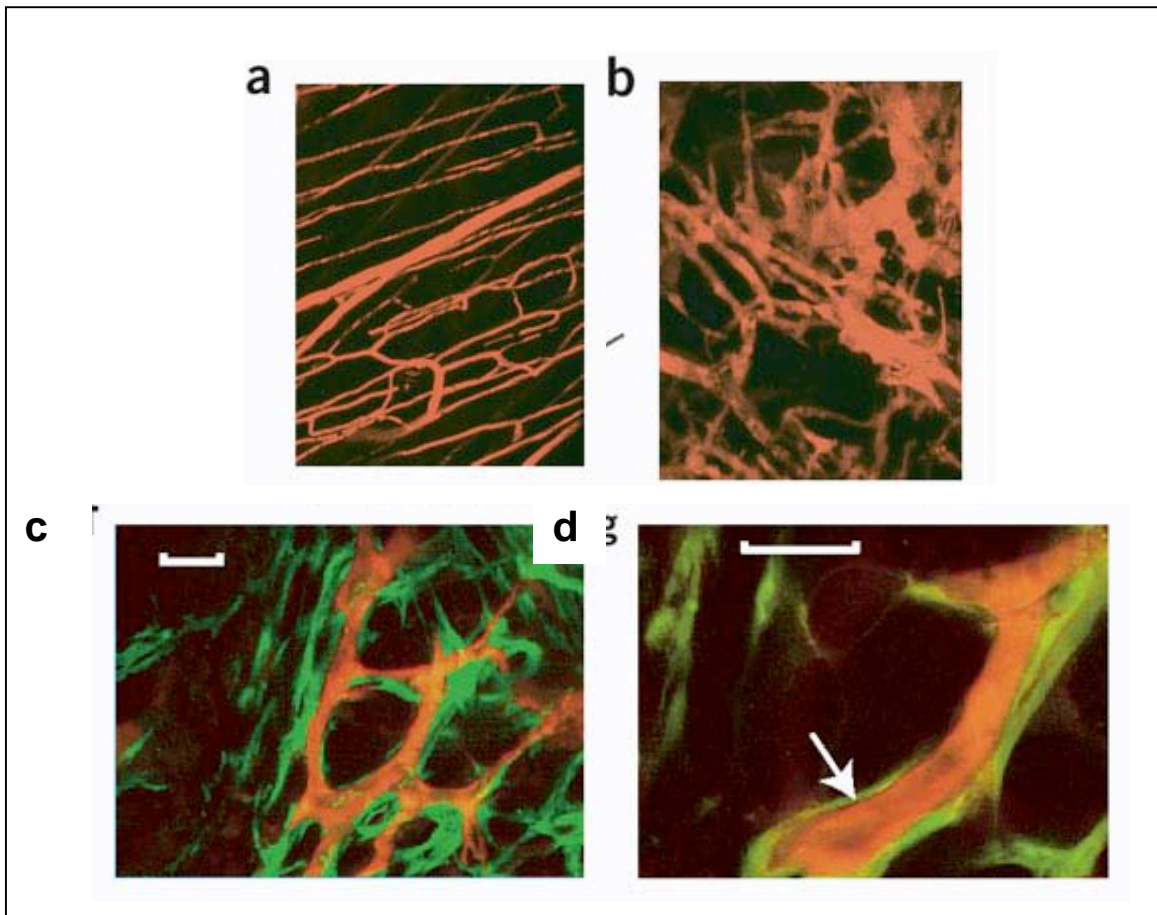


Figure 22 : Image du réseau vasculaire normal et tumoral prise en microscopie de fluorescence. Le réseau vasculaire d'un tissu non pathologique est régulier et orienté (a) tandis que dans le tissu tumoral, les vaisseaux sont de tailles aléatoires, présentent des cul-de-sacs et prennent une disposition anarchique (b). L'utilisation d'un modèle de cellules périvasculaires exprimant la GFP montre que le réseau vasculaire du tissu sain présente une couverture régulière (c) alors que les vaisseaux tumoraux présentent de nombreuses zones qui ne sont pas recouvertes (d). D'après Jain R (2003).

En outre, un degré de complexité supplémentaire a été décrit sous le terme de « vasculogénèse mimétique » qui désigne la formation de vaisseaux, non pas par activation et prolifération des cellules endothéliales mais par des cellules tumorales elles-mêmes. Ce mécanisme de transdifférenciation n'est pas majoritaire dans l'angiogénèse tumorale mais semble avoir un impact sur l'efficacité des thérapies anti-angiogéniques basées sur l'inhibition du VEGF ou de son récepteur. Mais sa signification clinique, si elle existe, n'est pas déterminée (Paulis YM et al, 2010, McDonald D et al, 2000).

## 2 – L'angiogenèse dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

### 2 – 1) Rôle du VEGF dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

Le VEGF est le mieux connu des facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Depuis sa découverte, d'abord identifié comme le VPF pour facteur de perméabilité vasculaire, son expression a été investiguée dans nombre de types tumoraux. Il s'agit d'un facteur décisif du switch angiogénique et comme mentionné précédemment, il est décrit comme l'élément déclencheur de la destabilisation des capillaires sains puis de leur bourgeonnement. Cependant, la néo-angiogenèse est un événement régulé différemment selon le type tumoral.

De façon intéressante, certaines études suggèrent que si la néoangiogenèse est un événement précoce dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, la surexpression du VEGF est préférentiellement associée à l'évolution tumorale et retrouvée dans des stades déjà avancés de la maladie (Denhart et al, 1997). En effet, dans une large cohorte, Pignataro et collègues (Pignataro L et al, 2001) analysent la densité microvasculaire (reflet d'une activité angiogénique et de modifications du micro-environnement tumoral) de tissus laryngés : celle-ci est plus importante que dans la muqueuse normale dès le stade pré-cancéreux.

Une étude antérieure confirme ces résultats et rapporte de plus que l'augmentation de la densité microvasculaire des tissus pré-invasifs n'est pas concomitante avec une élévation de l'expression du VEGF. En revanche la surexpression du VEGF (évaluée par immuno-histochimie *in situ*) est observée dans les échantillons de tumeurs de grades III/IV et métastatiques alors que les lésions pré-invasives l'expriment de façon similaire au tissu sain. En s'appuyant sur des travaux similaires menés sur des échantillons de tumeurs de la peau, les auteurs proposent donc le VEGF comme un facteur lié au maintien de l'angiogenèse participant à la progression tumorale des tumeurs épidermoïdes plutôt qu'un facteur d'initiation (Sauter ER et al, 1999).

De façon complémentaire, Hasina et collaborateurs se basent sur ces observations pour rechercher des profils d'expression de gène dans des tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou dans le but de déterminer quels facteurs peuvent potentiellement réguler l'angiogenèse dans ce type tumoral. Se basant sur des travaux antérieurs, ils soulignent que 25% des lésions pré-malignes et 75% des lésions malignes semblent induire une angiogenèse indépendante du VEGF. Leurs méthodes d'analyse identifient ainsi 2 types de profils majoritaires, l'un impliquant le VEGF, l'autre impliquant l'interleukine 8, son récepteur et le facteur de croissance HGF (Hasina R et al, 2008).

## 2 – 2) Les facteurs régulateurs de l'angiogenèse

L'expression de l'interleukine 8, de même que d'autres cytokines pro-inflammatoires semblent être une caractéristique de l'angiogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Des altérations de la réponse humorale, de l'angiogenèse, du métabolisme et dans les processus inflammatoires peuvent être observées chez les patients atteints de ce type de tumeur. De plus, la présence de cellules immunitaires associées à la tumeur est également documentée (Chen Z, et al 1999). L'équipe de Chen, après avoir identifié dans de premiers travaux un répertoire de cytokines exprimées par des lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, s'est intéressée à leur expression *in situ*, dans le serum d'une dizaine de patients et dans les milieux de cultures primaires de tumeurs. Ils ont démontré que les interleukines IL1 $\alpha$ , IL6, IL8, le facteur de croissance des macrophages GM-CSF, le VEGF et le FGF basique exprimés par les lignées cellulaires établies et primaires, ces facteurs sont détectés *in situ*, avec un marquage montrant une forte expression. De plus la plus forte expression du VEGF est trouvée dans les zones où la différenciation est pauvre (évaluée par le marquage de la keratine). Dans le serum, ce sont l'IL 6, 8 et le VEGF qui sont trouvés en plus forte concentration. L'étude ne comprend néanmoins pas d'évaluation de l'angiogenèse *in situ* ou *in vitro*. Le potentiel proangiogénique de ces diverses cytokines est mis en évidence dans d'autres travaux. IL1 $\alpha$ , IL 6 et GM-CSF semblent jouer un rôle dans l'initiation de l'inflammation locale, tandis que l'IL 8 stimule l'angiogenèse et la prolifération des granulocytes et macrophages, abondant dans le stroma des carcinomes épidermoïdes (Chen Z et al, 1999).

Parmi les facteurs de croissances pro-angiogéniques exprimés par les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, outre le VEGF et le GM-CSF, le PDGF est également détecté, mais en moindre quantité. Dans les surnageants de cultures primaires de tumeurs (issus d'une quinzaine d'échantillons), l'équipe de Ninck met en évidence de fortes concentrations de ces différents facteurs. De façon intéressante, ces travaux montrent par ailleurs que les cellules de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou expriment des combinaisons de ces facteurs. Notamment, le GM-CSF n'est jamais exprimé seul et il est associé, dans la plupart des cas rapportés ici, avec le VEGF et le PDGF. De plus, les auteurs rapportent une corrélation positive entre le nombre de facteurs détectés simultanément dans les surnageants de cultures primaires et la densité microvasculaire du tissu natif correspondant (Ninck S et al, 2003). Dans un travail plus récent, la même équipe complète ces observations en élargissant le nombre d'échantillons.



De façon similaire c'est une combinaison de facteurs qui est mise en avant, mais les auteurs mentionnent, en plus, des concentrations élevées de HGF dans la totalité des échantillons (Montag M et al, 2009). Le facteur HGF est également mis en avant dans l'étude de l'hétérogénéité angiogénique des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou par Hasina et collègues, qui identifient 2 profils génétiques principaux : l'un comptant le VEGF et le FGF, l'autre HGF, l'IL 8 et son récepteur. L'expression du 1<sup>er</sup> groupe de gènes par les tumeurs est associée à une densité microvasculaire plus importante que l'expression du 2<sup>ème</sup> (Hasina R et al, 2008). La présence conjointe de HGF et IL 8, d'après cette étude, dans un même groupe d'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse, est soutenue par des résultats obtenus *in vitro* : la stimulation de lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou par le facteur HGF induit une augmentation de l'expression de l'IL 8 et du VEGF, via l'activation de ERK ½ et AKT par son récepteur c-MET (Dong G et al, 2001).

En plus de ces facteurs de croissance, les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) semblent fortement exprimées dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Ces protéases, en dégradant la matrice, permettent la libération de facteurs de croissance qui y sont piégés et favorisent le bourgeonnement des néo-vaisseaux par la migration des cellules endothéliales. L'expression des MMP-1, 2, et 9 a été mise en évidence *in situ* (O-charoenrat P et al, 2002). D'après Franchi et collègues, l'augmentation de l'expression de la MMP-9 est corrélée à une augmentation de la densité microvasculaire et à une importante activité de la NO-synthase (le NO étant un agent stimulateur de l'angiogenèse) (Franchi et al, 2002). Il semble que la synthèse et l'activation de la MMP-2 soient placées sous le contrôle de GM-CSF. En effet, Tomita et collaborateurs rapportent que la présence de GM-CSF dans un milieu de culture de cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou est associée à une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la MMP-2 et de son activateur (MT1-MMP). L'activité protéasique de la MMP-2 est également stimulée en présence de GM-CSF (Tomita T et al, 2000).

Il est intéressant de constater que le VEGF, s'il reste un acteur principal de l'angiogenèse tumorale des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, n'est pas le seul. Il semble de plus agir de concert avec les seconds rôles : HGF et PDGF notamment. Ceci revêt une importance dans l'utilisation des thérapies ciblées, visant la thérapie « personnalisée ». Les molécules ciblant le PDGFR (Imatinib, Glivec®, Novartis) ou c-MET (sugen, SU11274) étant disponibles, établir un profil d'expression des cytokines pro-angiogéniques pourrait se révéler pertinent dans le but de mettre en place une thérapeutique adaptée à la biologie tumorale et trouver d'éventuels marqueurs prédictifs.

## 2 – 3) Effet anti-angiogénique des anti-EGFR

La transposition des essais d'agents anti-cancéreux *in vitro* à la situation *in vivo* souffre généralement de la pharmacocinétique et la pharmacodynamique, voire la pharmacogénomique liées à l'administration d'une molécule. Il est donc attendu que l'application d'un traitement *in vivo* produisent des effets moins importants que ceux observés *in vitro*. Or l'effet antitumoral du cetuximab s'est au contraire révélé plus marqué *in vivo*. Un certain nombre de travaux a rapidement mis en évidence la capacité anti-angiogénique du cetuximab comme un mécanisme important de l'effet antitumoral observé.

Viloria-Petit et collaborateurs, sur la base de ce constat et l'induction de l'expression du VEGF par l'activation d'EGFR (par l'EGF et le TGF $\alpha$ ) décrite par des travaux antérieurs, montrent alors que la synthèse de VEGF, ARNm et protéine, est réduite dans les cellules tumorales épidermoïdes A431 exposées au cetuximab, de façon dose-dépendante. Leur résultat est corroboré *in vivo*, le marquage immuno-histochimique du VEGF montrant une intensité diminuée dans les tumeurs après traitement. De même que la croissance tumorale est inhibée d'environ 30%, le nombre de vaisseaux sanguins est diminué de moitié dans ces tumeurs, démontrant que le blocage d'EGFR induit un effet anti-angiogénique médié par l'inhibition de la production de VEGF (Viloria-Petit et al, 1997).

D'autres études viennent appuyer ces observations, Perrotte et collègues ajoutent que dans un modèle de carcinome de la vessie, une diminution de l'expression de l'interleukine 8 et du FGF basique est détectée avec la diminution d'expression du VEGF *in vitro* et *in vivo* suite au traitement par cetuximab. Par ailleurs, après 5 semaines de traitement, la densité microvasculaire est réduite de 45% dans ces tumeurs. Les auteurs soulignent que ce phénomène est postérieur à l'inhibition de production des facteurs pro-angiogéniques étudiés (Perrotte P et al, 2000). Les mêmes résultats sont obtenus dans un modèle de carcinome de colon (Ciardello F et al, 2000) et complétés par une étude menée sur un modèle de tumeur du pancréas *in vitro* et *in vivo*. Dans cette dernière, les auteurs montrent de plus que dans les tumeurs traitées pendant 18 jours au cetuximab, 69% des cellules endothéliales sont apoptotiques (évaluation par la technique de TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). La diminution d'expression du VEGF et de l'IL 8 précèdent également la diminution de la densité microvasculaire (Bruno CJ et al, 2000). Les auteurs indiquent un effet cytotoxique du cetuximab sur les cellules endothéliales, sans avancer pour autant d'hypothèse sur un lien direct ou indirect (cellules endothéliales tumorales dépendantes du VEGF pour leur survie ou effet cytotoxique de l'anti-EGFR).

Un effet anti-angiogénique du cetuximab indépendant de son action sur les cellules tumorales est soutenu par les résultats de Huang et collègues qui, par un test d'angiogenèse in vitro (HUVECs cultivées sur matrigel), montrent que le cetuximab déstabilise les structures capillaires formées par les cellules endothéliales. L'angiogenèse tumorale induite par des cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou est également analysée dans cette étude. La lignée cellulaire greffée en situation orthotopique sur un petit nombre d'animaux montre une capacité invasive diminuée par le traitement au cetuximab. La vascularisation est évaluée au moyen d'une poche de matrigel où les cellules tumorales sont inoculées (24h après). Bien que l'étude compte peu d'animaux (6 pour ce test), les auteurs montrent une diminution significative de la vascularisation induite par les cellules tumorales par le traitement au cetuximab ([Huang SM et al, 2002](#)).

# **OBJECTIFS**

Cette étude a pour objet les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou pour lequel le cetuximab est délivré en association avec la radiothérapie. Une réponse modeste à cet agent anti-EGFR étant observé dans la pratique clinique pour cette pathologie, il semblait intéressant de rechercher d'éventuels marqueurs prédictifs de la réponse. De fréquentes altérations conduisant à l'activation constitutive de la voie PI3K /AKT étant rapportées dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, c'est sur cette voie de signalisation que se sont appliquées nos investigations. La perte d'expression de la protéine PTEN, évènement relativement fréquent dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, est un des mécanismes conduisant à l'activation constitutive d'AKT.

Or, le rôle de la perte d'expression de PTEN dans l'acquisition de résistance aux thérapies ciblées a été largement démontré *in vitro* et dans des études rétrospectives analysant la réponse des patients aux thérapies ciblées dans divers types tumoraux (Sein, poumon non à petite cellule, prostate). Ainsi, malgré des données justifiant de l'investigation d'une éventuelle influence de la perte d'expression PTEN dans les réponses modestes au cetuximab observées, jusqu'alors aucune étude n'a été menée pour élucider son rôle dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

Aussi, la partie expérimentale de cette étude a-t-elle été construite afin d'établir si la perte d'expression de la protéine PTEN a un impact sur la réponse au cetuximab d'un modèle de carcinome épidermoïde de la tête et du cou. La réponse cellulaire au cetuximab a été étudiée sur la lignée cellulaire Cal 27 en termes d'effets cytotoxiques/cytostatiques. L'inhibition d'expression de PTEN a été établie au moyen de l'ARN interférence selon une modalité transitoire et une modalité stable. Enfin, un modèle d'anneau aortique murin a été utilisé pour étudier l'effet des différentes conditions expérimentales sur la capacité d'induction de l'angiogenèse par les milieux conditionnés par les cellules Cal 27.

Les résultats sont donc présentés en trois parties. La première expose la fonctionnalité des voies de signalisation dépendante de l'EGFR dans le modèle cellulaire Cal 27, ainsi que sa réponse au cetuximab. Une deuxième partie avait pour objectif d'évaluer l'impact du statut d'expression de PTEN sur la réponse au cetuximab. Elle rapporte les résultats obtenus dans les cellules Cal 27 suite au silencing transitoire de PTEN, et décrit la caractérisation de lignées cellulaires clonales générées par le silencing stable de PTEN dans les cellules Cal 27. Enfin, la troisième partie du travail expérimental est consacrée à l'analyse du potentiel d'induction de l'angiogenèse les cellules Cal 27 soumises ces conditions expérimentales avec pour objectif, la recherche des facteurs potentiellement impliqués dans ce phénomène.

# **TRAVAUX PERSONNELS**

## **PARTIE I :**

Effets antiprolifératifs du cetuximab sur la lignée  
cellulaire Cal 27

## 1- Introduction

Le cetuximab (C225, Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique ciblant EGFR. L'Autorisation de Mise sur le Marché pour cette molécule dans les tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou date de 2004 en association avec la radiothérapie et est justifiée par la surexpression d'EGFR dans plus de 90% des cas.

Les facteurs de résistance aux thérapies ciblées sont nombreux et soulignent le manque de facteurs prédictifs de réponse des patients à ces traitements. Dans d'autres types tumoraux, les perturbations de l'expression des protéines de la signalisation intracellulaire en aval d'EGFR ont été mises en cause dans la résistance aux thérapies ciblées, notamment la perte d'expression de PTEN (Introduction : Partie II, 3).

Alors que la réponse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou au cetuximab est généralement modeste, et la perte d'expression de PTEN fréquente dans ce type tumoral, aucune étude n'élucide jusqu'à présent le rôle précis de celle-ci dans l'efficacité du cetuximab.

Notre travail a pour objet l'étude la réponse cellulaire de lignées de tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou au cetuximab et cherche à évaluer la perte d'expression de la protéine PTEN comme candidat en tant que marqueur prédictif de la résistance à cet anticorps monoclonal. La première partie du travail expérimental a donc consisté à choisir un modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou adapté en termes de réponse au cetuximab et de fonctionnalité des voies de signalisation en aval de l'EGFR. Puis l'effet du cetuximab et de l'EGF a été évalué sur l'activation des voies PI3K/AKT et la croissance de la lignée cellulaire Cal 27.



## 2- Matériel

### 2- 1) Lignées cellulaires

Un certain nombre de conditions expérimentales ont été testées sur trois lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale établies au Centre Antoine Lacassagne (Nice, France): Cal 27 (CRL-2095), Cal 33 (carcinome épidermoïde de la langue) et FaDu (hypopharynx). Les cellules Cal 27 ont été choisies pour la suite de l'étude. Cette lignée a été établie en 1982 à partir d'un échantillon tissulaire prélevé avant traitement sur une lésion de la langue chez un patient mâle de type caucasien âgé de 56 ans.

### 2- 2) Exposition des cellules au cetuximab

Le cetuximab (C225, Erbitux®) (Merck Lipha Santé, Lyon, France) est utilisé à partir de solutions injectables à 2mg/mL. Suite à des essais préliminaires évaluant l'effet d'une gamme de doses de cetuximab (0,1 à 150 µg/mL) et la durée d'exposition (24h, 48h et 72h ) sur la viabilité cellulaire, les cellules Cal 27 ont été retenues pour leur sensibilité à la dose de 20 µg/mL mise en contact pendant 48h.

### 2- 3) Stimulation des cellules à l'EGF

Les cellules Cal 27 exposées au cetuximab sont co-incubées avec le facteur de croissance épidermoïde (E.Coli, human recombinant EGF : Roche Applied Science, Meylan, France). Ce co-traitement de l'EGF avec le cetuximab vise à évaluer l'effet de l'anticorps monoclonal sur les cellules dans un état stimulé. Le schéma d'exposition à l'EGF choisi consiste en un ajout de 5ng/mL (final), 4h après la mise en contact avec le cetuximab, pour une durée de 48h.

## 3- Méthodes

### 3- 1) Conditions de culture et de traitements

#### a. Entretien de la lignée en culture cellulaire

Les cellules Cal 27 sont des cellules adhérentes cultivées en monocouche dans des flacons à bouchons filtrants de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, Dutcher, France), contenant 15 mL de milieu de culture RPMI 1640 supplémenté par 10% de serum de veau fœtal et 2mM de L-glutamine (Gibco,

Invitrogen). Ainsi supplémenté, ce milieu est dit « complet ». Les flasques sont placées dans un incubateur (HeRa Cell) maintenant une température de 37°C et une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité.

L'entretien des lignées cellulaires se fait par ensemencement de façon hebdomadaire à la densité de 20 000 cellules/mL. Après rinçage au PBS (Gibco, Invitrogen), le tapis cellulaire est décollé du support par exposition à une solution de trypsine-EDTA à 0,05%, préalablement chauffée à 37°C (3mL). L'action de l'enzyme est arrêtée, après quelques minutes d'exposition à 37°C, par l'ajout de milieu de culture supplémenté en SVF (10ml). La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée (10 minutes à 10 000 rpm), puis le culot cellulaire est repris dans 10 mL de milieu. La concentration cellulaire est déterminée par numération des cellules vivantes dans une fraction de 450 µL, au moyen de l'addition de 50 µL de bleu trypan (Sigma, France). Le comptage est réalisé au sein d'une chambre de comptage de Thomas (Polylabo, VWR, Fontenay Sous Bois, France). Le milieu de culture est ensuite renouvelé une fois par semaine.

#### b. Préparation des cellules pour l'expérimentation

Les cellules sont ensemencées suite à la trypsination dans des plaques de 6 ou 24 puits selon le test que l'on cherche à appliquer (Falcon, Dutcher, France). La densité cellulaire d'ensemencement est adaptée de sorte que tous les traitements soient réalisés lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Soit pour des plaques de 6 puits (9,6 cm<sup>2</sup>), 80000 cellules et pour des plaques de 24 puits (1,9 cm<sup>2</sup>), 20000 cellules. Pour ensemencer la totalité des plaques, une unique suspension cellulaire est préparée dans le milieu RPMI complet et distribuée après homogénéisation. Les cellules sont maintenues 2 jours en culture avant les traitements.

#### c. Exposition des cellules au cetuximab et à l'EGF

Pour l'exposition des cellules au cetuximab, le milieu complet dans lequel sont cultivées les cellules est remplacé par le milieu contenant une dose de cetuximab pour une durée de 24 à 72h afin de déterminer le temps d'exposition optimal. Une dilution aux concentrations finales voulues (0,1 à 150 µg/mL) est préparée de façon extemporanée dans le milieu de culture RPMI supplémenté par 2% de SVF. L'EGF est ajouté directement dans le milieu de culture, 4 heures après le changement de milieu précédemment décrit, à raison de 10 µL (EGF 50 ng/mL) pour un puit de p24 contenant 1mL et 20µL pour un puit de p6 contenant 2mL (Jhawer M et al, 2008). Au final, les cellules sont exposées à 5 ng d'EGF / mL pendant 48h.

### 3- 2) Caractérisation moléculaire de la lignée cellulaire tumorale

#### a. Géotypage *KRAS*

Les mutations activatrices du gène *KRAS* sont désormais reconnues comme un marqueur prédictif de la résistance au cetuximab. Le statut *KRAS* des cellules Cal 27 et Cal 33 a donc été vérifié. La recherche de mutations activatrices de *KRAS* dans les codons 12 et 13 a été réalisée selon la technique de PCR-RFLP en deux étapes, décrite par Schimanski et al. en 1999 (Schimanski CC, 1999). Un culot de  $10^6$  cellules est préparé à partir d'une culture des cellules en T25. Ce culot de cellules est fixé dans l'Alcool Formolé Acétique (AFA) puis inclus en paraffine. L'ADN génomique est extrait à partir de 4 à 5 coupes de  $10\mu\text{m}$  au moyen d'un kit dédié à l'extraction d'ADN à partir de tissus inclus en paraffine (QIamp DNA FFPE Tissue, Qiagen, France). La quantité totale d'ADN ainsi obtenu est dosée par spectrométrie (Spectromètre Eppendorf) et 100 ng sont utilisés pour la première PCR (Master Cycler Gradient, Eppendorf, Germany). Celle-ci permet l'amplification grâce à l'utilisation des amorces Ras A (sens ; 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTCCATGGAGCT-3') et Ras B (antisens ; 5'-TTATCTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCA-3'). Les produits de PCR sont ensuite soumis à une digestion enzymatique de 16h avec les enzymes de restriction *Bst*XI ou *Xcm*I (Master Cycler Gradient, Eppendorf, Germany). Ainsi, si les codons 12 et 13 sont de type sauvage, les amplicons sont digérés au niveau des 2 premières bases. Les produits de la 1<sup>ère</sup> digestion sont utilisés pour une 2<sup>ème</sup> PCR dans laquelle l'amorce Ras B est remplacée par l'amorce Ras C (5'-GGATGGTCCTCCACCAGTAATATGGATATTA-3'). Une 2<sup>nde</sup> digestion est ensuite catalysée à partir de  $7\mu\text{L}$  de ces amplicons grâce aux enzymes *Bst*XI ou *Xcm*I. Ce produit final est soumis à une séparation en PAGE et marqué au bromure d'éthidium permettant l'analyse par lumière UV (Geldoc EQ, Bio-Rad). Des extraits d'ADN portant des mutations sur les codons 12 et 13, issus de lignées cellulaires, sont utilisés comme contrôle positif.

#### b. Fonctionnalité des voies de signalisation activées par EGFR

L'activation des voies de signalisation en aval d'EGFR a été vérifiée par l'analyse du niveau d'expression des principales phosphoprotéines des voies PI3K/AKT et MAPK : pAKT et pERK, par western blot et Bioplex phosphoprotein array (BPA).

#### ***Extraction des protéines***

À l'issue du protocole expérimental, le milieu de culture des cellules est recueilli. Après un rinçage au PBS, les cellules sont mises en contact durant 20 minutes à froid avec un tampon de lyse

(BioRad cell lysis kit, BioRad, Marnes-La-Coquette, France), complétement extemporanément avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Facteurs 1 et 2 du kit BioRad et PMSF). Le tapis cellulaire est gratté puis centrifugé à 4°C après prélèvement (5 minutes à 6000 rpm). Le surnageant ainsi obtenu est conservé à -80°C jusqu'à analyse.

Le dosage du contenu total en protéines dans le surnageant est réalisé sur le principe de la méthode de Lowry. (BCA protein (Bicinchoninic acid) assay kit, Pierce, Fisher Scientific, Illkirch, France).

### ***Western Blot***

La séparation des protéines par SDS-PAGE se fait sur une quantité de 5 µg de protéines totales. L'échantillon protéique, mélangé à un tampon contenant du SDS, du β mercapto-ethanol et du bleu de Laemmli, est dénaturé par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. Après dénaturation, la séparation des protéines est réalisée par migration électrophorétique à 110 volts pendant au moins 1h dans un gel à 10% de polyacrylamide suite au passage dans un gel de concentration à 5% de polyacrylamide grâce à l'application d'un courant 50 volts pendant 30 minutes. Les protéines ainsi séparées sont transférées sur membrane de PVDF (Amersham) par transfert liquide, grâce à un courant d'intensité constante de 0,35 mA pour deux gels. Sur la membrane, les sites de réaction aspécifiques aux anticorps sont bloqués par une incubation des membranes pendant une heure dans un tampon TBS-Tween 0,1% contenant 5% de lait écrémé ou de BSA. Les membranes sont ensuite mises sous agitation durant la nuit à 4°C dans les solutions d'anticorps spécifiques dilués (dans le même tampon que pour la saturation). Les types et dilutions des anticorps utilisés sont consignés dans le tableau I.1.

À l'issue de la réaction avec l'anticorps primaire, les membranes sont lavées à plusieurs reprises avec le tampon TBST 0,1%, puis mises en contact pour 1h avec les solutions d'anticorps secondaires (température ambiante) couplé à la peroxydase. La révélation est faite par chimiluminescence par immersion des membranes dans le réactif ECL (amersham) pendant une minute. Les membranes sont ensuite séchées et enfermées dans du papier saran avant une mise en contact avec des films photographiques (Amersham) pour une durée variable selon la protéine cible (de 0,5 à 10 minutes).

Tableau I.1 : Liste des Anticorps spécifiques et de leurs dilutions utilisés pour le western blot.

Type d'anticorps	Fournisseur	Dilution
Monoclonal de souris <b>anti-pEGFR</b>	Cell signaling technology n°2236	1/1000
Monoclonal de souris <b>anti-PTEN</b>	Dako M3627	1/1000
Polyclonal de lapin <b>anti-pAKT</b>	Cell signaling technology n°9271	1/1000
Monoclonal de souris <b>anti-pERK ½</b>	Cell signaling technology n°9106	1/1000
Polyclonal de lapin <b>anti-β-tubulin</b>	Santa-Cruz inc. sc. 9104	1/3000
Polyclonal de lapin <b>anti-EGFR</b>	Cell signaling technology n°2232	1/1000
Polyclonal de lapin <b>anti-AKT</b>	Cell signaling technology n° 9272	1/1000
Polyclonal de lapin <b>anti-ERK ½</b>	Cell signaling technology n°9101	1/1000

### ***Bioplex protein array***

Le Bioplex protein array (BPA) est une technique d'analyse de l'expression des protéines semi-quantitative qui repose sur le principe de l'ELISA sur billes, couplée à la technique de détection de la cytométrie en flux (Chergui F, Chrétien AS et al, 2009). Développé par Luminex (Oosterhout, Pays-Bas), ce principe de détection des protéines permet l'analyse simultanée de nombreuses protéines cibles (jusqu'à 100 théoriquement) sur des échantillons de quantité très réduite. L'anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt est couplé de façon covalente à une bille marquée par un fluorophore. Chaque bille a donc sa signature spectrale propre. Suite à l'incubation de l'échantillon avec le mélange contenant les billes, un anticorps biotinylé dirigé contre un épitope différent de la protéine est ajouté, réagissant avec la streptavidine-phycoérythrine. Ce système de « sandwich » permet une double détection : un laser excitant la fluorescence de la bille (635 nm) et l'autre excitant le complexe streptavidine-phycoérythrine (532 nm). La fluorescence de la bille couplée à l'anticorps assure l'identité de la cible, l'intensité de fluorescence de la streptavidine-phycoérythrine permet la quantification.

Les échantillons de protéines (5 µg) sont déposés en plaques de 96 puits et dilués dans une solution tamponnée (Assay buffer, Phosphoprotein reagent kit, Bio-Rad). Les billes couplées aux anticorps spécifiques sont fournies dans le kit de détermination des phosphoprotéines (Bio-Plex phosphoprotein assays, Bio-Rad) et ajoutées aux échantillons dilués, la réaction a lieu durant la nuit à 20°C. Après un rinçage, les plaques sont incubées avec la solution d'anticorps biotinylés sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. La solution de révélation contenant le complexe streptavidine-phycoérythrine est ajouté et mis en contact 10 minutes. L'analyse consiste ensuite à une double excitation fluorescente permettant de recueillir le signal de la bille et de quantifier la protéine cible via l'intensité de fluorescence de la phycoérythrine. Les résultats sont ainsi enregistrés en intensités de fluorescence, rapportées à celle du contrôle positif qui est un extrait protéique standard (Extrait de protéines préparé à partir de cellules de carcinome mammaire MCF7) ajouté à chaque série.

### 3- 2) Evaluation de l'effet du cetuximab

#### a. Effet sur l'activation des voies de signalisation intracellulaire

L'inhibition des voies de signalisation par l'action du cetuximab est évaluée au moyen des mêmes méthodes d'analyse de l'expression des phosphoprotéines suite à 48 heures d'exposition des cellules au cetuximab. (Cf Partie I, § 3-1) b).

#### b. Effet sur la répartition dans les phases du cycle cellulaire

Le cetuximab est décrit comme un cytostatique pouvant bloquer le cycle cellulaire en phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>. Cet aspect de l'effet du cetuximab a donc été analysé à l'aide de la technique de cytométrie en flux, qui permet, par la mesure de contenu cellulaire en ADN suite à son marquage par un agent intercalant de l'ADN fluorescent, de déterminer les proportions de cellules dans chacune des phases du cycle au sein d'une population cellulaire.

Pour ce faire, les cellules sont collectées suite aux 48h d'exposition au cetuximab (20µg/mL) par trypsination (500µL par puits de p6) après un lavage au PBS. Les cellules sont dénombrées et lavées au PBS pour éliminer la trypsine, puis centrifugées comme indiqué précédemment (§2-1) b) avant d'être fixées par la reprise du culot cellulaire dans l'éthanol 70% à -20°C. La suspension cellulaire est conservée dans l'éthanol, à 4°C jusqu'à l'analyse. Avant le marquage, les cellules subissent de nouveau deux lavages au PBS, suivis de centrifugations. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans une solution à base de triton contenant 1mg/mL d'iodure de propidium (Molecular Probes, Invitroge, Cergy-Pontoise, France), ainsi que de la RNase A (10µg/mL). Le

triton est un détergent capable de perméabiliser les cellules, ce qui permet à l'iodure de propidium d'accéder à l'ADN. Cette molécule est fluorescente à 488 nm. La dégradation des ARN assure une mesure du contenu en ADN et non pas en ribonucléotides. Cette suspension cellulaire est laissée à température ambiante pendant 30 minutes pour permettre le marquage, avant d'être analysée par cytométrie en flux.

Les résultats sont recueillis sur au moins 10000 évènements au moyen du cytomètre en flux FACScalibur (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Les données de fluorescence liée à l'ADN sont acquises selon un mode linéaire en utilisant une fenêtre d'exclusion des doublets. La distribution des cellules dans le cycle est quantifiée au moyen du logiciel ModFit (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

#### c. Effet sur la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire des Cal 27 est évaluée par un test MTT. Celui-ci repose sur la capacité des cellules vivantes à métaboliser le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (Sigma). De couleur jaune pâle, le MTT est transformé, sous l'action enzymatique de la succinate déshydrogénase mitochondriale, en cristaux de formazan de couleur bleue/violette. L'intensité de la coloration bleue reflète donc la viabilité cellulaire.

Le test est réalisé sur le tapis de cellulesensemencé en plaques de 24 puits suite à 48 heures d'exposition au cetuximab. Le MTT est ajouté directement au milieu de culture pour que la concentration finale soit de 0,5mg/mL. La réaction se fait pendant 2h à 37°C. Puis le milieu est ôté et le tapis cellulaire lysé par l'ajout de 400µl de DMSO qui permet également la solubilisation des cristaux de formazan ; 150µL de soluté sont transférés en plaque de 96 puits afin de réaliser la lecture de l'absorbance à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan Ascent, Thermo Scientific, Gometz-Le-Chatel, France). Le blanc est mesuré sur 4 puits ne contenant que du DMSO.

#### d. Effet sur la prolifération cellulaire

Le taux de prolifération cellulaire est évaluée par une numération cellulaire au bleu trypan. Le comptage est réalisé à l'issue de l'exposition au cetuximab. Les cellules d'un puit de p6 sont détachées par l'incubation de 250 µL de trypsine-EDTA (0,05%, Sigma) pendant 7 minutes à 37°C. L'activité de la trypsine est stoppée par l'ajout d'1 mL de milieu complet. Après homogénéisation et dissociation des agrégats cellulaires, un volume de 450 µL est prélevé et mis en présence de bleu trypan 0,4% (Trypan blue, Gibco Invitrogen) afin d'exclure du comptage les cellules mortes. La numération est réalisée par un double comptage en hématimètre de Malassez à champs doubles dont le résultat est rapporté en moyenne.

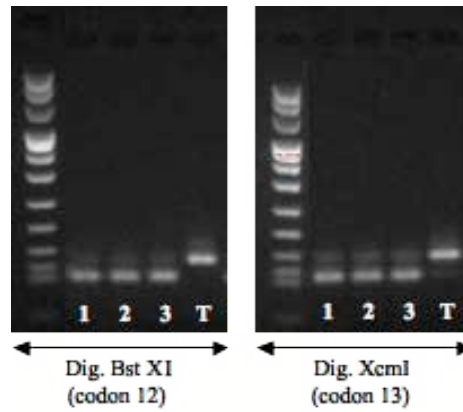


Figure I.1 : Recherche des mutations activatrices de *KRAS* dans les lignées cellulaires de carcinome épidermoïde de la tête et du cou. Gel d'agarose chargé avec les produits de la PCR-RFLP. Des lignées cellulaires mutées dans le codon 12 et le codon 13 sont utilisées comme témoin positif (T). Cal 27 (1), FaDu (2) et Cal 33 (3) ne sont pas mutées dans les codons 12 et 13 de *KRAS*.

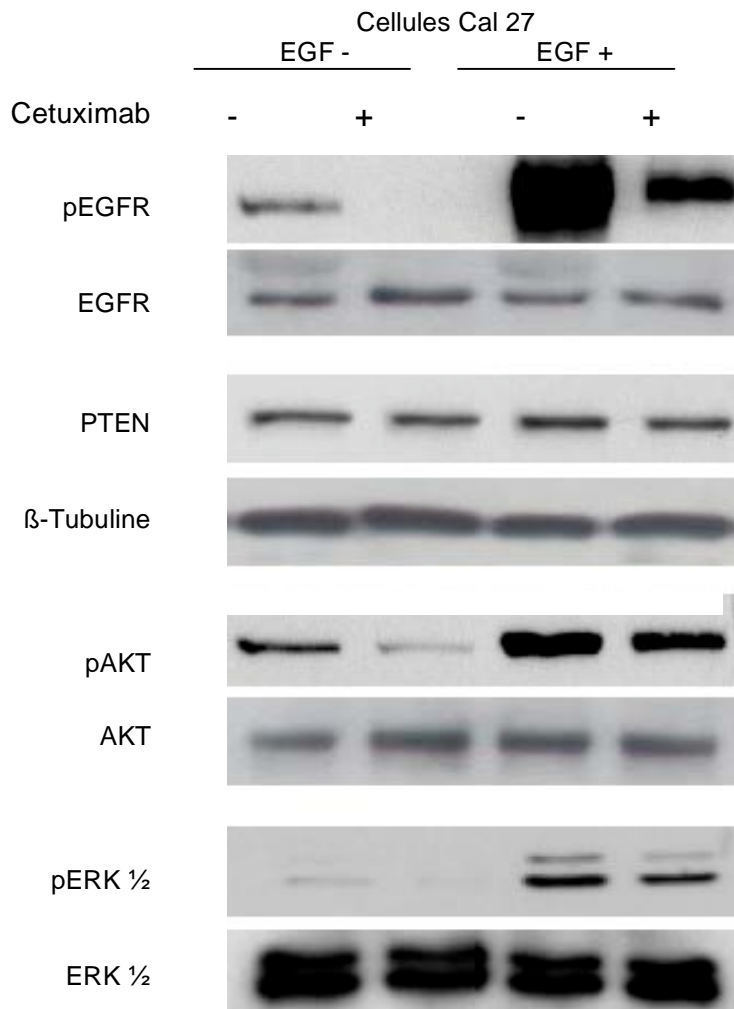


Figure I.2 : Expression des protéines des voies de signalisation activées par EGFR dans les cellules Cal 27, évaluée par western blot. Les extraits protéiques sont réalisés sur les cellules 48h après l'exposition au cetuximab (20 $\mu$ g/mL) et à l'EGF (5ng/mL). L'expression des protéines est recherchée par western blot par utilisation des anticorps spécifiques présentés dans le tableau I.1.



## 4- Résultats

### 4- 1) Caractérisation moléculaire de la lignée

#### a. Statut *KRAS*

Les mutations activatrices de *RAS* sont pour la plupart localisées dans les codons 12 et 13 de l'allèle. Le polymorphisme peut être recherché par différentes méthodes de biologie moléculaire. Ici la PCR-RFLP en deux étapes permet d'observer le polymorphisme au moyen de la différence de tailles entre fragments produits par les enzymes de restriction. Il s'agit de *Bst*XI et *Xcm*I pour la recherche de mutations dans les codons 12 et 13 de *KRAS*.

Aucune des trois lignées cellulaires issues de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou testées ne montrent de modification dans la longueur des fragments générés par la digestion des codons 12 et 13 (Figure I.1). Des extraits d'ADN de cellules porteuses de mutations sont utilisées comme témoin. Les produits d'amplification suite à la digestion sont soumis à une migration sur gel de polyacrylamide, la différence de taille des fragments des cellules des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou avec ceux des cellules témoin atteste de leur statut *KRAS* sauvage.

#### b. Voies de signalisation

Les cellules Cal 27 ne montrent pas de déficience pour l'expression de PTEN et un niveau basal (en absence de stimulation) de pEGFR, pAKT et pERK  $\frac{1}{2}$  est détecté du fait de la présence de facteurs de croissance dans le milieu de culture. Cependant, dans cet état basal, la voie des PI3K/AKT semble être plus active que la voie des MAP Kinases (Figure I.2, Cal 27, 1<sup>ère</sup> colonne). Les cellules Cal 27 répondent à la stimulation de l'EGF par l'augmentation massive du niveau de pEGFR détecté. La phosphorylation d'AKT et ERK  $\frac{1}{2}$  qui s'ensuit est clairement augmentée par le ligand. Mais la stimulation des voies de signalisation est de moindre ampleur que celle du récepteur, suggérant l'effet régulateur de PTEN sur l'activation d'AKT et ERK  $\frac{1}{2}$  dans ces cellules (Figure I.2, 3<sup>ème</sup> colonne). L'absence de variation dans l'expression de PTEN et des protéines non phosphorylées permet d'affirmer que les cellules Cal 27 sont sensibles à l'EGF qui induit l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK (Figure 2).

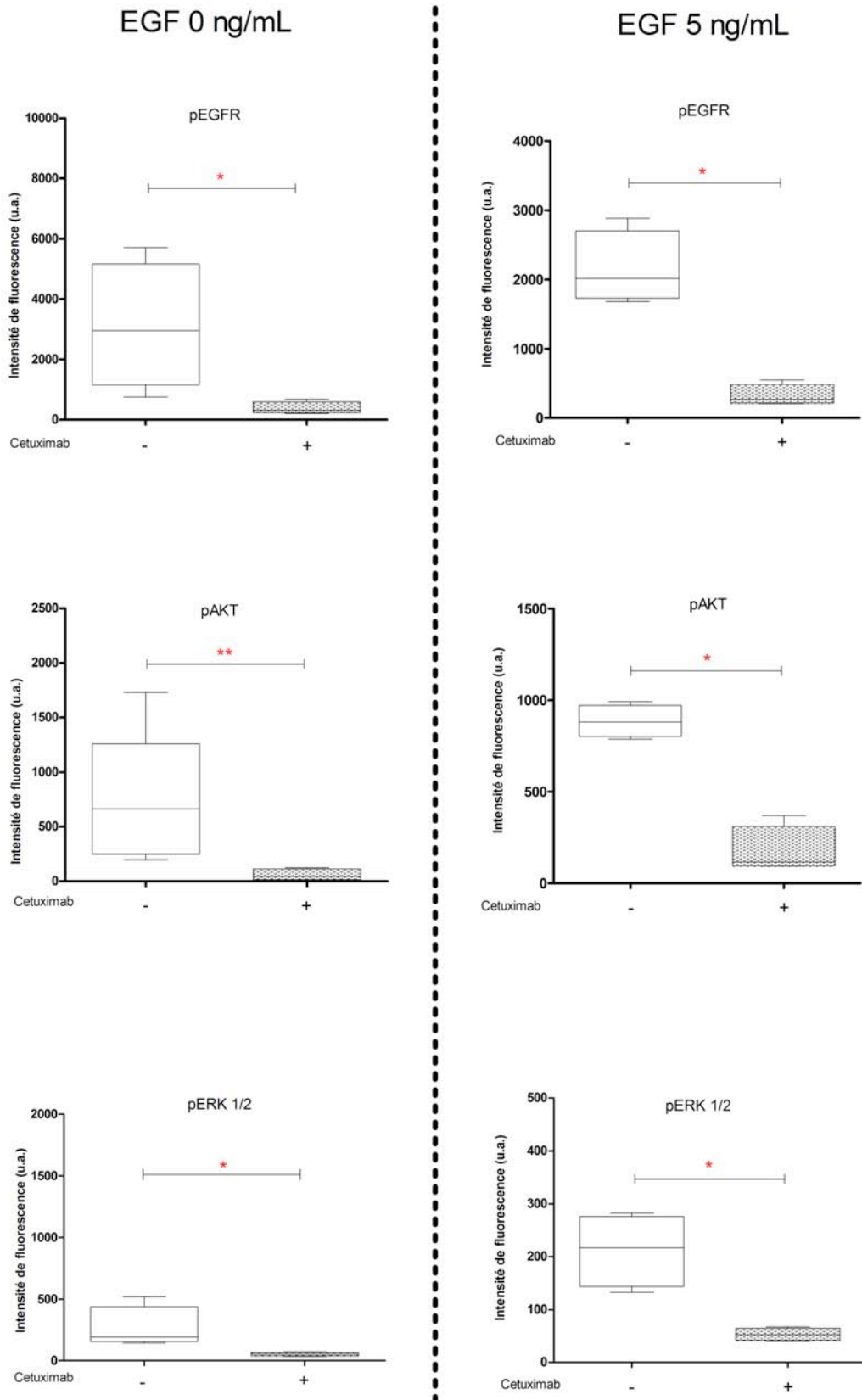


Figure I.3 : Mesure semie-quantitative de l'effet du cetuximab sur pEGFR, pAKT et pERK par Bioplex Protein Array. Les niveaux d'expression sont présentés en intensité de fluorescence médiane (d'au moins 3 expériences indépendantes  $\pm$  écarts moyens). Les extraits protéiques sont identiques à ceux utilisés pour le western blot. \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$ .

#### 4- 2) Evaluation de l'effet du cetuximab

##### a. Sur les voies de signalisation intracellulaire

Le premier mode d'action du cetuximab étant l'inhibition de la phosphorylation d'EGFR et la phosphorylation subséquente des protéines des voies de signalisation, cet effet du cetuximab a été analysé par western blot. Afin de quantifier de façon plus précise cet effet, la technique de Bioplex Protein Array a également été utilisée (BPA).

Analysée par western blot, l'efficacité du cetuximab à empêcher l'activation du récepteur à l'EGF et des voies de signalisation est sans équivoque. En effet l'expression basale de pEGFR et pERK ½ est supprimée : elle n'est plus détectée dans les lysats protéiques des cellules exposées 48h au cetuximab. L'expression basale de pAKT quant à elle, est très fortement diminuée également quoique pas supprimée (Figure I.2, 2<sup>ème</sup> colonne vs 1<sup>ère</sup>). Aucune modification dans les niveaux d'expression des protéines non phosphorylées n'est détectée (Figure I.2).

Selon la technique semie-quantitative de mesure de l'intensité de fluorescence par BPA, l'inhibition de pEGFR par le cetuximab est évaluée à 90%. De la même façon, l'inhibition d'expression de pAKT est de 93% et de 71% pour pERK ½ (Figure I.3).

Le cetuximab est également capable d'inhiber l'activation de pEGFR, pAKT et pERK ½ induite par l'EGF. Le western blot montre nettement la diminution d'expression de pEGFR et dans une moindre mesure, celles de pAKT et pERK. La quantification au moyen du BPA laisse moins de doute, l'activation de pEGFR étant diminuée de 88%, celle de pAKT de 87% et pERK est inhibée à 73%.

Le niveau d'expression des protéines totales (non phosphorylées) ne subit aucune modification suite à l'exposition des cellules Cal 27 au cetuximab.

##### b. Effet sur la répartition dans les phases du cycle cellulaire

La capacité du cetuximab à induire un blocage en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> a été documentée dans diverses lignées cellulaires, faisant du cetuximab un cytostatique. La croissance cellulaire des Cal 27 étant significativement diminuée par l'exposition au cetuximab, la répartition de la population distribution dans les phases du cycle cellulaire a été vérifiée par mesure du contenu en ADN au moyen de la cytométrie de flux. L'arrêt du cycle cellulaire étant un événement précoce de l'inhibition de la croissance cellulaire, l'effet du cetuximab a été recherché à 24h de traitement contrairement à la viabilité et à la numération cellulaire.

Les cellules exposées au cetuximab sont significativement plus nombreuses dans la phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> que les cellules non-traitées (11,2%). Cette augmentation est accompagnée d'une diminution de la

proportion de cellules en phase S sans que la phase G<sub>2</sub>M ne soit affectée (Tableau I.2). Le cetuximab induit donc une accumulation des cellules en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> qui pourrait être un blocage.

Tableau I.2 : Effet du cetuximab sur la distribution des Cal 27 dans le cycle cellulaire suite à la stimulation à l'EGF.

Les cellules exposées ou non au cetuximab (20µg/mL) et à l'EGF (50ng/mL) pendant 24h sont incubées avec l'iodure de propidium. L'analyse du contenu en ADN est réalisée par cytométrie en flux puis la proportion des cellules dans chaque phase du cycle est calculée par le logiciel ModFit. Les résultats présentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes ± écarts moyens.

*Effet du cetuximab : Cellules non traitées versus cellules traitées \*: P < 0,05 et \*\*: P < 0,01.*

#### Distribution dans le cycle cellulaire (%)

	<i>EGF</i>			
	-	+	-	+
<i>Cetuximab</i>	-	+	-	+
<b>G<sub>0</sub>G<sub>1</sub></b>	69,6 ± 3,2	80,8 ± 4,4**	59,4 ± 1,4	59,0 ± 2,0
<b>S</b>	17,8 ± 3,2	7,3 ± 1,3**	20,8 ± 2,0	24,1 ± 4,5
<b>G<sub>2</sub>M</b>	14,5 ± 2,9	13,9 ± 4,0	17,2 ± 3,1	20,6 ± 2,8

La distribution des Cal 27 stimulée par l'EGF dans le cycle cellulaire n'est pas significativement différentes de celles des cellules non stimulées, si les phases sont comparées une à une (Tableau I.2). En revanche, la comparaison du pourcentage additionné des cellules en phase G<sub>2</sub>M et en phase S montre que la stimulation par l'EGF augmente de 13,9% la proportion de cellules dans les phases du cycle cellulaire liées à la prolifération.

La distribution des cellules exposées à l'EGF dans le cycle cellulaire n'est pas modifiée suite à l'exposition au cetuximab.

Cependant, il est pertinent de souligner que la cytométrie en flux n'a montré la présence de pic sub-G<sub>1</sub> dans aucune des conditions expérimentales, comme le montre les histogrammes présentés en figure 4, et ce même lorsque le blocage en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> est observé. Cette observation suggère l'absence de phénomène apoptotique lié à l'exposition des cellules Cal 27 au cetuximab.

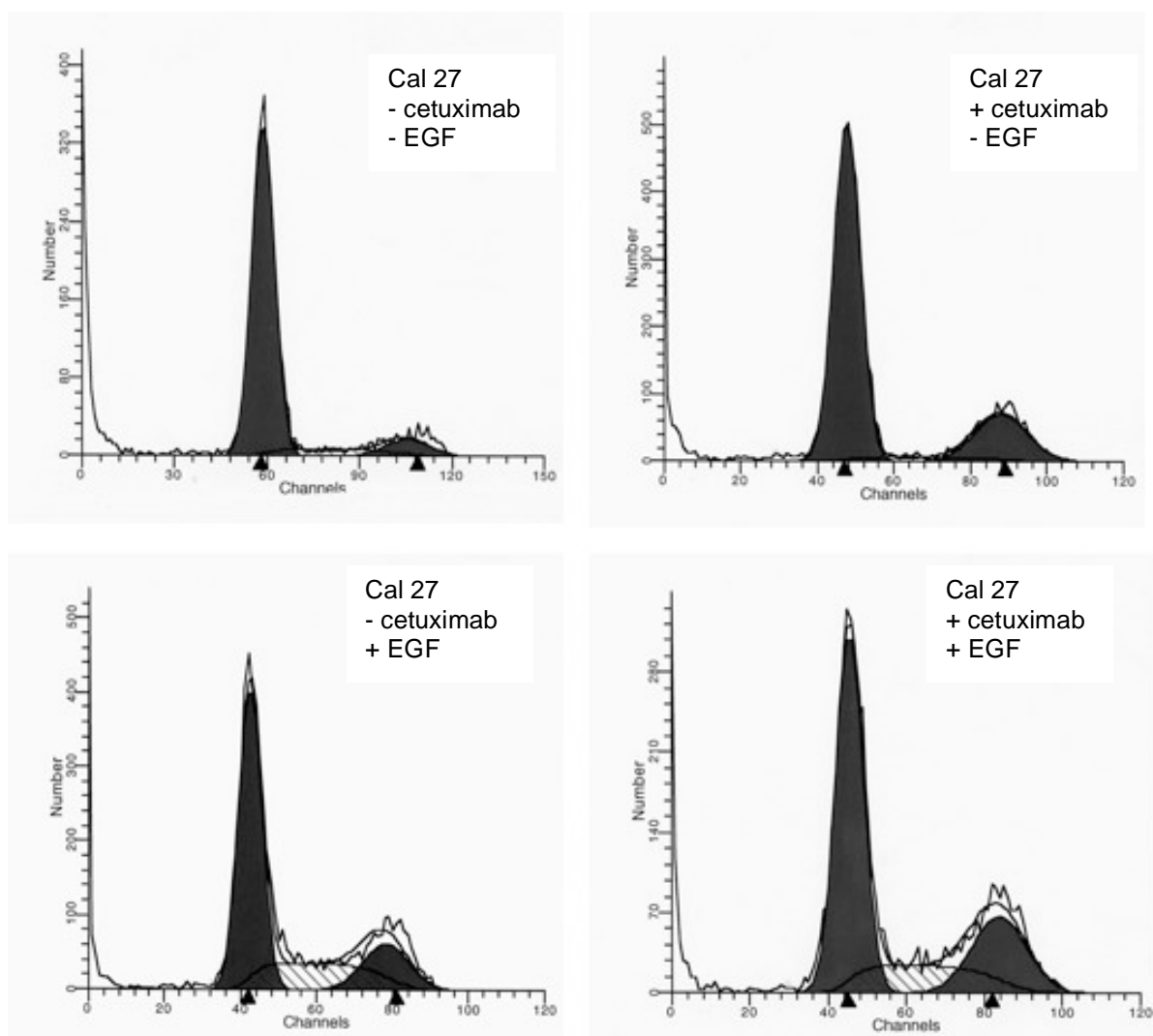


Figure I.4 : Histogrammes représentatifs de la distribution des cellules Cal 27 dans le cycle cellulaire. Les cellules exposées ou non au cetuximab (20 $\mu$ g/mL) et à l'EGF (50ng/mL) pendant 24h sont incubées avec l'iodure de propidium. L'analyse du contenu en ADN est réalisée par cytométrie en flux puis la proportion des cellules dans chaque phase du cycle est calculée par le logiciel ModFit. Les résultats présentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendants  $\pm$  écarts moyens.

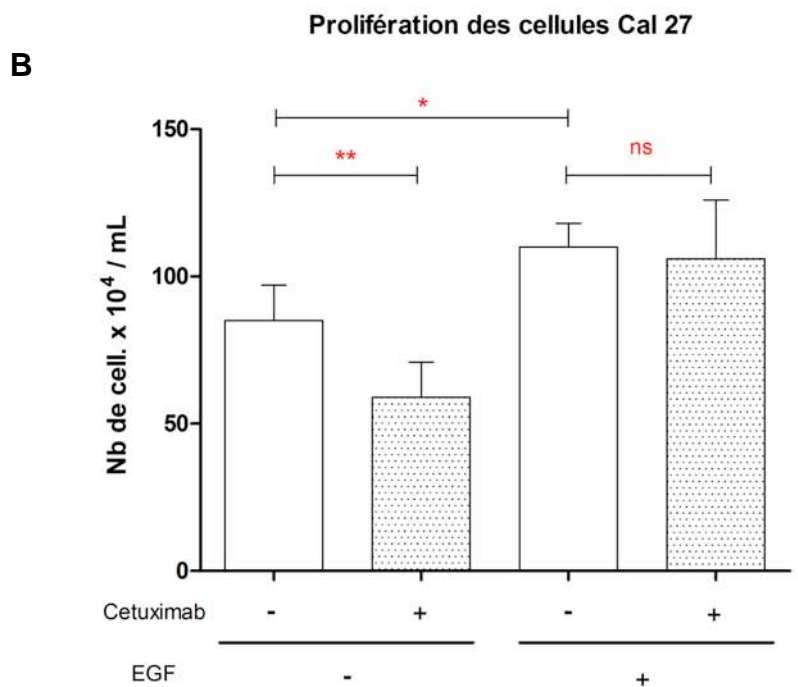
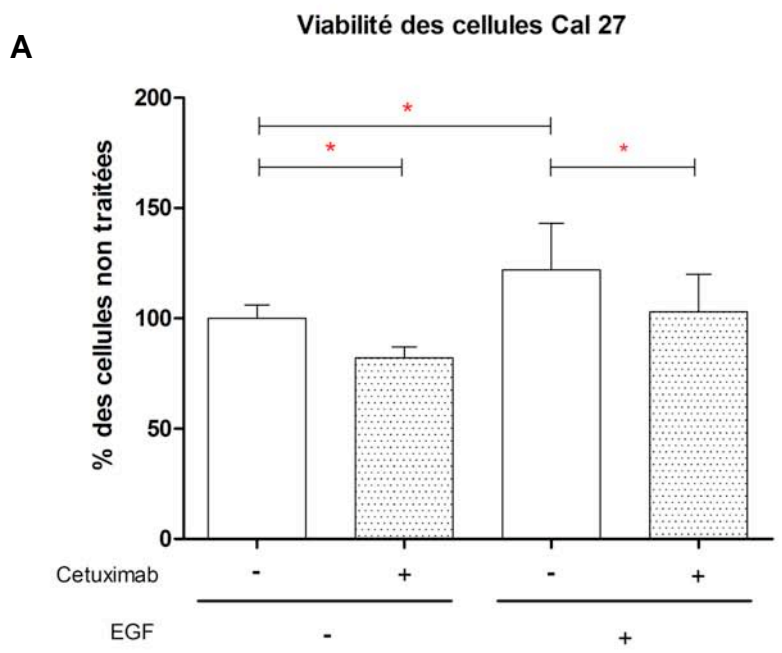


Figure I.5 : Effet du cetuximab et de l'EGF sur la viabilité et le nombre de cellules Cal 27. Les cellules sont exposées pendant 48h au cetuximab (20µg/mL) et à l'EGF (5ng/mL). La viabilité cellulaire (A) est évaluée par test MTT et l'absorbance est rapportée à celle du témoin non traité. Le nombre de cellules (B), reflétant le taux de prolifération, est déterminé par un test d'exclusion au bleu trypan. Les valeurs représentent la moyenne ± écarts moyens (d'au moins 3 expériences indépendantes) \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$ .

### c. Sur la croissance cellulaire

L'effet du cetuximab sur la croissance cellulaire des Cal 27 a été évalué par mesure de la viabilité au moyen d'un test MTT et par la mesure du taux de prolifération au moyen d'une numération cellulaire au bleu trypan.

Suite à une exposition de 48h au cetuximab, la viabilité cellulaire des Cal 27 est diminuée de 18% (Figure I.5A,  $P < 0,05$ ). La prolifération est également altérée puisque le nombre de cellules est réduit de 31% suite à cette exposition (Figure I.5B,  $P < 0,01$ ). Bien que la stimulation des voies de signalisation par l'EGF a pour conséquence une augmentation significative de la viabilité et du nombre de cellules (22 et 29% respectivement), l'effet du cetuximab reste significatif et la diminution de la viabilité cellulaire qu'il induit est du même ordre que dans les cellules non stimulées ( $P = 0,01$ ). Dans ce cas cependant, le taux de prolifération cellulaire induite par l'EGF ne semble pas sensible au cetuximab. En effet, le nombre de cellules n'est pas réduit, contrairement à la viabilité, ce qui peut être lié à l'absence de modification dans le cycle cellulaire décrit ci-dessus.

## 5- Discussion

Les cellules Cal 27 expriment un niveau basal de pEGFR, pAKT et pERK  $\frac{1}{2}$  et répondent à une stimulation à l'EGF. Cette expression des protéines phosphorylées répond à la présence de facteurs de croissance dans le milieu de culture complet, contenant 10% de SVF.

Dans cet état basal, le niveau d'expression de pAKT est cependant plus important que le niveau basal de pERK  $\frac{1}{2}$ . Par ailleurs le western blot montre que le cetuximab, suite à l'abrogation de l'expression de pEGFR, provoque la suppression de pERK  $\frac{1}{2}$  mais pas de pAKT. Ces observations suggèrent donc que dans les cellules Cal 27, l'activation de la voie des MAP Kinases est plus dépendante de l'activation d'EGFR que l'activité d'AKT. Cette protéine kinase, située très en amont dans les mécanismes de signalisation intracellulaire est responsable de l'intégration de divers signaux provenant de récepteurs des facteurs de croissance différents. Il est fort probable que le niveau basal de pAKT et son niveau résiduel suite à l'inhibition du récepteur à l'EGF par le cetuximab résultent de l'activité d'autres récepteurs tyrosines kinases stimulés par le serum de veau foetal. Parmi ceux-ci, l'IGF1-R semble jouer un rôle dans la tumorigenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. *In vitro* sa surexpression a été documentée (Barnes CJ et al, 2007) et récemment, son expression est également détectée *in situ*, dans des carcinomes oropharyngés non différenciés (Friedrich RE et al, 2010).

Les résultats de western blot et la quantification par BPA présentent de légères divergences : le BPA montre une diminution de l'expression de pEGFR et pERK suite à l'exposition des cellules Cal 27 au cetuximab alors que le western blot ne détecte plus leur expression. Ces divergences tiennent très probablement à une différence de sensibilité, le BPA pouvant révéler des variations plus fines que le western blot.

L'inhibition des voies de signalisation dépendantes d'EGFR par le cetuximab a l'effet attendu sur la croissance cellulaire des Cal 27. La viabilité cellulaire et le nombre de cellules sont diminués dans une proportion de 20%. Cet effet modéré, n'est pas sans rappeler le taux de réponse des patients atteints de tumeurs épidermoïdes de la tête et du cou, qui est modeste lorsque le cetuximab est utilisé en monothérapie (Cohen EE, 2006). Les résultats obtenus sur l'inhibition de la croissance cellulaire des Cal 27 par le cetuximab sont par ailleurs concordants avec ceux obtenus *in vitro* dans certaines études (Huang SM et al, 1999), ce qui fait de la lignée cellulaire un bon modèle d'étude.

L'EGF a un effet activateur important dans les cellules Cal 27, non seulement sur le plan moléculaire mais également en termes de croissance cellulaire puisque la viabilité est significativement augmentée. Par ailleurs, la stimulation de pAKT et pERK ½ de moindre mesure que celle observée sur l'expression massive de pEGFR laisse supposer que dans ces cellules, l'expression de PTEN assure une régulation efficace. Le cetuximab garde cependant dans ce contexte le même effet cytostatique que sur les cellules non stimulées.

En revanche, l'exposition au cetuximab des cellules stimulées par l'EGF ne produit pas une diminution significative du nombre de cellules, suggérant que le taux de prolifération des cellules est maintenu après 48h de traitement au cetuximab, ce qui est en lien avec les résultats obtenus suite à l'analyse du cycle cellulaire. Cet argument est également soutenu par le niveau d'expression des protéines des voies de signalisation stimulé par l'EGF qui reste important malgré le traitement au cetuximab. Notamment l'expression de pERK ½ qui n'est pas détectée dans les Cal 27 à l'état basal mais montre une forte activation par l'EGF. Bien que celui-ci subisse une diminution suite à l'inhibition de l'activation d'EGFR due à l'exposition au cetuximab, le niveau d'expression de pERK ½ dans les cellules stimulées est encore important, bien supérieur à ce qui est trouvé dans les cellules à l'état basal. La voie des MAPK semble donc toujours activée, pouvant expliquer que le cetuximab n'empêche pas la prolifération des cellules Cal 27 stimulées à l'EGF dans nos conditions expérimentales.



Néanmoins, la dose et la durée du traitement au cetuximab, utilisées pour mener ces expériences (et les autres exposées par la suite dans ce rapport) ont été choisies et fixées suite à la réalisation de gammes de dose-réponse sur les Cal 27 en absence de stimulation à l'EGF. Aussi, en présence d'une forte concentration d'EGF, le manque de réponse au cetuximab observé par la mesure de la prolifération cellulaire pourrait traduire l'inadéquation des conditions de traitement. Le temps de doublement des Cal 27 étant de 24 heures, il est également possible que les effets du cetuximab mesurés en présence d'EGF se manifestent au delà des 48h choisies dans le plan expérimental, le cetuximab étant décrit comme un cytostatique plus qu'un cytotoxique.

De façon intéressante, l'analyse du cycle cellulaire n'a révélé la présence d'un pic sub-G1 dans aucune des conditions expérimentales présentées. Ce résultat indique que les phénomènes apoptotiques décrits dans la littérature comme une conséquence de l'exposition cellulaire au cetuximab n'ont pas été mis en place ici (Cf. Introduction, partie II.5-3) a.), participant également au maintien du nombre de cellules à l'issue des 48h de traitement. L'apoptose induite par le cetuximab semble lignée cellulaire-dépendante et n'est pas systématiquement observée, les cellules Cal 27 répondent donc à l'effet cytostatique du cetuximab.

En complément, l'analyse des protéines non phosphorylées atteste que le turnover des protéines étudiées n'est pas modifié par le traitement au cetuximab ou la stimulation par l'EGF. Pourtant la régulation négative d'EGFR totale par le cetuximab a été décrite par ailleurs ([Jimeno A et al, 2005](#), [Fan Z et al, 1994](#)).

Tous ces résultats montrent donc que la lignée cellulaire Cal 27 est sensible au cetuximab, dans une proportion qui reflète ce qui peut être observé en situation de monothérapie des tumeurs de la tête et du cou. L'activation des voies PI3K/AKT et MAPK s'avère jouer un rôle important dans la croissance de ces cellules dans lesquelles PTEN est exprimé où il semble exercer son action de régulation.

## **PARTIE II :**

Rôle de PTEN dans la croissance cellulaire et la  
réponse au cetuximab des cellules Cal 27

## 1- Introduction

La première partie expérimentale de ce travail montre que les cellules Cal 27 constituent un modèle pertinent pour évaluer l'effet du cetuximab dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ; la croissance de cette lignée cellulaire étant sensible au cetuximab, et les voies de signalisation à la stimulation par EGF. Dans divers types tumoraux, il a été montré que la perte d'expression de PTEN est associée à une perte d'efficacité des thérapies anti-EGFR, par un phénomène de découplage entre l'activité des voies de signalisation et le récepteur (She QB et al, 2003, Frattini M et al, 2007, Bouali S et al, 2009).

La perte d'expression de la protéine PTEN est un évènement relativement fréquent dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, de même que les altérations qui conduisent à une activation constitutive des voies PI3K/AKT et MAPK. Le cetuximab, utilisé en monothérapie contre ce type de tumeurs, ne montre que de modestes effets (Cohen EE, 2006). Il semble cependant qu'aucune étude n'ait été menée pour préciser le rôle de la perte d'expression de PTEN dans la résistance des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou au cetuximab.

Parmi les lignées cellulaires établies comme modèle de ce type tumoral, et contrairement à celles utilisées expérimentalement pour l'étude de tumeurs de la prostate, du poumon non à petite cellule ou du sein, aucun modèle de carcinome épidermoïde de la tête et du cou comportant un phénotype PTEN déficient n'est disponible.

Aussi, dans le but d'évaluer l'impact de la perte d'expression dans la réponse au cetuximab, nous avons mis au point un modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou déficient pour PTEN, au moyen d'un silencing spécifique par ARN interférence. Cet outil assure à la fois une grande spécificité et une grande efficacité mais également une perte de fonction au niveau protéique. Dans un premier temps, le rôle de PTEN dans la réponse des Cal 27 au cetuximab a été étudié grâce à la mise en place d'un silencing transitoire. Ce caractère transitoire permet d'observer les évènements moléculaires qui sont la conséquence immédiate de la perte d'expression de la protéine PTEN. Mais pour mettre en place des protocoles expérimentaux qui s'inscrivent à plus long terme, et fournir un modèle transposable à l'étude *in vivo*, un silencing durable a ensuite été établi par transfection des cellules Cal 27 d'un plasmide codant pour un shRNA.

## 2- Matériel

### 2- 1) Lignées cellulaires

L'étude du rôle de PTEN dans la réponse au cetuximab est réalisée dans les cellules Cal 27, entretenues et ensemencées comme précédemment décrit (Partie I, 2-1)a). En ce qui concerne la validation du silencing par ARN interférence, les cellules Cal 33 ont également été utilisées, afin de vérifier l'efficacité de transfection.

### 2- 2) Silencing transitoire de PTEN

Le silencing transitoire de PTEN a été réalisé par transfection de siRNA : small interfering RNA. Il s'agit de séquences d'ARN qui induisent le mécanisme « d'interférence » qui conduit à la dégradation de l'ARN messager cible suite à la formation d'un duplex d'ARN par complémentarité de séquence. Ce phénomène naturel est un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle, qui a d'abord été caractérisé chez les plantes dans les années 1990. Comme de nombreuses découvertes fortuites dans l'histoire des Sciences, le processus d'ARN interférence se révèle être une avancée majeure et un outil de choix pour les biologistes. Cette découverte a été récompensée en 2006 par un prix Nobel de Physiologie et Médecine, attribué à Andrew Z. Fire et Craig C. Mello. Ils ont en effet montré que l'introduction d'un ARN double brin dans les cellules de *Caenorhabditis Elegans* avait pour effet la réduction de l'expression de certaines protéines de façon spécifique (Fire A et al, 1998).

En revanche, chez les mammifères, l'introduction d'ARN dans les cellules était connue pour induire une réaction antivirale de type interféron qui provoque une dégradation d'ARN messagers de façon non spécifique afin de bloquer la réplication virale. Une étude de 2001 montre cependant l'existence du mécanisme de silencing par ARN interférence chez les mammifères, définie par sa spécificité, dépendante de la taille des ARN introduits. Ces séquences d'ARN de moins de 25 nucléotides sont appelés « small interfering RNA » (Elbashir S et al, 2001).

Les travaux postérieurs définissent plus en détail le mode d'action des siRNA. Les groupes de recherche mettent en évidence que les ARN doubles brins produits de façon endogène par la cellule (dits shRNA pour leur conformation en épingle à cheveux) sont reconnus et clivés en petits ARN par la protéine Dicer, formant ces duplex de 20 à 25 paires de bases qui sont responsables du mécanisme d'ARN interférence. L'enzyme Dicer permet par ailleurs une interaction avec le complexe RISC (RNA induced silencing complex) par reconnaissance de domaines homologues

(argonaute). Au sein de ce complexe nucleoprotéique, le brin d'ARN dit « passager » est éliminé, tandis que le brin dit « guide » est conduit vers les ARN messagers dont il est complémentaire. Un nouveau duplex d'ARN est ainsi généré et découpé par les endonucléases composant le complexe RISC. La dégradation des ARNm qui s'ensuit, assure l'inhibition d'expression de la protéine de façon spécifique.

#### a. Séquences oligonucléotidique de siRNA

L'ARN interférence est induite dans les cellules Cal 27 et Cal 33 par introduction directe des petits ARN doubles brins, dont la séquence est complémentaire avec l'ARN messenger de la protéine cible : PTEN. Les séquences utilisées ont ainsi été synthétisées à partir de la séquence de l'ADN complémentaire de PTEN (PubMed NM n°000314). Cinq séquences différentes ont été élaborées (Eurogentec, Seraing, Belgique) puis testées sur les cellules Cal 27 et Cal 33. Leurs compositions sont détaillées dans le tableau suivant. Les ARN sont fournis sous forme hybridée et lyophilisée. L'ajout de 662,5 µL d'eau RNase free permet d'obtenir une solution de 100 µM d'ARN. Cette solution est aliquotée et conservée à -20°C pour une durée n'excédant pas 6 mois, la solution mère est conservée à -80°C.

Tableau II.1 : Composition en oligonucléotides des séquences de siRNA testées pour le silencing de PTEN. C : Cytidine. A : Adénosine. U : Uridine. G : Guanine.

Désignation	Séquence 5' vers 3'
SiPTEN 1	CAG CCA UCA UCA AAG AGA U
SiPTEN 2	GCU ACC UGU UAA AGA AUC A
SiPTEN 3	GGC UAG CAG UUC AAC UUC U
SiPTEN 4	CAG GAA CAA UAU UGA UGA U
SiPTEN 5	CAA UCA UGU UGC AGC AAU U

#### b. Transfection transitoire

L'agent de transfection utilisé est un polycation élaboré pour la transfection d'ARN interférants (INTERFERin™, PolyPlus Transfection). La quantité utilisée est déterminée par un index à la concentration de siRNA afin de respecter un rapport de charges adéquat entre nucléotides et cations.

(SENS) 5'- Site *Bam*HI – ADN codant – boucle – ADN codant – poly T – Site *Xba*I – 3'

(ANTISENS) 3'- ADN complémentaire – boucle – ADN complémentaire – poly A – Site *Xba*I – Site *Eco*R1-5'

5'- GATCCG - GCT ACC TGT TAA AGA ATC A – TTCAAGAGA – T GAT TCT TTA ACA GGT AGC C –  
TTTTTT – CTA GAG – 3'

3' – GC CGA TGG ACA ATT TCT TAG T – AAGTTCTCT – A CTA AGA AAT TGT CCA TCG G– AAAAAA –  
AGA TCT – CTT AAG - 5'

Figure II.1 : Schématisation et composition en oligonucléotides de la structure de la séquence codant pour le shRNA dirigé contre PTEN.

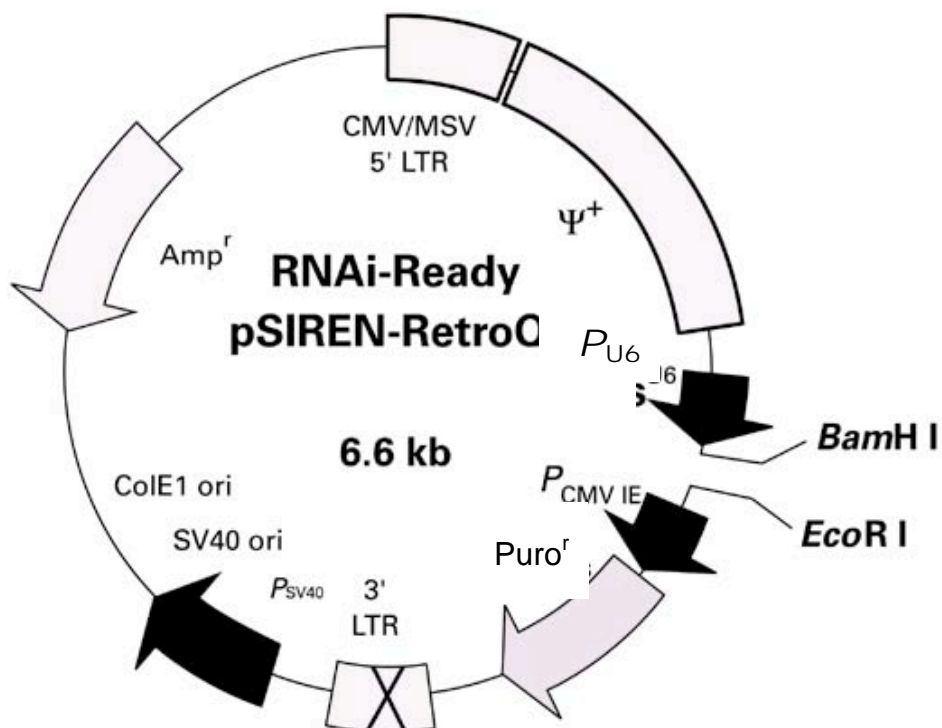


Figure II.2 : Représentation de la carte du plasmide RNAi-Ready pSIREN-RetroQ.

## 2- 3) Silencing stable

Le silencing durable de PTEN a été instauré dans les cellules Cal 27 par l'expression d'un plasmide codant pour la séquence d'ARN interférent n°2 (SiPTEN 2) présentée ci-dessus. Le silencing stable de PTEN a été réalisé au moyen d'un protocole expérimental qui comprend les étapes d'insertion de la séquence codant pour l'ARN interférant, jusqu'à l'obtention de lignées cellulaires clonales dans lesquelles l'inhibition d'expression de PTEN est vérifiée (Kattan Z et al, 2008). L'ADN plasmidique code cependant pour un ARN plus long que celle-ci qui adopte une conformation en épingle à cheveux du fait de sa composition nucléotidique. Cette structure est déterminante pour la mise en place du mécanisme d'ARN interférence (voir « principe » plus haut)

### a. Séquence utilisée

Aussi, une séquence d'ADN a été conçue à partir de la séquence de siRNA retenue. Elle est encadrée de nucléotides permettant la structuration de la séquence d'ARN sous sa forme d'épingle à cheveux ainsi que des séquences palindromiques correspondant aux sites de restriction des enzymes *Bam*HI, *Xba*I et *Eco*RI. Les sites de restriction *Bam*HI et *Eco*RI permettent l'insertion de la séquence d'intérêt. Le site *Xba*I est ajouté pour s'assurer de la présence de la séquence dans le plasmide. Une représentation schématique du construit et de la séquence oligonucléotidique correspondante est présentée figure II.1. La séquence d'ADN ainsi conçue a été synthétisée par Eurogentec.

### b. Plasmide/Insertion de la séquence

Le plasmide utilisé pour générer les cellules Cal 27 inhibées pour l'expression de PTEN est le « RNAi-READY pSIREN-RetroQ » de Clontech (représenté figure II.2). L'expression de la séquence d'ARNi est placée sous le contrôle du promoteur U<sub>6</sub> (ARN-polymérase III dépendant). Le plasmide contient également un gène codant pour la résistance à l'ampicilline dont l'expression est activée chez *Escherichia Coli* et un gène codant pour la résistance à la puromycine. Le plasmide est fourni sous forme linéarisée et digérée par les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI, permettant l'insertion de la séquence d'intérêt.

### c. Amplification/Extraction de l'ADN plasmidique

L'amplification de l'ADN plasmidique est réalisée par culture de bactéries *Escherichia Coli* transformées. L'ADN plasmidique est extrait au moyen d'une méthode physico-chimique par utilisation d'un kit (Kit Nucleobond, Macherey-Nagel, Allemagne), les différents tampons étant

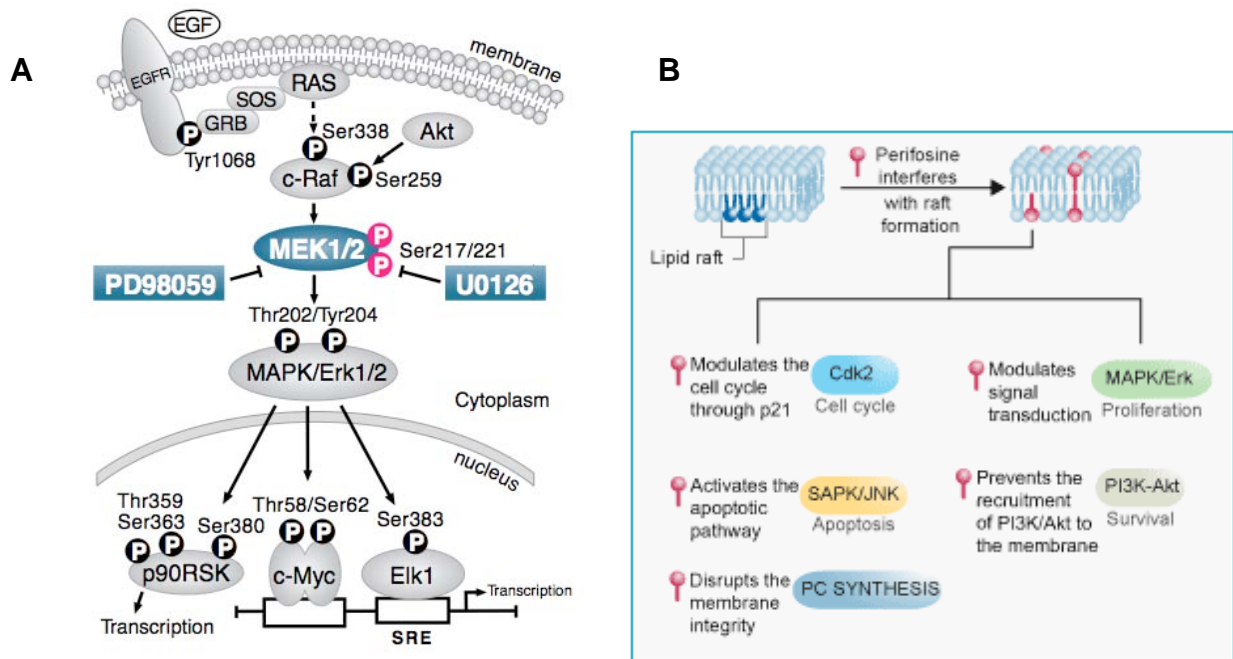


Figure II.3 : Représentation schématique des mécanismes d'action de U0126 (A) et de la perifosine (B). Selon les fournisseurs : Merck chemicals (KGaA, Darmstadt, Allemagne) et Æterna Zentaris (Frankfurt, Allemagne).



optimisés pour une extraction sélective de l'ADN plasmidique par rapport à l'ADN génomique. Par ailleurs, le kit fournit des colonnes équipées de filtres qui favorisent l'action des tampons et la sélectivité de l'extraction.

#### d. Transfection / Sélection

L'introduction de l'ADN plasmidique dans les cellules se fait par une méthode de transfection non virale. Les agents de transfection utilisés sont le Jet-PEI (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) et l'ICAFectin (Eurogentec, Seraing, Belgique). Il s'agit de polycations qui compactent et protègent l'ADN des nucléases et favorise le passage de la membrane plasmique.

#### e. Traitements des cellules

Afin d'observer l'effet de la suractivation des voies de signalisation dans les cellules PTEN déficientes, les cellules ont été exposées à des inhibiteurs spécifiques. L'effet de ces inhibiteurs de la voie PI3K/AKT et de la voie des MAPK a été évalué par la viabilité cellulaire (test MTT). Le composé U0126 (Cell Signaling Technology, Danvers MA, Etats-Unis) est un inhibiteur de MEK  $\frac{1}{2}$  et empêche ainsi l'activation de ERK  $\frac{1}{2}$  (Yeh JJ et al, 2009, Favata MF et al, 1998). Sous forme lyophilisée, U0126 est préparé dans du DMSO pour obtenir une solution mère de 10 mM, aliquotée et conservée à -20°C (Figure II.3.A). La perifosine (AEZS-130, Aeterna Zentaris inc., Francfort, Allemagne), bloque l'activation d'AKT par une destabilisation des seconds messagers lipidiques (Hideshima T et al, 2006, Li X et al, 2006). La perifosine est reconstituée dans de l'éthanol à 70% pour obtenir une solution stock à 100  $\mu$ M puis aliquotée et conservée à -20°C (Figure II.3.B).

### 2- 4) Xénogreffes et suivi de croissance *in vivo*

Des courbes de croissance en primo-injection des cellules Cal 27 transfectées et non transfectées ont été réalisées sur des souris nude âgées de 7 semaines. Un inoculat contenant une quantité de  $10^7$  cellules a été préparé pour un volume de 100  $\mu$ L de matrigel®. Les groupes étaient constitués de 4 animaux pour une évaluation préliminaire. Cet inoculat a servi à une injection sous-cutanée en position inguinale bilatérale. Les dimensions tumorales ont été mesurées au moyen d'un pied à coulisse.

### 3) Méthodes

#### 3-1) Transfection transitoire

La nature des séquences et la méthode de transfection confèrent un caractère transitoire à l'inhibition d'expression de la protéine cible. La transfection est réalisée selon une méthode non-virale sur les cellules lorsqu'elles sont entre 50 et 70% de confluence en plaques de 6 ou de 24 puits. Le milieu de culture complet est remplacé par un milieu dépourvu de SVF. Le format du support de culture définit un volume adapté du mélange siRNA - agent de transfection. La concentration optimale de siRNA est déterminée par des essais dose-réponse et fixée à 5 nM. Le volume de siRNA correspondant est donc déposé dans le milieu dépourvu de SVF. L'agent de transfection (INTERFERin™) est dilué directement dans le milieu contenant la séquence de siRNA. Après une homogénéisation, le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante, puis déposé goutte-à-goutte sur les cellules dans le milieu de culture dépourvu de SVF. Après 4h de réaction, celui-ci est remplacé par un milieu de culture complet. Le phénomène d'ARN interférence est analysé par détection de la protéine cible. Ainsi, des extractions de protéines sont-elles réalisées toutes les 24h à partir de 24h après la transfection et jusqu'à 196h. Le niveau d'expression de PTEN est vérifié par western blot (Cf. partie I).

#### 3- 2) Protocole d'exposition au cetuximab

Compte tenu du caractère transitoire du silencing et de la croissance des Cal 27, l'exposition des cellules au cetuximab est réalisée pendant 48h, 5 jours après l'ensemencement (soit 48h après la transfection) par le remplacement du milieu de culture complet par un milieu contenant 2% de SVF et 20 µg/mL de cetuximab.

#### 3- 3) Transfection stable : génération des clones PTEN déficients

##### a. Insertion de la séquence dans le plasmide / Amplification de l'ADN plasmidique

Le plasmide est fourni sous forme linéaire et a déjà subi la digestion par les enzymes de restriction *Bam*H1 et *Eco*R1. La séquence d'ADN à insérer (1µM) est incubée avec le plasmide (25ng/µL) en présence d'une ligase dans un tampon de réaction contenant 0,1 mM d'ATP (Ligase et Ligase buffer, Promega, France) pendant 5 minutes à température ambiante.

Les bactéries *Escherichia Coli* sont rendues compétentes par le chlorure de calcium (agent perméabilisant). La réaction de transformation consiste à mettre en présence le produit de la réaction de ligation et les bactéries compétentes, et de leur faire subir un choc thermique de 2 minutes à 42°C. Après une première amplification par une culture de ces bactéries d'1h à 37°C dans un milieu LB (10g/L de tryptone, 5g/L d'extrait de levure, 10g/L de NaCl, pH7), les bactéries transformées sont étalées sur un milieu à base d'agar contenant 5µg/mL, pour une culture d'une nuit en boîte de Petri.

La sélection par l'ampicilline permet la croissance de colonies de bactéries qui expriment effectivement le plasmide. Les colonies sont recueillies et cultivées séparément dans 5mL de milieu LB contenant 5µg/mL d'ampicilline, pour une nouvelle incubation d'une nuit à 37°C sous agitation. Un faible volume de la culture de chaque colonie est prélevé pour subir une première extraction (500 µL), qui permettra de vérifier la présence de plasmide contenant l'insert tandis que 500µL sont congelés (dans 500µL de glycerol). Il s'agit de la culture initiale qui pourra être remise en culture, amplifiée et fournir l'ADN plasmidique contenant la séquence d'intérêt.

La présence de l'insert dans le plasmide amplifié par chaque colonie recueillie est vérifiée au moyen d'une digestion par l'enzyme *XbaI*. Celle-ci consiste en une incubation d'1h à 37°C de l'ADN plasmidique avec l'enzyme de restriction (2 unités d'enzyme pour 1 µg d'ADN). La seule séquence de restriction *XbaI* du plasmide se situe à l'extrémité 3' du brin sens (Figure 6). Une migration sur gel d'agarose (Agarose 1,2% dans tampon Tris-Borate-EDTA) contenant 0,5mg/mL de bromure d'ethidium permet de visualiser la présence de l'insert dans l'extrait d'ADN plasmidique de la colonie testée, par la présence de deux fragments de restriction. La séparation électrophorétique est assurée par l'effet d'un courant de 100V pendant 35 minutes.

Seules les colonies positives sont remises en culture dans 300 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline pour une 2<sup>ème</sup> amplification.

#### b. Extraction de l'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait selon la méthode de lyse alcaline (Kit Nucleobond, Macherey-Nagel, Allemagne) et précipité à l'isopropanol. L'ADN plasmidique est ensuite dosé au moyen d'un spectrophotomètre par la mesure de l'absorbance à 260nm (Eppendorf, France).

#### c. Transfection

Les cellules Cal 27 sontensemencées à raison de 10<sup>6</sup> cellules par puits de plaque de 6 puits, 24h avant la transfection. La quantité d'agent de transfection est adaptée, selon les recommandations du fabricant, à la quantité d'ADN plasmidique utilisée (4 µg).

En plus du plasmide dans lequel la présence de l'insert a été validée, l'ADN du plasmide sans la séquence codant pour le shRNA est transfecté afin de générer une lignée cellulaire contrôle ou cellules « mock ». L'agent de transfection est préparé dans un volume de 100 µL de NaCl puis ajouté à l'ADN solubilisé dans un volume égal de NaCl. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante permettant la complexation de l'ADN et des structures cationiques, les 200 µL sont déposés sur les cellules dans le milieu dépourvu de SVF remplaçant le milieu de culture complet des cellules.

#### d. Sélection des cellules transfectées

Dès le lendemain, le milieu est remplacé par un milieu de culture complet contenant 0,5 µg/mL de puromycine. Par la suite, le milieu est ainsi renouvelé tous les 3 jours avec la même concentration de puromycine. Dans un premier temps, la mortalité cellulaire est très importante puis les cellules résistantes survivent et forment lentement des colonies. Le processus de sélection se poursuit jusqu'à ce que l'extension des colonies permette de les recueillir plus aisément et les remettre en culture pour une phase d'amplification.

Les colonies sont trypsinées par dépôt d'une goutte de trypsine 10X afin de remettre en culture les colonies isolées. Chacune d'elles est cultivée et amplifiée jusqu'à vérification du statut PTEN.

### 3- 4) Caractérisation des clones déficients PTEN

#### a. Morphologie

La morphologie cellulaire a été étudiée par microscopie à contraste de phase. Un microscope Nikon, équipé d'une camera CCD a permis de prendre des photos de chacune des lignées avec un grossissement x10.

#### b. Courbes de croissance *in vitro*

Afin de caractériser la croissance des lignées cellulaires Cal 27 transfectées et non transfectées, la viabilité cellulaire a été évaluée par test MTT et la prolifération par une numération au bleu trypan. Ces deux méthodes sont exposées dans la partie I. Pour établir la courbe de croissance, les cellules sontensemencées à J0 en plaque de 24 puits à raison de  $2 \cdot 10^4$  cellules par puits et d'une plaque analysée par jour. Le suivi de croissance s'effectue sur 10 jours et les plaques de 24 puits sontensemencées de sorte que les mesures sont réalisées en triplicat. Le temps de doublement est évalué sur la phase de croissance exponentielle des cellules, il est calculé au moyen d'une régression exponentielle.

### c. Traitement des cellules

Afin d'évaluer l'impact du silencing durable sur la sensibilité des cellules au cetuximab, le schéma expérimental appliqué aux cellules Cal 27 siPTEN (transitoire) a été adapté. Les lignées cellulaires sont ensemencées à J0 à une densité de  $2.10^4$  cellules/mL en p24 ou en p6 selon les analyses auxquelles elles sont destinées (MTT ou extraction de protéine). Après deux jours de culture, les cellules sont exposées pendant 48h au cetuximab.

Afin de préciser l'impact de l'activation des voies de signalisation suite à la perte d'expression de PTEN, les cellules ont été soumises à des inhibiteurs spécifiques de ces protéines activées. Respectivement la perifosine (AEZS-130, Aeterna Zentaris inc., Francfort, Allemagne), qui bloque l'activation d'AKT par une destabilisation des seconds messagers lipidiques et le U0126 (Cell Signaling Technology, Danvers MA, Etats-Unis) qui est un inhibiteur de MEK  $\frac{1}{2}$  et empêche ainsi l'activation de ERK  $\frac{1}{2}$ . La figure II.3 représente les mécanismes d'action de ces inhibiteurs. La perifosine et U0126 ont été utilisés seuls et en co-traitement avec le cetuximab pendant 48h à des doses croissantes. Le jour du traitement, le milieu de culture cellulaire est ôté et remplacé par les solutions adéquates de milieu contenant 2% de SVF et ces différents inhibiteurs selon les doses exposées dans le tableau suivant.

Tableau II.2 : Utilisation du cetuximab des inhibiteurs spécifiques de MEK  $\frac{1}{2}$  et de pAKT sur les cellules Cal 27 et les lignées cellulaires obtenues après silencing stable de PTEN et sélection à la puromycine.

Composé	Concentrations
<b>Cetuximab</b>	0 et 20 $\mu\text{g/mL}$
<b>U0126</b>	0 – 5 – 10 et 20 $\mu\text{g/mL}$
<b>Perifosine</b>	0 – 2,5 – 5 et 10 $\mu\text{M}$
<b>Cetuximab + U0126</b>	0 et 20 $\mu\text{g/mL}$ + 0 – 5 – 10 et 20 $\mu\text{g/mL}$
<b>Cetuximab + Perifosine</b>	0 et 20 $\mu\text{g/mL}$ + 0 – 2,5 – 5 et 10 $\mu\text{M}$

Les analyses des niveaux d'expression des phosphoprotéines et de la viabilité cellulaire à l'issue de 48h d'exposition à ces traitements et associations ont été effectuées comme précédemment mentionné.

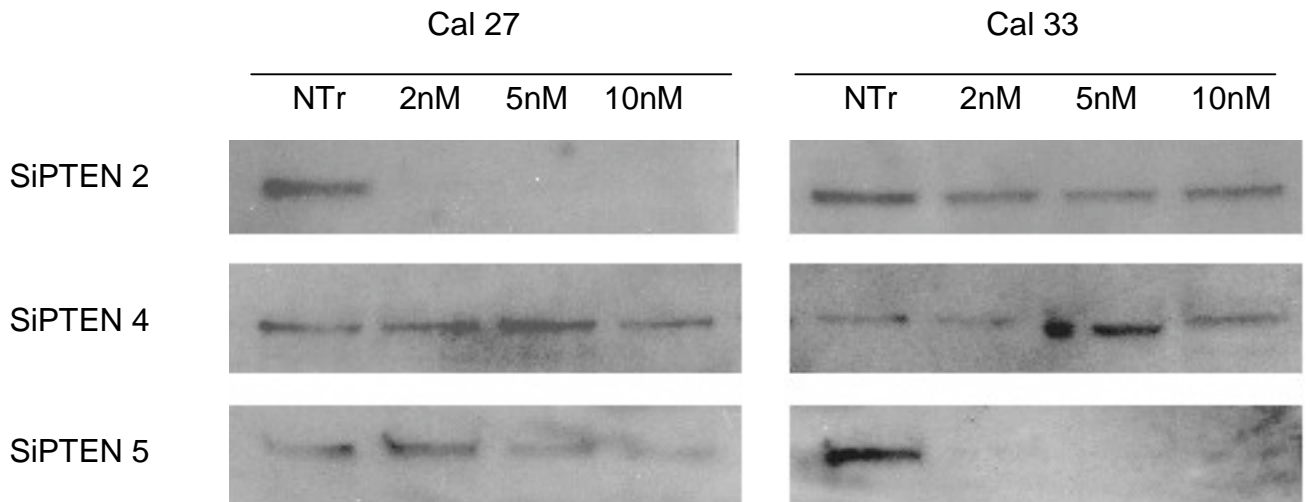


Figure II.4 : Expression de PTEN dans les cellules Cal 27 et Cal 33, 48h après transfection transitoire avec les séquences n°2, 4 et 5. NTr désigne l'extrait protéique issu de cellules non transfectées. Les séquences ont été administrées dans les quantités de 2, 5 et 10nM.

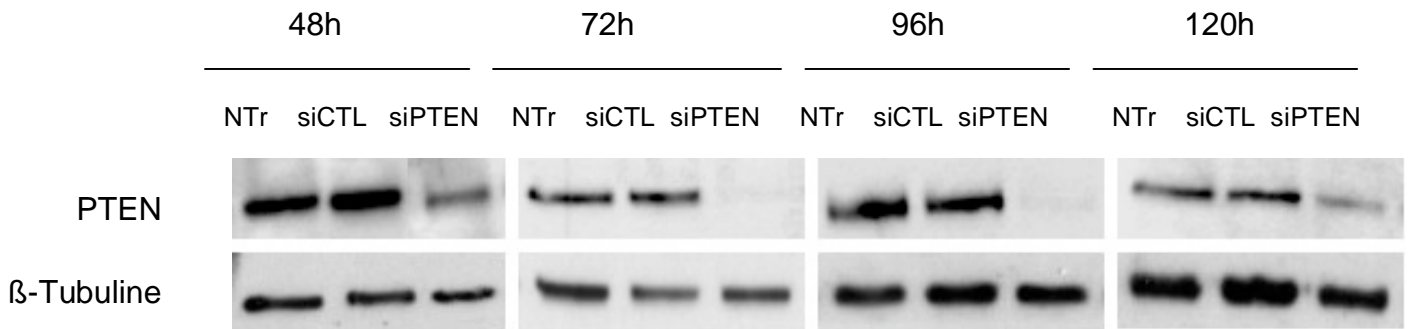


Figure II.5 : Cinétique de l'inhibition d'expression de PTEN dans les cellules Cal 27. Les temps mentionnés correspondent au temps de recueils des protéines après transfection. L'expression de PTEN est mise en évidence par western blot. L'expression de la β-tubuline sur les mêmes échantillons sert de contrôle.

#### d. Courbes de croissance *in vivo*

La croissance tumorale après primo-injection des cellules Cal 27 transfectées et non transfectées a consisté en une mesure hebdomadaire des diamètres de la tumeur (en mm). La formule (Grand diamètre x Petit diamètre<sup>2</sup>) / 2 permettant d'estimer le volume tumoral. La croissance tumorale a été suivie pendant 70 jours.

#### 4- Silencing transitoire : Réponse cellulaire au cetuximab en fonction du statut de PTEN

##### 4- 1) Choix des conditions expérimentales

Bien que les cellules Cal 33 sont moins sensibles au cetuximab que ne le sont les Cal 27, la transfection a été réalisée sur ces deux lignées afin d'assurer de la spécificité du phénomène. Après des essais préliminaires, dans le but de sélectionner la séquence la plus efficace, le niveau d'expression de PTEN a été recherché 48h après la transfection. Différentes quantités de siRNA ont été utilisées. La figure II.4 est représentative des résultats obtenus. L'efficacité d'une séquence de siRNA est déterminée par son action inhibitrice à une dose minimale. Il est intéressant de constater que les différentes séquences ne produisent pas les mêmes effets d'une lignée cellulaire à l'autre. De ce fait c'est la séquence SiPTEN 2 qui a été retenue pour la suite des travaux sur les Cal 27 puisqu'elle montre l'inhibition complète de PTEN à la dose minimale, 48h après la transfection. Cependant, des expériences complémentaires ont permis de déterminer qu'à la dose de 5nM, le phénomène d'inhibition est plus durable qu'avec l'utilisation de 2nM.

##### 4- 2) Cinétique de l'inhibition par siRNA

La transfection de siRNA au moyen d'un agent de transfection non viral induit nécessairement un phénomène transitoire qui peut cependant se manifester jusqu'à 7 jours selon le taux de prolifération de la lignée cellulaire transfectée notamment. L'aspect transitoire du silencing a donc été évalué. Une séquence de siRNA contrôle a été utilisée systématiquement (séquence proposée par Eurogentec). Ainsi par la suite, les cellules transfectées avec la séquence contrôle seront désignées par « cellules siRNA-contrôles » et les Cal 27 transfectées avec la séquence n°2 « cellules siPTEN ».

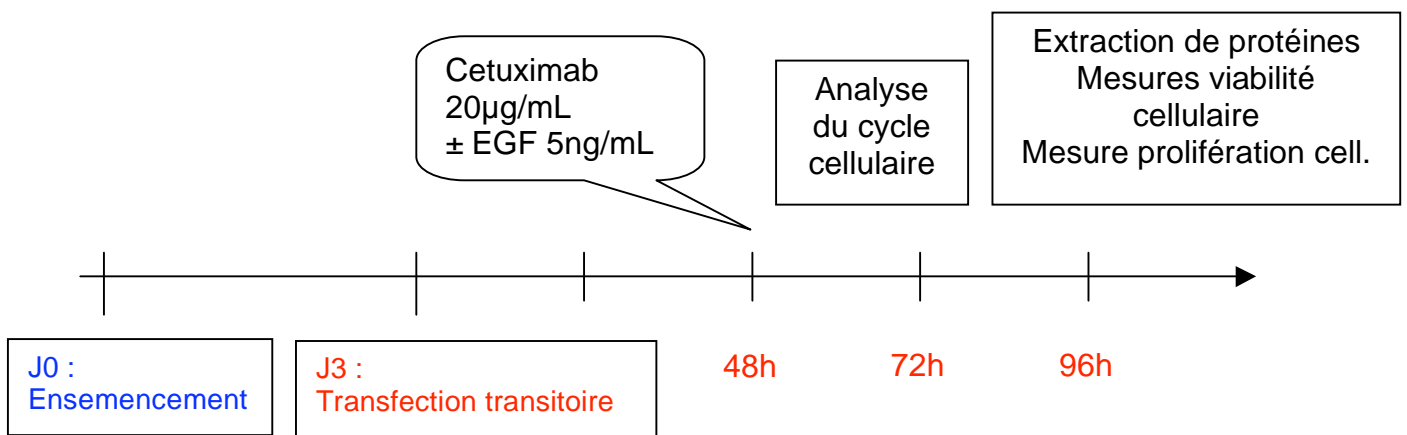


Figure II.6 : Schéma de la procédure expérimentale appliquée aux cellules Cal 27. L'analyse du cycle cellulaire est faite par cytométrie en flux. Les extraits protéiques sont utilisés pour l'étude de la fonctionnalité des voies de signalisation. La croissance cellulaire est évaluée la viabilité (Test MTT) et une numération cellulaire (Test au bleu trypan).



Afin d'établir un schéma expérimental adapté, l'efficacité du siRNA a été vérifiée sur une durée de 6 jours après la transfection. Des extractions de protéines ont donc été réalisées toutes les 24h à partir des cellules Cal 27 puis le niveau d'expression de PTEN a été évalué par analyse densitométrique des résultats de western blot. L'analyse densitométrique a été réalisée après normalisation des valeurs obtenues à celles mesurées pour la tubuline. Elle établit que le phénomène de silencing est progressif (Figure II.5 représentative de 3 expériences indépendantes). L'inhibition commence à 48h où l'expression de PTEN est diminuée de 55% par rapport au niveau détecté dans les cellules siRNA-contrôles. Le silencing est maximal 72 et 96h après la transfection, l'expression de PTEN est quasiment supprimée puisque l'inhibition est de 90%. Puis il est atténué, 120h après la transfection, où la protéine est de nouveau détectée à 25% du niveau d'expression des cellules siRNA-contrôle.

L'objectif de la mise en œuvre de l'inhibition de l'expression de PTEN par siRNA dans les cellules Cal 27 est d'observer les conséquences de cet événement dans ce modèle cellulaire, en particulier sur la réponse au cetuximab (exposée dans la partie I). Le plan expérimental adopté est représenté dans la figure II.6. Il a été établi de sorte que les cellules Cal 27 soient exposées au cetuximab pour une durée de 48h pendant leur phase exponentielle de croissance, de façon concomitante avec la perte d'expression de PTEN. Aucune différence significative n'ayant été trouvée entre les cellules siRNA-contrôles et les Cal 27 non transfectées, elles servent de référence à l'ensemble des résultats présentés ci-dessous.

#### 4- 3) Impact de la perte d'expression de PTEN sur les voies de signalisation

Du fait de son rôle régulateur des voies de signalisation activées par EGFR, les conséquences de la perte d'expression de PTEN sur les niveaux d'expression des phosphoprotéines clés ont été étudiées par western blot et BPA. Comme mentionné dans la figure II.6, les lysats cellulaires sont réalisés à l'issue de l'exposition au cetuximab, soit 96h après la transfection.

De façon attendue, alors que l'inhibition de l'expression de PTEN est maximale, une suractivation des voies de signalisation est observée. Les mesures réalisées au moyen du Bioplex Protein Array (BPA) montrent que le niveau de pAKT est multiplié par 7 dans les cellules siPTEN comparées aux cellules siRNA-contrôles et de même que pERK  $\frac{1}{2}$  voit son taux multiplié par 3 (Figure II.7).

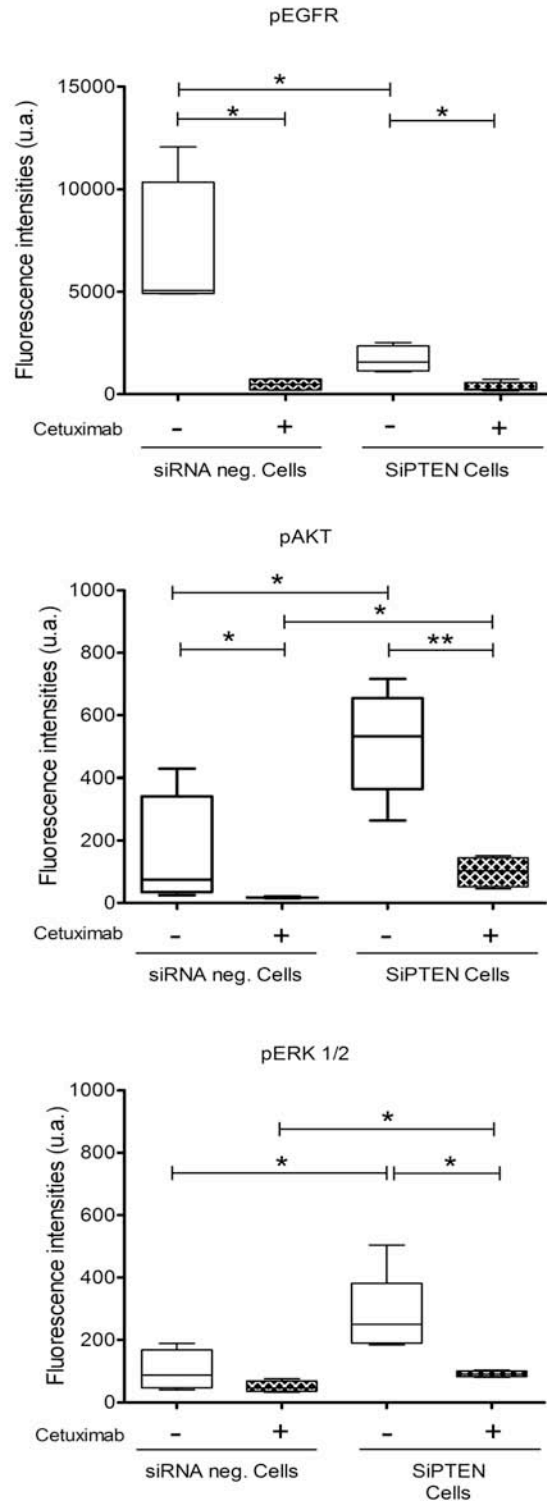


Figure II.7 : Mesure par BPA des niveaux d'expression de pEGFR, pAKT et pERK ½ dans les Cal 27 transfectées exprimés en unités de fluorescence. SiRNA neg. cells = Cal 27 transfectées avec la séquence contrôle. SiPTEN cells = cellules transfectées avec la séquence siPTEN 2. Les lysats cellulaires sont recueillis 96h après la transfection, suite à une exposition de 48h au cetuximab. Les niveaux d'expression sont présentés en intensité de fluorescence médiane (d'au moins 3 expériences indépendantes ± écarts moyens). \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$ .

De façon assez surprenante, l'analyse par BPA révèle également que le niveau de pEGFR est diminué de 61% dans les cellules siPTEN. Ce résultat est corroboré par les observations fournies par le western blot, il est à peine détecté dans les cellules siPTEN (Figure II.8, pEGFR, 3<sup>ème</sup> colonne vs 1<sup>ère</sup> colonne). Ainsi, le silencing de PTEN induit une diminution d'expression de pEGFR qui n'est pas liée à une régulation de l'expression de la protéine totale puisque son niveau d'expression est identique à celui trouvé dans les cellules contrôles (Figure II.8, EGFR).

AKT et ERK ½ sont donc très fortement phosphorylées dans les cellules siPTEN alors même que le récepteur n'est pas dans sa forme activée, ce qui met en évidence l'impact majeur de la perte d'expression de PTEN sur les voies de signalisation dans les cellules Cal 27. Malgré une telle activation des voies PI3K/AKT et MAPK, et l'absence d'EGFR phosphorylé, le cetuximab exerce un effet inhibiteur des voies de signalisation dans les cellules siPTEN, tout à fait similaire à celui observé dans les cellules siRNA-contrôles ou dans les cellules Cal 27 non transfectées (décrit dans la partie I). La diminution d'activation des phospho-protéines induite par le cetuximab est quantifiable par BPA, dans ces cellules dont l'expression de PTEN varie (Figure II.7). Elle est résumée dans le tableau suivant.

Tableau II.3 : Taux d'inhibition de l'activation d'EGFR et des protéines de la signalisation par le traitement au cetuximab (en % de la quantité basale)

Effet du cetuximab sur :	Cellules siRNA contrôles	Cellules siPTEN
<b>pEGFR</b>	58%	85%
<b>pAKT</b>	74%	81%
<b>pERK ½</b>	48%	70%

Ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur du cetuximab sur les voies PI3K/AKT et MAPK dans les cellules siPTEN est plus important que dans les cellules siRNA contrôles. Néanmoins, il est intéressant de souligner qu'après l'exposition au cetuximab, les niveaux d'expression des phosphoprotéines dans les cellules siPTEN restent significativement plus importants que ceux trouvés après traitement dans les cellules siRNA-contrôles (Figure II.7,  $P < 0,05$ ). Ceci apparaît très clairement sur les western blot (Figure II.8) qui montrent également que l'expression des protéines totales n'est pas affectée.

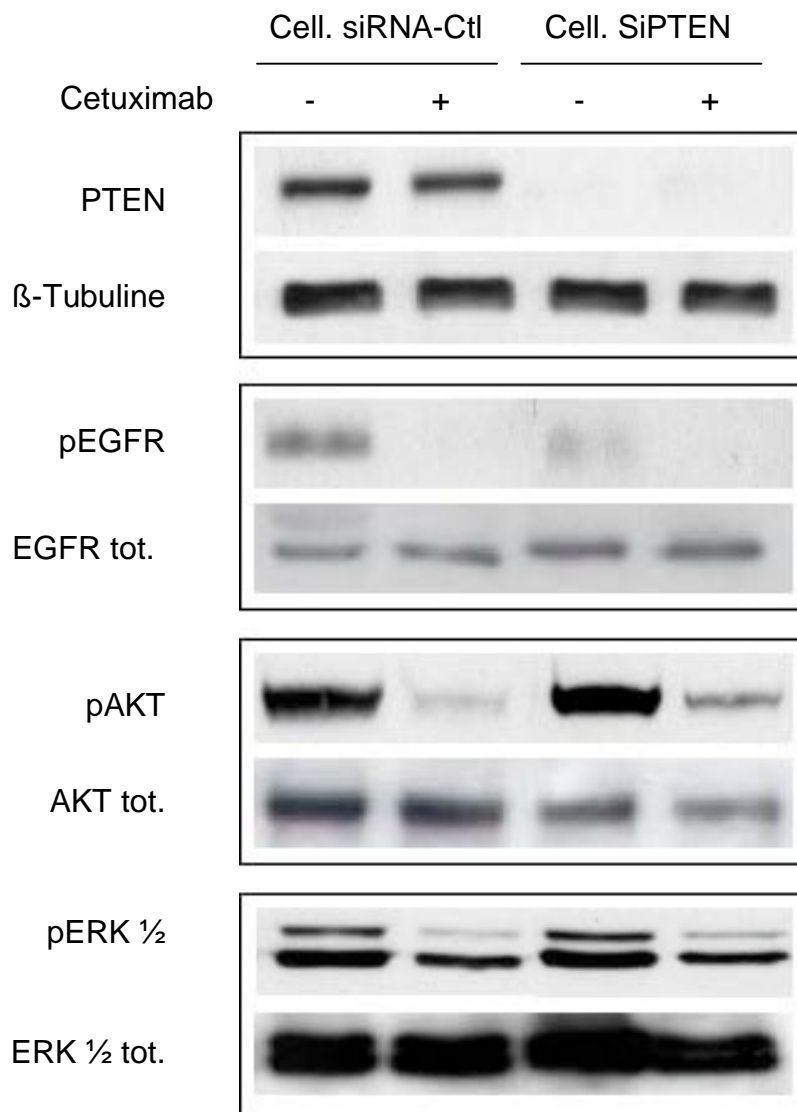


Figure II.8 : Expression de PTEN et des protéines activées par EGFR dans les cellules Cal 27 transfectées. Evaluation par western blot. Les extraits protéiques sont réalisés sur les cellules 48h après l'exposition au cetuximab (20 $\mu$ g/mL). L'expression des protéines est recherchée par western blot par utilisation des anticorps spécifiques présentés dans le tableau I.1.

#### 4- 4) Impact de la perte d'expression de PTEN sur le cycle cellulaire

Des modifications significatives de la distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire sont observées suite au silencing de PTEN (Tableau II.4). Le cycle cellulaire des cellules siRNA-contrôles et des cellules siPTEN a été analysé 24h après le début de l'exposition au cetuximab soit 72h après la transfection. Les cellules siRNA-contrôles sont en moyenne à 70,5% en phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> ( $\pm 2,5\%$ ), tandis que 65,9% ( $\pm 2\%$ ) des cellules siPTEN sont dans cette phase. Cette différence significative, observée dans les cellules Cal 27, est concordante avec le rôle de PTEN décrit dans la littérature comme ralentissant la progression en phase S. Mais de façon étonnante, la diminution du pourcentage de cellules SiPTEN en phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> n'est pas associée à des modifications du pourcentage de cellules en phase S, mais en G<sub>2</sub>M. En effet, l'augmentation observée en phase G<sub>2</sub>M est en moyenne de 5,2% et correspond à la diminution observée en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>.

Tableau II.4: Effet de l'exposition au cetuximab sur la distribution des cellules Cal 27 transectées dans le cycle cellulaire. Les cellules exposées ou non au cetuximab (20 $\mu$ g/mL) pendant 24h sont incubées avec l'iodure de propidium. L'analyse du contenu en ADN est réalisée par cytométrie en flux puis la proportion des cellules dans chaque phase du cycle est calculée par le logiciel ModFit. Les résultats présentent la moyenne d'au moins 4 expériences indépendants  $\pm$  écarts moyens. *Cellules non-traitées cetuximab versus Cellules traitées cetuximab*: \*:  $P < 0,05$ . *Cellules SiPTEN versus cellules siRNA-contrôles*: £:  $P < 0.05$ .

#### Distribution dans le cycle cellulaire (%)

	Cell. SiRNA-contrôles		Cell. SiPTEN	
	-	+	-	+
<b>G<sub>0</sub>G<sub>1</sub></b>	70,5 $\pm$ 2,5	77,6 $\pm$ 2,5*	65,9 $\pm$ 2,0	73,9 $\pm$ 5,1*
<b>S</b>	16,6 $\pm$ 2,1	8,2 $\pm$ 1,7*	15,7 $\pm$ 3,3	7,7 $\pm$ 2,5*
<b>G<sub>2</sub>M</b>	13,6 $\pm$ 3,5	14,4 $\pm$ 2,9	18,8 $\pm$ 2,1 <sup>£</sup>	17,6 $\pm$ 1,4

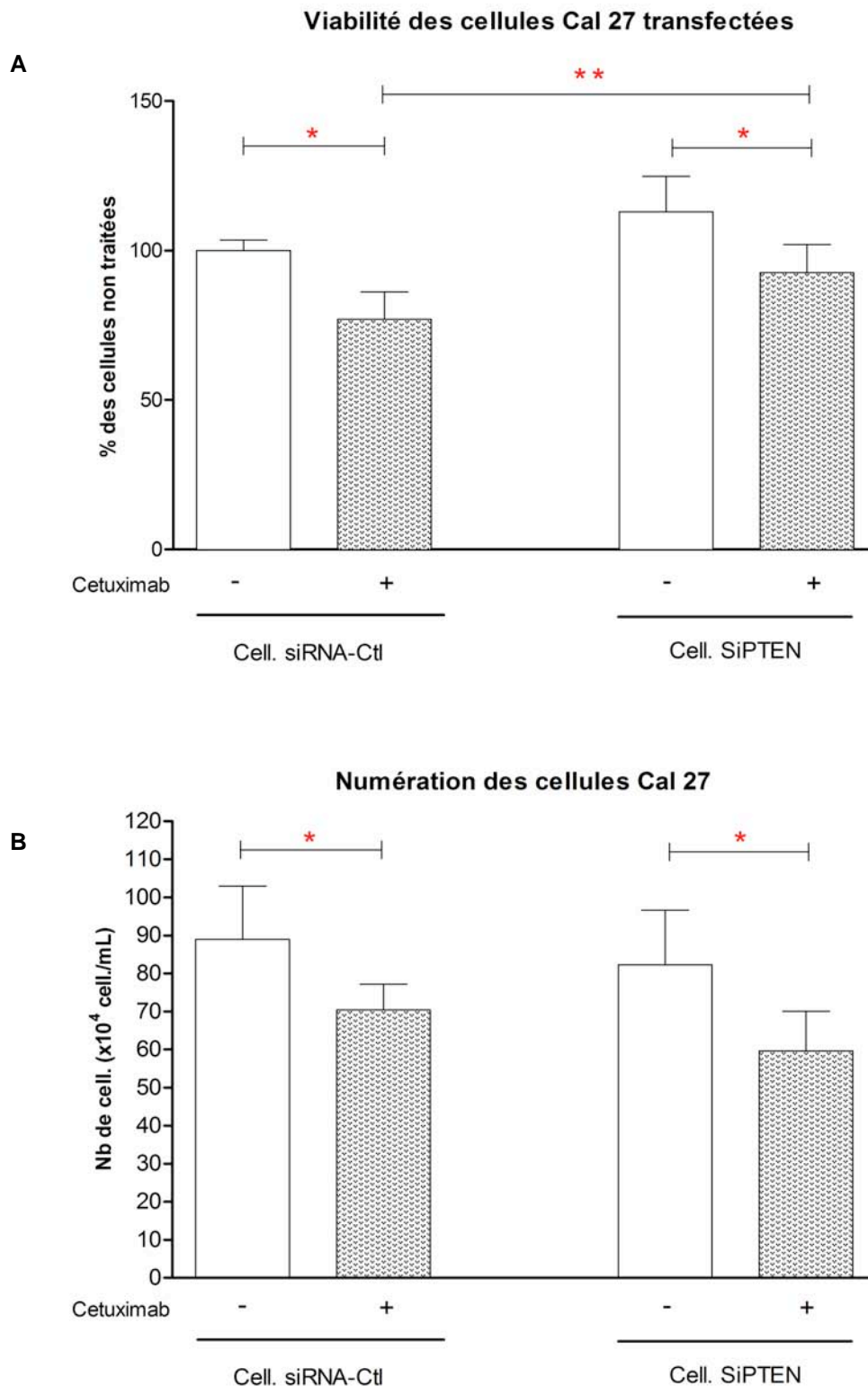


Figure II.9 : Effet du cetuximab et de l'inhibition de l'expression de PTEN sur la viabilité et la prolifération cellulaire des cellules Cal 27 transfectées de façon transitoire.

La viabilité cellulaire (mesurée par MTT) est évaluée après 48h d'exposition au cetuximab (A) et sur la prolifération (mesurée par la numération cellulaire), évaluée par numération cellulaire au bleu trypan (B). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écarts moyens (d'au moins 3 expériences indépendantes). \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$ .

Bien que ces effets soient relativement faibles, ils sont significatifs et indiquent le rôle de PTEN dans le contrôle du cycle cellulaire des Cal 27.

Le cetuximab provoque à l'inverse une augmentation significative du pourcentage de cellules en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> du même ordre dans les cellules siRNA-contrôles et les cellules siPTEN, soit respectivement 7,1% et 8% en moyenne. Cette accumulation suggère un blocage en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>, correspondant aux effets du cetuximab sur le cycle cellulaire décrits par ailleurs. Cette augmentation de la fraction cellulaire en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> permet de contrer les effets produits par le silencing de PTEN sur le cycle cellulaire.

Mais à la différence des modifications médiées par le silencing de PTEN, l'augmentation de la proportion de cellules en phase en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> induite par le cetuximab est associée à une diminution de la proportion de cellules en phase S. De plus, si l'on analyse les phases G<sub>2</sub>M et S additionnées, l'exposition des cellules au cetuximab induit une diminution de la proportion de cellules dans les phases prolifératives d'environ 10%. Cette action cytostatique du cetuximab est observée indépendamment du statut d'expression de PTEN (Tableau II.5).

Tableau II.5 : Effet du cetuximab sur la proportion de cellules Cal 27 dans les phases G<sub>2</sub> et S du cycle cellulaire. (Pourcentages obtenus à partir des données présentées dans le tableau II.4)

% de cellules en phases G <sub>2</sub> M + S	Cellules siRNA contrôles	Cellules siPTEN
<b>Cetuximab -</b>	32,9 ±1,5%	34 ±2,6%
<b>Cetuximab +</b>	22,5 ±4,2%	25,4 ±1,9%
<b>Cetuximab – vs +</b>	P = 0,0253	P = 0,0163

#### 4- 5) Impact de la perte d'expression de PTEN sur la croissance cellulaire

Bien que la viabilité cellulaire des cellules siPTEN rapportée à celle des cellules siRNA contrôles montre une légère augmentation (113 ± 8%), cette différence n'est pas significative (Figure II.9 A). La numération cellulaire, 96h après la transfection, titre à 89x10<sup>4</sup> cellules/mL (±11x10<sup>4</sup>) siRNA-contrôles et 82,3x10<sup>4</sup> cellules/mL (±10,5x10<sup>4</sup>) les cellules siPTEN. Aucune différence significative n'est donc mise en évidence dans le nombre de cellules à l'issue d'une perte d'expression de PTEN de 48h (Figure II.9 B). Aux vues de ces résultats, la croissance cellulaire des Cal 27 ne semble donc

pas significativement influencée par la perte d'expression de PTEN établie alors depuis 48h par le siRNA. Ces résultats sont résumés dans le tableau II.6.

Tableau II.6 : Taux d'inhibition sur la croissance cellulaire des cellules Cal 27 transfectées induit par l'exposition de 48h au cetuximab (en % des valeurs d'absorbance et du nombre de cellules du témoin non traité).

Effet inhibiteur du cetuximab sur :	Cellules siRNA contrôles	Cellules siPTEN
<b>Viabilité cellulaire</b>	16%, $P = 0,041$	20%, $P = 0,0069$
<b>Nombre de cellules</b>	21%, $P = 0,0428$	27%, $P = 0,018$

#### 4- 6) Conclusion/discussion

Les cellules siPTEN sont donc caractérisées pas une forte activation des voies de signalisation régulant la survie et la prolifération cellulaires, indépendamment de l'EGFR activé qui subit une régulation négative suite à la perte d'expression transitoire de PTEN.

Ces évènements semblent conférer aux cellules Cal 27 une tendance à augmenter la viabilité cellulaire. L'analyse du cycle cellulaire confirme cette tendance, les cellules semblant s'échapper de la phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>. Cependant les données obtenues montrent une augmentation significative du nombre de cellules en G<sub>2</sub>M alors que la phase S n'est pas affectée. Considérant les mécanismes connus du contrôle du cycle cellulaire par PTEN, ces résultats portent à croire que la perte d'expression de PTEN dans les cellules Cal 27 accélère leur sortie de la phase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> et qu'elles progressent jusqu'en G<sub>2</sub>M où elles semblent s'accumuler. Cependant, sans analyse cinétique du cycle cellulaire, il est impossible de conclure sur la chronologie de ces évènements. Mais ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par Jacob et al, dans des lignées cellulaires de mélanome. Ils suggèrent que (selon un mode lignée cellulaire-dépendant) sans être absolument requis, PTEN par sa localisation nucléaire participe à la régulation de la progression du cycle cellulaire en G<sub>2</sub> (Jacob AI et al, 2009).



La perte d'expression de PTEN pourrait avoir un impact positif dans la réponse des des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou à la radiothérapie. En effet, Puc et collègues ont mis en évidence que la perte de PTEN, favorisant l'état phosphorylé de la protéine CHK1 est un évènement qui limite les mécanismes de réparation de l'ADN (Puc J et al, 2005). L'activité de réparation de l'ADN médiée par CHK1 survient pendant la phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. Lors de la phase G<sub>2</sub>, ce sont plutôt les mécanismes du système HDR qui sont mis en place (Homologous recombination-Directed Repairs). Or PTEN régule positivement l'expression de la protéine Rad51 appartenant au système HDR et la phase G<sub>2</sub>M est décrite comme une phase du cycle cellulaire radio-sensible (Pawlick TM et al, 2004). Ainsi ces considérations portent à croire que la perte d'expression de PTEN, conduisant à une accumulation relative des cellules en G<sub>2</sub>M, pourrait avoir un effet radiosensibilisant. Tout récemment, le travail de Pattje et collaborateurs montre justement que l'expression de PTEN dans des échantillons de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou est associée à un mauvais contrôle loco-régional suite à la radiothérapie (Pattje WJ et al, 2010).

De façon intéressante, le cetuximab peut contrebalancer la diminution du pourcentage de cellules en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> induite par le silencing de PTEN mais n'a pas d'impact sur les modifications observées en G<sub>2</sub>M. Comme cela a été détaillé dans la partie introductive, le cetuximab et PTEN ont en partie recours à des mécanismes moléculaires communs pour bloquer l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Notamment, il a été montré que l'expression de PTEN comme l'exposition au cetuximab sont associées à une régulation positive de l'expression de p27, inhibiteur du complexe cycline E/cdk2 contrôlant la transition G<sub>1</sub>/S. Ainsi, le cetuximab rétablit le pourcentage de cellules G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> des cellules siPTEN à une proportion équivalente à celle observée suite au traitement des cellules siRNA-contrôle. Confirmant ainsi que dans les cellules Cal 27, la perte d'expression transitoire de PTEN n'induit pas une résistance à l'effet du cetuximab. Ainsi, les cellules de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou déficientes en PTEN sont non seulement sensibles au cetuximab, mais pourraient par ailleurs être plus sensibles à l'effet des radiations.

L'ensemble des résultats démontre que l'effet du cetuximab est de même ampleur dans les cellules siRNA-contrôles et les cellules siPTEN et permet de conclure que le cetuximab a une efficacité sur les cellules Cal 27 qui n'est pas significativement liée au statut d'expression de PTEN. Pour autant, le niveau de l'expression des phosphoprotéines et la viabilité cellulaire des Cal 27 siPTEN restent élevés suite à l'exposition au cetuximab.

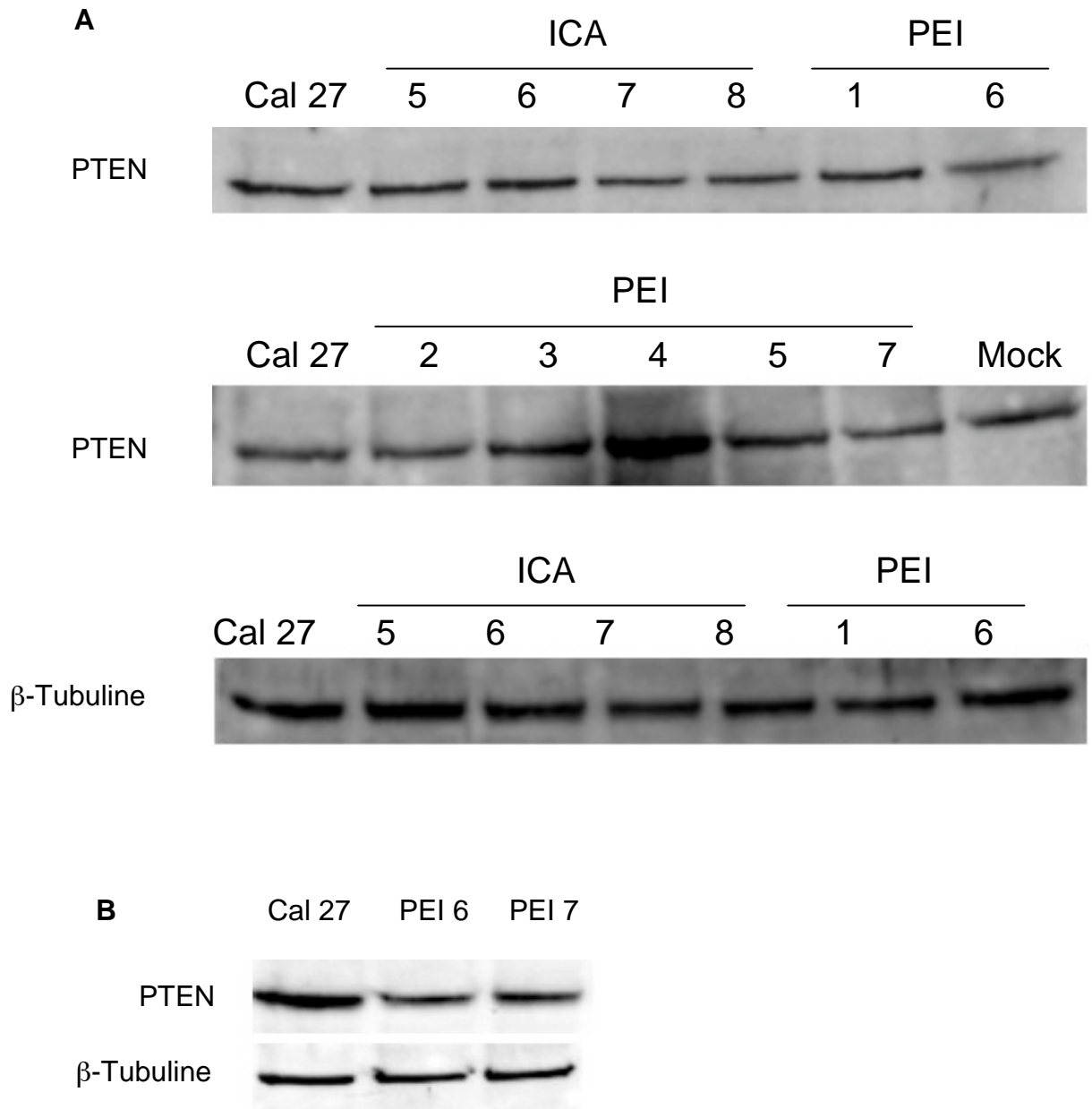


Figure II.10 : Expression de la protéine PTEN par les différents clones obtenus avec les deux agents de transfection ICAfectine (ICA) ou Jet-PEI (PEI) et après sélection à la puromycine. L'expression de PTEN est mise en évidence par western blot pour la sélection de lignées clonales d'intérêt (A). Les clones PEI 6 et PEI 7 ont été choisis sur la base de ces observations. L'expression de PTEN dans ces lignées a été vérifiée après 12 passages en culture. L'expression de la  $\beta$ -tubuline sert de contrôle. Les extraits protéiques ont été préparé 4 jours après l'ensemencement des cellules ( $2 \cdot 10^4$  cellules/mL) selon la méthode exposée dans la partie I.

Une tendance à favoriser la croissance cellulaire des Cal 27 sans pour autant l'augmenter de façon significative est observée, malgré la nette suractivation des voies de signalisation qui régulent la survie cellulaire et la prolifération en dépit d'une absence d'expression d'EGFR activé. Si ces résultats semblent en désaccord avec la littérature, qui établit que la perte d'expression de PTEN *in vitro* comme *in situ* confère une croissance tumorale augmentée de façon tout à fait significative, il faut cependant tenir compte du caractère transitoire utilisé dans le modèle présenté ici. L'observation d'une tendance orientée en faveur d'une augmentation de la croissance cellulaire laisse penser que l'impact de la perte d'expression de PTEN pourrait être observé à plus long terme. Ces conclusions ont donc conduit à l'établissement d'un silencing durable dans les cellules Cal 27.

## 5 - Modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou PTEN-déficient

Le silencing durable de PTEN est établi dans les cellules Cal 27 au moyen de l'expression d'un plasmide codant pour la séquence d'ARN interférant utilisé dans le modèle transitoire. Suite à la transfection, les cellules subissent une période de sélection à la puromycine qui permet de faire émerger des colonies dans lesquelles le plasmide est exprimé. Chacune d'elle est reprise en culture isolément, afin d'établir une lignée cellulaire clonale, l'expression de PTEN y est vérifiée.

### 5- 1) Sélection des cellules transfectées, expression de PTEN

Suite à la sélection par la puromycine, les clones qui sont apparus à l'issue de la sélection des cellules Cal 27 transfectées au moyen du PEI, ont été désignées comme clones « PEI » 1 à 8. De même, la transfection d'ADN plasmidique à l'aide de l'ICAFectin a permis d'isoler 6 clones « ICA ». L'amplification de ces clones s'est révélée être une étape critique, à l'issue de laquelle moins d'une dizaine de clones ont pu être exploités. L'expression de PTEN des lignées désignées PEI et ICA a donc été caractérisée par western blot. La figure II.10.A montre les images de western blot, représentatives de l'expression de PTEN dans certaines de ces lignées. Ce sont donc les clones PEI 6 et PEI 7 qui ont été retenus pour la suite des travaux, ainsi qu'une lignée « mock ». La figure II.10.B montre l'expression de PTEN dans ces lignées au passage 12 (le passage 1 correspondant à la première trypsination subie à la suite de la sélection), contrôlant le maintien du silencing plus tardivement. Une analyse densitométrique permet d'établir que l'inhibition d'expression de PTEN est de 51% dans les cellules PEI 6 et de 62% dans les cellules PEI 7.

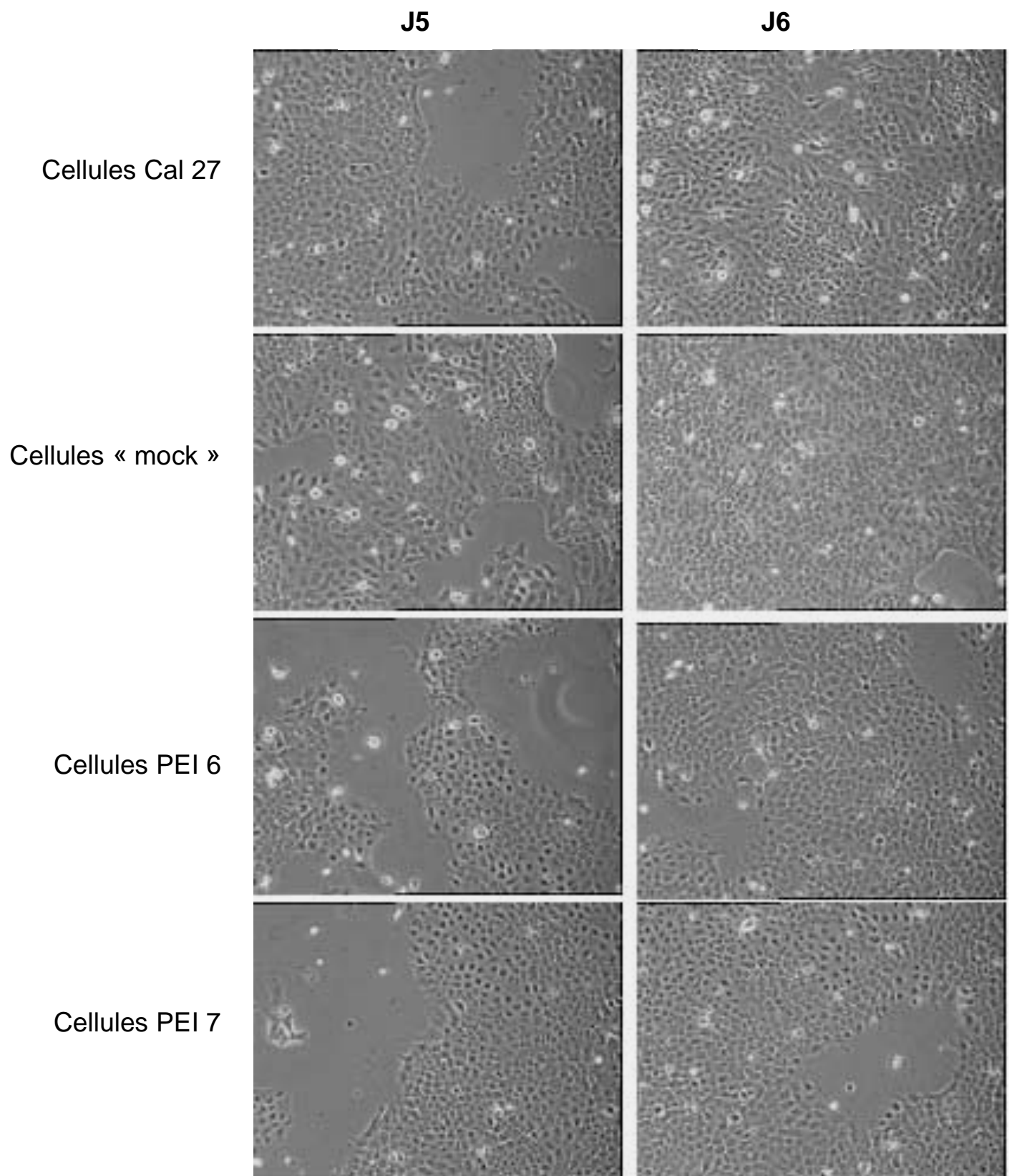


Figure II.11 : Morphologie des lignées cellulaires Cal 27 modifiées par transfection stable. Les clichés sont pris par un microscope à contraste de phase équipé d'une camera CCD Nikon, au 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> jours de culture (J5, J6) après ensemencement des cellules en puits de p6 à la densité de  $4.10^4$  cellules par puits, cultivées dans un milieu complet.

## 5- 2) Morphologie des cellules

La culture des différentes lignées de Cal 27 modifiées a permis une observation macroscopique des cellules qui indique des différences de comportement. En effet, outre un tapis cellulaire d'aspect très différent, les clones PEI 6 et 7 ont une morphologie différente de la lignée parentale.

La figure II.11 expose des clichés de ces lignées cellulaires réalisés au moyen d'un microscope à contraste de phase. Les lignées PEI 6 et 7 se distinguent par leur taille plus importante que les cellules « mock » et Cal 27, ce qui est en accord avec les effets de PTEN sur la régulation de la taille cellulaire qui ont été décrits dans d'autres modèles (Scanga SE et al, 2000, Uhlmann EJ et al, 2002). Le rapport nucléo-cytoplasmique est également différent puisque les cellules PEI 6 et PEI 7 ont un cytoplasme plus large, caractérisé par des extensions qui évoquent une forme amiboïde. De façon intéressante, on peut constater que les cellules PEI 6 et 7 occupent une surface de culture moins étendue. Les cellules Cal 27 et « mock », à mesure qu'elles prolifèrent, formeront des tapis cellulaires denses et serrés, caractéristiques d'un épithélium. Leurs équivalents PTEN déficientes laissent de larges plages vides de cellules. Les cellules PEI 6 et PEI 7 sont en effet moins adhérentes et se détachent rapidement du support de culture.

## 5- 3) Croissance cellulaire *in vitro*

Le rôle de PTEN dans la régulation de la croissance cellulaire étant décrit, il s'agit du premier paramètre étudié pour caractériser les lignées cellulaires PEI 6 et PEI 7.

Évaluée par MTT, la viabilité cellulaire des lignées transfectées et des Cal 27 montre des différences significatives (Figure II.12.A). Les lignées Cal 27 et mock décrivent des courbes de croissance très similaires avec une phase de latence de 48h et une phase exponentielle qui prend fin à 144h après l'ensemencement, ce qui correspond au moment où la confluence est atteinte. Au-delà, la viabilité cellulaire chute puisque les cellules sont sensibles à l'inhibition de contact. Si la courbe de viabilité des cellules mock est parallèle à celle des Cal 27 dans les 3 premiers jours après la mise en culture, dès 72h, elle est significativement inférieure d'environ 40%.

Ceci est d'autant plus marqué pour les cellules déficientes en PTEN dont la viabilité cellulaire est significativement plus faible que celle des cellules mock. Les cellules PEI 7 ont une viabilité qui est environ deux fois moindre que les cellules mock dès 48h jusqu'à 9 jours de culture. La viabilité des cellules PEI 6 suit celle des cellules mock sans distinction jusqu'à 120 heures après la mise en culture (5 jours), et au-delà elle est significativement inférieure, mais similaire à celle des cellules PEI 7.

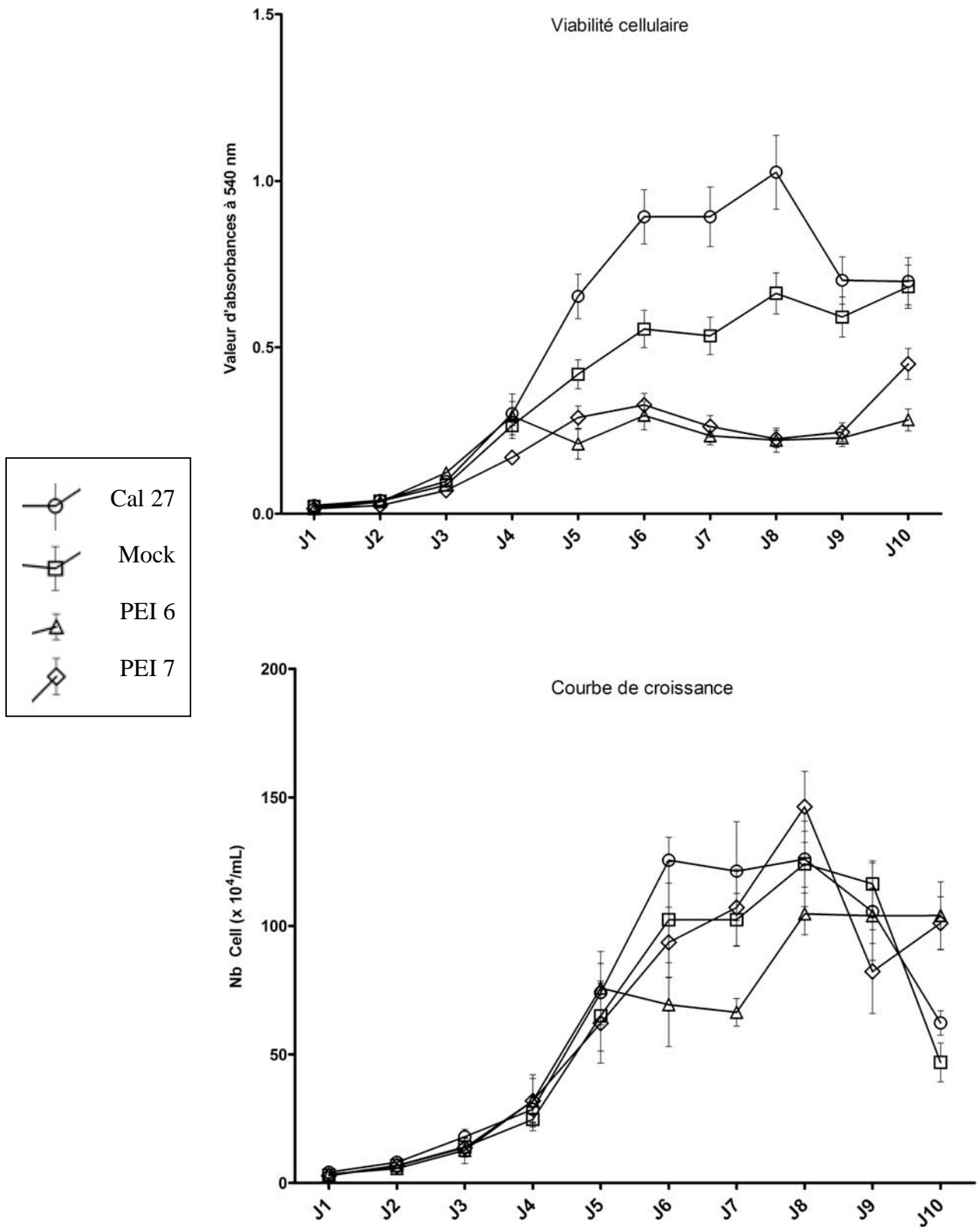


Figure II.12 : Effet de l'inhibition de la protéine PTEN sur la viabilité et la prolifération cellulaire dans les différentes lignées de cellules Cal 27 cultivées pendant 10 jours. La viabilité cellulaire a été évaluée par une mesure de l'activité métabolique mitochondriale (A) et la prolifération par une numération cellulaire (B) toutes les 24h pendant 10 jours. Les cellules ont toutes été ensemencées à raison de 2.104 cellules par puits. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  écart moyen d'au moins 3 expériences indépendantes.

Ainsi, de façon tout à fait inattendue, la viabilité cellulaire des cellules déficientes en PTEN est nettement plus faible que celle de la lignée parentale (Figure II.12.A).

En revanche le taux de prolifération montre des résultats très différents de ceux observés pour la viabilité cellulaire. Le nombre de cellules évalué toutes les 24h pour les différentes lignées cellulaires est similaire jusqu'à 120h (5 jours) de culture. Mais entre le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jours les taux de prolifération des quatre lignées semblent diverger. Les cellules PEI 6 à ce moment engagent déjà une phase de plateau avant que la prolifération ne reprenne (à J7, 168h). Le nombre des cellules PEI 7 augmente de façon exponentielle de 24h à 144h, et la prolifération est maintenue jusqu'à 192h (mais elle ne suit plus une tendance exponentielle). Les cellules mock et Cal 27 ne montrent pas de différence significative dans leur prolifération (Figure II.12.B).

Le calcul du temps de doublement indique en effet que les cellules Cal 27 et les cellules mock ont un temps de doublement similaire, respectivement de 24h et 23h. Le temps de doublement des cellules PTEN déficientes est quant à lui, significativement inférieur. Les cellules PEI 7 ont ainsi un temps de doublement de 21h et les PEI 6 de 19h seulement. Ce temps de doublement écourté des PEI 6, concorde avec le moment où la phase de plateau observée. Les cellules arrivent rapidement à une densité qui conduit à un phénomène d'inhibition de contact. Dans les conditions d'établissement de ces courbes de croissance, les cellules PEI 6 montrent donc un arrêt transitoire de la prolifération. Cependant, au dixième jour de culture, les cellules PEI 6 et 7 sont significativement plus nombreuses que les lignées parentale et contrôle (Figure II.12.B).

#### 5- 4) Voies de signalisation

Les niveaux d'expression de pEGFR, pAKT et pERK ½ ont été évalués par la technique de bioplex protein array (BPA).

Malgré le degré de sensibilité de la technique, l'expression pERK ½ ne peut être détecté dans aucune des lignées cellulaires. Le western blot, contrairement au BPA, permet de modifier les paramètres expérimentaux afin de pousser la limite de détection. Néanmoins, la mise en évidence de pERK ½ s'est également montrée difficile à mettre en oeuvre en western blot. La figure II.13 illustre les résultats. L'expression de pERK ½ dans les conditions basales n'est trouvée que dans les cellules Cal 27 et PEI 6.

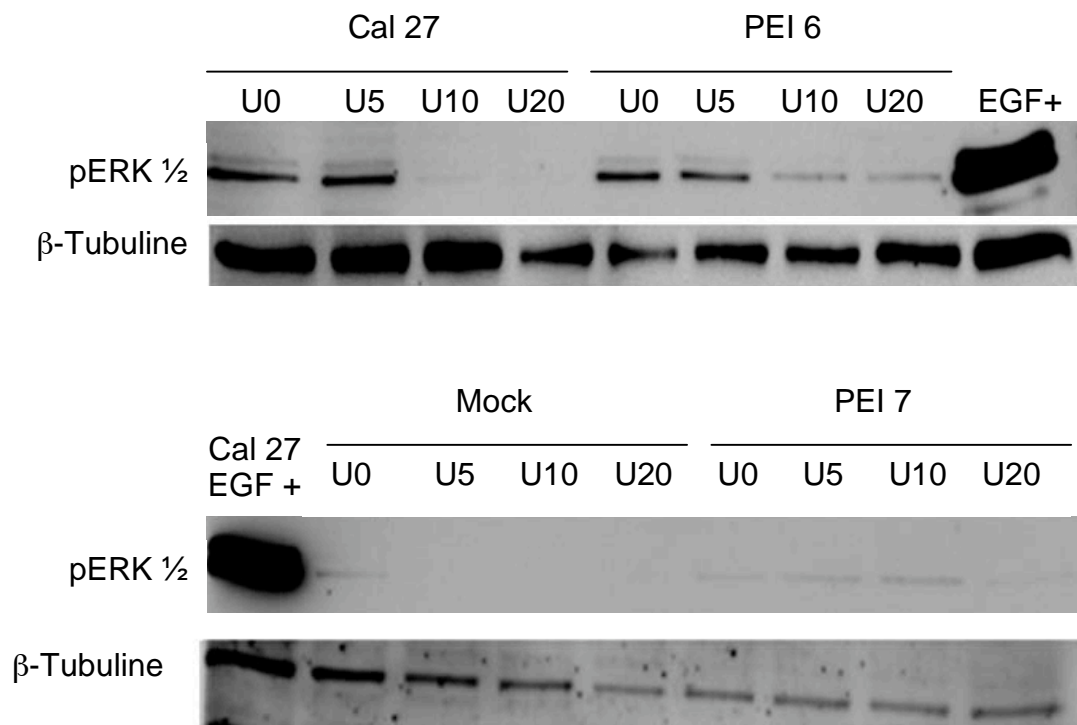


Figure II.13 : Expression de pERK 1/2 dans les cellules Cal 27 et Cal 27 transfectées par shRNA. Evaluation par western blot. Les extraits protéiques sont réalisés sur les cellules 48h après l'exposition à l'inhibiteur de MEK1/2 (U0126). U0 : 0 µg/mL. U5 : 5 µg/mL. U10 : 10 µg/mL et U20 : 20 µg/mL. L'expression des protéines est recherchée par western blot par utilisation des anticorps spécifiques présentés dans le tableau I.1. L'expression de la β-Tubuline sert de contrôle de charge des puits. Un extrait protéique de cellules Cal 27 stimulées à l'EGF (5ng/mL, voir partie I) sert de contrôle positif à l'expression de pERK 1/2.



Les niveaux d'expression et leurs variations de pEGFR et pAKT sont quantifiables par BPA. Ils sont similaires dans les cellules Cal 27 et Mock, aussi, comme témoin de transfection, seules les résultats sur les cellules Mock ont été représentés dans la figure II.14.

L'expression de pEGFR dans les différentes lignées cellulaires confirme que la perte d'expression de PTEN a un impact sur la quantité du récepteur activé. Les cellules PEI 6 montrent une diminution significative de 54% de pEGFR ( $P < 0,01$ ). Dans les cellules PEI 7 cette diminution est quantifiée à 61% de l'expression mesurée dans les cellules Mock ( $P < 0,01$ ). De façon intéressante, le blocage de pERK  $\frac{1}{2}$  par l'exposition cellulaire au composé U0126 a pour effet une augmentation significative de l'expression de pEGFR dans les cellules Mock et les lignées cellulaires clonales déficientes en PTEN (Tableau II.7).

Tableau II.7 : Variations des niveaux d'expression de pEGFR et pAKT dans les différentes lignées cellulaires suite à l'exposition au cetuximab et aux inhibiteurs U0126 et perifosine. Les niveaux d'expression des protéines sont comparés à ceux trouvés dans les cellules non exposées : \* =  $P < 0,05$  et \*\* =  $P < 0,01$ .

Effet du cetuximab sur l'expression de	Mock	PEI 6	PEI 7
<b>pEGFR</b>	↓ 47 % **	↓ 6 % *	↑
<b>pAKT</b>	↓ 47 % *	↓ 43 % *	↓ 75 % *
Effet de la perifosine sur l'expression de			
<b>pAKT</b>	↓ 70 % **	↓ 86 % **	↓ 93 % **
Effet de U0126 sur l'expression de			
<b>pEGFR</b>	↑ 38 % *	↑ 33 % *	↑ 30 % *

L'exposition des cellules au cetuximab produit une inhibition de l'activation d'EGFR de 47% dans les cellules Mock mais seulement de 6 % dans les PEI 6 et n'est pas mesurée dans les cellules PEI 7.

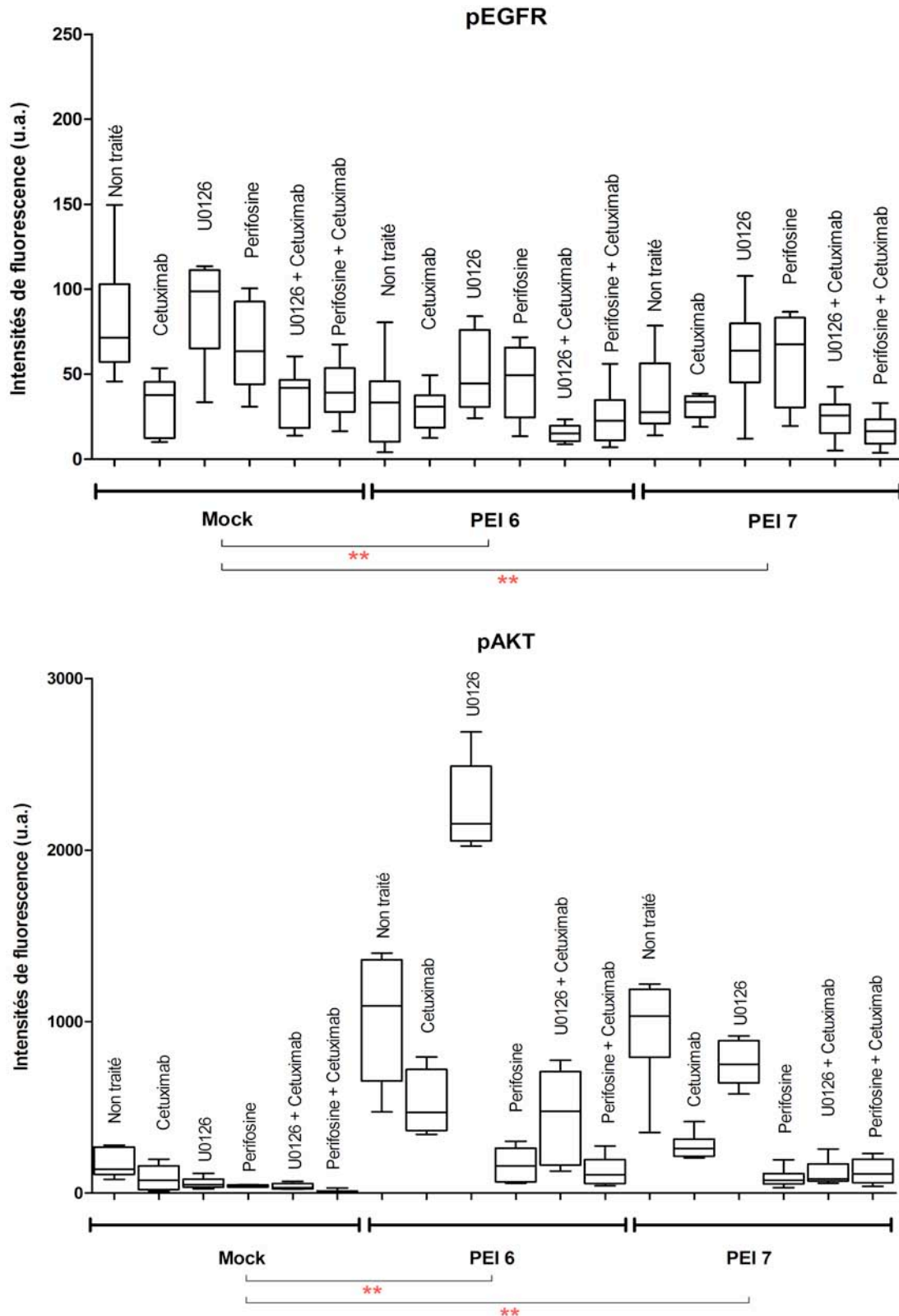


Figure II.14 : Mesure par BPA des niveaux d'expression de pEGFR et pAKT après traitement par des inhibiteurs spécifiques. Les résultats sont exprimés en unités de fluorescence. Les lysats cellulaires sont recueillis 96h après la transfection, suite à une exposition de 48h au cetuximab, à U0126 et à la perifosine. Les niveaux d'expression sont présentés en intensité de fluorescence médiane \*\* :  $P < 0,01$ . Cetuximab : 20  $\mu\text{g/mL}$ . U0126 : 10  $\mu\text{g/mL}$ . Perifosine : 5  $\mu\text{M}$ .

Une suractivation d'AKT est mise en évidence dans les cellules PEI 6 et PEI 7 puisque le niveau de pAKT dans ces cellules est respectivement multiplié par 8 et 7 fois par rapport aux cellules Mock du fait de la perte d'expression de PTEN (Figure II.14).

Le cetuximab produit une inhibition de l'expression de pAKT de 47% dans les cellules Mock. L'inhibition de pAKT est de même ampleur dans les cellules PEI 6 alors qu'elle est de 75% dans les cellules PEI 7 suite à leur exposition au cetuximab.

L'efficacité de la perifosine à inhiber sa cible à la dose de 5 $\mu$ M, est montrée dans les cellules Mock comme dans les cellules PEI 6 et PEI 7. De plus, l'inhibition de pAKT dans les clones inhibés pour l'expression de PTEN est significativement plus importante que dans les cellules Mock ( $P < 0,05$ ).

#### 5- 5) Réponse aux thérapies ciblées

Le cetuximab produit une diminution de la viabilité des cellules Cal 27, mock et PEI 7 de 30 % dans les conditions expérimentales et sans différence significative d'une lignée à l'autre (Figure II.15). Les cellules PEI 6 sont même, de façon surprenante, plus sensibles que les autres lignées puisque le cetuximab induit une diminution de 40% ( $P < 0,01$ ).

La figure II.16 présente les courbes dose-réponse des quatre lignées cellulaires aux composés utilisés.

L'inhibiteur spécifique de MEK, U0126, induit une diminution significative de la viabilité sans pour autant suivre un effet dose-dépendant. En effet il n'y a pas de différence significative dans la diminution de la viabilité cellulaire obtenue à 5, 10 et 20  $\mu$ g/mL de U0126 (Figure II.16). En revanche, à toutes les concentrations utilisées, le U0126 est significativement plus efficace que le cetuximab ( $P = 0,001$ ), excepté pour la lignée cellulaire mock qui semble résistante à l'effet de ce composé. Par ailleurs, la différence de viabilité des lignées cellulaires PTEN déficientes avec les cellules Cal 27 est significative ( $P < 0,05$ ). Exposée à la dose maximale utilisée (20  $\mu$ g/mL ) les cellules PEI 6 et PEI 7 sont deux fois plus sensibles que ne le sont les Cal 27 (viabilités cellulaires de 31  $\pm$ 4% et 32  $\pm$ 6% versus 62  $\pm$ 6%, respectivement).

Le tableau II.8 récapitule les effets des doses médianes de U0126 et perifosine utilisées ici ainsi que leurs associations au cetuximab.

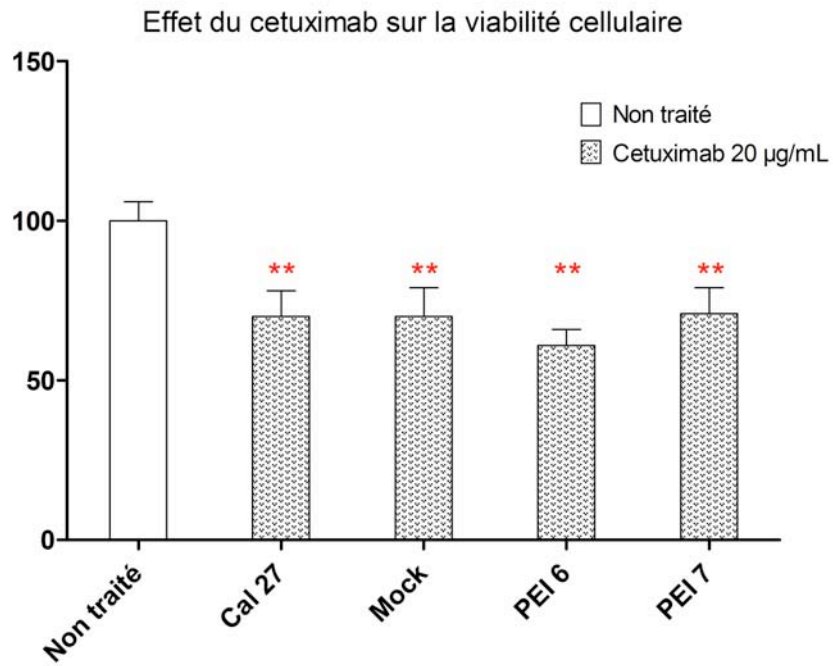


Figure II.15 : Effet du cetuximab sur la viabilité des différentes lignées cellulaires Cal 27 transfectées par shRNA. La viabilité des cellules a été évaluée par un test MTT après 48h d'exposition au cetuximab. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  écart moyen d'au moins 3 expériences indépendantes. \*\* :  $P < 0,001$

Tableau II.8 : Réduction de la viabilité cellulaire par l'exposition au cetuximab et aux concentrations médianes des inhibiteurs de MEK et pAKT. (en % du témoin non traité)

Effet <u>inhibiteur</u> sur la viabilité cellulaire	Cal 27	Mock	PEI 6	PEI 7
<b>Cetuximab</b> (20 µg/mL)	30 ±8%	30 ±9%	39 ±5%	29 ±8%
<b>U0126</b> (10 µg/mL)	36 ±5%	12 ±3%	61 ±2%	61 ±4%
<b>Périmfosine</b> (5 µM)	78 ±3%	75 ±8%	91 ±3%	88 ±4%
<b>Cetuximab + U0126</b>	76 ±5%	62 ±6%	74 ±8%	61±3%
<b>Cetuximab + Périmfosine</b>	85 ±4%	63 ±9%	90 ±2%	88 ±2%

La périmfosine, inhibiteur spécifique de pAKT, présente un effet dose sur la viabilité des cellules Cal 27 transfectées et non transfectées et induit une diminution de la viabilité cellulaire de 70 à 80% des quatre lignées cellulaires à la dose la plus faible (Figure II.14). La périmfosine se révèle être un puissant cytotoxique de ces lignées cellulaires, nettement plus efficace que le cetuximab ( $P < 0,01$ ). La viabilité des cellules Cal 27 et des cellules mock ne présente pas de différence significative. En revanche les lignées PEI 6 et PEI 7 montrent une plus grande sensibilité à la périmfosine ( $P < 0,05$  et  $P < 0,01$  à 5 µM).

La périmfosine présentant une telle cytotoxicité sur les cellules Cal 27 transfectées et non transfectées, l'association au cetuximab n'apporte pas d'avantage significatif par rapport à l'effet de la périmfosine seule. En revanche, l'association de U0126 au cetuximab produit une diminution de la viabilité cellulaire significativement plus importante que le U0126 seul, lui même plus efficace que le cetuximab seul (Figure II.16). De façon intéressante, alors que les cellules mock se montraient résistantes au composé, l'association du cetuximab à celui-ci a une efficacité significative sur leur viabilité cellulaire qui est réduite similairement à celle des cellules PEI 7.

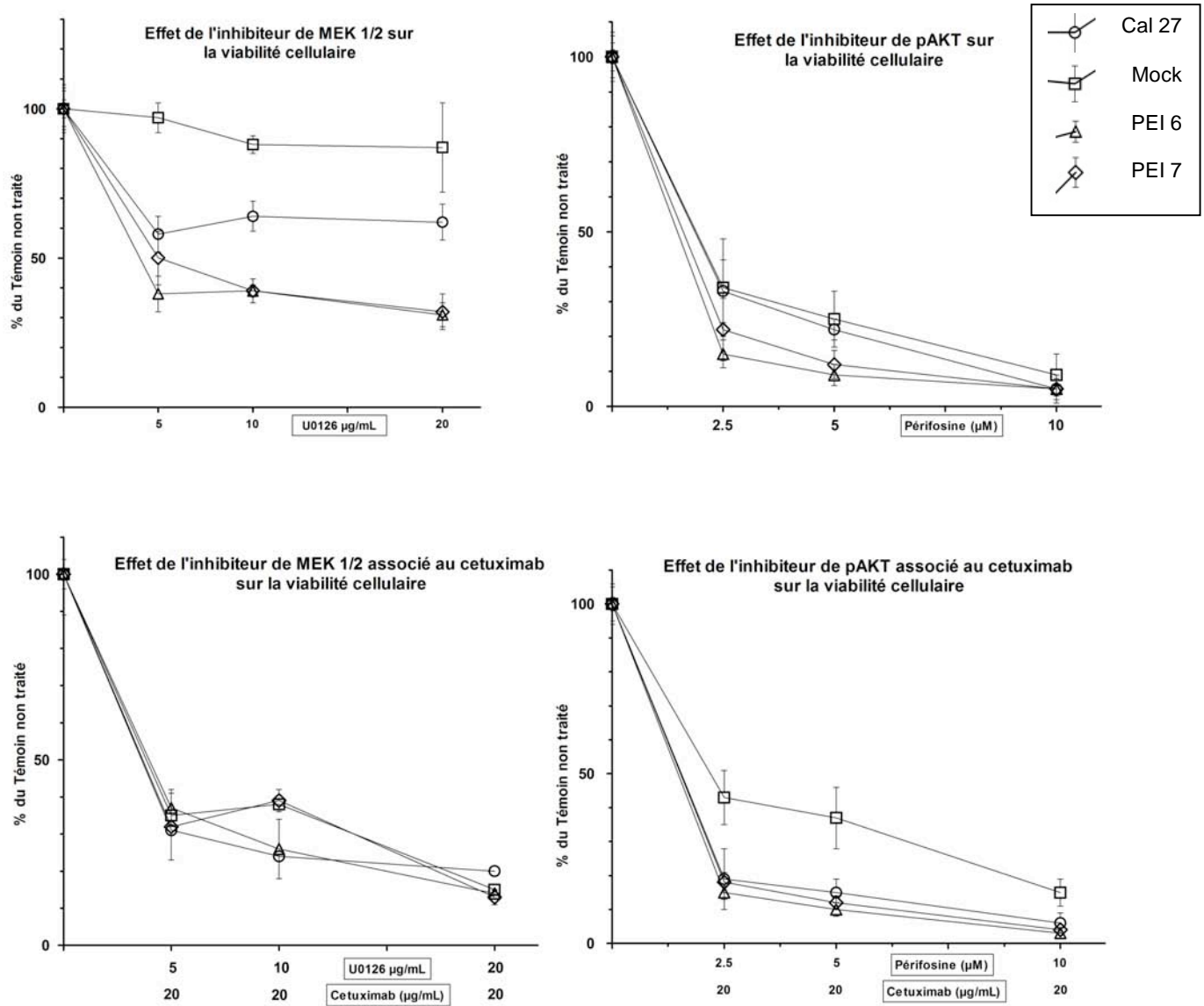


Figure II.16 : Effets des inhibiteurs U0126 (inhibiteur de MEK 1/2), de perifosine (inhibiteur de pAKT) et de leur association avec le cetuximab sur la viabilité des cellules Cal 27. La viabilité des cellules a été évaluée par un test MTT après 48h d'exposition au cetuximab. Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  écart moyen d'au moins 3 expériences indépendantes.

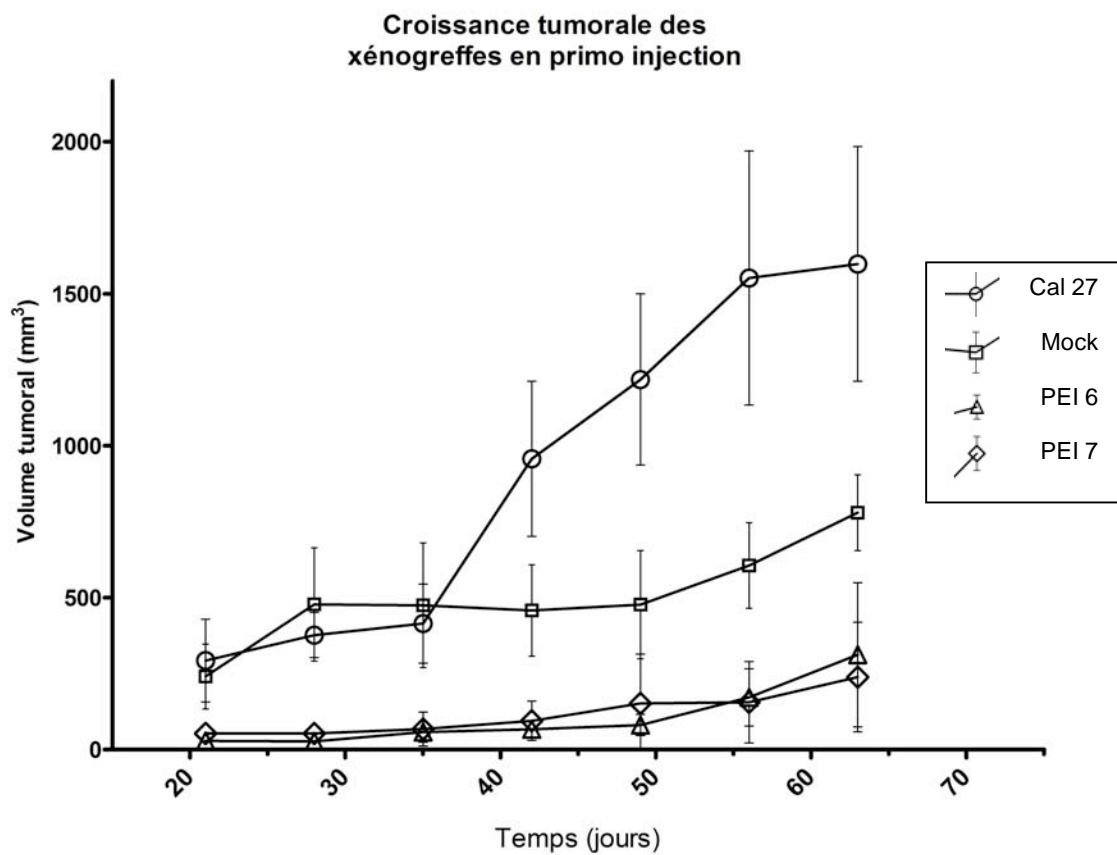


Figure II.17 : Croissance tumorale des différentes lignées cellulaires injectées en situation sous-cutanée chez les souris nude. Une suspension de 100µL de matrigel® contenant  $10^7$  cellules est injectée dans chaque creux inguinal de souris âgées de 7 semaines. Pour cet essai de croissance tumorale en primo-injection, les groupes étaient constitués de 4 animaux. Les diamètres de la masse tumorale sont mesurés une fois par semaine et la formule  $(\text{Petit diamètre} \times \text{Grand diamètre}^2) / 2$ , permet d'évaluer le volume de la tumeur, assimilé à une boule.

## 5 – 6) Courbe de croissance *in vivo*

L'injection des cellules Cal 27 transfectées et non transfectées a conduit à une prise tumorale de 100% (développement tumoral bilatéral observé chez tous les animaux utilisés). Cependant, alors que les cellules Cal 27 et mock forment une masse tumorale mesurable entre 15 et 20 jours après la xénogreffe, la formation d'une masse tumorale par l'injection des clones PEI 6 et 7 est retardée (Figure II.17). Ainsi, 40 jours après l'injection, le volume moyen des tumeurs formées par les cellules Cal 27 atteint déjà  $957 \text{ mm}^3 (\pm 255)$ , tandis que le volume moyen des tumeurs PEI 6 et 7 est de  $58 \text{ mm}^3 (\pm 34)$  et de  $68 \text{ mm}^3 (\pm 56)$  respectivement. Par ailleurs, la croissance des cellules mock est significativement inférieure à celle des Cal 27 ( $P < 0,001$ ) à partir du 40<sup>ème</sup> jour après l'injection. Le suivi de croissance tumoral a été arrêté 70 jours après l'injection. Les animaux porteurs des tumeurs Cal 27 et mock ont été sacrifiés, les tumeurs ayant atteint un volume important. Les tumeurs PEI 6 et 7 n'ont pas montré d'augmentation de volume suite à ces 70 jours (Figure II.17). Les tumeurs formées par les quatre lignées cellulaires, malgré leurs différences, montrent une zone de nécrose important dès la deuxième semaine après l'injection.

## 5- 7) Conclusion/discussion

La méthode de silencing stable utilisée ici, permet d'obtenir des lignées cellulaires dont la diminution d'expression de PTEN est d'environ 50%. Parmi les clones obtenus suite à la sélection par la puromycine, les clones PEI 6 et 7 ont été retenus sur ce critère, les autres cellules clonales présentant une expression de PTEN équivalente aux cellules Cal 27 parentales. Le phénomène de transfection stable par un agent non viral ne permet pas toujours d'atteindre l'inhibition complète de la protéine (Thomas N et al, 2010). Toutefois, les cellules PEI 6 et 7 constituent des modèles cellulaires en situation d'haplo-insuffisance. Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, la perte monoallélique de *PTEN* est un évènement fréquent, rapporté dans environ 40% des cas (Gasparotto D et al, 1998, Okami K et al, 1998). Or la situation d'haplo-insuffisance est souvent observée (tumeurs de la prostate et du sein notamment), a été rapporté comme un phénomène significatif dans la progression tumorale (Kwon CH et al, 2008, Alimonti A et al, 2010, Trotman LC et al, 2003, Kwabi-Addo B et al, 2001). Les résultats obtenus ici, montrent que la réduction partielle de l'expression de PTEN suffit à induire des modifications significatives dans le comportement des cellules PEI 6 et 7 en culture, en comparaison avec les cellules Cal 27 parentales.

Ces différences peuvent dans un premier temps être observées dans l'observation macroscopique



des cellules, qui laisse penser que les clones PEI 6 et 7 ont des capacités d'adhésion diminuées par rapport aux cellules mock et Cal 27. Les expériences menées pour vérifier ce paramètre sont insuffisantes pour amener à une conclusion définitive mais évoquent une réduction de la capacité d'adhésion de ces cellules.

Le suivi de croissance cellulaire *in vitro* met en évidence que la viabilité cellulaire des clones PEI 6 et PEI 7 est significativement plus faible que celle des cellules parentales. Cette diminution qui affecte également les cellules mock porte à croire que la transfection ou la sélection par antibiotique peuvent être en partie à l'origine de ce résultat.

Dans les cellules PEI 7, et plus encore des cellules PEI 6, le métabolisme mitochondrial semble nettement ralenti. Au contraire, le taux de prolifération, évalué par une numération cellulaire est équivalent à celui des cellules parentales. Une telle divergence suggère une possible altération dans la chaîne de transmission des électrons impliquée dans la respiration mitochondriale dont l'activité est reflétée par la réduction des sels de tetrazolium. Le test MTT se base sur l'activité succinate-deshydrogénase mitochondriale.

L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale permet de produire de l'ATP à partir du pyruvate, produit de la transformation du glucose. Comme son nom l'indique, la chaîne respiratoire mitochondriale requiert la consommation d'oxygène pour la production d'ATP. Les cellules ont cependant la possibilité d'utiliser la glycolyse sans avoir recours à la chaîne respiratoire, l'ATP est alors produit dans le cytoplasme, sans consommation d'oxygène. L'utilisation de ce mécanisme confère un avantage aux cellules tumorales exposées à des conditions limites en oxygène disponible, qui pourront dégager une source d'énergie malgré l'absence d'oxygène. La faible activité de la succinate déshydrogénase dans les cellules PEI 6 et 7 mise en évidence par le test MTT alors que le taux de prolifération est maintenu, suggère une activité mitochondriale altérée, plutôt qu'une diminution de la viabilité cellulaire. Les Cal 27 déficientes pour l'expression de PTEN pourrait avoir recours à la glycolyse anaérobie. De plus amples investigations doivent être menées afin de préciser ce mécanisme.

Le rôle de la voie PI3K/AKT dans le contrôle de la glycolyse appuie cette hypothèse. En effet pAKT, par la phosphorylation de GSK3 permet l'activation de la glycogène synthase et favorise la glycolyse (Figure II.16). Beckner et collaborateurs montrent que les cellules U87 maintiennent un taux de prolifération et une motilité importantes dans un environnement hypoxique grâce à une régulation positive de la glycolyse (Beckner ME et al, 2005), la restauration de l'expression de PTEN

antagonise ces effets. Une forte glycolyse cellulaire lève la dépendance à la vascularisation, les cellules disposent d'une source d'énergie interne. Une étude récente montre qu'en présence de fortes concentrations de glucose, l'augmentation de la glycolyse dans les cellules U87 et U251 permet une importante prolifération cellulaire (Blouin MJ et al, 2010). Cette prolifération des cellules PTEN déficientes est enrayée par le 2-déoxyglucose, un inhibiteur compétitif du glucose. Les auteurs proposent donc la perte d'expression de PTEN comme un mécanisme qui conditionne une « addiction au glucose ». Dans cette étude, la consommation importante de glucose par les cellules PTEN déficientes est par ailleurs liée à une production augmentée de lactate. De façon intéressante, Brizel et collègues ont mis en évidence des concentrations élevées de lactate dans des biopsies de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Brizel DM et al, 2001). De plus, dans ce type tumoral, la dépendance à la glycolyse est observée dans le cadre de l'imagerie, où une corrélation inverse entre la perfusion artérielle et la prise tumorale du glucose dans ces tumeurs a été rapportée (Hirasawa S et al, 2007).

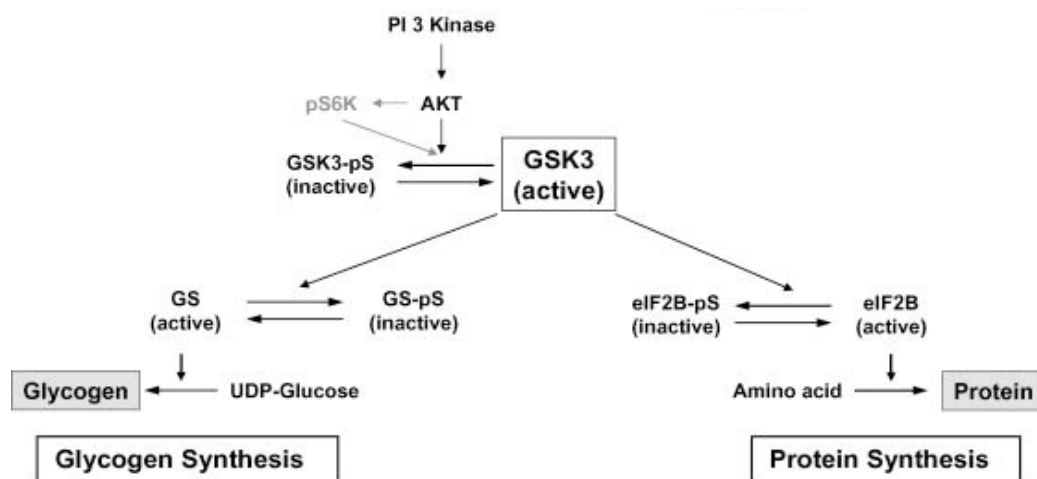


Figure II.18 : Schéma représentatif de l'action de GSK3 dans le contrôle de la synthèse de glycogène. D'après Lee J et Kim MS (2007).

Par ailleurs, les résultats obtenus par la mesure de la viabilité cellulaire des cellules PEI 6 et 7 sont comparables à ceux obtenus par l'équipe de Vitolo, qui a généré une lignée cellulaire de tumeur mammaire hétérozygote en PTEN. Cette étude montre que la viabilité cellulaire de ces clones PTEN<sup>+/-</sup>, suivie sur 9 jours est significativement plus faible que leurs équivalents PTEN<sup>+/+</sup>, en précisant qu'il s'agit de résultats obtenus lorsque les clones sont à des passages précoces. Sans avancer d'explication à ce phénomène, les auteurs montrent en effet qu'à des passages plus tardifs (nombre de passage non précisé), la viabilité de ces clones est identique aux cellules parentales (Vitolo MI et al, 2009). La viabilité cellulaire des clones PEI 6 et 7 ayant été analysée entre le passage

6 et le passage 12, il se peut que les résultats soient du même ordre que ceux rapportés par l'équipe de Vitolo. Les résultats obtenus suite à la xénogreffe des cellules PEI 6 et PEI 7 constituent un autre point de convergence avec l'étude présentée par cette équipe. En effet, démontrant que leur modèle mammaire PTEN<sup>+/-</sup> résiste à l'anoïkis, les auteurs cherchent à évaluer la capacité des cellules à former une tumeur secondaire au moyen de la xénogreffe. Or le modèle faillit à établir une tumeur *in vivo*, de même que les cellules PEI 6 et 7 ne montrent aucune croissance tumorale *in vivo*. D'après Vitolo et collaborateurs, ce phénomène est dû à un phénotype dormant qui caractérise les cellules PTEN déficientes.

En ce qui concerne l'effet des inhibiteurs de signalisation sur les différentes lignées cellulaires, l'efficacité du cetuximab est la même quel que soit le statut PTEN des cellules Cal 27, et ce bien que l'inhibition de pEGFR ne soit pas mise en évidence dans toutes les lignées cellulaires. L'inhibition de pEGFR dans les PEI 6 et PEI 7 exposées au cetuximab est en effet faible voire inexistante. Néanmoins, la diminution d'expression de pEGFR qui a été décelée suite au silencing transitoire de PTEN (voir partie II. 4-3) est confirmée par la perte durable d'expression de PTEN. L'inverse est observé lorsque les cellules sont exposées au U0126, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que le niveau de pEGFR pourrait être régulé via une boucle négative impliquant pERK 1/2 dont l'expression dans les Cal 27 est très faible à l'état basal mais subit une suractivation dans les cellules déficientes pour PTEN. Ce possible rétro-contrôle de l'activation de pEGFR par pERK 1/2 est suggéré par des travaux qui montrent que la voie des MAPK comporte de nombreuses boucles de contrôle négatif (Kiyatkin A et al, 2006, McCubrey JA et al, 2007).

Les cellules Cal 27 comme les cellules déficientes pour l'expression de PTEN sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs U0126 et périfosine. Par ailleurs, la suractivation de ces voies de signalisation du fait de la perte d'expression de PTEN sensibilise d'autant plus les lignées cellulaires PEI 6 et PEI 7 à ces inhibiteurs. Ces résultats indiquent que les cellules Cal 27 sont plus dépendantes de l'activation des voies de signalisation que du récepteur EGFR activé. En particulier la périfosine abroge l'activation de pAKT dans les lignées cellulaires parentales et de façon plus importante encore dans les cellules déficientes pour PTEN, aboutissant à une suppression de la croissance tumorale.

Ces résultats mettent ainsi en évidence que l'activité modeste du cetuximab dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ne semble pas être une conséquence de la perte d'expression de PTEN mais plutôt de l'activation constitutive des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK.

## **PARTIE III :**

Étude de l'angiogenèse tumorale induite par les  
cellules Cal 27 : impact du silencing de PTEN et du  
cetuximab

## 1- Introduction

Comme mentionné dans la partie introductive à ce travail, les anti-EGFR peuvent exercer un effet anti-angiogénique par leurs effets anti-tumoraux mais également par une action sur l'endothélium tumoral qui n'est pas encore clairement caractérisée.

Afin de distinguer la contribution de l'effet anti-tumoral du cetuximab à l'inhibition de l'angiogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, le laboratoire a adapté et développé différents modèles d'angiogenèse (*ex vivo* et *in vitro*) permettant d'observer le phénomène de bourgeonnement vasculaire induit par les cellules tumorales.

Le modèle de l'anneau aortique permet d'observer l'effet d'un milieu d'intérêt sur le bourgeonnement vasculaire, soit les phases précoces de l'angiogenèse.

Outre l'effet du cetuximab, le travail expérimental décrit ici vise à déterminer le rôle de PTEN dans les mécanismes d'induction du bourgeonnement vasculaire au moyen de la culture des anneaux aortiques dans des milieux dits conditionnés, obtenus à partir du milieu de culture des cellules Cal 27.

Ces milieux de culture « conditionnés » ont été recueillis à l'issue du protocole expérimental exposé dans la partie I, appliqué au modèle cellulaire. Les milieux conditionnés contiennent donc l'ensemble des facteurs libérés par les cellules soumises aux diverses conditions expérimentales. Couplé à une méthode de caractérisation moléculaire des milieux conditionnés, le modèle *ex vivo* de l'anneau aortique est un modèle de choix pour déterminer les effets pro ou anti-angiogéniques des composants d'un milieu reflétant partiellement le microenvironnement tumoral.

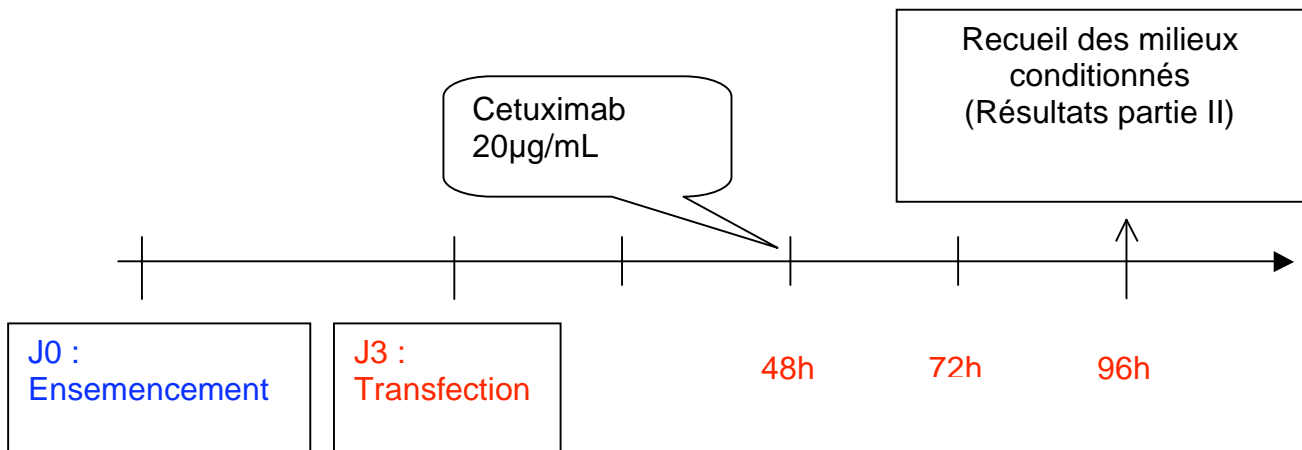


Figure III.1 : Schéma de la procédure expérimentale.

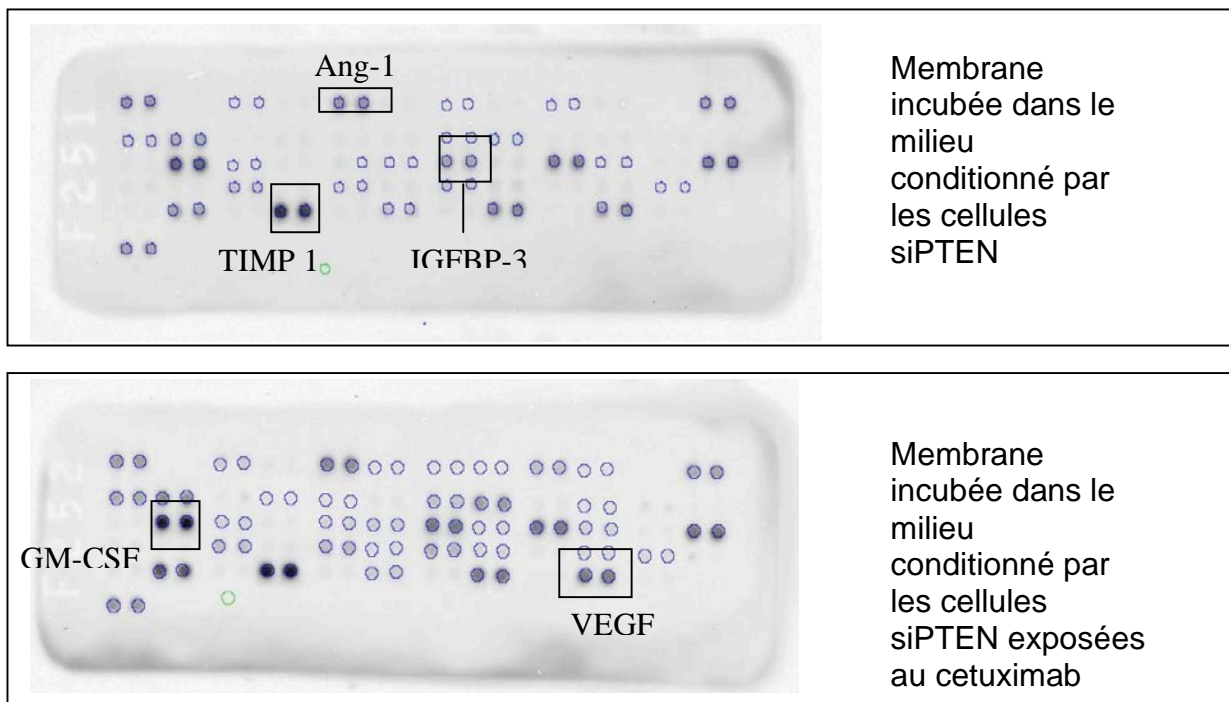


Figure III.2 Membranes du kit Proteome Profiler Array traitées au moyen du logiciel du GelDoc 2000. Les cercles bleus constituent les régions d'intérêt utilisées pour la mesure de l'intensité du signal de chémiluminescence mesurée par le logiciel QuantityOne. Le cercle vert détermine la zone utilisée pour la valeur d'intensité de signal du bruit de fond.

## 2- Matériel

### 2 - 1) Modèle d'explants aortiques

Les aortes sont prélevées sur des souris nude âgées de 5 à 7 semaines. La souris est sacrifiée par dose létale de pentobarbital sodique. Une plaque de 48 puits est préparée avec la mise en place de lamelles de verre de 9 mm de diamètre en fond de puits pour l'observation ultérieure par microscopie de fluorescence. Le matrigel® (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) est une préparation solubilisée extraite du sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm, une tumeur riche en protéines de la matrice extracellulaire. Le matrigel® se présente sous forme liquide à 4°C et polymérise sous forme gélatineuse à température ambiante. Il est donc manipulé à froid, dilué au tiers dans le milieu conditionné à tester. Les pièces d'aorte d'environ 1mm sont placées entre deux couches de matrigel® (Liu y et al, 2008, Maloney SL et al, 2009). Suite à leur mise en culture et à l'issue du protocole expérimental, les anneaux aortiques sont fixés et conservés dans du formol jusqu'à leur utilisation.

### 2 - 2) Production et caractérisation des milieux conditionnés

Le milieu de culture des cellules Cal 27 sont recueillis à l'issue du protocole expérimental rappelé figure III.1. Les cellules Cal 27, transfectées et non, sont placées dans un milieu à 2% de SVF et 20µg/mL de cetuximab pour l'exposition. Au cours des 48h qui suivent, ces milieux s'enrichissent de l'ensemble des facteurs produits par les cellules dans ces conditions expérimentales puis sont collectés de façon stérile, centrifugés et les surnageants conservés à -20°C avant utilisation.

La composition des milieux dits « conditionnés » a été évaluée au moyen du kit « Proteome Profiler Array » dédié à l'angiogenèse (R&D Systems, Royaume Unis). Il s'agit d'une méthode qui permet la détection simultanée d'une cinquantaine de facteurs clés impliqués dans la régulation du processus d'angiogenèse (Voir en annexes). Les anticorps de capture sont fixés sous forme de spots (en duplicats) à la surface d'une membrane de nitrocellulose (Figure III.2).

Le kit contient un mélange d'anticorps de détection biotinylés et la réaction de l'échantillon avec l'anticorps de capture fixé à la membrane est révélée par l'interaction Streptavidine-HRP/Biotine mise en évidence par chimiluminescence. L'intensité de celle-ci est évaluée au moyen d'un analyseur d'image équipé d'une caméra (ChemiDoc System, BioRad, France) et du logiciel Quantity One (BioRad, France).

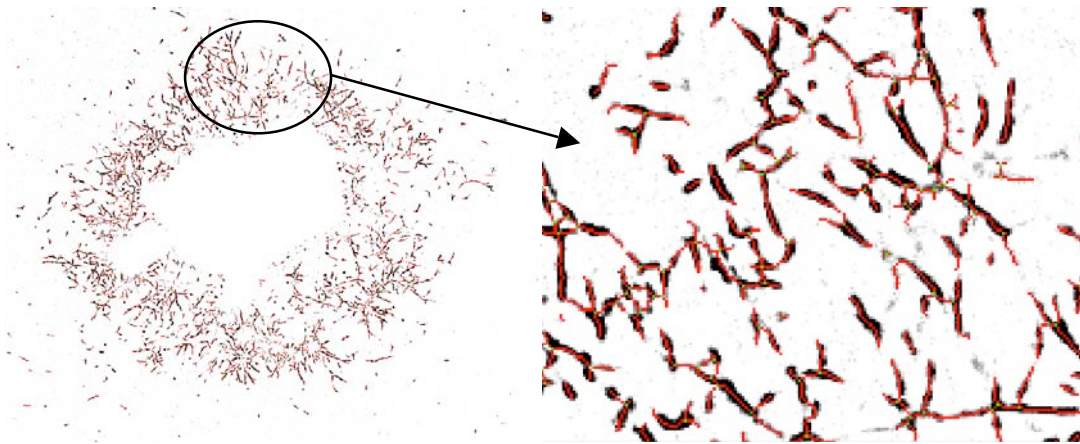


Figure III.3 : images d'anneau aortique traitées avec le logiciel AngioQuant (logiciel libre) montrant le réseau vasculaire permettant de calculer les paramètres quantitatifs. L'image de l'anneau a été obtenue après coloration au bleu de toluidine et traitement de l'image avec le logiciel NIS-AR (Nikon, Japon). Un grossissement de l'image est représenté permettant de vérifier la spécificité du seuillage réalisé avec le logiciel AngioQuant.



Elle est réalisée au moyen d'un microscope Nikon AZ100 équipé d'une camera CCD haute sensibilité (DS-Qi, Nikon, Japon). Les clichés obtenus sont analysés de façon quantitative - après un traitement d'image préliminaire au moyen du logiciel NIS-AR (Nikon Imaging Software-Advanced Research, Nikon, Japon) – par un dénombrement des structures tubulaires endothéliales et une évaluation de la longueur des bourgeonnements à l'aide du logiciel AngioQuant (Logiciel libre, [Niemistö A et al, 2005](#)). Le logiciel calcule également la surface occupée par les complexes tubulaires identifiés.

#### 2 – 4) Observation par microscopie de fluorescence

Les anneaux aortiques sont soumis à un marquage de l'actine filamentaire par la phalloïdine, couplée au fluorochrome Texas Red ( $\lambda_{exc}$  583 /  $\lambda_{ém}$  603), (FluoProb, Interchim, Montluçon, France). Une solution de triton X100 à 0,1% dans du PBS est utilisée pour la perméabilisation des échantillons afin de favoriser la pénétration du marqueur. L'observation est réalisée au moyen du microscope AZ100 de Nikon.

### 3- Méthodes

#### 3 – 1) Mise en culture des explants aortiques

Les aortes sont dégagées de leurs attaches et nettoyées du conjonctif environnant sur toute la longueur thoracique, puis excisées. Les vaisseaux sont rincés par deux bains dans une solution saline physiologique (HBSS). Ils sont ensuite délicatement découpés en tronçons d'environ 1mm de longueur.

Le matrigel® est utilisé pour établir un environnement tridimensionnel propice au bourgeonnement. Il est dilué au tiers par le milieu conditionné à tester. Un premier dépôt de 150µL qui tapisse la lamelle est mis à polymériser pour 30 minutes à 37°C. Les pièces aortiques sont ensuite placées sur ce gel et recouvertes de nouveau par 150 µL de matrigel, puis la plaque est mise à 37°C pendant 30 minutes. Enfin 500µL de milieu conditionné sont ajoutés pour la mise en culture pour une durée de 6 jours. A l'issue du protocole expérimental, les échantillons sont fixés au formol. L'effet de chaque milieu conditionné sur les anneaux aortiques est évalué sur un duplicat dans 3 séries de mise en culture indépendantes.

### 3 – 2) Milieux conditionnés :

#### a. Production

Les milieux conditionnés contiennent donc les facteurs libérés par les cellules Cal 27 sous l'effet des conditions expérimentales présentées figure III.1. Ils subissent une centrifugation de 1500 tours par minutes pendant 5 minutes afin de séparer les cellules ou débris cellulaires qu'ils contiennent. Les surnageants sont conservés, la quantité totale de protéines qu'ils contiennent est dosée selon la méthode de Lowry (exposée dans la partie I).

Le milieu initial utilisé pour la culture des cellules Cal 27 est un milieu RPMI pauvre en serum de veau foetal (2%). Pour assurer des conditions optimales à la culture des anneaux aortiques, les milieux conditionnés sont dilués de moitié dans un milieu complet (10% de SVF), fraîchement préparé.

#### b. Caractérisation

Pour la détection d'un large spectre de molécules dans ces milieux, le kit « Proteome Profiler Array » utilisé est un outil qui autorise une mesure semi-quantitative rapide et facile d'un grand nombre de facteurs clés de l'angiogenèse présent dans ces milieux (Voir en annexe). Le cocktail d'anticorps de détection est directement ajouté à un volume d'échantillon contenant une quantité de 1,5 mg de protéines totales, le tout est mis à réagir pendant 1h à température ambiante. Puis ce mélange est déposé sur les membranes de nitrocellulose après leur saturation, pour une incubation nocturne à 4°C sous agitation. Suite à plusieurs lavages, les membranes sont incubées 30 minutes dans la Streptavidine-HRP, puis lavées avant la révélation par chimiluminescence (ChemiDoc System, BioRad France). Une photo de la membrane est prise grâce à l'appareil d'analyse d'image. Les spots positifs sont sélectionnés et numérotés de même qu'une zone dans le bruit de fond, la figure III.2 illustre le traitement de l'image. Puis le logiciel Quantity One permet une quantification de l'intensité du signal qu'il restitue en valeurs numériques auxquelles est retirée la valeur du bruit de fond. Afin de comparer les résultats entre les membranes, les valeurs du signal ont été normalisées à un contrôle positif présent sur la membrane.

Si ce type d'analyse permet une première évaluation des facteurs en présence dans les milieux, il ne donne qu'une tendance des variations de concentration qui sont induites par les conditions expérimentales. Ces mesures ont donc été complétées par une mesure quantitative de cytokines par BPA (BioRad), au moyen du kit « Bioplex human cytokine » (BioRad, France).

### 3 – 3) Activité angiogénique

Les anneaux aortiques sont marqués par la phalloïdine et observés par microscopie de fluorescence. Après deux rinçages au PBS, les échantillons sont perméabilisés par une incubation de 10 minutes dans 500 µL de triton 0,1%. De nouveau, deux lavages au PBS sont réalisés. Les échantillons sont ensuite exposés pendant 30 minutes à la phalloïdine-Texas Red (6,6 nmol/mL) diluée au centième dans du PBS, à raison de 200 µL par puits.

Le modèle tridimensionnel rend difficile l'acquisition d'images en microscopie de fluorescence. L'observation en lumière transmise a été utilisée pour recueillir un maximum d'informations. Afin de réaliser une quantification du réseau vasculaire obtenu par bourgeonnement après culture des anneaux aortiques, une coloration au bleu de toluidine est utilisée. Les échantillons sont incubés dans 20 µL de solution de bleu de toluidine pendant 5 minutes et lavés au PBS pour éliminer l'excès de colorant. Le traitement de l'image permet de soustraire l'anneau des clichés réalisés (NIS-AR module : detect valleys) puis le nombre de tubules ainsi que leur longueur et la surface qu'ils occupent sont déterminées par le logiciel AngioQuant comme illustré dans la figure III.3.

#### 4- Modifications du micro-environnements par le cetuximab et la perte d'expression de PTEN : impact sur l'induction de l'angiogenèse tumorale

##### 4 – 1) Observation et quantification de l'angiogenèse induite par les milieux conditionnés

###### a. Culture des anneaux aortiques dans les milieux témoins

Le marquage par la phalloïdine-Texas Red de l'actine cellulaire montre que les anneaux aortiques cultivés dans les milieux non conditionnés (Milieux RPMI 2%, dilué de moitié avec un milieu complet) sont, au bout de 6 jours de culture, entourés de cellules qui ont migré à distance de la pièce aortique. De plus ces cellules semblent isolées les unes des autres (Figure III.4, photo « non conditionné »). Les images obtenues par microscopie optique confirment cette observation mais révèlent également la présence de structures de type tubulaire dans ce milieu (Figure III.5, photo « non conditionné »). La formation de telles structures peut être attribuée aux facteurs de croissance contenus dans le SVF du milieu non conditionné et à la composition du matrigel®. La quantification par le logiciel AngioQuant dénombre ainsi à 1202,3 ( $\pm$  136,2) complexes tubulaires en moyenne, avec la présence d'un certain nombre de ramifications.

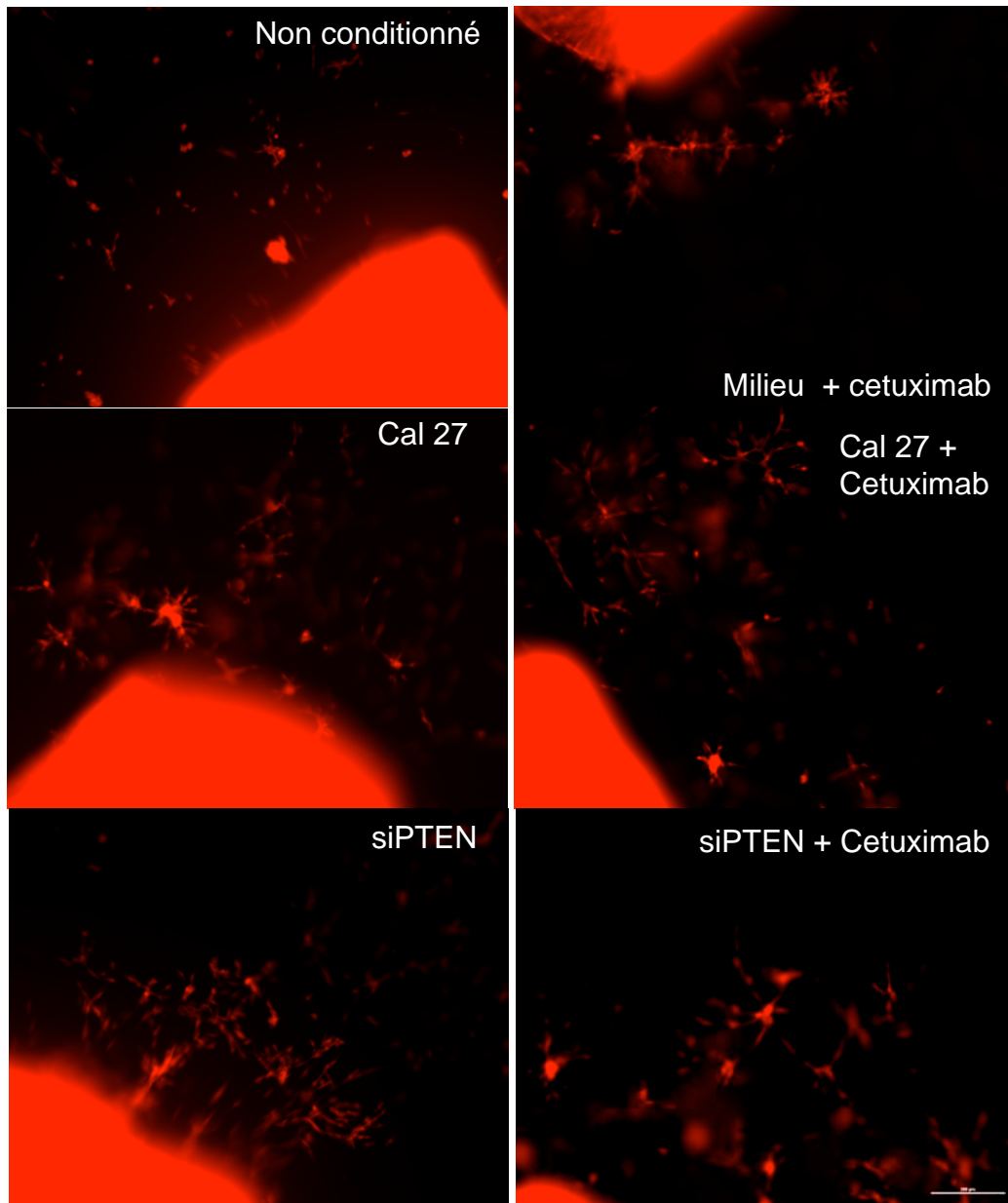


Figure III.4 : images par microscopie de fluorescence d'anneaux aortiques après 5 jours de culture. Les cellules sont visualisées par marquage de l'actine avec la phalloïdine-Texas Red. La barre représente 200  $\mu\text{m}$  (Nikon AZ100). Non conditionné désigne le milieu RPMI 2% de SVF dilué de moitié avec le milieu complet avant la mise en culture de l'anneau. siPTEN désigne le milieu produit par les cellules Cal 27 transfectées avec la séquence de siRNA ciblant PTEN. Les photos de droites représentent les anneaux aortiques conditionnés par les mêmes cellules, exposées durant 48h au cetuximab.

Cependant, il faut noter que le logiciel AngioQuant compte des structures tubulaires à partir de 10 pixels (30  $\mu\text{m}$ ) en largeur. Il est possible que le nombre important évalué dans ce milieu témoin (non conditionné par les cellules tumorales) soit en partie dû aux cellules endothéliales isolées.

Dans ce même milieu auquel le cetuximab a été ajouté, à l'observation on note une diminution du phénomène de bourgeonnement : le réseau tubulaire, visualisé en microscopie optique, a un aspect moins dense, suggérant un effet inhibiteur direct du cetuximab sur le bourgeonnement endothélial (Figure III.5 : photos « Milieu + cetuximab » vs « Milieu »). Le logiciel AngioQuant confirme l'observation en évaluant le nombre moyen de complexes tubulaires à 624 ( $\pm 186,7$ ). La prolifération cellulaire est ainsi divisée par 2 dans l'échantillon cultivé dans le milieu contenant 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cetuximab (Figure III.10, graphe Nombre : colonne 2 vs colonne 1), montrant un effet inhibiteur et cytostatique direct du cetuximab sur la prolifération des cellules vasculaires issues de l'anneau aortique.

Toutefois, le bourgeonnement qui se produit sous l'effet du milieu non conditionné contenant le cetuximab montre un niveau d'organisation qui semble plus important, en partie du fait de la présence diminuée des cellules endothéliales isolées, au profit de structures tubulaires ramifiées. Cette observation est appuyée par la détermination de la longueur moyenne des complexes tubulaires formés dans le milieu non conditionné contenant le cetuximab. En effet, celle-ci est deux fois plus importante que celle évaluée dans le milieu dépourvu de cetuximab ( $\times 2,3$  ;  $P = 0,0495$ ).

Le phénomène de bourgeonnement étant identifié de façon importante dans les milieux témoins, non conditionnés par les cellules tumorales, les données quantitatives fournies par le logiciel ont été analysées suite à une normalisation aux valeurs moyennes correspondant au milieu non conditionné sans cetuximab (anneau aortique « Milieu », Figure III.5) afin de faciliter la comparaison entre les échantillons.

#### b. Culture des anneaux aortiques dans les milieux conditionnés par les cellules Cal 27

Le bourgeonnement aortique, sous l'effet des milieux conditionnés par les cellules Cal 27, est dense (Figures III.4 et III.5, photo « Cal 27 »), montrant la prolifération cellulaire pendant la période de culture. Le dénombrement par le logiciel AngioQuant, évalué à 1242 ( $\pm 215,5$ ) le nombre de complexes tubulaire en moyenne, contre 1102,3 ( $\pm 136,8$ ) dans le milieu témoin non conditionné, la différence n'est pas significative.

Le marquage fluorescent permet d'identifier des cellules en amas qui se forment sous l'effet du milieu conditionné par les cellules Cal 27 (Figure III.4, photo « Cal 27 »). Ils sont également visibles en microscopie optique suite au marquage au bleu de toluidine (Figure III.5 photo « Cal 27 »). Par microscopie à contraste de phase, un grossissement plus important permet la visualisation de ces « paquets » de cellules à l'origine de plusieurs ramifications, comme représenté par les photos suivantes (Figure III.6)

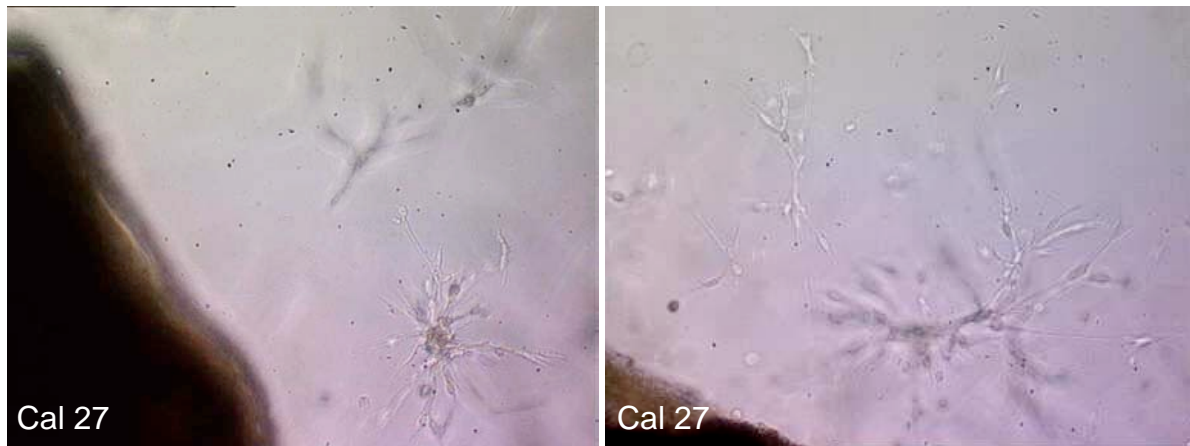


Figure III.6 : Image de deux anneaux aortiques à 5 jours de cultures dans les milieux conditionnés par les cellules Cal 27 en microscopie à contraste de phase. Grossissement x10. Cal 27 désigne le milieu produit par les cellules Cal 27.

L'analyse des données normalisées (aux valeurs obtenues dans l'analyse du milieu non conditionné) met en évidence une augmentation significative de la longueur des tubules. Les tubules formés sous l'effet du milieu conditionné par les cellules Cal 27 sont 1,7 fois plus longs que sous l'effet du milieu non conditionné (Figure III.7, graphe Longueur : colonne 3 vs colonne 1). La migration des cellules vasculaires à distance de l'anneau aortique n'est pas significativement modifiée par le milieu conditionné par les cellules Cal 27 ( $521,5 \pm 72,4$  vs  $623 \pm 133,4$ ). Cependant, ces complexes tubulaires s'éloignent peu de l'anneau aortique et montrent des ramifications importantes. Quelques cellules semblent former des plages réduites d'où rayonnent de courtes ramifications.

L'anneau aortique cultivé dans le milieu conditionné par les cellules Cal 27 exposées au cetuximab bourgeonne de façon importante, formant de nombreuses structures tubulaires. Mais on peut observer deux grandes différences par rapport à la situation précédente : des tubes vasculaires ramifiés plus longs, plus distant de l'anneau aortique et en même temps de plus nombreux amas cellulaires denses (Figure III.5, cercle rouge : photo « Cal 27 + cetuximab »).

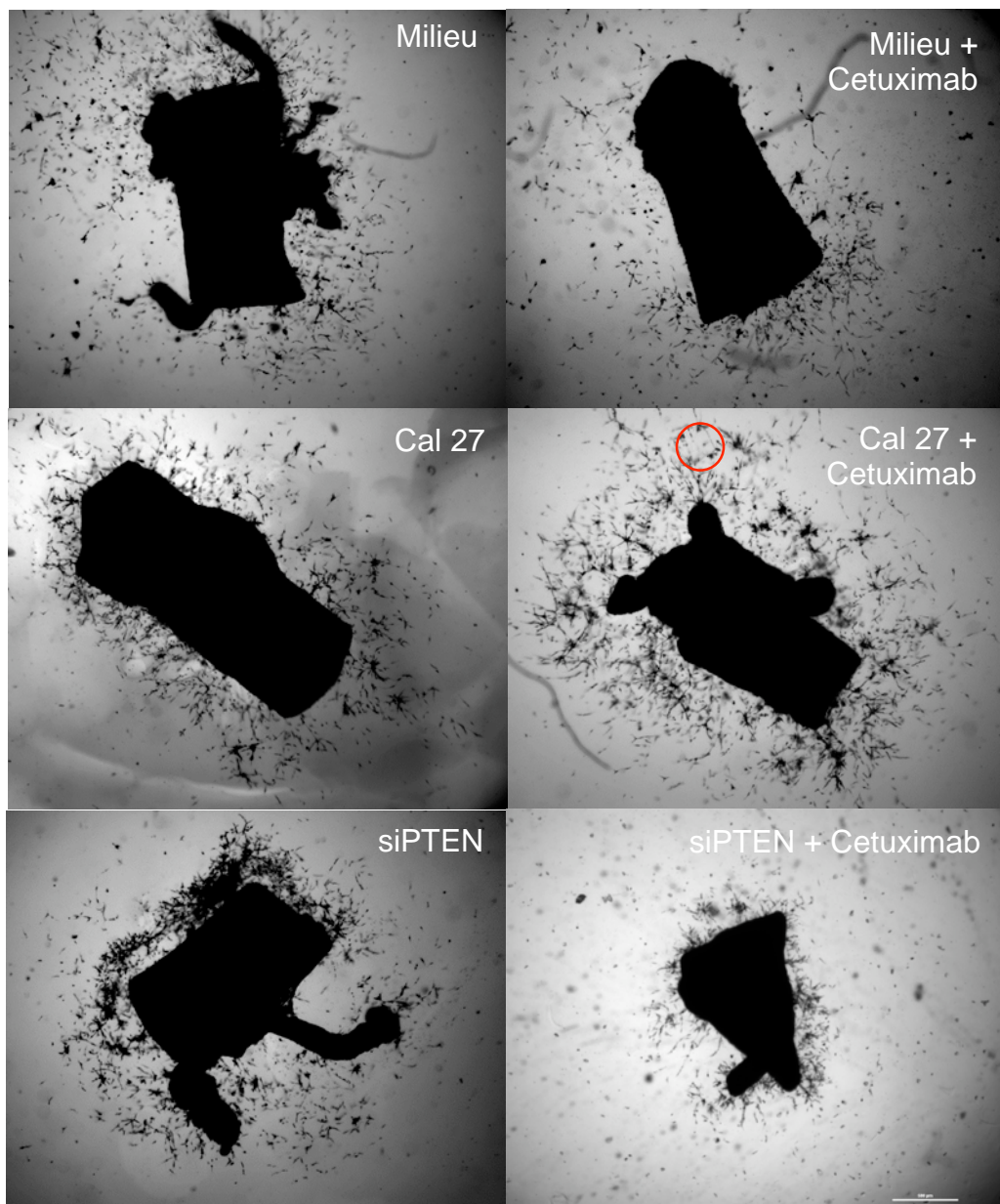


Figure III.5 : images par microscopie à lumière transmise d'anneaux aortiques après 5 jours de cultures dans les différents milieux conditionnés. La barre représente 500  $\mu\text{m}$  (Nikon AZ100). Non conditionné désigne le milieu RPMI 2% de SVF dilué de moitié avec le milieu complet avant la mise en culture de l'anneau. Cal 27 désigne le milieu produit par les cellules Cal 27. Le cercle rouge indique une structure en « amas cellulaire ». siPTEN désigne le milieu produit par les cellules Cal 27 transfectées avec la séquence de siRNA ciblant PTEN. Les photos de droites représentent les anneaux aortiques conditionnés par les mêmes cellules, exposées durant 48h au cetuximab.

L'effet anti-prolifératif du cetuximab qui était observé de façon directe sur les cellules vasculaires dans le milieu non conditionné n'est pas trouvé via le conditionnement par les cellules Cal 27. A partir de ces amas cellulaires, les ramifications restent nombreuses et longues. Le milieu produit par les cellules Cal 27 exposées au cetuximab induit la formation de structures tubulaires légèrement plus longues ( $\times 0,7$ , Figure III.10, graphe Longueur : colonne 4 vs colonne 3;  $P = 0,05$ ) que celles trouvées sous l'effet du milieu Cal 27.

Après exposition au cetuximab, les facteurs angiogéniques libérés par les cellules Cal 27 permettent d'induire des complexes tubulaires continus, fortement ramifiés sur une grande distance tout en restant en contact avec l'anneau aortique. Le cetuximab semblerait avoir ici un rôle qui faciliterait la mise en place de structures capillaires fines longues, « efficaces », avec des cellules étirées comme le montre le marquage à la phalloïdine. Cependant, on observe parallèlement un plus grand nombre de plages cellulaires d'où partent des ramifications désordonnées sans aucun contact avec l'anneau aortique, plages qui pourraient être dues à des cellules dont l'activité angiogénique serait réduite, et donc dont la capacité à s'étirer, migrer pour former des structures capillaires serait restreinte.

#### c. Culture des anneaux aortiques dans les milieux conditionnés par les cellules siPTEN

Le marquage fluorescent de l'actine dans l'échantillon en culture dans le milieu conditionné par les cellules siPTEN est irrégulier (Figure III.4, photo « siPTEN »). Les cellules marquées ont un aspect allongé sans former de nettes ramifications, ou rares.

Le phénomène angiogénique induit par le milieu produit par les cellules siPTEN mis en évidence par microscopie optique après marquage au bleu de toluidine (Figure III.5, photo « siPTEN ») est caractérisé par de très nombreuses cellules concentrées à proximité de l'anneau, de forme peu étirée. Lorsqu'elles le sont, elles forment des tubes très courts, donnant un aspect foisonnant et serré.

L'aspect concentré du bourgeonnement, peut être estimé par la distance maximale qui le sépare de l'anneau aortique, qui constitue alors une mesure de la migration cellulaire. En moyenne, les structures tubulaires s'étendent en moyenne jusqu'à  $521,5 \mu\text{m}$  ( $\pm 72,4$ ) de l'anneau dans le milieu conditionné par les cellules Cal 27 alors qu'elles sont trouvées jusqu'à  $358 \mu\text{m}$  ( $\pm 81$ ) dans le milieu conditionné par les cellules siPTEN (Figure III.5 photo « Cal 27 » vs « siPTEN »).

De plus, le dénombrement des structures tubulaires par le logiciel AngioQuant montre que la culture des anneaux aortiques dans le milieu conditionné par les cellules siPTEN aboutit à une formation plus dense de complexes vasculaires comparés à ceux obtenus avec le milieu conditionné



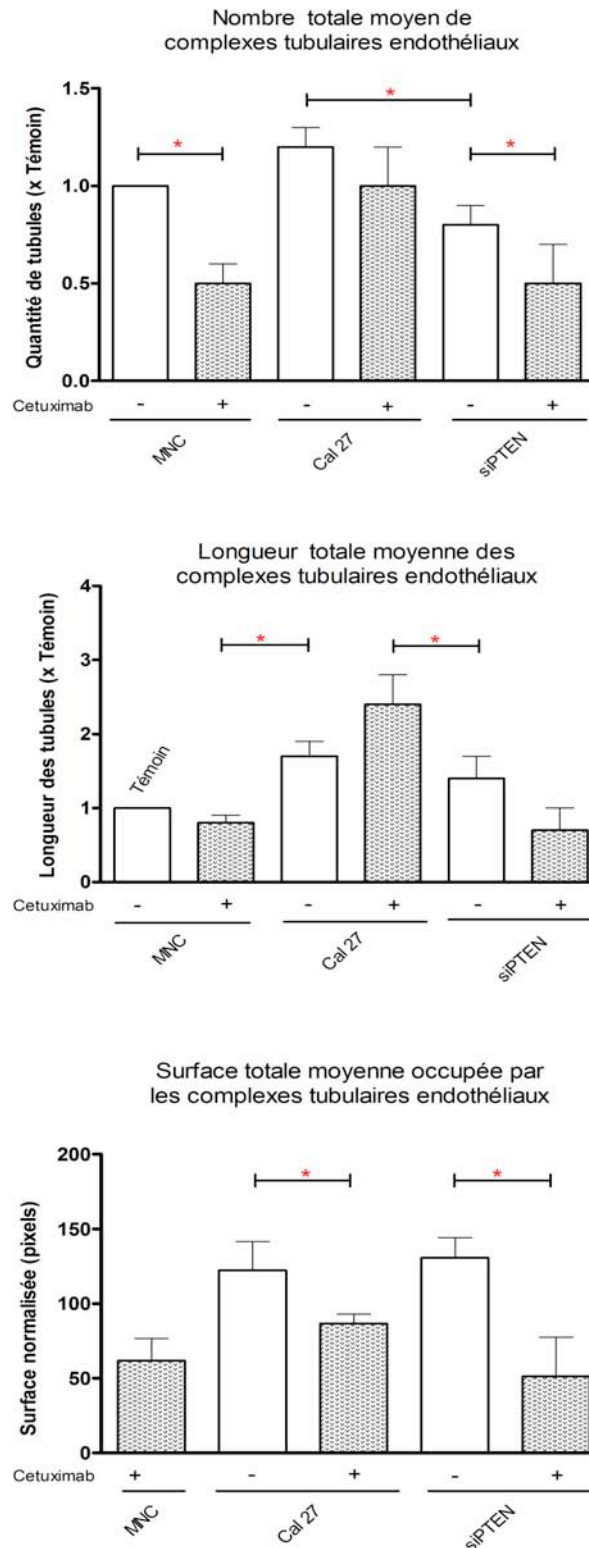


Figure III.7 : Variation des paramètres quantitatifs caractéristiques du bourgeonnement aortique. Les graphiques représentent les valeurs normalisées du nombre et de la longueur de tubules, ainsi que la surface qu'ils occupent, par rapport au milieu non conditionné par les cellules tumorales. MNC désigne le milieu non conditionné. siRNA Ctl le milieu conditionné par les cellules Cal 27 transfectées par la séquence de siRNA contrôle et siPTEN le milieu conditionné par les cellules Cal 27 transfectées par la séquence de siRNA qui cible PTEN. La normalisation est réalisée sur les moyennes des duplicats de 3 expériences indépendantes  $\pm$  écarts moyens. \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$ .

par les cellules Cal 27 ( $P = 0,0143$  - Figure III.10, graphe Nombre, colonne 5 vs colonne 3). La densité du réseau vasculaire formé rend néanmoins l'analyse quantitative difficile. Les images obtenues en grossissement plus important par microscopie à contraste de phase détaillent ce phénomène sur les images suivantes (Figure III.8).

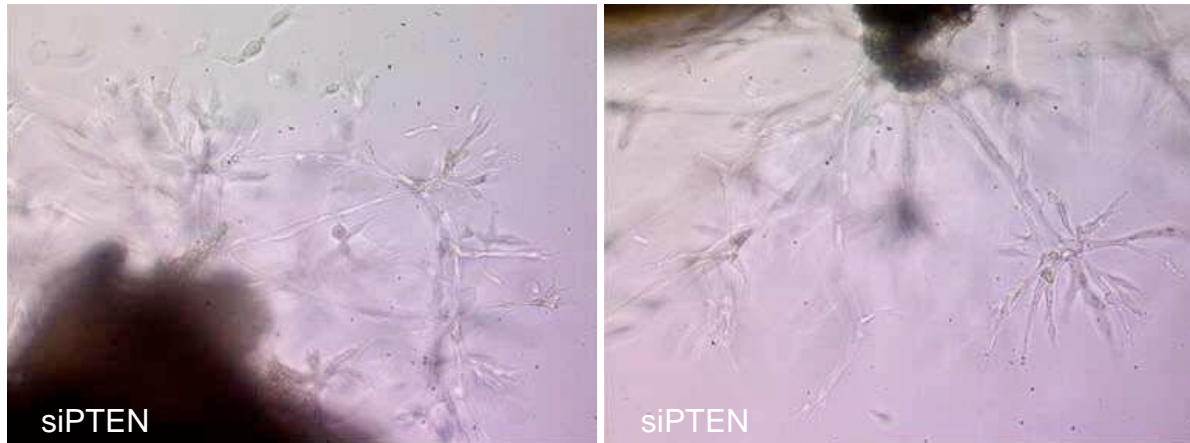


Figure III.8 : Image de deux anneaux aortiques à 5 jours de cultures dans les milieux conditionnés par les cellules siPTEN en microscopie à contraste de phase. Grossissement  $\times 10$ . siPTEN désigne le milieu produit par les cellules Cal 27 dans lesquelles l'expression de PTEN est inhibée par siRNA.

Le silencing de PTEN dans les cellules Cal 27 affecte donc bien la production de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales, conduisant à une diminution de la capacité migratoire des cellules vasculaires sous l'effet de ce milieu, mais une augmentation très importante du nombre de bourgeonnements et de ramifications.

Suite au traitement des cellules SiPTEN par le cetuximab, on observe un éclaircissement très nette des structures vasculaires, avec une densité cellulaire très restreinte et des ramifications peu nombreuses (Figure III.5 photos « siPTEN + cetuximab » vs « siPTEN »). Les données de quantification confirment l'observation puisque le nombre des structures tubulaires est réduit de 40% en milieu conditionné par les cellules siPTEN exposées au cetuximab par rapport au nombre total moyen compté en milieu conditionné par les cellules siPTEN non traitées ( $472,2 \pm 263,2$  vs  $1013 \pm 101,7$  ;  $P = 0,0275$ ).

Ainsi, les cellules siPTEN exposées au cetuximab produisent un milieu dont la capacité à induire le bourgeonnement endothélial est significativement amoindrie par rapport aux cellules non traitées, avec une longueur totale des structures tubulaires diminuée de moitié ( $1,4$  vs  $0,7$  – Figure III.10 Graphe Longueur, différence non significative statistiquement  $P = 0,0771$ ).

Ainsi le cetuximab aurait, via les cellules SiPTEN, un effet inhibiteur sur l'angiogenèse, effet particulièrement visible sur la capacité des cellules vasculaires à proliférer.

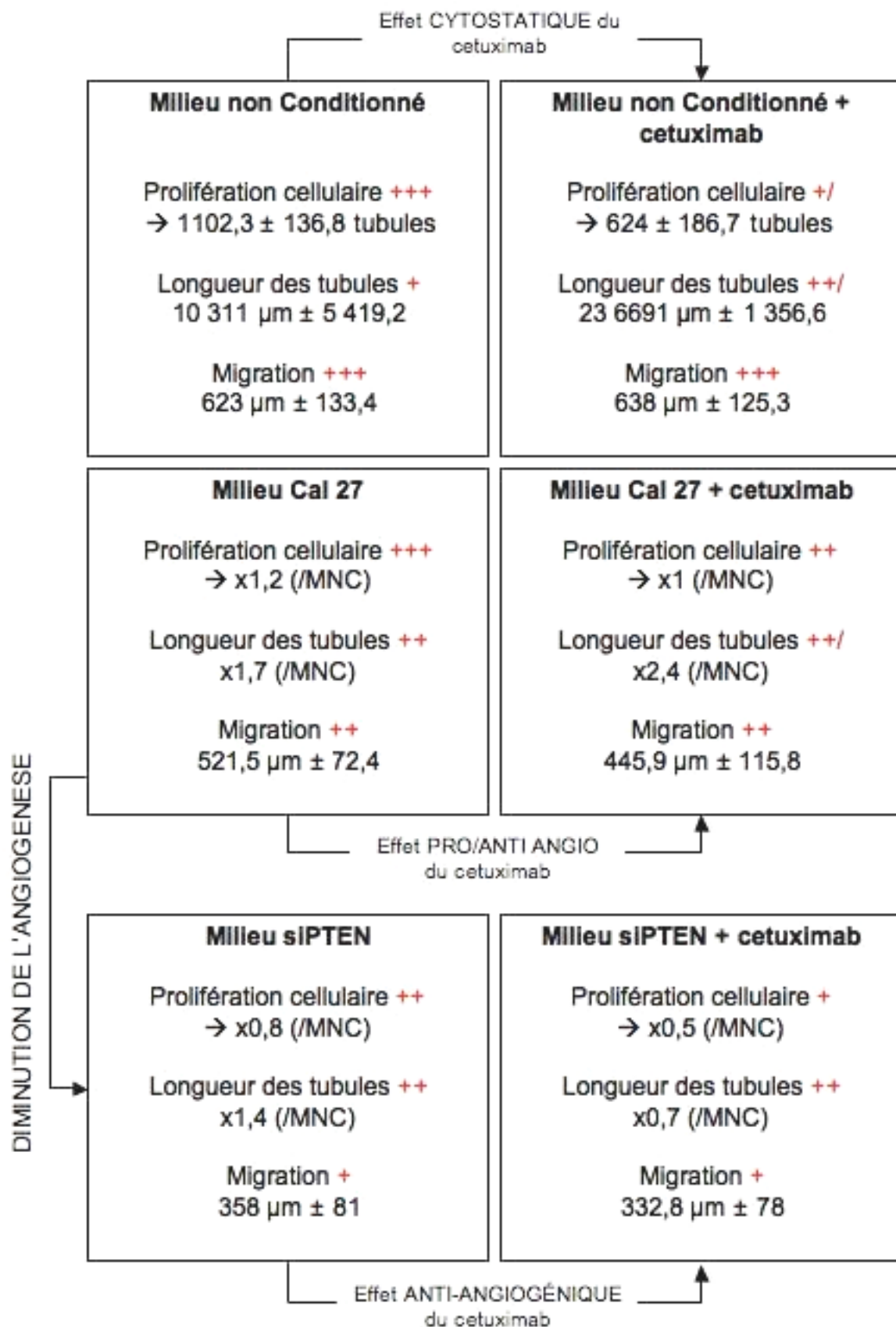


Diagramme III.1 : Récapitulatif des effets angiogéniques des différents milieux conditionnés sur les anneaux aortiques.

L'ensemble de ces résultats montre que le cetuximab a un effet antiangiogénique direct sur les cellules endothéliales (milieu non conditionné contenant le cetuximab). L'exposition des cellules Cal 27 au cetuximab provoque des changements dans les molécules angiogéniques que ces cellules libèrent dans le milieu conditionné. Ces changements ont un impact essentiellement sur l'architecture du réseau vasculaire issu des anneaux aortiques. Ce dernier apparaissant plus étendu, abondamment ramifié, tout en présentant de plus nombreuses plages de cellules ragroupées.

En revanche, le silencing de PTEN a pour conséquence une production de facteurs par les cellules Cal 27 qui ont pour effet de concentrer l'angiogénèse dans un périmètre restreint autour de l'anneau aortique, suggérant que dans ce contexte, la capacité des cellules endothéliales à migrer semble limitée, au profit d'une capacité de bourgeonnement et de ramification augmentée, puisqu'elles sont très nombreuses et les tubes très courts.

L'ensemble des résultats est schématisé dans le diagramme suivant D.III.1.

#### 4 – 2) Composition des milieux conditionnés

Pour comprendre ces observations microscopiques, le contenu en molécules angiogéniques des milieux conditionnés a été analysé. Ainsi les quantités de VEGF ont été évaluées afin de vérifier si les modifications de la concentration du facteur (dont l'expression est régulée par la voie PI3K/AKT, dépendante de l'EGFR) peuvent être à l'origine des phénomènes angiogéniques observés. Pour ce faire, la technique de bioplex protein array a été utilisée. peuvent être à l'origine de ces phénomènes de bourgeonnement. Pour ce faire, la technique de bioplex protein array a été utilisée.

##### a. Dosage du VEGF

Les cellules Cal 27 produisent à l'état basal (dans les conditions expérimentales décrites dans la partie II de ce travail) 2pg/mL de VEGF dans le milieu conditionné (Figure III.7). L'exposition au cetuximab réduit d'environ 3 fois la libération de VEGF par les cellules Cal 27, correspondant à l'inhibition de la voie PI3K/AKT (partie I et II) qui régule la synthèse du VEGF. Cette régulation est également mise en évidence par l'effet du silencing de PTEN sur la concentration de VEGF puisque la perte transitoire de PTEN dans les cellules Cal 27 a pour conséquence une production de VEGF multipliée par 3 (5,46 pg/mL).

### Dosage du VEGF dans les milieux conditionnés

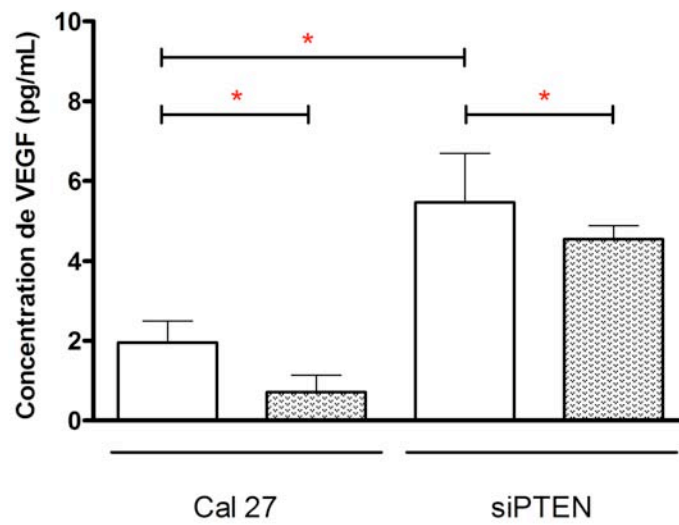


Figure III.9 : Concentrations de VEGF dans les différents milieux conditionnés. La mesure de la concentration de VEGF dans les milieux conditionnés par les cellules Cal 27 et les milieux conditionnés par les cellules siPTEN ont été réalisées au moyen du bioplex protein array, avec l'utilisation d'un kit dédié au dosage des cytokines. Le graphique représente les valeurs moyennes du dosage de 3 expériences indépendantes  $\pm$  écarts moyens. \* :  $P < 0,05$ .

L'efficacité du cetuximab à inhiber l'activation de la voie PI3K/AKT observée dans les cellules siPTEN a pour conséquence une réduction de 20% de la concentration de VEGF dans le milieu conditionné. Ainsi les quantités de VEGF libérées par les cellules correspondent aux mécanismes de régulation de sa synthèse précédemment décrits.

Ainsi, l'augmentation du VEGF libéré par le silencing de PTEN permet d'expliquer en partie les résultats observés en microscopie avec une densité de bourgeonnement qui est augmentée, typique d'une concentration élevée de VEGF. Les effets anti-angiogéniques (baisse de 60% du taux de VEGF libéré) du cetuximab via les cellules Cal 27 sont quant à eux difficilement corrélables aux observations microscopiques qui montrent d'une part un réseau vasculaire plus étendu, plus ramifié donc en opposition avec une baisse de VEGF, et d'autre part une augmentation du nombre de plages de cellules regroupées (donc non angiogéniques) en adéquation avec cette baisse de VEGF libéré.

En revanche, dans le cas des cellules siPTEN traitées par le cetuximab, la baisse de VEGF libéré (20%) est en adéquation avec l'effet anti-angiogénique (anti-prolifératif) observé par microscopie.

Ainsi, l'analyse de l'angiogenèse par microscopie montre que à lui seul, le VEGF ne peut expliquer les différences parfois subtiles observées entre les différentes conditions expérimentales. Ceci a motivé une analyse plus globale de la balance angiogénique des facteurs en présence dans ces milieux conditionnés, par l'étude de leurs compositions au moyen d'un kit permettant la détection simultanée d'un grand nombre de facteurs pro ou anti-angiogéniques.

#### b. Détection d'autres facteurs

La technique utilisée pour identifier un plus large spectre de molécules présentes dans les milieux conditionnés est une technique d'array. Ce type d'analyse permet de mettre en évidence des variations de nombreuses cibles dues à une condition expérimentale, sans cependant fournir une quantification de l'ampleur des variations. Les résultats mettent en évidence que l'exposition des cellules Cal 27 au cetuximab, de même que le silencing transitoire de PTEN ont un impact sur la quantités de facteurs pro et anti-angiogéniques libérés par les cellules, qui peut être mis en relation avec les variations de l'activation des voies de signalisation mises en évidence précédemment.

La figure III.10 représente les résultats de l'analyse des milieux conditionnés, ils sont exprimés en intensité du signal obtenu. Une quinzaine de facteurs impliqués dans la régulation de l'angiogenèse ont émergé de cette analyse, sur les cinquante que le kit peut mettre en évidence.

Ainsi, les résultats de l'array montrent que de nombreux facteurs pro et anti-angiogéniques sont détectés dans les milieux conditionnés par les cellules Cal 27 et que le cetuximab comme la perte d'expression transitoire de PTEN ont un impact sur la libération de ces facteurs par les cellules Cal 27.

## Facteurs de régulation de l'angiogenèse détectés dans les milieux conditionnés

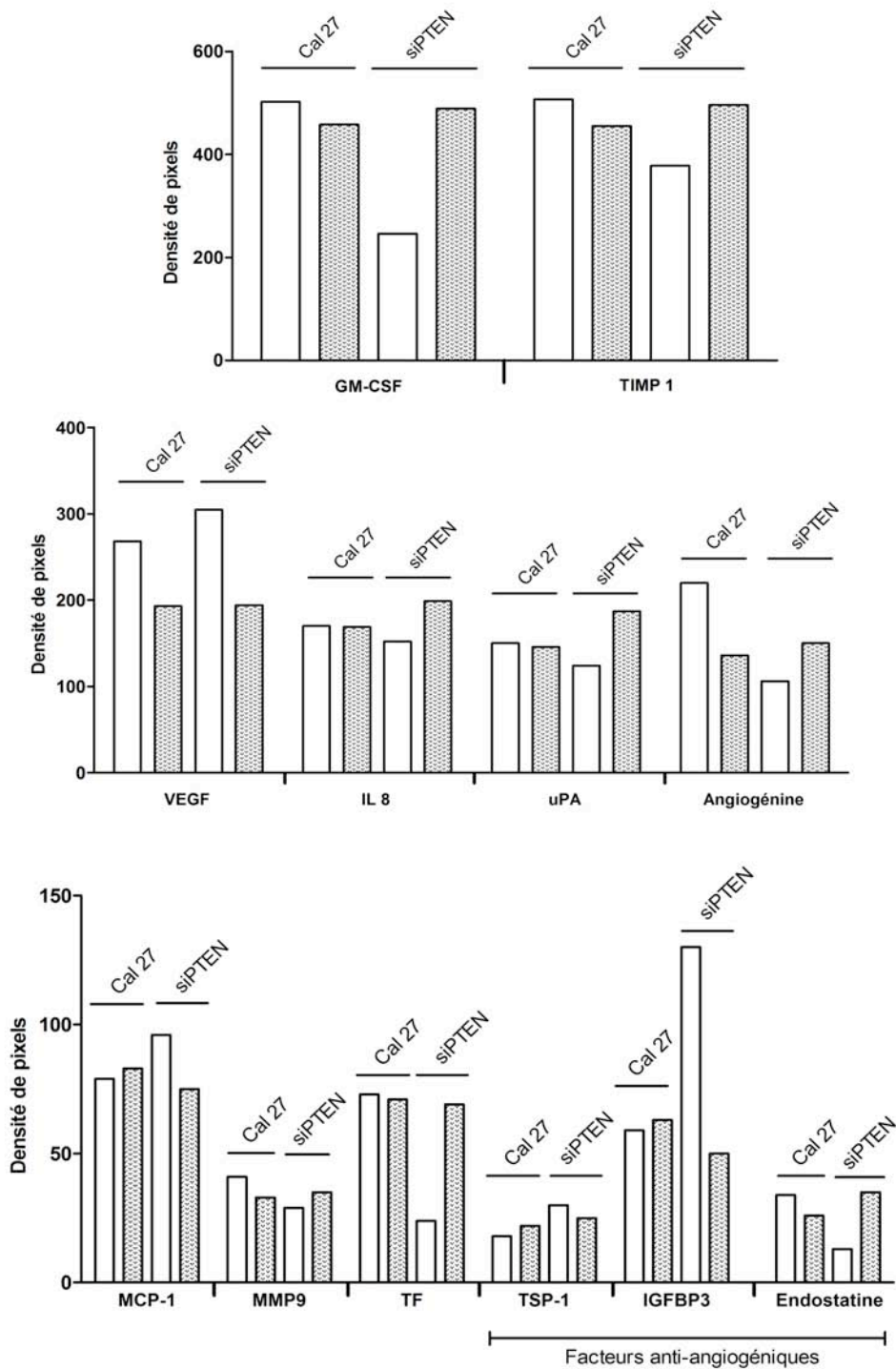


Figure III.10 : Variation des facteurs impliqués dans la régulation de l'angiogenèse détectés dans les différents milieux conditionnés. Les graphiques représentent l'intensité de signal mesurée par le logiciel Quantity One sur les membranes ayant réagi avec les milieux conditionnés par les cellules Cal 27 et siPTEN. Ils sont présentés en quantités décroissantes afin de respecter les échelles. Le premier graphique présente les facteurs qui ont produit un signal d'intensité comprise entre 200 et 600 pixel/mm<sup>2</sup>. Le second présente les facteurs qui ont produit un signal d'intensité comprise entre 100 et 350 pixel/mm<sup>2</sup>. Le dernier présente les facteurs qui ont produit un signal d'intensité comprise entre 20 et 150 pixel/mm<sup>2</sup>.

Outre le nombre de facteurs détectés dans des concentrations variables dans les milieux conditionnés, ces résultats montrent la complexité de la balance pro/anti-angiogénique puisque les facteurs ont des effets biologiques d'ampleurs variables.

Les facteurs pro-angiogéniques IL 8, GM-CSF, MCP 1 et VEGF ont été décrits comme des facteurs qui jouent un rôle prépondérant dans l'angiogénèse induite par les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Partie introductive). Ces facteurs sont en effet mis en évidence et leurs niveaux d'expression par les cellules Cal 27 exposées au cetuximab ou les cellules siPTEN subissent des variations. En revanche, le FGF basique, impliqué dans la promotion de l'angiogénèse tumorale des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, n'a été détecté ni par le BPA ni par la méthode d'array, ce qui indique qu'il ne fait pas partie des facteurs sécrétés par les cellules Cal 27, mais pourrait être plutôt issu de la matrice extracellulaire et/ou de la membrane basale endothéliale.

De façon similaire à ce qui est observé *in vivo* et chez les patients, les facteurs qui sont détectés dans les plus importantes quantités dans le milieu conditionné par les cellules Cal 27 sont le GM-CSF, le VEGF et l'IL8 (Figure II.10). Par ailleurs, la lignée cellulaire sécrète, dans des quantités comparables à celles du GM-CSF, l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases TIMP 1, en lien avec la présence de la MMP 9 dans les milieux conditionnés. En termes d'intensité de signal viennent ensuite l'angiogénine, du même ordre que celle de l'IL8, suggérant une forte concentration basale de ces deux facteurs dans le milieu conditionné des cellules Cal 27.

Le traitement des cellules Cal 27 par le cetuximab semble provoquer une diminution de la libération du VEGF, de l'angiogénine, de la MMP9 et de l'endostatine, mais également une augmentation de la thrombospondine-1 (TSP-1), de l'IGFBP3, etc. L'analyse de ce milieu conditionné montre une balance angiogénique qui est modifiée à la fois au niveau de ces facteurs pro et anti-angiogéniques, ce qui peut expliquer ces deux effets observés en microscopie, à savoir un effet qui semble pro-angiogénique avec des structures tubulaires mieux structurées et un effet anti-angiogénique avec des plages plus nombreuses de cellules en amas, peu angiogéniques.

Le silencing de PTEN, quant à lui, induit de fortes modifications de certains facteurs : une très forte augmentation de l'IGFBP3 (facteur anti-angiogénique), et une très forte diminution du facteur tissulaire (TF), de GM-CSF et de l'angiogénine (facteurs pro-angiogéniques) et de l'endostatine (facteur anti-angiogénique). Le silencing de PTEN produit par ailleurs des augmentations significatives de VEGF, MCP-1, TSP-1 et de significatives diminutions de TIMP-1, uPA, MMP9. Ces nombreuses et fines modifications de la balance montrent là encore, qu'il est difficile d'établir un lien entre les observations microscopiques et des phénomènes moléculaires.



Il est intéressant cependant de noter qu'en cas de traitement des cellules siPTEN par le cetuximab, nombreuses de ces modifications sont « inversées » dans le sens où le cetuximab, s'opposerait à l'effet que le silencing de PTEN semble avoir sur la sécrétion de ces facteurs et sans doute sur leur expression. Parmi toutes ces modifications on note, par exemple, que pour la thrombospondine 1, facteur décrit comme un anti-angiogénique puissant, le silencing de PTEN conduit à son augmentation d'un facteur de 1,7 fois dans le milieu, comparé aux cellules Cal 27 exprimant PTEN. L'exposition de ces cellules siPTEN au cetuximab, ramène leur libération de la TSP-1 à des valeurs proches des cellules Cal 27 non traitées et il en est de même pour GM-CSF, TIMP-1, MMP9, MCP-1, TF, IGFBP3, Endostatine. En revanche, il s'avère que pour le VEGF, l'uPA et l'IL8, le cetuximab va au delà de cette inversion d'effet (Figure II.10). Pour le VEGF, pour lequel, il inhibe l'augmentation de sécrétion induite par le silencing de PTEN, le cetuximab inhibe en plus la sécrétion basale des cellules Cal 27. De même pour l'uPA et l'IL8, le cetuximab inhibe la diminution induite par le silencing de PTEN et en plus induit une augmentation de ces deux facteurs comparés au niveau basal retrouvé dans les milieux conditionnés par les cellules Cal 27.

## 5- Discussion

La microscopie de fluorescence a été choisie initialement comme méthode d'observation pour la possibilité d'avoir recours à des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales comme le facteur Von Willebrand. La détection de cette protéine a été tentée par un marquage immuno-fluorescent indirect. Mais le matrigel piégeant l'anticorps, un bruit de fond important a été observé. La technique de fluorescence s'est donc heurtée aux conditions expérimentales mises en oeuvre ici, notamment la culture tri-dimensionnelle dans une matrice extracellulaire. Cependant le marquage à la phalloïdine-Texas Red donne un certain nombre d'informations d'ordre qualitatif. Notamment le marquage de l'actine des cellules endothéliales cultivées dans le milieu conditionné par les cellules siPTEN est hétérogène suggérant que le cytosquelette de ces cellules peut être altéré. La sensibilité du microscope à très faible grossissement (x 4) en fluorescence empêche l'utilisation de cette technique d'observation pour visualiser l'anneau aortique dans son ensemble

Afin de visualiser l'induction de l'angiogénèse par l'anneau aortique entier, le recours à une technique de microscopie photonique en transmission a été adaptée. De plus l'observation en lumière transmise a permis de recueillir un grand nombre de données pouvant être exploitées de façon quantitative.

La dissémination des cellules endothéliales à distance de l'anneau aortique n'est pas un phénomène induit par les cellules tumorales puisqu'il est observé dans les échantillons cultivés en milieu non conditionné. Les cellules endothéliales migrent depuis la pièce aortique, mais restent massivement sous forme sphérique sans adopter le phénotype angiogénique qui leur permet de proliférer activement tout en migrant et s'étirant pour former des tubes et en bourgeonnant pour former un réseau vasculaire complexe et structuré.

Outre la matrice synthétique et les conditions de culture qui fournissent des facteurs de croissance, il semble que les cellules endothéliales ne trouvent pas les molécules suffisantes pour basculer dans ce phénotype angiogénique complet. Les résultats présentés correspondent à six jours de culture des anneaux aortiques. Les premières cellules en migration sont visibles environ 72 heures après la mise en culture. Dans ces milieux non conditionnés par les cellules tumorales, un effet inhibiteur direct du cetuximab sur le bourgeonnement des cellules endothéliales est mis en évidence, suggérant que le cetuximab pourrait inhiber l'angiogénèse indépendamment de son effet via les cellules tumorales. Ce mécanisme d'inhibition directe de l'angiogénèse par l'action des anti-EGFR sur les cellules

endothéliales a été précédemment décrit.

Notamment, des travaux menés *in vivo* dans un modèle de carcinome du pancréas montrent un effet cytotoxique du cetuximab sur les cellules endothéliales. En effet, dans cette étude 69% d'entre elles sont en apoptose au sein des tumeurs portées par les animaux traités par cetuximab (Bruns CJ et al, 2000). Suite à ce type d'observations, le mécanisme d'action a été étudié, et l'équipe de Hirata attribue l'effet anti-angiogénique d'un autre anti-EGFR, le gefitinib, au blocage de la signalisation intracellulaire endothéliale suite à l'inhibition de l'EGFR ainsi qu'à une régulation négative de la synthèse de VEGF et d'IL8 (Hirata A et al, 2002). La surexpression de l'EGFR par les cellules endothéliales semble être une caractéristique des cellules endothéliales associées aux tumeurs. Kim et collaborateurs montrent en effet que le récepteur, exprimé par les cellules endothéliales tumorales, n'est pas détecté dans les cellules endothéliales issues d'organes sains (Kim SJ et al, 2003). De plus ces auteurs évoquent la possibilité selon laquelle l'expression et l'activation de récepteurs de croissance par les cellules endothéliales répondent à un conditionnement par le microenvironnement. Cependant, des travaux menés au sein du laboratoire (menés par Valérie Jouan-Hureau et Cédric Boura sous la direction de Béatrice Faivre) confirment que les cellules endothéliales (HUVEC), en culture non conditionnée, expriment un niveau d'EGFR basal faible mais détectable par western blot. Ces données permettent d'expliquer l'effet anti-angiogénique du cetuximab dans les milieux non conditionnés par son action cytostatique sur les cellules endothéliales.

Le logiciel AngioQuant donne des indications quantitatives sur le phénomène de bourgeonnement, qui doivent néanmoins être exploitées en considérant les caractéristiques de mesure. En effet, le logiciel évalue un complexe tubulaire pour le signal d'une dizaine de pixels, aussi parmi les événements comptés, on peut distinguer des cellules qui ne forment pas à proprement parler de structure de type tubulaire, expliquant le nombre élevé trouvé dans le milieu non conditionné par les cellules tumorales. Le logiciel fournit un module de comptage du nombre d'embranchements, évaluant le phénomène d'anastomose qui est un paramètre pertinent dans l'étude de l'angiogenèse tumorale qui met en place des réseaux vasculaires désordonnés avec de nombreuses structures non fonctionnelles. Toutefois cette donnée n'a pas pu être exploitée dans cette étude, le niveau de discrimination du logiciel étant insuffisant à traiter les images présentées ici. Notamment des amas compacts de cellules endothéliales sont observés dans le milieu conditionné par les cellules siPTEN et ne permettent pas de distinguer de façon assez fine les ramifications formées.

En confrontant les observations morphologiques et les données quantitatives qui fournissent une indication plutôt que des valeurs absolues, on observe cependant une tendance à la structuration et l'organisation du réseau vasculaire formé sous l'effet du milieu conditionné par les cellules tumorales exposées au cetuximab. Ce dernier induit la formation d'un nombre de structures tubulaires plus faible mais dont la longueur est augmentée.

Ce phénomène peut être rapproché de la « normalisation » vasculaire qui a d'abord été décrite *in vivo* et chez les patients traités par thérapies anti-angiogéniques. En 2009, deux études sont publiées simultanément, démontrent que le traitement par erlotinib améliore la vascularisation tumorale. De façon intéressante, ces deux études sont menées sur des modèles de xénogreffes SQ20B, une lignée cellulaire issue d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou. Cerniglia et collègues, mènent des travaux qui évaluent l'architecture et la fonctionnalité des vaisseaux. Ils montrent que le traitement par erlotinib inhibe la synthèse du VEGF. D'après les auteurs, la modification du microenvironnement du fait de cette inhibition est à l'origine du phénomène de normalisation qu'ils décrivent. Les tumeurs SQ20B, suite à seulement 4 jours de traitement à l'erlotinib ont une vascularisation plus régulière (vaisseaux mieux formés) et plus fonctionnelle (vaisseaux moins fuyants, augmentation du flux sanguin tumoral). Ces modifications induites par le traitement anti-EGFR conduisent à une meilleure oxygénation, dont les auteurs suggèrent qu'elle est à l'origine de la radiosensibilisation. Dans leur étude, Qayum et collaborateurs font les mêmes observations dans les tumeurs suite au traitement par erlotinib (augmentation du flux sanguin, diminution de l'hypoxie tumorale), qu'ils complètent avec des inhibiteurs de Ras et de PI3K. L'inhibition des voies de signalisation provoque également une normalisation vasculaire (Cerniglia G et al, 2009, Qayum N et al, 2009).

Ainsi, le niveau d'organisation du bourgeonnement aortique en réponse au milieu conditionné par les cellules Cal 27 exposées au cetuximab semble s'inscrire dans ce phénomène de normalisation vasculaire. Ces observations doivent être complétées par une étude *in vivo*.

De façon inattendue, la perte transitoire de l'expression de PTEN a pour effet une modification de la composition des milieux conditionnés qui conduit à une diminution du nombre de complexes tubulaires formés. L'analyse de la composition des milieux conditionnés montre que les cellules siPTEN produisent un niveau de thrombospondine 1 plus important que les cellules Cal 27. Cette régulation négative de la TSP-1 par PTEN concorde avec les données publiées par Soula-Rothhut et collègues. D'après ces travaux, la réexpression de PTEN dans une lignée cellulaire de carcinome de la thyroïde induit une répression de l'expression de la TSP-1 (Soula-Rohhut et al, 2009).

L'IGFBP3, qui est également un facteur anti-angiogénique impliqué dans l'inhibition de l'angiogenèse induite par les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Oh SH et al, 2006), est présente en forte concentration dans les milieux produits par les cellules siPTEN et participe probablement à la diminution de l'induction du bourgeonnement endothélial. De la même façon, la libération ou la synthèse de GM-CSF et MCP1, décrits comme des facteurs importants dans l'induction de l'angiogenèse par les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, est régulée de façon négative par les cellules siPTEN.

Par ailleurs le milieu conditionné par les cellules siPTEN induit un bourgeonnement qui s'étend peu, évoquant une faible capacité à migrer ou à se propager au sein de la matrice tridimensionnelle. Il est intéressant de constater que la présence des MMP semble diminuée dans ces milieux, fournissant une possible explication à l'observation. En effet, les concentrations de la MMP 9 et du TIMP 1 diminuent légèrement. Bien que TIMP1 soit un inhibiteur des métalloprotéases, son niveau d'expression est considéré comme un marqueur de l'activation des MMP (Pradhan-Palikhe et al, 2010). Ainsi, les variations des quantités de facteurs qui régulent l'angiogenèse détectés dans les milieux conditionnés, donnent une indication sur l'origine moléculaire de l'induction plus ou moins importante par les milieux conditionnés par les cellules tumorales. Cependant, il convient de compléter ce type d'analyse par des dosages quantitatifs (ELISA) pour avoir une indication plus précise.

L'angiogenèse induite par les milieux conditionnés par les cellules Cal 27 ne montre pas de corrélation avec les variations de concentration du VEGF mesurées. Il semble donc que l'angiogenèse induite par ce modèle cellulaire ne soit pas entièrement dépendante de ce facteur, ce qui corrobore les travaux de Hasina et collaborateurs, qui proposent deux clusters de gènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse induite par les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Hasina et al, 2008). Une telle observation se révèle pertinente dans un contexte translationnel, car il pose dès la question du bénéfice des thérapies anti-angiogénique basées sur le ciblage du VEGF dans des sous-populations de patients dont les tumeurs seraient dépendantes d'autres facteurs pour l'établissement de la vascularisation tumorale.

# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Les tumeurs des voies aérodigestives supérieures regroupent un ensemble de lésions malignes hétérogènes en termes histologique, anatomique et moléculaire. Une telle hétérogénéité en fait une pathologie complexe dont la biologie tumorale reste à élucider. Les carcinomes épidermoïdes, qui représentent 90% des tumeurs de la tête et du cou, sont notamment caractérisés par un taux de récurrence très élevé. D'après Cripps et al, ce taux n'a pas diminué en l'espace de trois décennies, et ce malgré des changements dans la prise en charge thérapeutique avec notamment l'émergence des thérapies ciblées qui ont pourtant soulevé de grands espoirs. Le constat d'une efficacité modérée de ces agents anti-cancéreux dans le traitement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou a conduit à une activité de recherche dense qui vise à éclaircir les mécanismes moléculaires sous-jacents. Un des objectifs de ces investigations étant d'identifier d'éventuels marqueurs moléculaires pouvant prédire l'efficacité des thérapies ciblées.

Le travail présenté ici s'inscrit dans cette thématique, ayant pour socle le constat que la perte d'expression de la protéine PTEN, un acteur clé de l'intégrité cellulaire, est un évènement relativement fréquent dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, contrairement aux altérations qui touchent le gène. En effet, le catalogue des mutations somatiques, alimenté par le projet « Cancer genome », avance la fréquence de mutations de *PTEN* à moins de 5% (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). Cependant les altérations de l'expression protéique de PTEN sont de l'ordre de 20% (Guney et al, 2007, Lee J et al, 2001).

Par ailleurs, les voies de signalisation contrôlées par l'activité de PTEN sont impliquées dans la synthèse de facteurs qui régulent le processus angiogénique. Notamment le VEGF, décrit comme une molécule pro-angiogénique majeure. La perte d'expression de PTEN a donc été décrite comme un évènement qui favorise l'angiogenèse tumorale. Des travaux indiquent que la surexpression de VEGF peut être liée à une résistance aux anti-EGFR (Viloria-Petit et al, 2001, Vallböhmer D et al, 2005). La capacité anti-angiogénique des anti-EGFR a été décrite dans de nombreuses études menées *in vivo*. Toutefois les mécanismes sous-jacents sont méconnus. De même les stratégies d'inhibition de l'angiogenèse tumorale sont aujourd'hui entrées dans l'arsenal thérapeutique mais leurs mécanismes d'action sont encore mal compris.

Notre étude est la seule, en date, à tenter de définir le rôle de la perte d'expression de PTEN dans la réponse au cetuximab des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. L'absence de donnée concernant une relation entre la perte d'expression de PTEN et une réponse modeste de ce type tumoral au cetuximab, est peut-être due à l'absence de modèles cellulaires établis, naturellement

déficients pour PTEN, contrairement à ceux qui sont disponibles dans d'autres types tumoraux.

La première partie de ce travail expérimental consistait donc à la mise au point d'un modèle cellulaire adapté. La lignée cellulaire Cal 27 a été sélectionnée pour subir un silencing de PTEN selon une modalité transitoire et une modalité stable. Ces deux méthodes, apportant des résultats complémentaires.

Dans une seconde partie, notre travail s'est intéressé au phénomène de l'angiogenèse tumorale. Dans ce contexte, l'objectif visait à étudier les modifications induites par le silencing de PTEN et le traitement par cetuximab dans les cellules Cal 27, pouvant avoir des conséquences sur le potentiel angiogénique de ces cellules tumorales. C'est pourquoi nous avons eu recours à un modèle d'explants aortiques. Celui-ci constitue un modèle *ex vivo* plus complexe que les modèles d'angiogenèse *in vitro* (Goodwin AM, 2007, Aplin AC et al, 2008) et offre la possibilité d'observer l'effet de milieux de culture produits par les cellules tumorales : les milieux conditionnés. Cette approche permet ainsi d'observer les effets angiogéniques médiés par les cellules tumorales directement, contrairement aux études *in vivo* au cours desquelles les traitements notamment, peuvent agir au niveau de l'endothélium ou du stroma tumoral.

La lignée cellulaire Cal 27 s'avère être un modèle pertinent, dont la réponse au cetuximab est en ligne avec ce qui a été précédemment observé *in vitro* (Huang SM et al, 1999) et reflétant la modeste réponse clinique observée suite au traitement de patient atteints de cette pathologie (Cohen EE, 2006). Par ailleurs, cette lignée caractérisée par une surexpression de l'EGFR (Olivier S et al, 1990) répond à la stimulation à l'EGF par une activation des voies de signalisation et conduit à une augmentation de la viabilité cellulaire des Cal 27 d'environ 20% après 48h d'exposition. Il est intéressant de constater que le traitement par cetuximab a pour effet une réduction de la viabilité cellulaire qui est exactement du même ordre. Dans leur étude, qui établit que la perte d'expression de PTEN est associée à une résistance au cetuximab dans les carcinomes colorectaux, Jhaver et collaborateurs indiquent que la réponse d'une lignée cellulaire à l'EGF prédit la réponse au cetuximab. Les cellules Cal 27 semblent correspondre à ce schéma (Jhaver M et al, 2008).

Cependant, activateurs ou inhibiteurs, les effets médiés par l'EGFR sont modérés. Ces résultats suggèrent que la lignée Cal 27 n'est pas strictement dépendante d'EGFR pour sa croissance. En revanche, la sensibilité des cellules Cal 27 aux inhibiteurs spécifiques de phosphoprotéines plus en aval de la signalisation indique une forte dépendance aux voies PI3K/AKT et MAPK pour leur survie et leur prolifération. Ce résultat explique probablement que le silencing de PTEN, transitoire comme durable, n'induit pas de perte d'efficacité du cetuximab sur les cellules Cal 27.



En particulier, l'activation d'AKT semble être déterminante pour la croissance cellulaire de la lignée Cal 27, comme en atteste la suppression de la viabilité provoquée par le traitement par la perifosine. De même, le blocage de l'activation de ERK  $\frac{1}{2}$  induit une inhibition de la croissance cellulaire importante, mais d'effet plus modéré. Notre modèle cellulaire est représentatif de la réponse, modeste, au cetuximab des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et la perifosine se révèle être un puissant inhibiteur de la croissance cellulaire de ce modèle. Il semble dès lors intéressant de proposer la perifosine, actuellement en phase II d'essais cliniques dans divers types tumoraux, comme un candidat prometteur pour compléter l'arsenal des thérapies ciblées utilisées dans la prise en charge des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

Contrairement à ce qui a été démontré dans divers types tumoraux, nos résultats permettent de conclure que l'efficacité du cetuximab n'est pas affectée par la perte d'expression de PTEN dans les cellules Cal 27.

Cependant la perte d'expression de PTEN a un impact significatif sur l'état d'activation des voies de signalisation et la croissance des cellules Cal 27. Alors qu'une régulation négative de pEGFR significative est observée suite au silencing de PTEN, les voies PI3K/AKT et MAPK sont suractivées. Les cellules déficientes pour PTEN se montrent alors d'autant plus sensibles à l'inhibition de pAKT et de pERK  $\frac{1}{2}$ .

Ensemble, ces résultats suggèrent que malgré une surexpression d'EGFR dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, la croissance tumorale de ce type de cancer pourrait être sous la dépendance d'acteurs moléculaires des voies de signalisation intracellulaires plutôt que sous celle du récepteur en lui même, ce qui pourrait expliquer que les résultats cliniques du traitement par cetuximab sont modérés.

Par ailleurs, au cours de notre étude de l'angiogenèse induite par les cellules tumorales, nous avons pu observé un effet direct cytostatique du cetuximab sur les cellules vasculaires. Cependant l'exposition des cellules Cal 27 au cetuximab ne semble pas induire de modifications claires du potentiel pro-angiogénique des cellules tumorales puisque des effets contradictoires ont été mis en évidence.

Le silencing de PTEN induit des changements significatifs dans la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire, observé à 72h après la transfection par le siRNA. La diminution du pourcentage de cellules en G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> observée dans les cellules siPTEN est un effet attendu, selon la régulation de la transition G<sub>1</sub>S décrite pour PTEN. En revanche cette déplétion se fait au profit de la phase G<sub>2</sub>M plutôt que de la phase S.

Des travaux récents évoquent la localisation nucléaire de PTEN comme un possible mécanisme de régulation de la progression du cycle en phase G<sub>2</sub> (Jacob AI et al, 2009). L'accumulation relative des cellules PTEN déficientes dans la phase G<sub>2</sub>M, décrite comme la phase la plus radio sensible (Pawlick TM et al, 2004), ainsi que le rôle de la protéine dans le maintien de l'intégrité du matériel génomique, suggèrent que la perte d'expression pourrait avoir un effet radiosensibilisant sur les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, ce que montrent Pattje et collaborateurs très récemment (Pattje WJ et al, 2010).

Dans ce contexte, le cetuximab ne montrant pas de perte d'efficacité et étant une molécule radiosensibilisante, la perte d'expression de PTEN dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou pourrait en fait s'avérer être un évènement positif pour la prise en charge thérapeutique par radiations et chimiothérapie concomitante.

Depuis sa caractérisation, *PTEN* est décrit comme un gène suppresseur de tumeurs. L'approche expérimentale qui a permis de déterminer ce rôle du gène et de la protéine pour laquelle il code, a essentiellement consisté en des transfections, amenant à la surexpression de PTEN *in vitro* et *in vivo* dans des lignées cellulaires déficientes pour l'expression de la phosphatase. Dans les différents modèles utilisés, les protocoles expérimentaux appliqués ont produit des différences importantes dans le potentiel prolifératif des cellules selon le statut d'expression de PTEN. Au contraire, l'inhibition de l'expression de PTEN dans les cellules Cal 27 ne produit pas de changement drastique dans le taux de prolifération cellulaire. Bien que le temps de doublement des cellules PEI 6 et PEI 7 soient écourté, le nombre de cellules est équivalent à celui trouvé pour les cellules parentales.

Les courbes de suivi de la croissance cellulaire indiquent une diminution significative de la mesure par MTT du fait de la perte d'expression de PTEN. Les disparités entre le taux de prolifération et ces résultats qui rapportent l'activité respiratoire mitochondriale nous ont amené à nous interroger sur la production d'ATP cellulaire indépendante de la mitochondrie.

La perte d'expression de PTEN dans les cellules Cal 27 est un évènement qui pourrait favoriser le métabolisme du glucose sans consommation d'oxygène, les cellules Cal 27 auraient recours à la glycolyse pour leur production d'ATP, sans la respiration mitochondriale.

Dans les cancers oraux, GSK3 est maintenue dans un état inactif par sa phosphorylation, catalysée par pAKT (Mishra R, 2010), ce qui permet l'activité de la glycogène-synthase. La glycogène-synthase constitue une réserve de glucose immédiatement disponible pour le métabolisme énergétique cellulaire. La perte d'expression de PTEN dans les cellules Cal 27 provoque une suractivation d'AKT et pourrait donc agir en faveur de la glycolyse. Afin de vérifier l'impact de la perte

d'expression de PTEN sur le métabolisme du glucose dans les cellules Cal 27, une mesure du lactate (produit lors de la glycolyse) dans le milieu de culture fournirait une indication d'éventuelles modifications. Il a été montré, sur un petit nombre de patients, que l'augmentation du taux de lactate dans le micro-environnement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou est associée à une plus grande incidence de métastases (Walenta S et al, 1997).

Le recours à la glycolyse comme source d'ATP, de façon indépendante de la mitochondrie, donc de façon indépendante de la disponibilité en oxygène, confère un avantage aux cellules tumorales. La survie cellulaire est assurée dans les conditions où l'oxygène se raréfie dans le micro-environnement, et ce avant même que les mécanismes adaptatifs cellulaires induits par hypoxie n'ait été mis en place, via notamment l'activation du facteur de transcription HIF-1 et ses cibles.

Des travaux menés sur des modèles cellulaires déficients pour l'expression de PTEN mettent en évidence une « addiction au glucose » pour leur prolifération, qui peut être levée par la restauration de l'expression de la protéine. Il semble que les cellules déficientes pour l'expression de PTEN dépendent de la glycolyse pour leur prolifération (Blouin MJ et al, 2010).

De même, l'étude de Mahimainathan et collègues lie la perte d'expression de PTEN à une hypertrophie cellulaire induite par de fortes concentrations de glucose (Mahimainathan L et al, 2006). Il est intéressant de noter que les cellules PEI 6 et PEI 7, déficientes pour PTEN, obtenues suite à nos travaux, sont caractérisées par une taille plus importante que les cellules parentales.

Une forte glycolyse cellulaire lève la dépendance à la vascularisation, les cellules disposent d'une source d'énergie interne. Nos résultats, obtenus dans l'étude de l'impact du silencing de PTEN sur l'induction de l'angiogenèse dans un modèle d'anneaux aortiques, soutiennent ce concept. En effet, le milieu conditionné par les cellules siPTEN montre une capacité à induire le bourgeonnement endothélial amoindrie par rapport aux cellules Cal 27. Une diminution de la concentration de certains facteurs pro-angiogéniques, conjuguée à l'augmentation de facteurs anti-angiogéniques, est détectée dans les milieux conditionnés par les cellules déficientes pour l'expression de PTEN.

Ainsi, les modèles cellulaires Cal 27 inhibés pour l'expression de PTEN, dont l'activité métabolique mitochondriale est réduite, évoquent un recours à la glycolyse cellulaire et ont une capacité à induire l'angiogenèse qui semble diminuée.

La perte d'expression de PTEN favorise la migration cellulaire (Tamura et al. 1998, Dey N et al 2008, Gu et al. 1999). Une perte d'adhésion des cellules du fait de l'inhibition d'expression de PTEN par siRNA a également été décrite (Mise-Omata S et al, 2005).

Les observations des lignées cellulaires PEI 6 et PEI 7 suggèrent également une perte d'adhésion, bien que des tests doivent être réalisés pour étudier ce phénomène. Le détachement des cellules déficientes pour l'expression de PTEN ne semble pas être suivi par la mort cellulaire. En effet, la perte d'expression de PTEN a été liée à la résistance à l'anoïkis. Vitolo et collaborateurs montrent que la perte d'expression générée *in vitro* a pour conséquence favorise la survie des cellules de cancer du sein qui perdent leur capacité d'adhésion. Dans leurs travaux, les auteurs décrivent l'incapacité des cellules déficientes en PTEN à former des tumeurs *in vivo*. La xénogreffe des lignées cellulaires PEI 6 et PEI 7 conduit à un résultat comparable. L'injection sous cutanée de ces cellules chez la souris nude a montré une prise tumorale qui n'est pas suivie de la croissance *in vivo*. D'après les travaux de l'équipe de Vitolo, ce type de résultats indique la mise en place de la dormance tumorale. Ce terme désigne une capacité des cellules à s'établir à un site tumoral secondaire mais restant dans un état de quiescence dans un premier temps. Au niveau cellulaire, le phénomène de dormance répond à une balance entre la prolifération et le taux d'apoptose. Cette balance serait, au niveau moléculaire, au moins en partie assurée par pERK ½ et p-p38. Une activation de la kinase p38 supérieure à celle de ERK ½ ferait basculer la cellule dans un phénotype non prolifératif (Aguirre-ghiso JA et al, 2003).

Nos résultats sont, encore une fois, en ligne avec cette hypothèse du phénotype dormant puisque l'expression de pERK ½ n'est pas détectée dans les cellules Cal 27 dont l'expression de PTEN est inhibée de façon durable.

De plus, le phénotype de dormance cellulaire résulte en l'incapacité à recruter des vaisseaux sanguins et empêche une augmentation de la masse tumorale (Ranganathan et al, 2006). En effet, le maintien d'un potentiel anti-angiogénique semble être une composante importante de la dormance tumorale. Parmi les gènes régulés positivement en situation de dormance, on trouve la thrombospondine 1 (Almog N, 2010). De façon intéressante, une augmentation de la quantité de TSP 1 est détectée dans les milieux conditionnés par les cellules siPTEN. Si la dormance tumorale est observée sur le plan clinique par la présence de micro-métastases ou de sites secondaires qui restent silencieux, les mécanismes de la levée de cette dormance sont encore méconnus.

Dans nos conditions expérimentales, la perte d'expression de PTEN n'a pas nettement promu la croissance tumorale. La fréquence de la perte d'expression de PTEN dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, nous permet de penser qu'il ne s'agit pas d'un évènement déterminant du mécanisme de tumorigenèse de ce type tumoral.

En revanche, si elle survient de façon tardive dans le développement tumoral, comme le suggèrent les observations de Lee et collaborateurs qui identifient une expression prédominante de PTEN dans les zones les mieux différenciées des carcinomes oraux analysés (Lee J et al, 2001), la perte de PTEN pourrait avoir un rôle dans l'initiation des processus métastatiques. Ces travaux montrent d'ailleurs la valeur pronostique de la perte de PTEN puisque dans leur cohorte, les auteurs montrent une corrélation entre le taux de récurrence élevé et la perte d'expression de PTEN (75% des patients atteints de tumeurs n'exprimant pas ou peu PTEN présentent une progression de la maladie à 5 ans). La perte de PTEN dans les cellules Cal 27 semble déclencher l'activation de la glycolyse, favoriser la résistance à l'anoïkis, ne stimule pas l'angiogenèse tumorale de façon significative et a été décrite comme un événement qui favorise la mobilité cellulaire. Ces divers phénomènes biologiques participent à la survie cellulaire lors de la dissémination. Nos travaux, appuyés par ceux d'autres équipes, portent à croire que la perte d'expression de PTEN induit des mécanismes cellulaires qui équipent les cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou pour survivre à des modifications du micro-environnement et pour s'échapper du foyer tumoral primaire.

Nos résultats mettent en évidence par ailleurs, une diminution de l'induction de l'angiogenèse par les cellules Cal 27 dont l'expression de PTEN est inhibée, ainsi qu'une incapacité à former une masse tumorale *in vivo*, répondant aux caractéristiques de cellules qui entrent en dormance tumorale.

En conclusion, nous proposons l'hypothèse que la perte de PTEN dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou constitue un événement déclencheur de phénomènes cellulaires favorisant la dissémination et l'établissement de sites tumoraux secondaires. Cependant la perte d'expression de PTEN ne permet pas à lui seul la croissance tumorale d'un foyer secondaire, probablement du fait de la mise en place d'un phénotype de dormance tumorale. Les mécanismes de la levée de la dormance sont à l'heure actuelle méconnus. Cependant cette hypothèse, appuyée par un taux de récurrence à 5 ans important dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, fait de la perte d'expression de PTEN un potentiel biomarqueur de la survenue d'événements métastatiques et récurrents dans cette pathologie.

# **ANNEXES**

## CLASSIFICATION TNM

Le système proposé par le chirurgien français Pierre Denoix dans les années 1940-1950 permet de classer les cancers. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour node en anglais) et à distance pour d'éventuelles métastases (M).

T = Etendue de la tumeur primaire  
N = Etat des noeuds lymphatiques  
M = Métastases

### Classification clinique prétraitement :

T	Tumeur primaire
Tis	Cancer pré-invasif (carcinome in situ)
T0	Pas de tumeur primaire
T1	Tumeur de 2 cm ou moins (dans sa plus grande dimension)
T2	Tumeur de 2 cm à 4 cm
T3	Tumeur de plus de 4 cm
T4	Tumeur avec extension au muscle squelettique, à la peau, au cou, etc.
Tx	Tumeur non déterminée ou non évaluable
N	Ganglions lymphatiques (Noeuds)
N0	Pas d'envahissement ganglionnaire
N1	Envahissement dans un seul ganglion lymphatique homolatéral, lésion < 3 cm
N2	Envahissement dans un seul ganglion lymphatique homolatéral, lésion de 3 cm à 6 cm
N3	Envahissement de un ou plusieurs ganglions lymphatiques homolatéraux, lésion > 6 cm
Nx	Envahissement non déterminé ou non évaluable
M	Métastase distante
M0	Pas de métastase
M1	Présence d'une métastase viscérale
Mx	Métastase non déterminée ou non évaluable

Il découle de ce système d'évaluation de l'étendue de la lésion cancéreuse, une gradation en 4 degrés de sévérité. Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou de grades 3 et 4 sont également qualifiée de « maladie localement avancée »

Grades :

Grade 1 T1 N0 M0

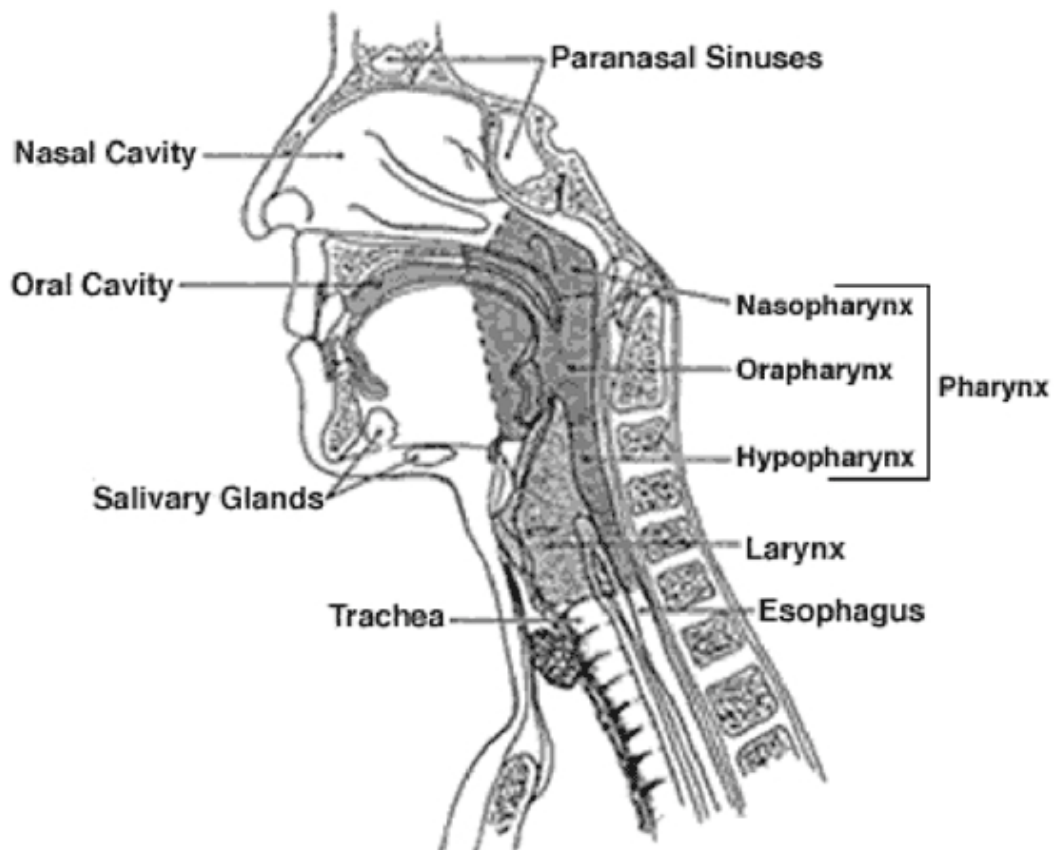
Grade 2 T2 N0 M0

Grade 3 T3 N0,1 M0

Grade 4 Tous T N1 M0

Tous T N2,3 M0

Tous T N M1





LISTE EXHAUSTIVE DES FACTEURS ANGIOGÉNIQUES DÉTECTÉS PAR LE KIT  
 PROTEOME PROFILER™ « HUMAN ANGIOGENESIS ARRAY » DE R&D SYSTEMS

Coordinate	Target/Control	Alternate Nomenclature	Effects of Pretreatment
A1, A2	Positive Control	Control (+)	
A5, A6	Activin A		
A7, A8	ADAMTS-1		
A9, A10	Angiogenin	ANG	
A11, A12	Angiopoietin-1	Ang-1	-
A13, A14	Angiopoietin-2	Ang-2	
A15, A16	Angiostatin/Plasminogen		
A17, A18	Amphiregulin	AR	
A19, A20	Artemin		
A23, A24	Positive Control	Control (+)	
B1, B2	Coagulation Factor III	TF	
B3, B4	CXCL16		
B5, B6	DPPIV	CD26	
B7, B8	EGF		
B9, B10	EG-VEGF	PK1	
B11, B12	Endoglin	CD105	
B13, B14	Endostatin/Collagen XVIII		
B15, B16	Endothelin-1	ET-1	+
B17, B18	FGF acidic	FGF-1	
B19, B20	FGF basic	FGF-2	
B21, B22	FGF-4		
B23, B24	FGF-7	KGF	
C1, C2	GDNF		
C3, C4	GM-CSF		
C5, C6	HB-EGF		
C7, C8	HGF		
C9, C10	IGFBP-1		
C11, C12	IGFBP-2		
C13, C14	IGFBP-3		
C15, C16	IL-1 $\beta$	IL-1F2	
C17, C18	IL-8	CXCL8	

Coordinate	Target/Control	Alternate Nomenclature	Effects of Pretreatment
C19, C20	LAP (TGF- $\beta$ 1)		+
C21, C22	Leptin		
C23, C24	MCP-1	CCL2	
D1, D2	MIP-1 $\alpha$	CCL3	
D3, D4	MMP-8		+
D5, D6	MMP-9		
D7, D8	NRG1- $\beta$ 1	HRG1- $\beta$ 1	
D9, D10	Pentraxin 3 (PTX3)	TSG-14	-
D11, D12	PD-ECGF		
D13, D14	PDGF-AA		
D15, D16	PDGF-AB/PDGF-BB		
D17, D18	Persephin		
D19, D20	Platelet Factor 4 (PF4)	CXCL4	
D21, D22	P/GF		
D23, D24	Prolactin		
E1, E2	Serpin B5	Maspin	+
E3, E4	Serpin E1	PAI-1	
E5, E6	Serpin F1	PEDF	
E7, E8	TIMP-1		
E9, E10	TIMP-4		
E11, E12	Thrombospondin-1	TSP-1	
E13, E14	Thrombospondin-2	TSP-2	
E15, E16	uPA		
E17, E18	Vasohibin		
E19, E20	VEGF		
E21, E22	VEGF-C		
F1, F2	Positive Control	Control (+)	
F23, F24	Negative Control	Control (-)	

Correspondance des coordonnées sur la membranes de nitrocellulose :



## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Abe T, Terada K, Wakimoto H, Inoue R, Tyminski E, Bookstein R, Basilion JP, Chiocca EA. PTEN decreases in vivo vascularization of experimental gliomas in spite of proangiogenic stimuli. *Cancer Res.* 63 pp : 2300-5. 2003

Abukhdeir AM, Park BH. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med.* 10 : e19. 2008

Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res.* 5 pp : 2884-90. 1999

Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, Raspall G, Giralt J, Rosello J, Nicholson RI, Mendelsohn J, Baselga J. Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res.* 61 pp : 6500-10. 2001

Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A, Salmena L, Sampieri K, Haveman WJ, Brogi E, Richardson AL, Zhang J, Pandolfi PP. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet.* 42 pp : 454-8. 2010

Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett.* 294 pp : 139-46. 2010

Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res.* 10 pp : 4029-37. 2004

Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 62 : pp 7350-6. 2002

Aplin AC, Fogel E, Zorzi P, Nicosia RF. The aortic ring model of angiogenesis. *Methods Enzymol.* 443 pp : 119-36. 2008

Backman S, Stambolic V, Mak T. PTEN function in mammalian cell size regulation. *Curr Opin Neurobiol.* 12 pp : 516-22. 2002

Baker SJ. PTEN enters the nuclear age. *Cell.* 128 pp : 25-8. 2007

Barnes CJ, Ohshiro K, Rayala SK, El-Naggar AK, Kumar R. Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 13 pp : 4291-9. 2007

Baselga J, Norton L, Masui H, Pandiella A, Coplan K, Miller WH Jr, Mendelsohn J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst.* 85: pp : 1327-33. 1993

Beckner ME, Gobbel GT, Abounader R, Burovic F, Agostino NR, Laterra J, Pollack IF. Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Lab Invest.* 85 pp : 1457-70. 2005

Bei R, Budillon A, Masuelli L, Cereda V, Vitolo D, Di Gennaro E, Ripavecchia V, Palumbo C, Ionna F, Losito S, Modesti A, Kraus MH, Muraro R. Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol.* 204 pp : 317-25. 2004

Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller BM, Friedlander M, Ruf W. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med.* 10 pp : 502-9. 2004

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3 pp : 401-10. 2003

Bianco R, Shin I, Ritter CA, Yakes FM, Basso A, Rosen N, Tsurutani J, Dennis PA, Mills GB, Arteaga CL. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene.* 22 pp : 2812-22. 2003

Birchmeier C. ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp Cell Res.* 315: pp 611-8. 2009

Blouin MJ, Zhao Y, Zakikhani M, Algire C, Piura E, Pollak M. Loss of function of PTEN alters the relationship between glucose concentration and cell proliferation, increases glycolysis, and sensitizes cells to 2-deoxyglucose. *Cancer Lett.* 289 pp : 246-53. 2010

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 9 pp : 567-78. 2006

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* 11 pp : 21-8. 2010

Bornstein Michael, Filippi Andreas, Buser Daniel. Radiothérapie de la région cervico faciale : conséquences intra-oraux précoces et tardives. *Rev Mens Suisse Odontostomatol* 111 : pp 69-73. 2001

Bouali S, Chrétien AS, Ramacci C, Rouyer M, Becuwe P, Merlin JL. PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells. *Oncol Rep.* 21 pp : 731-5. 2009

Bouyain S, Longo PA, Li S, Ferguson KM, Leahy DJ. The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc Natl Acad Sci* 102 pp : 15024-9. 2005

Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. *Ann Oncol.* 16 : pp 249-50. 2005

Britten CD. Targeting ErbB receptor signaling: a pan-ErbB approach to cancer. *Mol Cancer Ther.* 3 : pp 1335-42. 2004

Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, Mueller-Klieser W. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 51 pp : 349-53. 2001

Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ, Evans DB, Abbruzzese JL, Hicklin DJ, Radinsky R. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res.* 6 pp : 1936-48. 2000

Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family : spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol.* 19 : 124-34. 2007

Caballero M, Grau JJ, Blanch JL, Domingo-Domenech J, Auge JM, Jimenez W, Bernal-Sprekelsen M. Serum vascular endothelial growth factor as a predictive factor in metronomic (weekly) Paclitaxel treatment for advanced head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 133: pp 1143-8. 2007

Cavalot A, Martone T, Roggero N, Brondino G, Pagano M, Cortesina G. Prognostic impact of HER-2/neu expression on squamous head and neck carcinomas. *Head and Neck* 29 pp : 655-664 2007

Cerniglia GJ, Pore N, Tsai JH, Schultz S, Mick R, Choe R, Xing X, Durduran T, Yodh AG, Evans SM, Koch CJ, Hahn SM, Quon H, Sehgal CM, Lee WM, Maity A. Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the microenvironment by vascular normalization to improve chemotherapy and radiotherapy efficacy. *PLoS One.* 4 : e6539. 2009

Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 10 pp : 301-16. 2010

Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Oncol.* 22 pp : 469-80. 2003

Chen Q, Samaranayake LP, Zhou H, Xiao L. Homozygous deletion of the PTEN tumor-suppressor



gene is not a feature in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 36 pp : 95-9. 2000

Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 5 pp : 1369-79. 1999

Cheney IW, Neuteboom ST, Vaillancourt MT, Ramachandra M, Bookstein R. Adenovirus-mediated gene transfer of MMAC1/PTEN to glioblastoma cells inhibits S phase entry by the recruitment of p27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes. *Cancer Res.* 59 pp : 2318-23. 1999

Chergui F, Chrétien AS, Bouali S, Ramacci C, Rouyer M, Bastogne T, Genin P, Leroux A, Merlin JL. Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. *Clin Chem.* 55 pp : 1327-36. 2009

Chong VZ, Thompson M, Beltaifa S, Webster MJ, Law AJ, Weickert CS. Elevated neuregulin-1 and ErbB4 protein in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 100 pp : 270-80. 2008

Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netterville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 24 pp : 4170-6. 2006

Chung JH, Eng C. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.* 65 pp : 8096-100. 2005

Ciardello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S. Antitumor effects and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa) and EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Canc Res* 6 pp : 2053-2063. 2000

Ciardello F, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Caputo R, Pomatico G, De Placido S, Bianco AR,

Mendelsohn J, Tortora G. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 6 pp : 3739-47. 2000

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 pp : 505-16. 2006

Cohen EE, Haraf DJ, Kunnavakkam R, Stenson KM, Blair EA, Brockstein B, Lester EP, Salama JK, Dekker A, Williams R, Witt ME, Grushko TA, Dignam JJ, Lingen MW, Olopade OI, Vokes EE. Epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib added to chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 28 pp : 3336-43. 2010

Cohen EE. Role of epidermal growth factor receptor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 24 pp : 2659-65. 2006

Cripps C, Winkvist E, Devries MC, Stys-Norman D, Gilbert R. Epidermal growth factor receptor targeted therapy in stages III and IV head and neck cancer. *Curr Oncol.* 17 : pp 37-48. 2010

Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H, Marsh DJ, Ritz J, Freedman A, Stiles C, Eng C. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. *Hum Mol Genet.* 8 pp : 185-93. 1999

Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, Demard F, Milano G. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol.* 11 pp : 1873-8. 1993

Dawson JP, Bu Z, Lemmon MA. Ligand-induced structural transitions in ErbB receptor extracellular domains. *Structure.* 15 pp : 942-54. 2007

Denhart BC, Guidi AJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Lab Invest.* 77 pp : 659-64. 1997

Dey N, Crosswell HE, De P, Parsons R, Peng Q, Su JD, Durden DL. The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration. *Cancer Res.* 68 pp : 1862-71. 2008

Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell.* Feb 100 pp : 387-90. 2000

Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol.* 76 pp : 157-61. 2005

Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Nuclear EGFR as novel therapeutic target : insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol.* 186 : 1-6. 2010

Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van Waes C. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 61 pp : 5911-8. 2001

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411 pp: 494-8. 2001

Fan Z, Lu Y, Wu X, Mendelsohn J. Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. *J Biol Chem.* 269 pp : 27595-602. 1994

Fan Z, Shang BY, Lu Y, Chou JL, Mendelsohn J. Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res.* 3 pp : 1943-8. 1997

Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal.* 19 pp : 2487-97. 2007

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 273 pp : 18623-32. 1998

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 17. 2010

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391 pp : 806-11. 1998

Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 57 pp : 1-18. 2006

Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 6 pp : 273-86. 2007

Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 95 pp : 1902-10. 2002

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer.* 97 pp : 1139-45. 2007

Friedrich RE, Hagel C, Bartel-Friedrich S. Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in primary and metastatic undifferentiated carcinoma of the head and neck: a possible target of immunotherapy. *Anticancer Res.* 5 pp : 1641-3. 2010

Fukumura D, Jain RK. Imaging angiogenesis and the microenvironment. *APMIS.* 116: pp 695-715. 2008

Fukumura D, Yuan F, Endo M, Jain RK. Role of nitric oxide in tumor microcirculation, blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am J Pathol.* 150 pp : 13-25. 1997

Fung C, Grandis JR. Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck.

Expert Opin Emerg Drugs. 15 pp : 355-73. 2010

Furukawa K, Kumon Y, Harada H, Kohno S, Nagato S, Teraoka M, Fujiwara S, Nakagawa K, Hamada K, Ohnishi T. PTEN gene transfer suppresses the invasive potential of human malignant gliomas by regulating cell invasion-related molecules. *Int J Oncol.* 29 pp : 73-81. 2006

Gao X, Neufeld TP, Pan D. Drosophila PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev Biol.* 221 pp : 404-18. 2000

Gasparotto D, Vukosavljevic T, Piccinin S, Barzan L, Sulfaro S, Armellin M, Boiocchi M, Maestro R. Loss of heterozygosity at 10q in tumors of the upper respiratory tract is associated with poor prognosis. *Int J Cancer.* 84 pp : 432-6. 1999

Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H, Eng C. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol.* 156 pp : 1693-700. 2000

Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Res.* 63 pp : 282-6. 2003

Giri D, Ittmann M. Inactivation of the PTEN tumor suppressor gene is associated with increased angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma. *Hum Pathol.* 30 pp : 419-24. 1999

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res.* 1 pp : 1311-8. 1995

Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res.* 74 pp : 172-83. 2007

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer.

Cancer Res. 53 pp : 3579-84. 1993

Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K, Yamada KM. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol.* 146 pp : 389-403. 1999

Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol.* 143 pp : 1375-83. 1998

Guney K, Ozbilim G, Derin AT, Cetin S. Expression of PTEN protein in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 34 pp : 481-6. 2007

Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 359 : pp 1143-54. 2008

Harari PM, Huang SM. Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49 pp : 427-33. 2001

Hasina R, Whipple ME, Martin LE, Kuo WP, Ohno-Machado L, Lingen MW. Angiogenic heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma : biological and therapeutic implications. *Lab Invest.* 88 pp : 342-53. 2008

Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, Burris HA 3rd, Swanson P, Lopez T, Buchanan G, Reiner M, Gansert J, Berlin J. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 16 pp : 2205-13. 2010

Henderson YC, Wang E, Clayman GL. Genotypic analysis of tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and p53 in head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope.* 108 pp : 1553-6. 1998

Herbst RS, Arquette M, Shin DM, Dicke K, Vokes EE, Azarnia N, Hong WK, Kies MS. Phase II multicenter study of the epidermal growth factor receptor antibody cetuximab and cisplatin for recurrent and refractory squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 23 pp : 5578-87. 2005

Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG, Anderson KC. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood.* 107 pp : 4053-62. 2006

Hirasawa S, Tsushima Y, Takei H, Hirasawa H, Taketomi-Takahashi A, Takano A, Oriuchi N, Endo K. Inverse correlation between tumor perfusion and glucose uptake in human head and neck tumors. *Acad Radiol.* 14 pp : 312-8. 2007

Hirata A, Ogawa S, Kometani T, Kuwano T, Naito S, Kuwano M, Ono M. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* 62 pp : 2554-60. 2002

Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, Cortes-Funes H. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer.* 41 pp : 453-60. 2005

Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy : microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 94 pp 883-93. 2002

Hu L, Hofmann J, Jaffe RB. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates angiogenesis and vascular permeability associated with ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 11 pp : 8208-12. 2005

Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell.* 21 pp : 737-48. 2006

Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 59 pp : 1935-40. 1999

Huang SM, Li J, Harari PM. Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther.* 7 pp : 507-14. 2002

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 5 : 341-54. 2005

Jacob AI, Romigh T, Waite KA, Eng C. Nuclear PTEN levels and G2 progression in melanoma cells. *Melanoma Res.* 19pp : 203-10. 2009

Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 9 pp : 685-93. 2003

Janmaat ML, Kruyt FA, Rodriguez JA, Giaccone G. Response to epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells: limited antiproliferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of extracellular signal-regulated kinase or Akt kinase pathways. *Clin Cancer Res.* 9 pp : 2316-26. 2003

Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci* 92 pp : 4392-6. 1995

Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R, Mariadason JM. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res.* 68 pp :1953-61. 2008

Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R, Mariadason JM. PIK3CA mutation/PTEN expression



status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res.* 68 pp : 1953-61. 2008

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ.* 12 pp : 363-9. 2001

Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Amador ML, Oppenheimer D, Bouraoud N, Kulesza P, Sebastiani V, Maitra A, Hidalgo M. Epidermal growth factor receptor dynamics influences response to epidermal growth factor receptor targeted agents. *Cancer Res.* 65 pp : 3003-10. 2005

Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 65: pp 328-39. 2001

Kattan Z, Marchal S, Brunner E, Ramacci C, Leroux A, Merlin JL, Domenjoud L, Dauça M, Becuwe P. Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. *PLoS One.* 4 : e2002. 2008

Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 120 pp : 781-7. 2007

Kim SJ, Uehara H, Karashima T, Shepherd DL, Killion JJ, Fidler IJ. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin Cancer Res.* 9 pp : 1200-10. 2003

Kim SM, Kim JS, Kim JH, Yun CO, Kim EM, Kim HK, Solca F, Choi SY, Cho BC. Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells. *Cancer Lett.* 296 pp : 150-9. 2010

Kiyatkin A, Aksamitiene E, Markevich NI, Borisov NM, Hoek JB, Kholodenko BN. Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J Biol Chem.* 281 : 19925-38. 2006

Kotelevets L, van Hengel J, Bruyneel E, Mareel M, van Roy F, Chastre E. Implication of the

MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *FASEB J.* 19 pp : 115-7. 2005

Koul D, Parthasarathy R, Shen R, Davies MA, Jasser SA, Chintala SK, Rao JS, Sun Y, Benveniste EN, Liu TJ, Yung WK. Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN. *Oncogene.* 20 pp : 6669-78. 2001

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14: pp 467-75. 2005

Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res.* 316 pp : 1083-100. 2010

Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, Touge H, Makino H, Takata M, Miyata M, Nakamoto M, Burioka N, Shimizu E. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 13 pp : 1552-61. 2007

Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, Greenberg N, Ittmann M. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98 pp : 11563-8. 2001

Kwon CH, Zhao D, Chen J, Alcantara S, Li Y, Burns DK, Mason RP, Lee EY, Wu H, Parada LF. Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res.* 68 pp : 3286-94. 2008

Kwon CH, Zhu X, Zhang J, Knoop LL, Tharp R, Smeyne RJ, Eberhart CG, Burger PC, Baker SJ. Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet.* 29 pp : 404-11. 2001

Lee J, Kim MS. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 77 pp 1 : S49-57. 2007

Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Hong WK, Mao L. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 127 pp : 1441-5. 2001

Li DM, Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 pp : 15406-11. 1998

Li J, Simpson L, Takahashi M, Miliareis C, Myers MP, Tonks N, Parsons R. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Res.* 58: pp 5667-72. 1998

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell.* pp : 301-11. 2005

Li X, Luwor R, Lu Y, Liang K, Fan Z. Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. *Oncogene.* 25 pp : 525-35. 2006

Li YM, Zhou BP, Deng J, Pan Y, Hay N, Hung MC. A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells. *Cancer Res.* 65 pp : 3257-63. 2005

Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 57 pp : 246-54. 2003

Liao HJ, Carpenter G. Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 69 pp : 6179-83. 2009

Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. *KRAS* mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced

colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 26 pp : 374-9. 2008

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 3 pp : 802-8. 2001

Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 16 pp : 649-56. 2006

Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer.* 82 pp : 1991-9. 2000

Liu Y, Wu J, Ho PY, Chen LC, Chen CT, Liang YC, Cheng CK, Lee WS. Anti-angiogenic action of 5,5-diphenyl-2-thiohydantoin-N10 (DPTH-N10). *Cancer Lett.* 271 pp : 294-305. 2008

Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, Bartholomeusz G, Hsu SC, Hung MC. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J Cell Biochem.* 98 pp : 1570-83. 2006

Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell.* 7 pp : 575-89. 2005

López-Albaitero A, Ferris RL. Immune activation by epidermal growth factor receptor specific monoclonal antibody therapy for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 133 pp 1277-81. 2007

Lu Y, Lin YZ, LaPushin R, Cuevas B, Fang X, Yu SX, Davies MA, Khan H, Furui T, Mao M, Zinner R, Hung MC, Steck P, Siminovitch K, Mills GB. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene.* 18 pp : 7034-45. 1999

Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L, McCleod M, Heim WJ, Hermann RC, Paschold E, Iannotti NO, Dakhil S, Gorton S, Pautret V, Weber MR, Woytowicz D. Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J Clin Oncol.* 28 pp : 911-7. 2010

Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273 pp : 13375-8. 1998

Mahimainathan L, Das F, Venkatesan B, Choudhury GG. Mesangial cell hypertrophy by high glucose is mediated by downregulation of the tumor suppressor PTEN. *Diabetes.* 55 pp : 2115-25. 2006

Maloney SL, Sullivan DC, Suchting S, Herbert JM, Rabai EM, Nagy Z, Barker J, Sundar S, Bicknell R. Induction of thrombospondin-1 partially mediates the anti-angiogenic activity of dexrazoxane. *Br J Cancer.* 101 pp : 957-66. 2009

Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, De Placido S, Myers JN, Papadimitrakopoulou VA. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer.* 104 pp : 2430-6. 2005

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1773 : 1263-84. 2007

McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol.* 156 pp : 383-8. 2000

Mencobi M, Grillo-Ruggieri F, Salami A, Scasso F, Rebella L, Grimaldi A, Dellepiane M, Moratti G, Bruzzone A, Spigno F, Ghio R, Figliomeni M. Induction chemotherapy in head and neck patients followed by concomitant docetaxel-based radiotherapy. *Eur J Cancer Care* 2010

Milas L, Akimoto T, Hunter NR, Mason KA, Buchmiller L, Yamakawa M, Muramatsu H, Ang KK. Relationship between cyclin D1 expression and poor radioresponse of murine carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 52 pp : 514-21. 2002

Milas L, Fan Z, Andratschke NH, Ang KK. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58 pp : 966-71. 2004

Mise-Omata S, Obata Y, Iwase S, Mise N, Doi TS. Transient strong reduction of PTEN expression by specific RNAi induces loss of adhesion of the cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 328 pp : 1034-42. 2005

Mishra R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer.* 9 pp : 144. 2010

Montag M, Dyckhoff G, Lohr J, Helmke BM, Herrmann E, Plinkert PK, Herold-Mende C. Angiogenic growth factors in tissue homogenates of HNSCC : expression pattern, prognostic relevance, and interrelationships. *Cancer Sci.* 100: pp 1210-8. 2009

Morgan S, Grandis JR. ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res.* 315 : pp 572-82. 2009

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 pp : 13513-8. 1998

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 6 pp : 117-27. 2004

Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, Horváth G, Lockett SJ, Damjanovich S, Park JW, Jovin TM, Szöllosi J. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci.* 115 pp : 4251-62. 2002

Niemisto A, Shmulevich I, Yli-Harja O, Chirieac LR, Hamilton SR. Automated quantification of lymph node size and number in surgical specimens of stage II colorectal cancer. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 6 pp : 6313-6. 2005

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 21 pp : 2000-8. 2002

Nozawa H, Howell G, Suzuki S, Zhang Q, Qi Y, Klein-Seetharaman J, Wells A, Grandis JR, Thomas SM. Combined inhibition of PLC $\gamma$ -1 and c-Src abrogates epidermal growth factor receptor-mediated head and neck squamous cell carcinoma invasion. *Clin Cancer Res.* 14 pp : 4336-44. 2008

O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Archer DJ, Eccles SA. C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol.* 38 pp : 73-80. 2002

Oh SH, Kim WY, Kim JH, Younes MN, El-Naggar AK, Myers JN, Kies M, Cohen P, Khuri F, Hong WK, Lee HY. Identification of insulin-like growth factor binding protein-3 as a farnesyl transferase inhibitor SCH66336-induced negative regulator of angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 12 pp : 653-61. 2006

Okami K, Wu L, Riggins G, Cairns P, Goggins M, Evron E, Halachmi N, Ahrendt SA, Reed AL, Hilgers W, Kern SE, Koch WM, Sidransky D, Jen J. Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer Res.* 58: pp 509-11. 1998

Olivier S, Formento P, Fischel JL, Etienne MC, Milano G. Epidermal growth factor receptor expression and suramin cytotoxicity in vitro. *Eur J Cancer.* 26 pp : 867-71. 1990

Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT, Waksal HW, Hicklin DJ. Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer.* 89 pp : 74-82. 2000

Pandolfi PP. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. *N Engl J Med.* 351 pp :

2337-8. 2004

Panousis C, Rayzman VM, Johns TG, Renner C, Liu Z, Cartwright G, Lee FT, Wang D, Gan H, Cao D, Kypridis A, Smyth FE, Brechbiel MW, Burgess AW, Old LJ, Scott AM. Engineering and characterisation of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR. *Br J Cancer*. 92 pp : 1069-77. 2005

Pattje WJ, Schuurin E, Mastik MF, Slagter-Menkema L, Schrijvers ML, Alessi S, van der Laan BF, Roodenburg JL, Langendijk JA, van der Wal JE. The phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 mediates radiosensitivity in head and neck cancer. *Br J Cancer*. 102 pp : 1778-85. 2010

Pattje WJ, Schuurin E, Mastik MF, Slagter-Menkema L, Schrijvers ML, Alessi S, Van der Laan BF, Roodenburg JL, Langendijk JA, van der Wal JE. The phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 mediates radiosensitivity in head and neck cancer. *Br J Cancer*. 102 pp : 1778-85. 2010

Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, Tjan-Heijnen VC, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta*. 1806 pp : 18-28. 2010

Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 59 pp : 928-42. 2004

Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, Gonzalez MV. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 114: pp 242-8. 2005

Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res*. 56 pp : 3666-9. 1996

Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res*. 5 pp : 257-65. 1999



Pignataro L, Corsi MM, Sambataro G, Porcaro L, Tredici P, Broich G. Plasmatic cytokine network in patients with laryngeal carcinoma after surgical treatment. *Anticancer Res.* 21 pp : 3621-5. 2001

Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Maity A. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res.* 63 pp : 236-41. 2003

Pradhan-Palikhe P, Vesterinen T, Tarkkanen J, Leivo I, Sorsa T, Salo T, Mattila PS. Plasma level of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 but not that of matrix metalloproteinase-8 predicts survival in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 46 pp : 514-8. 2010

Psyrrri A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, Rimm D, Burtness BA. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res.* 11 pp : 5856-62. 2005

Puc J, Parsons R. PTEN loss inhibits CHK1 to cause double stranded-DNA breaks in cells. *Cell Cycle.* 4 pp : 927-9. 2005

Qayum N, Muschel RJ, Im JH, Balathasan L, Koch CJ, Patel S, McKenna WG, Bernhard EJ. Tumor vascular changes mediated by inhibition of oncogenic signaling. *Cancer Res.* 69 pp : 6347-54. 2009

Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, Barón AE, Zeng C, Johnson TK, Bunn PA Jr. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 11 pp : 795-805. 2005

Radu A, Neubauer V, Akagi T, Hanafusa H, Georgescu MM. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 23 pp : 6139-49. 2003

Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer : a focus on human papillomavirus. *J Dent Res.* 86 : pp 104-14. 2007

Ranganathan AC, Adam AP, Aguirre-Ghiso JA. Opposing roles of mitogenic and stress signaling pathways in the induction of cancer dormancy. *Cell Cycle.* 5 pp : 1799-807. 2006

Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab.* 21 pp : 96-103. 2010

Ridge JA, Glisson BS, Horwitz EM, Lango, MN. Head and Neck tumors, in *Cancer Management : a multidisciplinary approach*, 10th edition. 2007

Roda JM, Joshi T, Butchar JP, McAlees JW, Lehman A, Tridandapani S, Carson WE 3rd. The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines. *Clin Cancer Res.* 13 pp : 6419-28. 2007

Rong Y, Belozarov VE, Tucker-Burden C, Chen G, Durden DL, Olson JJ, Van Meir EG, Mackman N, Brat DJ. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate tissue factor expression in glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. *Cancer Res.* 69 pp : 2540-9. 2009

Rosner M, Fuchs C, Siegel N, Valli A, Hengstschläger M. Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle. *Hum Mol Genet.* 18 pp : 3298-310. 2009

Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17 : pp 679-94. 2003

Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M. Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 5 pp : 775-82. 1999

Scanga SE, Ruel L, Binari RC, Snow B, Stambolic V, Bouchard D, Peters M, Calvieri B, Mak TW, Woodgett JR, Manoukian AS. The conserved PI3K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both

cell size and survival in *Drosophila*. *Oncogene*. 19 pp : 3971-7. 2000

Scharovsky OG, Mainetti LE, Rozados VR. Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Curr Oncol*.16: pp 7-15. 2009

Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Canc. Res*. 59 pp : 5169-5175. 1999

Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, Beyer T, Lohse S, Bleeker WK, Peipp M, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Dechant M. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*. 184 pp : 512-20. 2010

Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z, Skrinos E, Murone C, Saunderson TH, Chappell B, Papenfuss AT, Poon AM, Hopkins W, Smyth FE, MacGregor D, Cher LM, Jungbluth AA, Ritter G, Brechbiel MW, Murphy R, Burgess AW, Hoffman EW, Johns TG, Old LJ. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104 pp : 4071-6. 2007

She QB, Solit D, Basso A, Moasser MM. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res*. 12 pp : 4340-6 2003

Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, Yin Y. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*. 128 pp : 157-70. 2007

Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, Freilino ML, Graner MW, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gooding WE, Furnari FB, Grandis JR. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting.

Clin Cancer Res. 12 pp : 5064-73. 2006

Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*. 19 pp : 2489-95. 2000

Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, Seeger JM, Weiss J, Fischer F, Frommolt P, Michel K, Peifer M, Mermel C, Girard L, Peyton M, Gazdar AF, Minna JD, Garraway LA, Kashkar H, Pao W, Meyerson M, Thomas RK. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res*. 69 pp : 3256-61. 2009

Soula-Rothhut M, Coissard C, Sartelet H, Boudot C, Bellon G, Martiny L, Rothhut B. The tumor suppressor PTEN inhibits EGF-induced TSP-1 and TIMP-1 expression in FTC-133 thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 304 pp : 187-201. 2005

Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol*. 22 pp : 77-85. 2004

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 95 pp : 29-39. 1998

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 pp : 6199-204. 1999

Sung FL, Poon TC, Hui EP, Ma BB, Liong E, To KF, Huang DP, Chan AT. Antitumor effect and enhancement of cytotoxic drug activity by cetuximab in nasopharyngeal carcinoma cells. *In Vivo*. 19 pp : 237-45. 2005

Sweeney C, Fambrough D, Huard C, Diamonti AJ, Lander ES, Cantley LC, Carraway KL 3rd. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J Biol Chem*. 276 pp : 22685-98. 2001

Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol.* 25 pp : 2164-70. 2007

Thomas N, Pernot M, Vanderesse R, Becuwe P, Kamarulzaman E, Da Silva D, François A, Frochot C, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem Pharmacol.* 80 pp : 226-35. 2010

Thomas SM, Coppelli FM, Wells A, Gooding WE, Song J, Kassis J, Drenning SD, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 63 pp : 5629-35. 2003

Tian T, Nan KJ, Wang SH, Liang X, Lu CX, Guo H, Wang WJ, Ruan ZP. PTEN regulates angiogenesis and VEGF expression through phosphatase-dependent and -independent mechanisms in HepG2 cells. *Carcinogenesis.* 31: pp : 1211-9. 2010

To MD, Perez-Losada J, Mao JH, Balmain A. Crosstalk between Pten and Ras signaling pathways in tumor development. *Cell Cycle.* 9 pp : 1185-8. 2005

Tomita T, Fujii M, Tokumaru Y, Imanishi Y, Kanke M, Yamashita T, Ishiguro R, Kanzaki J, Kameyama K, Otani Y. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor upregulates matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane type-1 MMP (MT1-MMP) in human head and neck cancer cells. *Cancer Lett.* 156 pp : 83-91. 2000

Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Van Dyke T, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol* 3 : E59. 2003

Tse GM, Yu KH, Chan AW, King AD, Chen GG, Wong KT, Tsang RK, Chan AB. HER2 expression predicts improved survival in patients with cervical node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 141 pp : 467-73. 2009

Ueda S, Basaki Y, Yoshie M, Ogawa K, Sakisaka S, Kuwano M, Ono M. PTEN/Akt signaling through epidermal growth factor receptor is prerequisite for angiogenesis by hepatocellular carcinoma cells that is susceptible to inhibition by gefitinib. *Cancer Res.* 66 pp : 5346-53. 2006

Uhlmann EJ, Wong M, Baldwin RL, Bajenaru ML, Onda H, Kwiatkowski DJ, Yamada K, Gutmann DH. Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures. *Ann Neurol.* 52 : 285-96. 2002

Vallböhmer D, Zhang W, Gordon M, Yang DY, Yun J, Press OA, Rhodes KE, Sherrod AE, Iqbal S, Danenberg KD, Groshen S, Lenz HJ. Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J Clin Oncol.* 23 pp : 3536-44. 2005

Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 359 pp : 1116-27. 2008

Viloria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppi JM, Rak J, Kerbel RS. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 61 : 5090-101. 2001

Viloria-Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol.* 151 pp : 1523-30. 1997

Vitolo MI, Weiss MB, Szmanski M, Tahir K, Waldman T, Park BH, Martin SS, Weber DJ, Bachman KE. Deletion of PTEN promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 69 pp : 8275-83. 2009

Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol.* 150 pp :

409-15. 1997

Weber A, Langhanki L, Sommerer F, Markwarth A, Wittekind C, Tannapfel A. Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene*. 22 pp : 4757-9. 2003

Wen S, Stolarov J, Myers MP, Su JD, Wigler MH, Tonks NK, Durden DL. PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98 pp : 4622-7. 2001

Weng L, Brown J, Eng C. PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet*. 10 pp : 237-42. 2001

Weng LP, Brown JL, Baker KM, Ostrowski MC, Eng C. PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum Mol Genet*. 11 pp : 1687-96. 2002

Weng LP, Smith WM, Brown JL, Eng C. PTEN inhibits insulin-stimulated MEK/MAPK activation and cell growth by blocking IRS-1 phosphorylation and IRS-1/Grb-2/Sos complex formation in a breast cancer model. *Hum Mol Genet*. 10 pp : 605-16. 2001

Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 99 pp : 63-7. 2002

Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*. 22 pp : 3113-22. 2003

Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest*. 95 pp : 1897-905. 1995

Yamatodani T, Ekblad L, Kjellén E, Johnsson A, Mineta H, Wennerberg J. Epidermal growth factor receptor status and persistent activation of Akt and p44/42 MAPK pathways correlate with the effect of cetuximab in head and neck and colon cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 135 pp :

395-402. 2009

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 pp : 127-37. 2001

Yeh JJ, Routh ED, Rubinas T, Peacock J, Martin TD, Shen XJ, Sandler RS, Kim HJ, Keku TO, Der CJ. KRAS/BRAF mutation status and ERK1/2 activation as biomarkers for MEK1/2 inhibitor therapy in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 8 pp : 834-43. 2009

Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Egleston BL, Speier WF 4th, Haffty B, Kowalski D, Camp R, Rimm D, Vairaktaris E, Burtness B, Psyrri A. Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16 pp : 553-8. 2007

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 125 pp : 1137-49. 2006

Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor-1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 60 pp : 1541-5. 2000

Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 14 pp : 391-6. 2000



## RÉSUMÉ

Le cetuximab est indiqué, en monothérapie pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou récurrents et/ou métastatiques. Cependant sur les tumeurs primaires, il s'est révélé d'une efficacité modeste. Dans divers types tumoraux, il a été montré que la perte d'expression de PTEN est associée à une résistance aux thérapies anti-EGFR, il s'agit d'un évènement relativement fréquent dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

Cette étude est la première à investiguer directement le rôle de la perte d'expression de PTEN dans la réponse au cetuximab des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

Aussi, la mise au point d'un modèle PTEN déficient montre que la perte d'expression de PTEN dans les cellules Cal 27 conduit à une suractivation des voies de la survie et de prolifération cellulaire qui n'aboutit cependant pas à une résistance au cetuximab. Ces travaux montrent que les cellules Cal 27 sont plus dépendantes de l'activation de la voie PI3K/AKT que de l'activité de l'EGFR pour leur croissance, expliquant l'effet modeste du cetuximab.

Notre étude de l'angiogenèse par un modèle d'anneaux aortiques cultivé en milieux conditionnés, montre que le bourgeonnement endothélial n'est pas dépendant du VEGF. Le silencing de PTEN dans ces cellules, régule positivement les facteurs anti-angiogéniques TSP1 et IGFBP 3 et diminue la capacité d'induction du bourgeonnement endothélial.

Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, la perte d'expression de PTEN ne semble pas être un évènement important dans la tumorigenèse mais avoir un impact déterminant en tant qu'évènement tardif. L'ensemble des données fournies par notre modèle permet de proposer, pour la perte d'expression de PTEN, un rôle d'initiation du processus métastatique dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

**MOTS CLÉS** : cetuximab, PTEN, carcinome épidermoïde de la tête et du cou, angiogenèse

## **SUMMARY**

### **“IMPACT OF PTEN LOSS OF EXPRESSION ON CETUXIMAB RESPONSE AND ANGIOGENESIS INDUCTION BY A CELLULAR MODEL OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA”**

Cetuximab has been recently accepted as a single agent to treat recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. However, modest efficacy of cetuximab used as a single agent has been reported on primary tumor. In many tumor types, loss of PTEN expression has been described to be associated to resistance to anti-EGFR therapies. Loss of PTEN expression is a frequent event in head and neck squamous cell carcinoma.

This study is the first one to directly investigate the role of PTEN loss of expression in response of head and neck squamous cell carcinoma to cetuximab.

PTEN-deficient cellular model shows that loss of PTEN expression leads to an overactivation of the signaling pathways ruling cell survival and proliferation but do not impact on cetuximab efficacy. According to our data, Cal 27 cells growth rather depends on PI3K/AKT activation than on EGFR.

Observation of angiogenesis, using an aortic ring assay cultured in conditioned media, shows that endothelial sprouting is not dependent on VEGF. PTEN silencing in Cal 27 cells induces anti-angiogenic TSP1 and IGFBP 3 levels in the conditioned medium and reduces the sprouting induction ability by Cal 27 cells.

Finally, it is likely that loss of PTEN expression is not a key event in head and neck squamous cell carcinoma tumorigenesis, but might be determinant when occurring as a late event. Taken together, our data suggest that loss of PTEN expression could be involved in initiating metastasis process in head and neck squamous cell carcinomas.

**KEY WORDS** : cetuximab, PTEN, carcinome épidermoïde de la tête et du cou, angiogénèse