



HAL
open science

Anomalies géniques de l'épithélium respiratoire : applications dans la carcinogenèse bronchique et la mucoviscidose

Philippe Scheid

► **To cite this version:**

Philippe Scheid. Anomalies géniques de l'épithélium respiratoire : applications dans la carcinogenèse bronchique et la mucoviscidose. Biotechnologies. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN10305 . tel-01754376

HAL Id: tel-01754376

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754376v1>

Submitted on 30 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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I

FACULTE DE MEDECINE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

BIOINGÉNIERIE

Discipline : 

Présentée et soutenue publiquement

par

Philippe SCHEID

Le 4 novembre 2002

Titre :

**ANOMALIES GENIQUES DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE :
APPLICATIONS DANS LA CARCINOGENESE BRONCHIQUE ET LA
MUCOVISCIDOSE**

Directeur de thèse : Mr le Professeur Yves MARTINET

JURY

M. le Professeur B. DESRUES (Rapporteur)

M. le Professeur Y. MARTINET

M. le Professeur J-M. VIGNAUD

M. le Professeur E. WEITZENBLUM (Rapporteur)

Remerciements

Je souhaite exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont aidé à l'aboutissement de ce travail et en particulier aux membres du jury de cette thèse.

A notre maître Monsieur le Professeur Yves Martinet, pour avoir inspiré et guidé ces travaux et pour son soutien sans faille,

A Monsieur le Professeur Benoît Desrues pour son accueil Chaleureux et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail,

A Monsieur le Professeur Jean-Michel Vignaud pour son enthousiasme et sa grande compétence,

A Monsieur le Professeur Emmanuel Weitzenblum pour son accueil bienveillant, et qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ce travail.

A Monsieur le Professeur Eric WFW Alton qui nous a accueilli dans son laboratoire au National Heart and lung Institute à Londres, et qui nous a transmis son savoir dans le domaine de la mucoviscidose,

A Jane, Uta, Felix, Myra, Steve, Michele, Liz, Ray, James, Stephano, Chris et Mary du laboratoire de Eric WFW Alton,

A Ann, David, Sarah et soeur Rose du Royal Brompton Hospital,

A Madame le Docteur Nadine Martinet pour sa compétence et son opiniâtreté,

A Monsieur le Professeur Michel Vidailhet pour son soutien permanent,

A notre maître Monsieur le Professeur Daniel Anthoine qui nous a toujours encouragé.

A toi Marie-Lyne,

A Nicolas, Bastien et Léa,

A mes parents.

Glossaire

ADK :	Adénocarcinome
ADNmt :	ADN méthyltransférase
AP1 :	Activator Protein 1
CB :	Cancer bronchique
CBNPC :	Cancer bronchique non à petites cellules
CBPC :	Cancer bronchique à petites cellules
cdk :	Cyclin-dependant-kinases
CE :	Carcinome épidermoïde
CF :	Cystic Fibrosis Utilisé pour "mucoviscidosique" Par analogie : non-CF pour "non mucoviscidosique"
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CIS :	Carcinome In Situ
EGF :	Epidermal Growth Factor
EMSA :	ElectroMobility Shift Assay
ENaC :	Epithelial Sodium Channel
GRP :	Gastrin Releasing Factor
HNE :	Hyperplasie NeuroEndocrine
HNEDI :	Hyperplasie NeuroEndocrine Diffuse Idiopathique
IGF :	Insulin-like Growth Factor
ICAM1 :	InterCellular Adhesion Molecule 1
IKB :	Inhibiteur du facteur de transcription nucléaire NFκB
IL-1 :	Interleukine-1
IL-6 :	Interleukine-6
IL-8 :	Interleukine-8

IL-10 :	Interleukine-10
LBA :	Lavage BronchoAlvéolaire
NBD :	Nucleotide Binding Domain
NF κ B :	Nuclear Factor Kappa B
ORCC :	Outwardly Rectifying Chloride Channel
PA :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCNA :	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PNN :	Polynucléaire Neutrophile
pRb :	Protéine Rb
RAR :	Récepteur de l'Acide Rétinoïque
R-EGF :	Récepteur de l'Epidermal Growth Factor
SA :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SSCP :	Single Strand Conformation Polymorphism
TGF :	Transforming Growth Factor
TNF α :	Tumor Necrosis Factor α
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	13
PREMIERE PARTIE : Applications des connaissances de la carcinogenèse bronchique à l'évaluation du pronostic des cancers bronchiques et à leur chimioprévention	14
Introduction	16
Chapitre I : Données de la littérature	18
I. Les caractéristiques histologiques des cancers bronchiques	18
1. La muqueuse bronchique normale et ses différents types cellulaires	18
2. Les cellules impliquées dans la carcinogenèse bronchique	19
3. Les aspects histologiques des états précancéreux	20
3.1. Le modèle classique de transformation horizontale de l'épithélium	21
3.2. L'hyperplasie adénomateuse atypique	21
3.3. L'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique (HNEDI)	21
4. La classification histologique internationale des cancers du poumon	22
4.1. Le cas des carcinomes bronchiques à différenciation neuroendocrine	23
4.1.1. Les cancers bronchiques à petites cellules	25
4.1.2. Les tumeurs carcinoïdes	25
4.1.3. Les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules	27
4.2. Le carcinome épidermoïde	27
4.3. L'adénocarcinome	27
4.4. Les carcinomes à grandes cellules	28
5. La stroma-réaction des cancers du poumon	28
II. Les mécanismes de la carcinogenèse	29
1. Cadre général de la carcinogenèse bronchique	29
2. Le cancer bronchique, maladie du cycle cellulaire	30
3. Le rôle des facteurs de croissance	33
4. Les gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans le cancer du poumon	33
4.1. Voie du gène du rétinoblastome (Rb)	34
4.1.1. La régulation de la protéine Rb (pRb)	34
4.1.1.1. La liaison à E2F	34
4.1.1.2. Le rôle de la cycline D1	35
4.1.1.3. Le rôle de p16 ^{INK4}	35
4.1.2. Interfaces de Rb avec d'autres voies de signalisation	36
4.1.3. Anomalies de la voie Rb et cancer du poumon	36
4.2. Le gène p53	37
4.2.1. Généralités	37
4.2.2. Les anomalies du gène p53	37
4.2.3. La voie de régulation de p53	39
4.2.3.1. Le contrôle de l'arrêt du cycle en G1	39
4.2.3.2. La régulation de l'apoptose	40
4.2.3.3. Fréquence des anomalies de la voie de régulation de p53 et cancer du poumon	41
4.2.3.4. Carcinogènes du tabac et p53	43
4.3. Autres gènes suppresseurs possiblement impliqués	43

5. Les proto-oncogènes et oncogènes impliqués dans le cancer du poumon	44
5.1. Les récepteurs de type tyrosine-kinase.....	44
5.1.1. Le récepteur de l'EGF	45
5.1.2. Le gène c-erb-B2	45
5.2. Les oncogènes myc.....	45
5.2.1. Les caractéristiques de base.....	45
5.2.2. Le rôle de c-myc dans la prolifération cellulaire.....	46
5.2.3. Les oncogènes myc dans les cancers du poumon.....	46
5.3. Les gènes ras.....	47
5.3.1. Caractères généraux des gènes ras.....	47
5.3.2. L'activation des protéines ras.....	47
5.3.3. Le rôle de p21 ras dans la transduction des signaux extracellulaires	48
5.3.4. Mutations de ras et cancers.....	49
5.3.5. Mutations de K-ras et adénocarcinome bronchique.....	49
5.3.6. L'influence du type de carcinogène	50
6. Les anomalies de la méthylation de l'ADN	50
6.1. La méthylation, élément de la régulation épigénétique.....	50
6.2. Evolution de la méthylation	53
6.2.1. Lors de la réplication de l'ADN : la méthylation de maintenance	53
6.2.2. Notion de méthylation de novo.....	53
6.2.3. La méthylation de l'ADN au cours de l'embryogenèse	53
6.2.3.1. Coordination des processus de déméthylation/reméthylation de novo.....	53
6.2.3.2. La méthylation est impliquée dans l'empreinte parentale.	55
6.2.3.3. Expression variable d'un gène et statut de méthylation	55
6.3. La méthylation de l'ADN est un indicateur de la fonction des gènes.....	56
6.3.1. Relation entre méthylation et activité d'un gène.....	56
6.3.2. Les mécanismes de répression de gènes méthylés	56
6.4. Méthylation de l'ADN et cancers	57
6.4.1. Mécanismes de l'influence de la méthylation de l'ADN sur la carcinogenèse	57
6.4.1.1. Inhibition de la fonction des gènes suppresseurs de tumeur	57
6.4.1.2. Les mutations ponctuelles de l'ADN	57
6.4.1.3. Le rôle de l'ADN méthyltransférase.....	58
6.4.1.4. Hypométhylation globale et transformation néoplasique.....	58
6.4.2. Méthylation de l'ADN et tumeurs solides	59
7. Anomalies géniques dans les lésions préneoplasiques.....	60
7.1. Le gène suppresseur p53.....	61
7.2. Les gènes impliqués directement dans le contrôle du passage G1/S : Rb, p16 et cycline D1.....	61
7.3. Le couple c-erb-B2/R-EGF	62
7.4. L'oncogène c-myc.....	62
7.5. L'oncogène K-ras.....	62
7.6. Le gène FHIT (Fragile Histidine Triad).....	62
7.7. L'instabilité génique	63
7.8. Déséquilibre du niveau d'expression des gènes impliqués dans le processus apoptique.....	64
7.9. Autres anomalies	64
III. Les facteurs de pronostic des cancers bronchiques	65
1. La classification TNM.....	65
2. Les nouveaux marqueurs de pronostic des CBNPC.....	69
2.1. Marqueurs de la voie de Rb : p16 ^{INK4} , cyclines D ₁ et E	69
2.2. Les marqueurs pronostiques de la voie de p53	71
2.2.1. le gène p53	71
2.2.2. Le couple Bcl2 / Bax.....	72
2.2.3. La protéine p21 ^{Waf1}	72

2.3. Les mutations du gène K-ras	72
2.4. Autres marqueurs	73
2.5. Les antigènes des groupes sanguins.....	73
IV. Bases de la prévention des cancers bronchiques par les rétinoïdes	74
1. Le métabolisme des rétinoïdes.....	74
1.1. Les principaux rétinoïdes.....	74
1.2. Absorption – distribution – transformation et stockage	75
2. Les récepteurs de la vitamine A.....	75
2.1. Les récepteurs nucléaires	75
2.2 Les récepteurs de l'acide rétinoïque et les récepteurs des rétinoïdes X.....	76
3. La régulation transcriptionnelle par l'acide rétinoïque	77
3.1. Notion d'éléments de réponse à l'acide rétinoïque	77
3.2. Notion d'hétérodimérisation des RARs et RXRs	78
3.3. Rôle des cofacteurs transcriptionnels.....	79
4. Pathologie et disponibilité de la vitamine A	79
4.1. Durant l'embryogenèse.....	79
4.2. Dans le contrôle de la carcinogenèse	80
4.3. Dans la carcinogenèse bronchique.....	81
5. Effets de l'administration préventive de rétinoïdes chez l'homme	83
5.1. Etudes concernant les lésions épithéliales préinvasives et rétinoïdes.....	83
5.2. La prévention de deuxièmes cancers	84
5.3. La prévention primaire chez des volontaires sains.....	85
5.4. Constat d'échec des essais de chimioprévention chez l'homme	87
Chapitre II : Les objectifs du travail de recherche	90
Chapitre III : Etude des marqueurs pronostiques des carcinomes bronchiques non à petites cellules	92
Article n°1: P. Scheid, J. Moldvay, P. Wild, K. Nabil, J. Borrelly, B. Marie, G. Farré, T. Labib, G. Pottier, R. Sesboué, C. Bronnner, J.M. Vignaud, Y. Martinet, N. Martinet. Predictive survival markers for resected non-small-cell lung carcinoma. Clin Cancer Res 2000, 6:1125-1134	93
I. Matériels et méthodes	103
1. Population étudiée.....	103
2. Etude immunohistochimique des tumeurs.....	105
3. Etude des mutations du codon 12 du gène K-ras dans les adénocarcinomes	105
4. Etude statistique	105
II. Les résultats	106
1. Description de la population.....	106
2. Histologie et marqueurs immunohistochimiques	106
3. Etude des mutations de l'exon 1 de K-ras (entre les codons 1 et 31).....	109
4. Etude statistique multivariée	111
Chapitre IV : Etude de la méthylation du promoteur du gène RAR β_2	112
Abstract n°1: P. Scheid, E. Picard, G. Farré, C. Rochette-Egly, Y. Martinet, J.M. Vignaud, N. Martinet. Retinoic acid receptor β promoter methylation in lung tumor. Eur Respir J 2000, 16:396S. World Congress on Lung Health, 10 th European Respiratory Society Annual Congress, Florence, 30 août-3 septembre 2000.....	113

I. Matériels et méthodes	114
1. Population étudiée.....	114
2. Etude de l'expression de la protéine RAR β_2 en immunohistochimie	115
3. Allélotypage par le marqueur D3S1283	116
4. Etude de la méthylation du promoteur de RAR β_2	116
4.1. La bisulfitation de l'ADN	116
4.2. Identification des cytosines méthylées sur des lignées de cancers bronchiques n'exprimant par RAR β_2	117
4.3. La PCR spécifique de la méthylation (MSP).....	120
5. Analyse statistique.....	121
II. Les résultats	122
1. Expression de la protéine RAR β	122
2. Allélotypage de la région 3p24.2	122
3. Etude de la méthylation du promoteur du gène RAR β_2	125
4. Corrélations avec les caractéristiques cliniques de la population	125
Chapitre V : Discussion	129
DEUXIEME PARTIE : Applications des connaissances des anomalies géniques des maladies respiratoires à la compréhension et à la modulation des mécanismes de l'inflammation des voies aériennes dans la mucoviscidose	134
Introduction	135
Chapitre I : Données de la littérature	137
I. Du gène à la protéine de la mucoviscidose	137
1. Le gène CFTR	137
2. La structure et la maturation de la protéine CFTR	137
3. Les fonctions de la protéine CFTR	139
3.1. La protéine CFTR est un canal chlore	139
3.2. La régulation d'autre canaux échangeurs d'ions	140
4. Les mutations du gène CFTR.....	141
II. Les mécanismes de l'atteinte pulmonaire	144
1. Le liquide de surface des voies aériennes	146
1.1. L'hypothèse de la diminution du volume des sécrétions.....	146
1.2. L'hypothèse de l'élévation de la concentration de sodium dans les sécrétions bronchiques..	147
1.3. L'activité antimicrobienne du liquide de surface bronchique.....	148
2. L'infection des voies aériennes	148
2.1. Les germes responsables	149
2.2. Facteurs de l'adhérence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	150
2.2.1. L'adhésion au mucus bronchique.....	150
2.2.2. Le rôle des pili bactériens.....	150
2.2.3. Les récepteurs asialoGM1 médiateurs de l'adhérence de PA	150
2.2.4. Corrélations entre adhérence bactérienne et mutations du gène CFTR	151
2.3. Destruction de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par internalisation CFTR dépendante ?	152
3. L'inflammation des voies aériennes	153
3.1. L'inflammation est un événement précoce et persistant	153
3.1.1. Inflammation du liquide de lavage bronchioloalvéolaire.....	153
3.1.2. Le couple polynucléaire neutrophile – Interleukine-8	153
3.1.3. Le déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases	154
3.1.4. La production de radicaux libres de l'oxygène	155

3.1.5. Le rôle de l'interleukine-10	156
4. Inflammation primaire ou secondaire à l'infection ?	157
4.1. Les constatations cliniques	157
4.2. Les modèles cellulaires.....	157
4.3. Apport des xénogreffes de bronches fœtales.....	158
4.4. Le rôle clef du facteur de transcription nucléaire Kappa B (NFκB).....	160
4.4.1. Structure et mode d'activation de NFκB	160
4.4.2. Activation endogène (primaire) de NFκB dans la mucoviscidose	163
5. Place actuelle du traitement anti-inflammatoire dans la mucoviscidose.....	164

Chapitre II : Les objectifs des travaux de recherche.....165

Chapitre III : Etude des mécanismes de l'inflammation de l'épithélium des voies aériennes

Abstract n°2: Scheid P, Davies JC, Martinet Y, Geddes DM, Alton EW. Sécrétion élevée d'interleukine-8 par les cellules épithéliales nasales dans la mucoviscidose : liée à l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Mal Respir 1999, 16:1S122
3^{ème} Congrès de Pneumologie de Langue Française, Paris, 27-30 janvier 1999..... 167

Article n°2: Scheid P, Kempster L, Griesenbach U, Davies JC, Dewar A, Weber PP, Colledge WH, Evans MJ, Geddes DM, Alton EW. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. Eur Respir J 2001, 17:27-35 168

I. Matériels et méthodes	177
1. La population étudiée	177
2. Le recueil des cellules épithéliales nasales	177
3. La souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA01)	178
4. Etude de la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales	178
4.1. A l'état basal et après stimulation par PA.....	178
4.2. En parallèle avec l'étude de l'adhérence bactérienne	178
5. Evaluation de l'adhérence de PA en microscopie électronique à balayage	179
6. Etude de l'activation de NFκB.....	179
6.1. Les cultures cellulaires	179
6.2. Etude in vivo chez la souris	180
6.3. Transfection du gène CFTR dans les cellules Cos-7	180
6.4. Etude de l'activité de NFκB et identification des sous-unités de NFκB en électrophorèse ..	181

II. Résultats.....	182
1. La sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales.....	182
2. Egalisation de l'adhérence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et conséquences sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales.....	182
3. L'influence du génotype sur la production d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales	182
4. Activité de NFκB dans les cellules épithéliales nasales et les tissus murins.....	186
5. Activité de NFκB et production d'IL-8 dans les modèles de lignées cellulaires	187
6. Effets de la transfection du gène CFTR normal, ou porteur d'une mutation ΔF508 ou G551D.....	190

Chapitre IV : Modulation de l'activité de NFκB in vitro par thérapie génique.....191

Abstract n°3: Scheid P, Griesenbach U, Davies JC, Siddique Z, Gruenert DC, GeddesDM, Alton EW. Interleukin-8 production by airway epithelium and the effect of liposome-mediated IκB gene transfer. Thorax 1998, 53:A78. British Thoracic Society, Winter meeting, Londres, 2-4 décembre 1998 192

Article n°3: Griesenbach U, Scheid P, Hillery E, de Martin R, Huang L, Geddes DM, Alton EW. Anti-inflammatory gene therapy directed at the airway epithelium. Gene Ther 2000, 7:306-13	193
I. Matériels et méthodes	201
1. Préparation des adénovirus.....	201
2. Les oligonucléotides "leurres" utilisés	202
3. Transfection des lignées cellulaires.....	202
4. Sécrétion d'IL-8 par les cellules tranfectées	202
5. Infection à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez la souris	202
6. Efficacité de la transfection par mesure de l'expression de la β galactosidase.....	203
7. Identification de l'ADN complémentaire de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ par RT-PCR	203
8. Etudes statistiques	203
II. Résultats	203
1. Sécrétion d'IL-8 après transfection par $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	203
2. Activation de NF κ B après transfection par la construction adénovirus- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	206
3. Efficacité de la transfection d'oligonucléotides complémentaires de la séquence de consensus de NF κ B (decoy)	208
Chapitre V : Discussion	209
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	213
Table des matières des tableaux	216
Table des matières des figures	217
BIBLIOGRAPHIE	220

INTRODUCTION GENERALE

Des progrès considérables dans la connaissance des anomalies géniques des maladies respiratoires ont été réalisés depuis une vingtaine d'années. Le délai est cependant très long entre la mise en évidence du substratum (ou d'une partie de celui-ci) à l'échelon génique, et les applications diagnostiques, pronostiques ou thérapeutiques qui peuvent en découler.

Notre activité clinique est plus particulièrement ciblée sur la prise en charge des cancers bronchiques du fait de l'orientation historique du Service de Pneumologie. En outre nous avons développé depuis 1993 un Centre de Soins pour les adultes atteints de mucoviscidose devenu nécessaire compte tenu de l'évolution démographique de cette population de patients. Ces deux domaines distincts de la pathologie respiratoire ont néanmoins en commun le fait d'être la conséquence d'anomalies génétiques: monogéniques dans le cadre de la mucoviscidose, et multigéniques dans le cadre de la carcinogénèse bronchique. Nos travaux de recherches fondamentales ont naturellement été orientés vers ces deux cadres de la pathologie respiratoire.

Nous allons exposer nos travaux dans les applications qui sont issues des connaissances nouvelles à l'échelon génique dans deux grands domaines : 1) la carcinogénèse bronchique pour l'établissement de facteurs de pronostic des cancers bronchiques plus précis et plus fiables, et pour la compréhension des mécanismes des échecs de la chimioprévention par les rétinoïdes, et 2) la mucoviscidose pour la compréhension des causes de l'inflammation de la muqueuse des voies aériennes et pour la mise en œuvre de moyens thérapeutiques nouveaux à visée anti-inflammatoire.

Pour chacun de ces deux grands thèmes de travail nous rapporterons les connaissances actuelles dans une revue bibliographique détaillée et nous exposerons les modalités et les résultats de nos travaux.

PREMIERE PARTIE

*Applications des connaissances de la carcinogenèse
bronchique à l'évaluation du pronostic des cancers
bronchiques et à leur chimioprévention*

Introduction

Le cancer bronchique (CB) est la première cause de décès par cancer chez l'homme en Europe Occidentale avec une mortalité d'environ 50 /100.000 habitants (1). En Lorraine on observe une surmortalité persistante liée au CB en dépit des transformations socioéconomiques régionales des deux dernières décennies, avec en 1998 pour la Meurthe-et-Moselle des index de surmortalité de 133 pour l'homme et de 145 pour la femme (base nationale de 100) (2,3). Parallèlement on assiste à un rajeunissement progressif des populations touchées (4), et à un accroissement régulier de la fréquence du cancer bronchique chez la femme (1) en Europe et plus encore aux USA où le CB est devenu le deuxième cancer en fréquence et le premier en terme de mortalité (5).

Le tabac est le principal pourvoyeur de cancer bronchique, avec dans un certain nombre de cas l'effet additif ou potentialisateur d'une exposition professionnelle (6). Compte tenu des limites actuelles de l'aide au sevrage tabagique, des délais d'efficacité de l'arrêt du tabagisme, et des résultats globalement décevants du traitement du CB, d'autres approches complémentaires sont à développer pour essayer de limiter l'hécatombe prévisible : dans les domaines 1) de la chimioprévention, 2) des stratégies de détection précoce et 3) de l'identification de nouveaux facteurs de pronostic susceptibles d'orienter les modalités thérapeutiques.

Dans une première partie nous exposerons successivement les conditions actuelles du diagnostic, les connaissances concernant la carcinogénèse bronchique, les limites actuelles des approches préventives actuelles et les facteurs et marqueurs de pronostic disponibles.

Dans une deuxième partie nous relaterons notre expérience dans les domaines :

1) de la recherche de nouveaux facteurs de pronostic à usage clinique, sur une série de CBNPC étudiés pour les oncogènes *bcl2*, *c-erb-B2*, *Ki-ras*, le gène suppresseur p53 ainsi que pour les antigènes des groupes sanguins.

2) des mécanismes physiopathologiques susceptibles d'expliquer les échecs de la chimioprévention des cancers bronchiques par les dérivés de la vitamine A avec l'étude des anomalies de la méthylation du promoteur du gène du récepteur $\beta 2$ de l'acide rétinoïque (RAR- $\beta 2$) sur une série de tumeurs de type CBNPC.

Les résultats de ces travaux ouvriront la discussion sur une réflexion concernant la stratégie globale pour l'optimisation des moyens de chimioprévention et pour l'intégration des facteurs de pronostic issus des études histologiques, immunohistochimiques et de biologie moléculaire dans les stratégies thérapeutiques et de diagnostic précoce.

Chapitre I : Données de la littérature

I. Les caractéristiques histologiques des cancers bronchiques

1. La muqueuse bronchique normale et ses différents types cellulaires

La muqueuse trachéobronchique est recouverte d'un épithélium pseudostratifié reposant sur une membrane basale qui repose elle-même sur un chorion. Les cellules de l'épithélium de surface sont majoritairement constituées de cellules ciliées et de cellules à mucus respectivement dans un rapport de environ 6 à 1. Le mouvement coordonné des cellules ciliées porteuses chacune d'environ 200 cils constitue l'escalator qui permet au mucus de remonter jusqu'à la glotte où il est dégluti avec les particules captées. Les cellules à mucus (dites caliciformes) constituent également des glandes pénétrant profondément dans le chorion, et sont responsables de la plus grande partie de la production du mucus. Les cellules basales, de forme grossièrement triangulaire, ancrées à la membrane basale sont capables de division et assurent le renouvellement de l'épithélium de surface.

Lors d'une agression de la muqueuse on constate une disparition des cellules ciliées qui sont remplacées grâce à la multiplication par divisions successives des cellules basales en cellules indifférenciées à petits grains de mucus. Il semble que la restauration des cellules normales ciliées et à mucus se fasse à partir des cellules à petits grains de mucus lors de la réparation épithéliale.

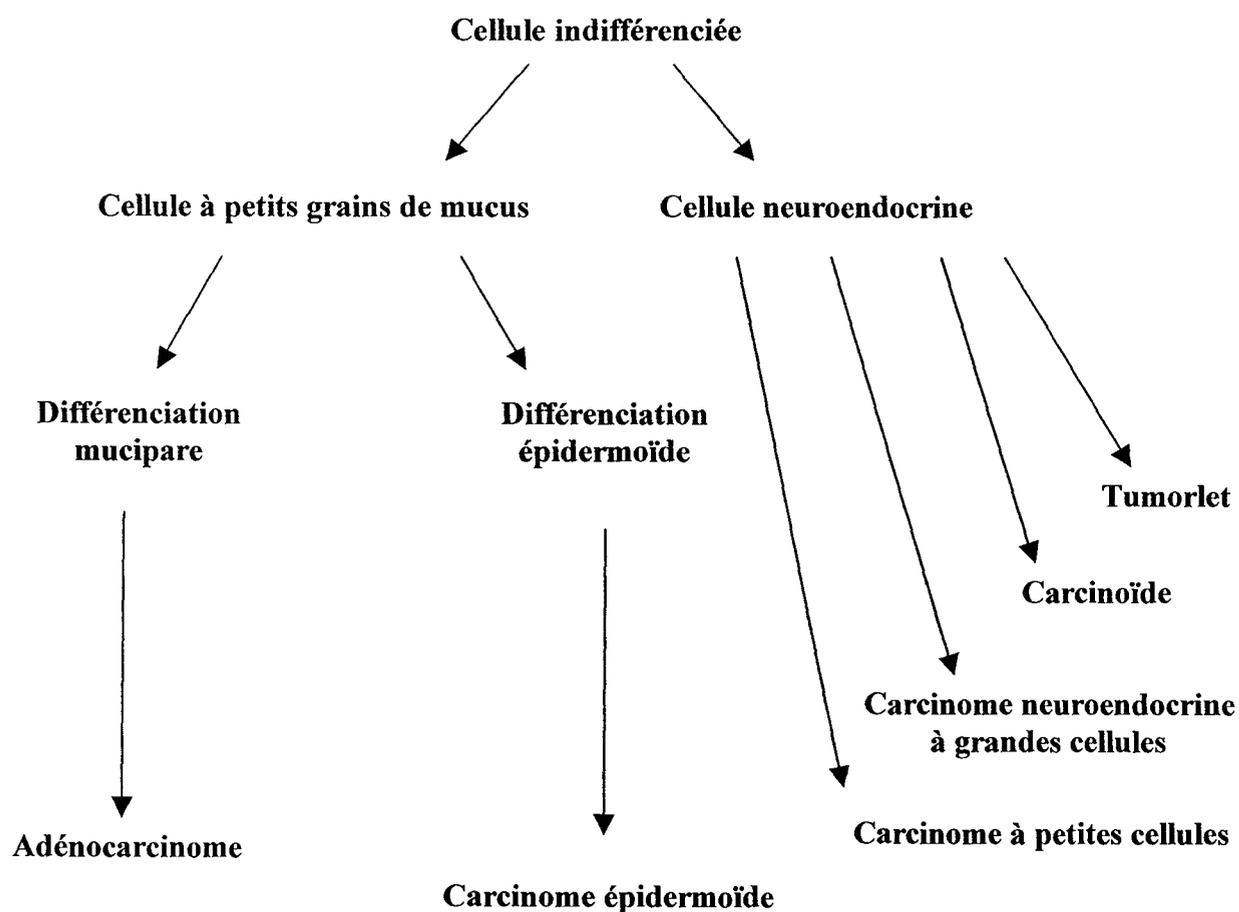
La muqueuse comporte également des cellules neuroendocrines, environ 4⁰/₀₀ des cellules bronchiques, dont le rôle est mal connu et à partir desquelles on pense que se développent les tumeurs de la lignée neuroendocrine depuis les tumorlets jusqu'aux carcinomes bronchiques à petites cellules. Les cellules neuroendocrines sont en général isolées en regard de la membrane basale et sont capables de sécréter différentes substances

(bombesine-like-peptique, calcitonine, sérotonine...). A partir des bronchioles distales terminales et respiratoires on individualise des cellules mucipares, les cellules de Clara et pneumocytes de type II qui proviennent également de la différenciation de cellules totipotentielles.

2. Les cellules impliquées dans la carcinogénèse bronchique

Toutes les cellules capables de se diviser sous l'effet d'un processus d'agression chronique ou du fait d'agents carcinogènes peuvent proliférer et devenir néoplasiques. Les cellules capables de se diviser sont les cellules basales, les cellules à petits grains de mucus, les cellules neuroendocrines, les cellules de Clara, et les pneumocytes de type 2 (7).

Figure n°1: Hypothèses actuelles concernant l'origine cellulaire des différents types histologiques de cancers bronchiques.



3. Les aspects histologiques des états précancéreux

3.1. Le modèle classique de transformation horizontale de l'épithélium

Les lésions précancéreuses de la muqueuse bronchique sont dans la plupart des cas la résultante d'une agression chronique de l'épithélium par les cancérogènes de la fumée de tabac. Le caractère plurifocal et la diffusion de l'agression épithéliale sont à l'origine du concept de champ de cancérisation. Cette notion est matérialisée par la fréquence des cancers synchrones (deux CB primitifs en même temps) et métachrones (deux CB primitifs décalés dans le temps).

Les lésions précancéreuses sont de petite taille, de 1 à 3 millimètres, strictement limitées à l'épithélium, sans franchir la membrane basale, d'où leur dénomination de lésions non-invasives ou pré-invasives. La fréquence exacte de ces lésions est mal connue en raison de leur petite taille, de leur caractère diffus et de leur mauvaise visibilité lors de l'examen endoscopique classique en lumière blanche. En ce qui concerne les cancers épidermoïdes proximaux, la succession chronologique des modifications morphologiques conduisant aux états précancéreux serait la suivante :

- **l'hyperplasie épithéliale** avec l'augmentation du nombre de couches cellulaires mais avec persistance de cellules ciliées et à mucus en surface ; cela correspond au remplacement de l'épithélium cylindrique cilié mucipare pseudostratifié, où toutes les cellules reposent sur la lame basale, en un épithélium de type épidermoïde pluristratifié,
- **la métaplasie épidermoïde**, où il existe une désorganisation structurale avec la disparition des cellules de surface, ciliées et à mucus, qui sont remplacées par des cellules d'origine basale, mûrissant vers la surface avec étalement progressif de leur forme, sans atypies cellulaires associées,
- **la métaplasie avec dysplasie**, avec une désorganisation structurale associée à des atypies cellulaires épithéliales dont la répartition sur l'épaisseur de la muqueuse métaplasique (1/3

inférieur seulement, 2/3 inférieur ou plus) permet de les classer en dysplasie légère, modérée ou sévère,

- le **carcinome in situ** (CIS) où les désordres architecturaux et les atypies cellulaires intéressent la lésion sur toute son épaisseur, sans franchissement de la membrane basale.

L'hyperplasie et la métaplasie ne sont pas considérées comme des états précancéreux car ils peuvent également être observés en réponse à des agressions variées sans rapport avec un processus de transformation tumorale. La dysplasie et le CIS sont par contre d'authentiques lésions précancéreuses.

La séquence des transformations successives des lésions depuis l'hyperplasie jusqu'au carcinome in situ est un modèle de transformation horizontale avec une évolutivité variable et une possibilité d'arrêt à chaque stade, le potentiel de régression restant discuté pour les lésions de grade élevé notamment les CIS. Ce modèle de progression horizontale n'exclut pas la possibilité d'une progression verticale avec passage direct au carcinome invasif à partir de chacune des quatre étapes (Figure n°2).

3.2. L'hyperplasie adénomateuse atypique

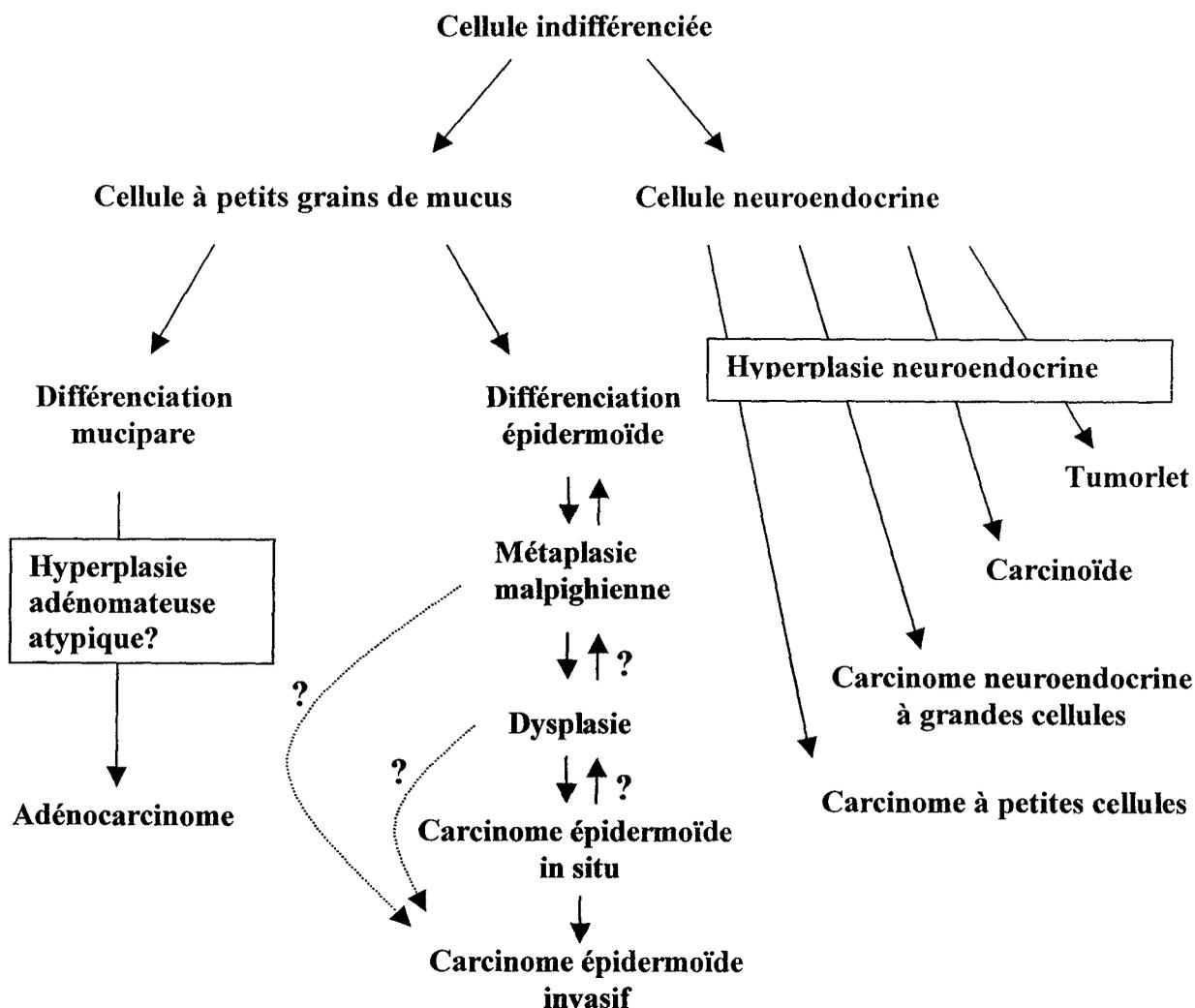
Cet aspect histologique est considéré comme un état précancéreux des adénocarcinomes périphériques, notamment bronchioloalvéolaires. Ce sont des lésions de petite taille de quelques millimètres de diamètre, de siège péribronchiolaire ayant l'aspect d'un carcinome bronchioloalvéolaire sans en avoir tous les critères de malignité, et correspondant à une prolifération clonale de pneumocytes de type 2 (8,9).

3.3. L'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique (HNEDI)

On peut observer des aspects d'hyperplasie neuroendocrine (HNE) et des tumorlets dans des situations pathologiques bénignes telles que les fibroses pulmonaires, les

bronchectasies et la bronchiolite constrictive. L'aspect d'HNEDI sort de ce cadre et est identifiée dans deux tiers des cas des patients porteurs d'une tumeur carcinoïde. La fréquence de cet aspect histologique à proximité des carcinoïdes suggère que l'HNEDI est un état préneoplasique pour les tumeurs carcinoïdes mais aucune filiation spacio-temporelle n'est démontrée entre l'HNEDI et le cancer bronchique à petites cellules (CBPC) (10,11).

Figure 2 : Hypothèses de filiation des étapes successives conduisant à la transformation carcinomateuse de l'épithélium bronchique



4. La classification histologique internationale des cancers du poumon

La nouvelle classification histologique internationale de l'O.M.S. des tumeurs du poumon et de la plèvre a été publiée en 1997 (12) (tableau n°1). Elle apporte des

modifications importantes dans les domaines des lésions préinvasives, des tumeurs neuroendocrines et des adénocarcinomes.

Cette classification repose sur des critères histologiques conventionnels applicables dans le monde entier afin de pouvoir être appliquée par le plus grand nombre et de permettre une bonne comparabilité des données d'un pays ou d'un continent à l'autre. Les techniques ancillaires (histochimiques, immunohistochimiques), la microscopie électronique, les cultures cellulaires et la biologie moléculaire sont susceptibles d'apporter des informations essentielles supplémentaires pour préciser le typage des processus tumoraux en tumeur épithéliales, lymphomateuses ou mésenchymateuses... Cela est particulièrement vrai dans le cas des tumeurs neuroendocrines à grandes cellules et des tumeurs pleurales.

D'une manière générale les cancers bronchiques sont classés en fonction de la composante la plus différenciée et gradés en fonction de la composante la plus indifférenciée. Le caractère hétérogène des cancers du poumon est fréquent, avec 50 % de tumeurs montrant plus d'un des différents types histologiques. Cette notion d'hétérogénéité est très importante en particulier dans l'étude de fragments biopsiques de petite taille.

4.1. Le cas des carcinomes bronchiques à différenciation neuroendocrine

En clinique pneumologique il est habituel de séparer les carcinomes bronchiques présentant des aspects morphologiques, ultrastructuraux ou immunohistochimiques neuroendocrines, des carcinomes ne présentant pas de marqueurs neuroendocrines. Cependant la classification de l'O.M.S. a choisi de faire figurer les cancers bronchiques neuroendocrines de façon éclatée en les intégrant séparément dans les CBPC (groupe 3), les carcinomes à grandes cellules (groupe 4) et les tumeurs carcinoïdes (groupe 7) auxquels s'ajoute l'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique considéré comme un état prénéoplasique

<i>Tumeurs bénignes</i>	<i>Lésions préinvasives</i>
<p><i>Papillome</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - épidermoïde - glangulaire - mixte <p><i>Adénome</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - alvéolaire - papillaire - de type glande salivaire : <ul style="list-style-type: none"> - adénome des glandes muqueuses - adénome pléiomorphe - adénome monomorphe - adénome myoépithélial - cystadénome mucineux - autres 	<ul style="list-style-type: none"> - Dysplasie malpighienne et carcinome in situ - Hyperplasie adénomateuse atypique - Hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique
<p><i>Tumeurs Malignes</i></p>	
<p>1. Carcinome épidermoïde et variantes avec composantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - papillaire - à cellules claires - à petites cellules - basaloïde <p>2. Carcinome à petites cellules variantes : composites avec composantes à différenciation épidermoïde, adénocarcinomeuse ou à grandes cellules</p> <p>3. Adénocarcinome</p> <ul style="list-style-type: none"> - acineux - papillaire - carcinome bronchioloalvéolaire (non mucineux, mucineux, mixte) - solide à sécrétion mucineuse - mixte - variantes : adénocarcinome bien différencié de type foetal, mucineux colloïde, cystadénocarcinome mucineux, à cellules claires 	<p>4. Carcinome à grandes cellules et variantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> - carcinome neuroendocrine à grandes cellules composite - carcinome basaloïde - carcinome lymphoépithélioïde - à cellules claires - avec phénotype rhabdoïde <p>5. Carcinome adénosquameux</p> <p>6. Carcinome pléiomorphe avec éléments sarcomatoïdes ou sarcomateux</p> <ul style="list-style-type: none"> - carcinome pléiomorphe - carcinomes à cellules fusiformes - carcinome à cellules géantes - carcinosarcomes - pneumoblastome <p>7. Carcinoïde</p> <ul style="list-style-type: none"> - typique - atypique <p>8. Carcinome de type salivaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - Carcinome mucoépidermoïde - Carcinome adénoïde kystique - autres <p>9. Carcinomes inclassables</p>

(12). Le tableau n°2 résume le spectre des proliférations bénignes et malignes de la lignée neuroendocrine.

4.1.1. *Les cancers bronchiques à petites cellules*

Ils restent une entité clairement séparée dans le cadre de la classification qui représente environ 15 à 25 % des tumeurs pulmonaires, et ont habituellement un développement proximal et médiastinal. On distingue les CBPC purs et les CBPC composites qui comportent en plus des plages d'aspects différents, de type épidermoïde, adénocarcinomeux ou à grandes cellules, ou d'autres plus rarement.

Les cellules sont de petite taille d'aspect arrondi ou fusiforme dont le noyau est finement granuleux avec un index mitotique élevé, et sont disposées en larges travées ou en massifs denses. Les plages de nécrose sont fréquentes.

En microscopie électronique on identifie dans les deux tiers des cas des granules neuroendocrines. Les marqueurs immunohistochimiques peuvent être négatifs dans 25 % des cas (Leu 7, chromogranine, synaptophysine).

4.1.2. *Les tumeurs carcinoïdes :*

Classées séparément également dans la classification de l'O.M.S., elles sont à l'autre extrémité du spectre des tumeurs neuroendocrines avec un potentiel malin toujours présent même dans les formes typiques (potentiel faible). Elles représentent 2 à 3 % des tumeurs pulmonaires. Elles surviennent également chez des patients non fumeurs (le tabagisme est retrouvé uniquement dans 20 à 40 % des cas) et peuvent parfois s'intégrer dans le cadre de néoplasies endocriniennes multiples (NEM type I).

En dehors de l'aspect pathologique neuroendocrine (organisation pallissadique, en rosette ...) ce sont le nombre de mitoses et/ou l'existence de plage(s) de nécrose qui séparent

Tableau n°2 : Classification des proliférations et néoplasies neuroendocrines**I. Hyperplasie à cellules neuroendocrines et tumorlets**

- Hyperplasie à cellules neuroendocrines
 - associée à une fibrose ou une inflammation
 - adjacente aux tumeurs carcinoïdes
 - hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique
- Tumorlets

II. Tumeurs avec morphologie neuroendocrine

- Carcinoïde typique
- Carcinoïde atypique
- Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
- Carcinome bronchique à petites cellules (CBPC)

III. Carcinome bronchique non à petites cellules avec différenciation neuroendocrine**IV. Autres tumeurs avec caractères neuroendocrines**

- Pneumoblastome
- Tumeur neuroectodermale primitive
- Tumeur à cellules rondes desmoplastiques
- Carcinome avec différenciation rhabdoïde
- Paragangliome

clairement les carcinoïdes typiques et les carcinoïdes atypiques. La distinction est très importante en raison du génie évolutif bien plus marqué des formes atypiques.

4.1.3. Les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules

La présence de caractères morphologiques neuroendocrines peut être précisée par une étude ultrastructurale et surtout par immunohistochimie. L'index mitotique est un élément important, de même que la présence d'une nécrose tumorale.

4.2. Le carcinome épidermoïde

C'est une prolifération tumorale maligne qui présente les caractères de différenciation de l'épithélium malpighien (kératinisation, ponts intercellulaires), dont l'extension au sein de la tumeur permet de définir le degré de différenciation. Des variantes papillaires, à cellules claires, à petites cellules et basaloïdes sont possibles en fonction d'aspects cellulaires focaux différents mais qui gardent les caractéristiques morphologiques des CBNPC. Le carcinome épidermoïde est classiquement une tumeur plutôt « centrale » développée aux dépens des bronches proximales (jusqu'au niveau sous-segmentaire), parfois excavée donnant un aspect classique d'abcès « en cadre ». Il s'agit de la tumeur la plus fréquente, qui représente environ 40 à 50 % des cas de cancer du poumon.

4.3. L'adénocarcinome

C'est une tumeur épithéliale présentant une différenciation glandulaire ou une production de mucus avec une organisation acinaire, papillaire, bronchiolo-alvéolaire ou solide avec production de mucines, souvent combinées (tableau n°1). En dehors des carcinomes bronchioloalvéolaires classiquement de topographie uniquement périphérique, les adénocarcinomes se développent à tous les niveaux depuis les bronches périphériques

jusqu'aux alvéoles et peuvent donc donner des processus tumoraux proximaux ou périphériques. Leur fréquence classique est d'environ 25 à 30 % des cancers bronchiques en augmentation avec des chiffres jusqu'à 40 % dans certains travaux. Cette fréquence accrue serait peut-être liée à une fréquence accrue des cancers bronchiques féminins ou à une modification des habitudes tabagiques (13).

Avec la révision récente de la classification O.M.S., le sous groupe des carcinomes bronchiolo-alvéolaires a vu sa définition limitée à des tumeurs non invasives et présentant une architecture bronchiolo-alvéolaire pure. Toutes les autres formes invasives ou mixtes sont reclassées dans le cadre des différents variants d'adénocarcinomes.

4.4. Les carcinomes à grandes cellules

Ce sont des tumeurs malignes indifférenciées sans différenciation épidermoïde adénocarcinomateuse ou à petites cellules. Désormais ce groupe inclut notamment :

- les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules,
- les carcinomes basaloïdes purs dont ils semblent partager la caractèrè agressif et le pronostic sévère.

5. La stroma-réaction des cancers du poumon

Les cellules tumorales sont disposées dans un tissu de soutien non tumoral appelé stroma-réaction composé d'une matrice extracellulaire et d'un compartiment cellulaire comprenant des fibroblastes, des cellules inflammatoires et des cellules endothéliales. Pour les cellules tumorales, le stroma assure plusieurs fonctions : 1) un support mécanique, 2) l'apport nutritionnel grâce au développement d'une néovascularisation, 3) une aide au contrôle de la différenciation, de la prolifération, de l'adhésion et de la migration des cellules tumorales, 4) une participation au phénotype invasif et/ou métastatique de la tumeur (14).

La matrice extracellulaire :

Sa composition est variable selon les types histologiques de carcinome bronchique et joue un rôle important dans la migration des cellules tumorales. Dans la matrice extracellulaire des intégrines sont impliquées dans les processus d'adhésion des cellules tumorales. Les cellules tumorales stimulent les cellules stromales mésenchymateuses pour qu'elles synthétisent certains protéoglycanes qui sont des récepteurs pour des facteurs de croissance tumorale (EGF, TGF β ...).

La composante cellulaire :

Le stroma tumoral comporte notamment des fibroblastes, des lymphocytes T (TIL: Tumor Infiltrating Lymphocytes) et des macrophages (TAM: Tumor Associated Macrophages) dont les interactions médiées par des cytokines, des facteurs de croissance (PDGF, TGF β ...) permettent la progression de la tumeur par un remodelage de la matrice extracellulaire, le développement d'une néovascularisation et une relative tolérance immunitaire.

Les plages de nécrose observées dans la tumeur sont la conséquence d'une insuffisance de l'apport nutritionnel et de la vascularisation tumorale par rapport à la vitesse de prolifération tumorale.

II. Les mécanismes de la carcinogenèse

1. Cadre général de la carcinogenèse bronchique

La transformation cellulaire cancéreuse est un processus complexe constitué de nombreuses étapes. Des agents carcinogènes sont parfois clairement identifiés dans le cadre d'expositions professionnelles (tableau n°3) (6). Les techniques de biologie moléculaire ont

permis d'identifier des anomalies génétiques variées dans les cellules de cancers du poumon : mutations ponctuelles, délétions, réarrangements chromosomiques, hyperexpression (augmentation de la transcription du gène) ou amplification (augmentation du nombre de copies du gène) de gènes impliqués dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire. Le concept en trois étapes (initiation, promotion, progression) dérivé des connaissances sur la carcinogenèse chimique rend insuffisamment compte de la complexité des événements à l'échelon moléculaire que les progrès de la génétique des cancers permettent de préciser. A l'échelon d'une cellule, la succession des modifications génétiques successives va lui conférer un avantage mitotique lui permettant de s'expander par divisions plus rapides et de constituer un clone. Ce clone cellulaire va donc progresser plus rapidement, puis au sein de celui-ci une autre cellule va à son tour acquérir une autre anomalie et être à l'origine d'un nouveau subclone qui s'amplifiera, et ce jusqu'à la survenue d'une dernière anomalie qui marquera le caractère cancéreux et lui confèrera la capacité d'expansion clonale par rapport aux cellules normales ou précancéreuses voisines.

Ce schéma d'évolution est illustré dans la figure n°3 qui souligne également l'acquisition de caractéristiques nouvelles (perte des capacités d'adhérence, acquisition de capacités de migration ...) tout au long de l'évolution de la tumeur (15).

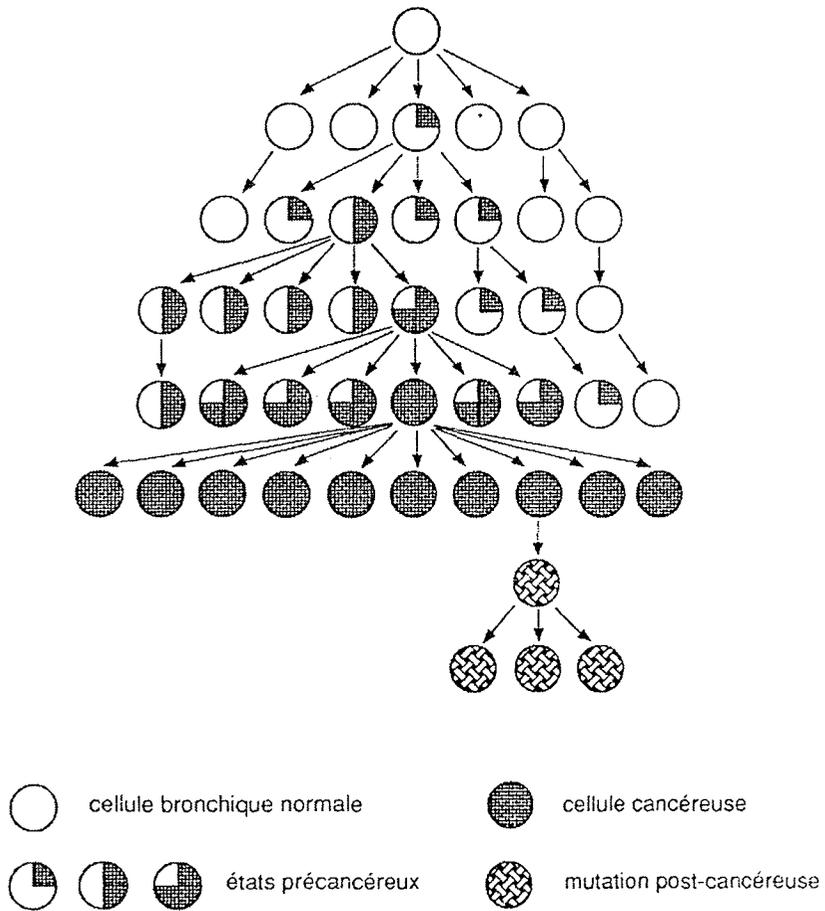
2. Le cancer bronchique, maladie du cycle cellulaire

De nombreux gènes, oncogènes et gènes suppresseurs, sont impliqués dans le cancer bronchique. Ce dernier est considéré comme une maladie avec dérégulation du cycle cellulaire. Classiquement le cycle cellulaire comporte quatre phases : deux phases d'intense activité, la phase de réplication de l'ADN (phase S) et la mitose (phase M), et deux phases « plus calmes », pré-réplivative (phase G₁) et post-réplivative (phase G₂). Un contingent de cellules sort du cycle et entre en phase de repos G₀ (cellules quiescentes). Le point de

Tableau n°3 : Les principaux agents carcinogènes pour le poumon

Arsenic	Nickel
Amiante	Oxyde de fer
Beryllium	Gaz moutarde
Bis (chlorométhyl) éther	Brais et goudrons de houille
Chlorométhyl éther	Suies
Cadmium	Silice cristalline (inhalée sous forme de quartz ou cristobalite)
Chrome	Radiations ionisantes (radon, uranium ...)

Figure n°3 : Principe de la carcinogenèse bronchique avec, après « chaque » mutation, la sélection d'un clone ayant un avantage mitotique (15).



restriction G_1 situé juste avant l'entrée en phase S est un point critique de contrôle de l'entrée de la cellule dans le cycle. Il existe un deuxième point critique G_2 situé juste avant la phase M. Le cycle cellulaire est une horloge qui fait intervenir le jeu des activations /désactivations des couples de cyclines (D, E...)/cyclin-dependent-kinases (cdk) sous le contrôle de protéines régulatrices comme p53, Rb, E2F dont les rôles respectifs seront détaillés au paragraphe II4. En cas de dommage irréparable de l'ADN, la voie de régulation de p53 conduit la cellule à l'apoptose.

3. Le rôle des facteurs de croissance

Des facteurs de croissance tels que le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), l'IGF-I (Insuline-Like Growth Factor I) peuvent favoriser la transmission de signaux de croissance cellulaire notamment par l'intermédiaire des cyclines D1. L'origine autocrine ou paracrine de certains facteurs de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth Factor), le GRF (Gastrin Releasing Factor), ou l'IGF permet aux cellules cancéreuses une autonomisation et une accélération du processus mitotique (16). Le GRF est ainsi fréquemment identifié dans les processus tumoraux de la lignée neuroendocrine.

4. Les gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans le cancer du poumon

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes ubiquitaires qui codent pour des protéines, notamment nucléaires, inhibant la prolifération cellulaire. Certains sont également impliqués dans la régulation de l'apoptose. Ils exercent leur activité sur un mode récessif, c'est à dire qu'il faut que les deux allèles soient non fonctionnels (mutation, délétion ...) pour que « l'effet suppresseur » soit aboli.

4.1. Voie du gène du rétinoblastome (Rb)

Localisé au niveau de la région chromosomique 13q14, le gène Rb est le premier gène suppresseur à avoir été identifié chez des patients porteurs de rétinoblastome, mais on sait désormais qu'il est impliqué dans des processus tumoraux touchant de nombreux autres organes, dont le poumon. Il code pour une phosphoprotéine nucléaire ubiquitaire de 105 à 110 kDa qui contrôle l'arrêt du cycle cellulaire en G₁. La protéine Rb (pRb) sous sa forme non phosphorylée (active) participe au maintien des cellules en phase G₁, alors que la forme phosphorylée (inactive) autorise d'une part le passage de la phase G₁ en S et d'autre part est observée pendant toute les phases S-G₂-M des cellules proliférantes.

Les exons 13-18 et 20-22 du gène Rb sont essentiels pour le maintien de la fonction suppressive de Rb car ils codent pour les zones de liaisons de la pRb à d'autres protéines nucléaires notamment le facteur de transcription E2F (17).

4.1.1. La régulation de la protéine Rb (pRb)

4.1.1.1. La liaison à E2F

La protéine E2F est un facteur de transcription nécessaire au passage de la cellule en phase S. La liaison de E2F à pRb déphosphorylée bloque l'activité transcriptionnelle de E2F et maintient ainsi la cellule en G₁ (au point de restriction G₁). La libération de E2F à l'occasion d'une phosphorylation de pRb va permettre à la cellule de passer de G₁ en phase S.

La perte de la fonction suppressive de Rb peut être la conséquence :

- de la perte ou de la modification de sites critiques de la pRb,
- de la séquestration de la pRb par la protéine MDM2,
- de l'hyperphosphorylation de pRb induite par le couple cycline D₁/cdk.

La protéine E2F va ensuite se fixer sur son site de liaison responsable de l'enclenchement de la réplication (phase S).

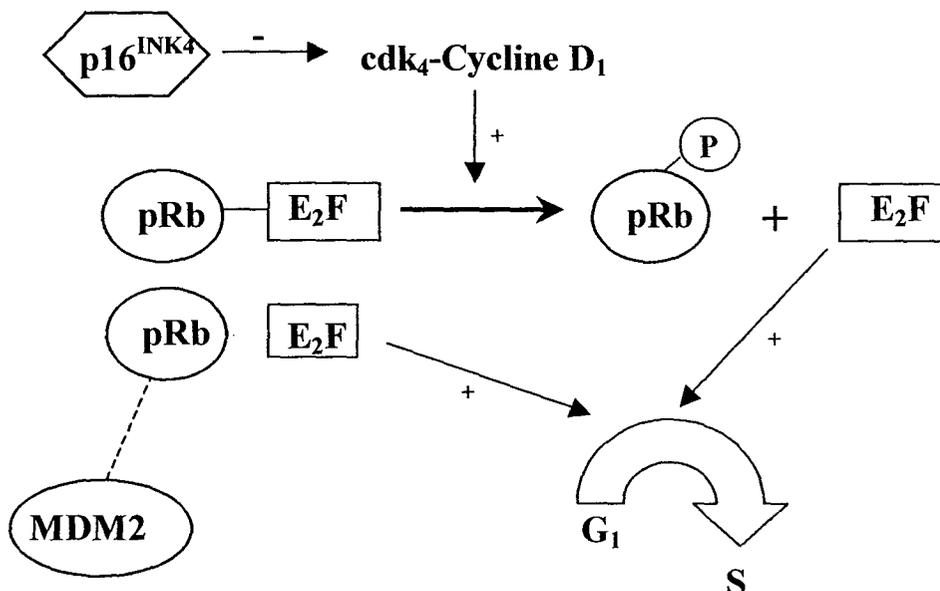
4.1.1.2. Le rôle de la cycline D1

L'augmentation de l'expression de la cycline D₁ à l'occasion d'un événement génétique (mutation, amplification) ou d'une hyperexpression conduit à l'emballement du cycle cellulaire par hyperphosphorylation de pRb. Ce mécanisme intervient dans les cancers bronchiques (18). L'activité de la cycline D₁ est elle-même sous le contrôle négatif d'inhibiteurs des complexes cycline D₁/cdk₄ tels que p15 et p16.

4.1.1.3. Le rôle de p16^{INK4}

Le gène p16^{INK4} code pour un inhibiteur de la cdk₄ qui a un rôle essentiel dans le blocage de la liaison du couple cycline D₁-cdk₄ lui-même déterminant pour l'état de phosphorylation de Rb. Le gène p16^{INK4} est localisé au niveau de la région 9p21, région fréquemment l'objet de délétions dans les cancers du poumon (19). D'autres mécanismes responsables d'altération de la fonction de p16^{INK4} ont été décrits comme des mutations ou des anomalies de la méthylation de son promoteur (20). Le gène p16^{INK4} se comporte comme un gène suppresseur de tumeur et sa dérégulation conduit à une libération de l'activité de la cycline D₁ et de la cascade d'aval conduisant à l'emballement du cycle cellulaire.

Figure n°4 : Le contrôle de l'entrée en phase S par la protéine Rb.



Au même locus que p16^{INK4} se situe un autre gène suppresseur p19^{ARF} qui diffère de p16^{INK4} par son premier exon, les deux gènes partageant les même deuxième et troisième exons. La protéine codée par chacun d'eux s'avère néanmoins différente du fait d'un décalage du cadre de lecture. Le gène p19^{ARF} est également impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en G₁ par son " effet protecteur de p53 " du fait de son aptitude à inhiber MDM2 (voir en II4.2.3.1).

4.1.2. Interfaces de Rb avec d'autres voies de signalisation

Avec p53 : la protéine p21^{Waf1} activée par p53 est un inhibiteur des cdk et donc un inhibiteur de la voie d'activation de la cycline D1. L'activation de p21^{Waf1} par p53 est donc un facteur d'arrêt du cycle cellulaire en G₁ Rb-dépendant.

Avec c-myc : la protéine c-myc est un activateur du passage de G1 en S par son action au niveau des complexes cycline E/cdk2 qui peuvent ensuite induire une phosphorylation de Rb et une libération de E2F (21).

4.1.3. Anomalies de la voie Rb et cancer du poumon

Les anomalies de Rb sont très fréquentes (de 75% à 100% des cas) dans les CBPC et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules, lorsqu'on étudie les délétions alléliques au locus de Rb en 13q14 ou les pertes d'expression de pRb en immunohistochimie (22-24). Dans les CBNPC elles sont moins fréquentes de l'ordre de 15% à 30% (25).

L'hyperexpression de la cycline D₁ est identifiée dans les CBNPC en présence d'une pRb normale dans environ 40% des cas. Elle n'est pas identifiée dans les CBPC qui présentent pour la plupart une absence d'expression de pRb (26).

Les anomalies du gène p16^{INK4} sont présentes dans environ 50% des CBNPC et sont semble-t-il bien corrélées avec une perte de l'expression de la protéine p16 (19,26).

4.2. Le gène p53

4.2.1. Généralités

Le gène p53 a un rôle pivot dans le contrôle de la prolifération cellulaire car d'une part il partage avec Rb la responsabilité du blocage du cycle cellulaire en G1 et d'autre part il induit l'apoptose. Le gène p53 est localisé sur le bras court du chromosome 17 en 17p13 et code pour une phosphoprotéine nucléaire de 53 kd composée de 393 acides aminés dont les anomalies sont parmi les plus fréquentes dans les cancers humains et plus particulièrement dans les cancers du poumon. Initialement identifié dans des cellules transformées par le virus SV40 (27,28) et considéré comme un oncogène, il a été ensuite établi que le gène p53 est en fait un gène suppresseur de tumeur après la démonstration que la protéine p53 normale, dite « sauvage » est capable de corriger le phénotype tumoral induit par une mutation conjointe de *ras* et de p53 (29). Les altérations du gène p53 sont les anomalies génétiques les plus fréquemment retrouvées, dans environ 50% à 60% des cas toutes localisations tumorales confondues (30).

4.2.2. Les anomalies du gène p53

- Les mutations ponctuelles

Les anomalies du gène p53 les plus fréquentes sont les mutations ponctuelles, conduisant au remplacement d'un acide aminé le plus souvent entre les acides aminés situés entre les positions 120 et 300, zone où sont localisés les sites de liaison de p53 et des îlots riches en motifs cytosine-guanine (CG). De très nombreuses mutations ont été décrites qui interviennent au niveau de sites critiques (« hot spots ») pour la fonction de p53 et induisent un changement de conformation de la protéine p53. Dans la plupart des cas la protéine p53 mutante a une demi-vie anormalement longue de plusieurs heures (5 à 10 heures) par rapport à celle de la protéine sauvage (environ 20 minutes), et ainsi se stabilise et s'accumule dans la

cellule. En conséquence seules les protéines " mutées " sont détectables et cela fait de l'immunohistochimie un outil remarquable de détection des anomalies de p53. Il existe néanmoins des restrictions à ce cadre :

- 1) l'existence de stabilisations de protéine p53 en rapport avec d'autres mécanismes comme la liaison à une protéine d'origine exogène, notamment virale (31),
- 2) lors d'une hyperexpression de MDM2 (voir en II4.2.3.1) susceptible d'accélérer la dégradation de p53,
- 3) le fait que certaines mutations conduisent à l'absence complète de transcription de l'allèle muté et donc à un phénotype protéique « nul ».

- Les mutations des lignées germinales.

Elles ont été identifiées chez des patients porteurs d'un syndrome de Li-Fraumeni (32,33) présentant une instabilité génétique des fibroblastes avec une susceptibilité particulière pour la survenue de sarcomes des tissus mous, de cancers mammaires et bronchiques.

- Les délétions alléliques (Loss Of Heterozygosity, LOH):

Une délétion allélique au niveau du locus 17p13 est fréquemment observée dans les cancers bronchiques (34). Les délétions homozygotes de p53 sont rares et résultent en une absence complète de protéine p53.

Dans la majorité des cas où le gène p53 n'est pas fonctionnel on observe une délétion allélique sur un allèle et c'est à l'occasion de la survenue d'une mutation ponctuelle sur le deuxième allèle que la fonction suppressive de p53 est perdue.

4.2.3. La voie de régulation de p53

Le gène p53 est considéré comme un gardien du génome responsable de sa stabilité et de la capacité de réparation des lésions subies par l'ADN. Ainsi après un dommage subi par l'ADN le rôle essentiel de p53 passe par son implication dans deux domaines: le blocage du cycle cellulaire en G₁ permettant aux processus de réparation de l'ADN d'intervenir, ou l'induction de l'apoptose. L'intégrité de la protéine p53 est nécessaire pour la régulation de ces deux processus essentiels. La survenue d'une anomalie de p53 est susceptible de conduire à une dérégulation des deux voies aboutissant à l'entrée des cellules de G₁ en S et au blocage de l'apoptose. Il a été démontré qu'on peut corriger le déficit fonctionnel de p53 par la réintroduction d'un gène p53 normal dans des cellules n'ayant pas de p53 fonctionnelle (35).

4.2.3.1. Le contrôle de l'arrêt du cycle en G1

Le rôle de la protéine p21^{Waf1}:

La protéine p53 sauvage agit principalement au niveau du gène WAF1/CIP1 qui code pour la protéine p21^{Waf1}, impliquée dans la régulation de la phosphorylation de Rb. A l'état de base la protéine p21^{Waf1} est un inhibiteur des complexes cycline D1-cdk4 et cycline E-cdk2, limitant la phosphorylation de Rb et donc l'entrée en phase S (36-38). L'action de p21^{Waf1} passerait également par une deuxième voie en inhibant le facteur PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (39)

MDM2 effecteur du rétrocontrôle de p53 :

A l'état normal p53 induit également la transactivation du gène MDM2, dont le produit de transcription joue un rôle de rétrocontrôle négatif à la transcription de p53 (40) et favorise sa dégradation par le système des ubiquitines. Il a été montré que MDM2 est également capable de se complexer à la protéine Rb, libérant ainsi E2F (41). Ainsi dans des

situations pathologiques la protéine MDM2 serait capable de s'opposer aux rôles suppresseurs de p53 et Rb et jouerait un rôle d'oncogène (figure n°4).

Par ailleurs la survenue de délétions au niveau de la région chromosomique 9p21, outre la défaillance du contrôle des complexes cyclineD₁-cdk4 par p16^{INK4}, peut impliquer une baisse de l'expression de p19^{ARF} qui est un inhibiteur des complexes MDM2-p53. En effet normalement l'action de p19^{ARF} bloque ces derniers dans le noyau (42) et prolonge l'activité de p53 et permet la réparation de l'ADN lésé (43).

p53 contrôle le gène *Gadd45* (growth arrest and dNA damage) impliqué dans les processus d'excision/réparation de l'ADN (44). Le gène *Gadd45* est un inhibiteur du stimulateur de la croissance cellulaire PCNA (45,46).

4.2.3.2. La régulation de l'apoptose.

Le gène p53 sauvage a un rôle proapoptotique en modifiant le niveau transcriptionnel des gènes *Bcl2* et *Bax*. Ainsi p53 :

- inhibe la transcription du facteur anti-apoptotique *Bcl2*
- stimule la transcription du facteur pro-apoptotique *Bax*

La régulation de l'apoptose s'exerce par l'équilibre entre les dimères *Bax/Bax* stimulateurs de l'apoptose et les hétérodimères *Bax/Bcl2* inhibiteurs de l'apoptose. En cas de mutation de p53 l'équilibre s'inverse en faveur des dimères *Bcl2/Bax* antiapoptotiques. Le gène *Bcl2* se comporte comme un oncogène cellulaire et l'expression anormalement élevée de la protéine *Bcl2* inhibe l'apoptose.

Par ailleurs le gène *c-myc* par son action stimulatrice du gène *Bcl2* joue un rôle antiapoptotique qui favorise un échappement au contrôle de la croissance cellulaire par p53 (47).

Tableau n°4 : Principaux gènes contrôlés par p53 impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose

p21 ^{Waf1}	Inhibiteur de cyclin-dependent-kinases
MDM2	Inhibiteur de p53. Participe à une boucle autocrine de régulation de l'activité de p53
Gadd45	Blocage du cycle cellulaire. Rôle dans la réparation de l'ADN
Bax	Inducteur de l'apoptose
IGF BP3	Insulin like Growth factor Binding Protein 3 Inhibiteur du signal mitogénique

4.2.3.3. Fréquence des anomalies de la voie de régulation de p53 et cancer du poumon.

Les anomalies de p53 (détectées par immunohistochimie, séquençage, single strand conformation polymorphism (SSCP), délétion allélique) sont identifiées dans 50 à 60 % des cas de cancer du poumon (tableau n°5) (48) et d'environ 80 % des cas de CBPC. La corrélation entre la détection d'une accumulation de p53 mutée en immunohistochimie et l'existence d'une mutation de p53 est bonne. Néanmoins on estime que environ 15 % des anomalies de p53 ne s'accompagnent pas d'une accumulation de p53 (phénotype protéique nul).

Tableau n°5 : Fréquence des anomalies de p53 détectées en immunohistochimie dans les CBNPC d'après Steels (48) (IHC: immunohistochimie, PCR-SSCP: Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)

Auteur	Technique	Fréquence
Brambilla 1993 (n=95)	IHC	56 %
D'Amico 1999 (n=408)	IHC	43 %
Geradts 1999 (n=103)	IHC	48 %
Kondo 1996 (n=23)	PCR-SSCP	56 %
Mac Laren 1993 (n=120)	IHC	55 %
Mitsudomi 1993 (n=58)	PCR-SSCP	41 %
Moldvay 1998 (n=83)	IHC	55 %
Ohsaki 1996 (n=99)	IHC	44 %
Pastorino 1997 (n=515)	IHC	43 %
Tomizawa 1999 (n=108)	PCR-SSCP	41 %

Les anomalies de MDM2 sont plus rares dans les cancers du poumon. L'amplification ou l'hyperexpression de MDM2 identifiées dans 15 à 30 % des cancers du poumon conduiraient à une dégradation accélérée de la protéine p53 sauvage. Pour les tumeurs présentant une mutation de MDM2 et par conséquent une dérégulation de p53 la conséquence n'est pas formellement établi : rôle de contrôle négatif ou additionnel ? (49).

Les anomalies de p19^{ARF} seraient plus fréquentes dans les tumeurs de la lignée neuroendocrine, 75% des cas versus 25% dans les CBNPC (50).

Les anomalies de Bcl2 sont particulièrement liées aux tumeurs neuroendocrines. Dans les CBPC la protéine Bcl2 est hyperexprimée dans environ 90 % des cas contre environ 25 %

dans les CBNPC. Dans les tumeurs carcinoïdes le rapport entre *Bcl2* et *Bax* est inversé avec un niveau d'expression de supérieur *Bax*. Ainsi la liaison entre l'activité proapoptotique de p53 et l'expression respective de *Bcl2* et *Bax* sont particulièrement évidentes et démonstratives dans les processus tumoraux de la lignée neuroendocrine (51).

4.2.3.4. Carcinogènes du tabac et p53

Il a été démontré que la formation d'adduits de benzo-(a)-pyrène au niveau des guanines de l'ADN se fait particulièrement au niveau de certains codons du gène p53 en positions 157, 248 et 273 correspondant à des zones sensibles ("hot spots") pour les cancers bronchiques. La mutation du codon 157 est plus spécifique du Benzo(a)pyrène (52,53). En fait ces sites sont particulièrement sensibles aux dérivés aromatiques, et les niveaux d'adduits sur les codons seraient fonction du type de composé aromatique (54). Les mutations du gène p53 observées dans les cancers du poumon sont préférentiellement des transversions de type G→T de même type que les anomalies qu'on peut reproduire expérimentalement lors de l'exposition de cellules humaines au benzo(a)pyrène.

4.3. Autres gènes suppresseurs possiblement impliqués.

La très haute fréquence des délétions alléliques sur des loci particulièrement associés aux cancers du poumon suggère le rôle de nombreux autres gènes suppresseurs défectueux dans cette pathologie. Le processus d'inactivation d'un gène suppresseur fait en effet intervenir le plus souvent la délétion d'un allèle et une mutation sur l'autre allèle. La délétion biallélique « homozygote » est un mécanisme plus rare. Des perturbations de la méthylation semblent être fréquemment impliqués dans l'inactivation des gènes suppresseurs .

Il existe vraisemblablement d'autres gènes impliqués, notamment p73 un gène voisin de p53, qui aurait un rôle de gène suppresseur également (55).

5. Les proto-oncogènes et oncogènes impliqués dans le cancer du poumon

Les pro-oncogènes sont des gènes normaux impliqués dans les fonctions cellulaires de base de la cellule, en particulier dans les mécanismes de régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire. Leurs séquences sont particulièrement conservées au cours de l'évolution phylogénétique car elles sont retrouvées (parfois peu modifiées) des vertébrés jusqu'aux levures. Les proto-oncogènes codent pour des protéines variées intervenant dans la transmission des signaux induisant la division cellulaire : des facteurs de croissance, de division cellulaire (gènes *ras*), des protéines nucléaires contrôlant la transcription et /ou la régulation du cycle cellulaire (gène *myc*)... La survenue d'une anomalie dans un site critique du gène ou d'une modification de son niveau d'expression va conférer à ce gène un pouvoir oncogène (d'où leur nom) impliqué dans la transformation cellulaire maligne. Les anomalies génétiques les plus fréquentes concernant les proto-oncogènes sont : des mutations ponctuelles, des translocations, des amplifications. Ce sont des gènes dits dominants car il suffit de la modification de l'un des deux allèles pour induire l'acquisition du pouvoir transformant et l'accélération de la croissance cellulaire. Nous aborderons les principaux oncogènes impliqués dans les cancers du poumon.

5.1. Les récepteurs de type tyrosine-kinase

Deux proto-oncogènes de ce type codent pour des récepteurs de facteurs de croissance impliqués dans les CBNPC : *c-erb-B1* et *c-erb-B2*.

Le plus anciennement connu est *c-erb-B1* qui code pour le récepteur de l'Epithelial Growth Factor (R-EGF) dont les ligands sont l'EGF et le Transforming Growth Factor α (TGF α). On a identifié secondairement *c-erb-B2* qui est l'homologue chez l'homme de *Neu* mis en évidence sur un neuroblastome murin induit par l'éthyl-nitroso-urée, et qui code une protéine baptisée p185 en raison de son poids moléculaire de 185 kd (chez la souris). Lors du

processus d'activation des différents récepteurs on assiste à une dimérisation des sous unités codées par la famille *c-erb* (1 à 4) en homodimères ou en hétérodimères.

5.1.1. Le récepteur de l'EGF

Le R-EGF possède une partie extracellulaire sur laquelle se fixent ses ligands l'EGF et le TGF- α , et une partie intracellulaire dotée d'une activité tyrosine kinase à son extrémité carboxyterminale. La fixation du ligand est responsable d'une dimérisation avec autophosphorylation de la région intracellulaire et d'une phosphorylation en cascade des protéines kinases (MAP kinases) responsables de la transmission du message mitotique à des facteurs de transmission nucléaires (*c-jun* et *c-myc*).

En immunohistochimie on a identifié une hyperexpression du R-EGF dans 80% des CBNPC par rapport aux cellules bronchiques normales, alors qu'il n'est pas détectable dans les CBPC (56,57). Cette hyperexpression de la protéine correspond le plus souvent à une hyperexpression du gène et non pas à une amplification ni à une mutation (7).

5.1.2. Le gène *c-erb-B2*

L'homologie de p185 codée par *c-erb-B2* avec l'EGF est d'environ 50% (58). C'est dans les CBNPC que l'hyperexpression de *c-erb-B2* est le plus souvent rencontrée, particulièrement dans les adénocarcinomes (59,60). En effet 20 à 30% de ces derniers présentent une hyperexpression de p185 (60,61).

5.2. Les oncogènes *myc*

5.2.1. Les caractéristiques de base.

Ce sont des gènes qui exercent leur action selon un caractère dominant. La famille *myc* comprend plusieurs oncogènes : *c-myc*, *L-myc* et *N-myc* qui codent pour des

phosphoprotéines nucléaires dont les différents domaines assurent des fonctions de facteur de transcription. La partie N-terminale de la protéine *myc* est un domaine de transactivation et intervient dans les interactions avec la protéine Rb. La partie C-terminale comporte des motifs « hélice-boucle-hélice » et « fermeture éclair à leucine » qui interviennent dans les liaisons avec l'ADN ce qui est typique des facteurs de transcription. Les mécanismes d'activation de *myc* sont principalement liés à une amplification ou à une hyperexpression. D'autres mécanismes existent tels que la translocation du gène *myc* en aval du promoteur d'un autre gène actif (lymphome de Burkitt) ou une mutation au niveau de son promoteur (62).

5.2.2. Le rôle de *c-myc* dans la prolifération cellulaire

La fonction de *c-myc* est placée à un carrefour essentiel dans la régulation des processus :

- de prolifération cellulaire : l'induction de *c-myc* est suffisante pour l'entrée et le maintien dans le cycle cellulaire de cellules quiescentes,
- de différenciation cellulaire terminale : *c-myc* inhibe celle-ci en bloquant l'entrée des cellules dans une prédifférenciation G0/G1 ; le TGF- β est capable d'inhiber *c-myc* et de favoriser ainsi la différenciation terminale,
- d'activation du gène *Bcl2*, et ainsi d'inhiber l'apoptose.

Ainsi *c-myc* se trouve impliqué, à la fois dans l'induction de la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose.

5.2.3. Les oncogènes *myc* dans les cancers du poumon

Les gènes de la famille *myc* sont globalement amplifiés dans environ 15 à 20 % des cancers du poumon, *c-myc* dans tous types de cancer du poumon, et *L-myc* et *N-myc*

exclusivement dans les tumeurs à différenciation neuroendocrine dans environ 10 à 30 % des cas (63-65).

5.3. Les gènes *ras*

5.3.1. Caractères généraux des gènes *ras*

Les gènes *ras*, identifiés initialement dans un sarcome murin (rat sarcoma) sont au nombre de trois : *K-ras*, *H-ras* (découverts par Kirstein et Harvey) et *N-ras* (identifié sur un neuroblastome), et codent pour des protéines de poids moléculaire de 21 kDa comportant de 188 à 189 acides aminés. Les protéines p21-*ras* se fixent à la membrane interne des cellules par leur extrémité carboxyterminale. Les gènes *ras* sont présents de façon ubiquitaire chez les eucaryotes depuis les levures jusqu'aux mammifères avec une excellente homologie des séquences pour les deux premiers exons. Cela traduit un rôle primordial dans les processus de transduction des signaux de prolifération pour la plupart des cellules, ainsi que de transduction des signaux de différenciation pour certains types cellulaires (66).

Lorsqu'une mutation affecte un gène *ras*, il se comporte comme un oncogène dominant, la mutation d'un seul des deux allèles donnant un avantage mitotique à la cellule mutée.

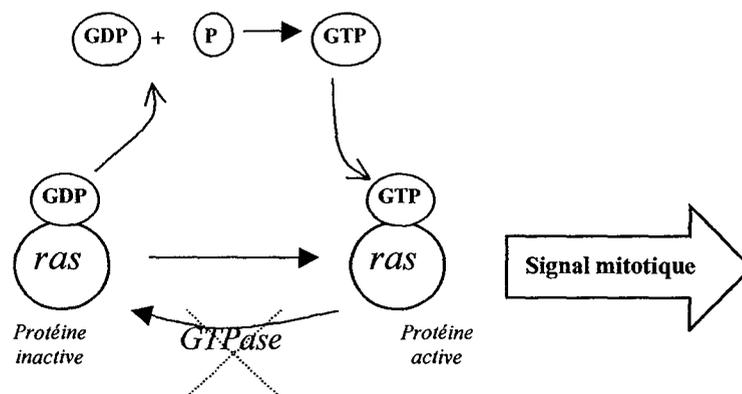
La survenue de mutations ponctuelles du gène représente le type d'anomalie le plus fréquent. Lorsqu'une mutation affecte un codon critique du proto-oncogène *ras*, il devient un oncogène.

5.3.2. L'activation des protéines *ras*

Les protéines p21-*ras* font partie de la famille des protéines-G liant les groupements guanine-diphosphate (GDP) et guanine-triphosphate (GTP). Les protéines cytoplasmiques p21-*ras* sont toutes liées soit au GDP qui correspond à la forme inactive de la protéine, soit au

GTP qui correspond à la forme active et interagit en aval pour transmettre le signal d'origine extracellulaire pour la transduction de signaux de croissance ou de différenciation cellulaire. A l'état normal il existe un équilibre entre les formes active et inactive des protéines p21-*ras*, l'activation se faisant en échangeant du GDP avec du GTP présent dans le cytoplasme. L'inactivation se produit par hydrolyse du GTP en GDP grâce à une activité GTPasique intrinsèque de p21-*ras* qui est ainsi capable d'autoréguler son activité. Dans les adénocarcinomes bronchiques, lorsqu'une mutation ponctuelle du gène K-*ras* est survenue sur un des codons critiques (12, 13 ou 61) correspondant aux sites de fixation des résidus GDP/GTP sur la protéine p21-*ras*, la conformation de cette dernière est modifiée et induit une diminution de l'activité GTPasique intrinsèque. L'accumulation résultante de la protéine p21-*ras* active conduit au maintien d'un signal mitotique anormalement élevé en aval (67,68).

Figure n°5 : Régulation et activité anormale de la protéine ras mutée



5.3.3. Le rôle de p21-*ras* dans la transduction des signaux extracellulaires

On connaît des signaux extracellulaires capables d'induire l'activation de p21-*ras* : par l'intermédiaire d'ERKs (Extracellular Regulated Kinases), de facteurs de croissance tels que

l'insuline, l'EGF et le Platelet Derived Growth Factor (PDGF). En aval l'activation de p21-*ras* conduit à l'induction de facteurs de transcriptions comme *c-fos*, *c-jun* et *c-myc*.

La régulation de l'activité de p21-*ras* est modulée par plusieurs mécanismes :

- l'activité GTPasique intrinsèque qui peut être déficiente en cas de mutation ponctuelle du gène *ras* sur un codon critique,
- les protéines GAP (GTPase Activating Protein) qui sont capables de potentialiser l'activité GTPasique intrinsèque,
- des protéines d'acylation de *ras* qui interagissent à l'extrémité carboxyterminale, zone indispensable pour l'ancrage de la p21-*ras* à la membrane cellulaire,
- l'intervention d'une protéine homologue Rap1-p21 qui joue un rôle d'analogue de p21-*ras* et bloque son activité.

5.3.4. Mutations de *ras* et cancers

L'hyperexpression de *ras* a été décrite avec une fréquence très élevée pour certains auteurs, voisine de 70 % pour des tumeurs étudiées en immunohistochimie (69,70).

Les mutations des gènes *ras* sont d'une fréquence très variée dans les cancers humains, particulièrement dans les cancers du pancréas (95 %), du colon (50 %), du poumon (30 % dans les adénocarcinomes) et dans une moindre mesure dans les cancers de la thyroïde et les myélodysplasies. Les mutations de H-*ras* sont retrouvées dans les cancers de la thyroïde et les carcinomes cutanés spinocellulaires (30 %) ; celles de N-*ras* dans les leucémies aiguës myéloblastiques, les myélodysplasie (30 %) et les mélanomes malins.

5.3.5. Mutations de K-*ras* et adénocarcinome bronchique

Les travaux publiés ont identifié une fréquence de mutations du gène K-*ras* de 15 à 30 % dans les adénocarcinomes bronchiques primitifs (71-73). Ces mutations de K-*ras* sont rares

dans les autres types de CBNPC et absentes dans les processus tumoraux de la lignée neuroendocrine. Les mutations de *K-ras* surviennent fréquemment au niveau des codons 12, 13 et 61 et en fait dans l'immense majorité des cas au niveau du codon 12 (74).

5.3.6. L'influence du type de carcinogène

L'incidence des mutations de *K-ras* dans les adénocarcinomes bronchiques serait variable en fonction du tabagisme : 5 % dans les tumeurs de non fumeurs et 30 % dans les tumeurs de fumeurs (75). L'exposition aux carcinogènes de la fumée de tabac, benzo(a)pyrène et nitrosamines notamment, serait responsable comme pour p53 de mutations de type transversion G→T (76). L'exposition aux radiations ionisantes pourrait également induire des mutations de *ras*. L'implication préférentielle d'un des trois différents gènes *ras* et le type de mutation (transversion GT, GA ...) seraient ainsi vraisemblablement liées aux types de carcinogènes en cause plutôt qu'à des différences d'ordre ethnique comme certains l'ont suggéré initialement pour expliquer la prépondérance des anomalies de *K-ras* en Europe occidentale et de *N-ras* et de *H-ras* en Asie.

L'influence pronostique de l'existence de mutations de *K-ras* qui a été décrite par certains auteurs sera développée au chapitre III.

6. Les anomalies de la méthylation de l'ADN

6.1. La méthylation, élément de la régulation épigénétique

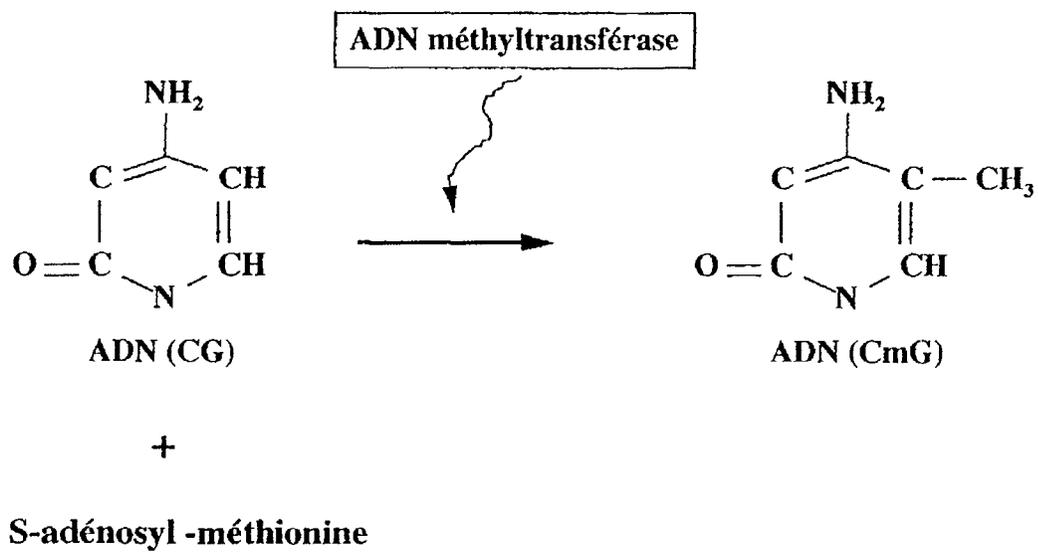
L'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement des cellules de l'organisme est contenu dans l'ADN. Toutes les cellules ont une origine commune et le même matériel génétique, mais l'expression de l'ADN et la fonction qui s'y rattache sont variables selon les différents types cellulaires qui composent les 800 tissus de l'organisme. Les mécanismes moléculaires du développement et de la différenciation cellulaires sont

encore insuffisamment compris mais il est clair qu'il résulte d'interactions complexes et coordonnées entre l'ADN et un certain nombre de protéines. Ainsi l'information génétique contenue dans l'ADN, matérialisée par la succession des quatre bases adénine (A), thymine (B), cytosine (C) et guanine (G), peut être traduite ou maintenue silencieuse en fonction de processus complexes. Parmi ces mécanismes, la fixation de groupements méthyles (-CH₃) sur certaines cytosines participe à la régulation de l'expression de gènes essentiels impliqués : dans les fonctions de base de la cellule (gènes de ménage), dans le développement des cancers, dans la transmission des caractères hérités (gènes d'empreinte) et peut-être dans les mécanismes d'adaptation des espèces à leur environnement (caractères acquis) (77).

Dans les cellules eucaryotes, les groupements -CH₃ se fixent sur les cytosines presque toujours au niveau de motifs CG ou CpG (p soulignant le squelette phosphate/pentose qui relie les bases). La méthylation concerne 70 % à 80 % des séquences CG, alors que seulement 2 à 7 % des cytosines de l'ADN animal sont méthylés. La méthylation intervient après la réplication de l'ADN grâce à l'intervention d'une ADN méthylase qui catalyse le transfert d'un groupement -CH₃ à partir d'une molécule donneuse appelée S-adénosyl-méthionine (SAM).

Dans l'ADN normal la majorité des séquences CG non méthylées sont regroupées dans des régions riches en CG appelées îlots CpG (CpG islands) alors que la majorité des séquences CG méthylées sont dispersées dans le génome. Les îlots CpG ont une longueur d'environ 1 kb et se situent presque toujours à proximité de séquences codantes. On estime qu'il existe environ 45000 îlots CpG dans un génome haploïde humain.

Figure n° 6 : Méthylation de l'ADN par l'intervention d'une ADN méthylase



6.2. Evolution de la méthylation

6.2.1. Lors de la réplication de l'ADN : la méthylation de maintenance

La transmission du profil de méthylation aux cellules filles lors de la mitose intervient après l'étape de la réplication elle-même. Après la séparation des deux brins d'ADN méthylés et la synthèse de deux brins homologues néoformés sous l'influence de l'ADN polymérase, on obtient deux nouveaux sites dits hémiméthylés où un seul des deux brins est méthylé. L'intervention d'une ADN méthylase au niveau de l'ADN hémiméthylé conduit à deux duplex méthylés. Il a été montré *in vitro* que la méthylation du deuxième brin n'intervient que si le premier brin l'est, ce qui signifie que l'enzyme ne reconnaît que les sites hémiméthylés. Il s'agit de la méthylation de maintenance qui est illustrée par la figure n°7.

6.2.2. Notion de méthylation de novo

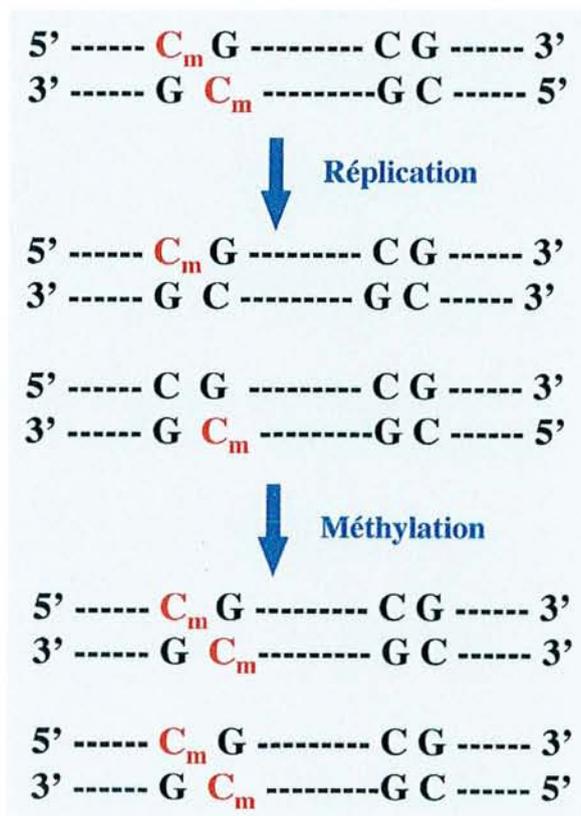
La méthylation de maintenance est un mécanisme assuré par l'ADN méthyltransférase de type 1 codé par le gène *Dnmt1* d'abord identifié chez la souris. On supposait l'existence probable d'autres méthylases du fait de la persistance d'une activité de méthylation dans des cellules embryonnaires mutantes pour le gène *Dnmt1*. Il a été confirmé qu'il existe différents types de méthylases codées par les gènes *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, dont certaines sont capables en plus d'induire une méthylation de novo comme *Dnmt3a* et *Dnmt3b* (78). Il existe vraisemblablement une coordination de l'action de ces différents enzymes notamment au décours du développement (79).

6.2.3. La méthylation de l'ADN au cours de l'embryogenèse

6.2.3.1. Coordination des processus de déméthylation/reméthylation de novo

Après la fécondation, il existe une étape de déméthylation globale de l'ADN qui efface en partie les profils de méthylation parentaux vraisemblablement du fait de l'intervention

Figure n°7 : La méthylation de maintenance : après la réplication les deux brins néoformés vont être méthylés en reproduisant le profil de l'ADN d'origine.



d'une méthylase (80) mais cela pourrait également être la conséquence de l'absence de méthylation de maintenance au décours des divisions cellulaires successives. Par la suite, en fonction des différents types cellulaires, des groupements méthyls seront transférés sur l'ADN par l'intermédiaire d'ADN méthyltransférases dans un processus de méthylation de novo. Une fois le schéma de méthylation établi, il sera fidèlement reproduit par le processus de méthylation de maintenance dans les cellules filles (81).

6.2.3.2. La méthylation est impliquée dans l'empreinte parentale.

La grande majorité de nos gènes s'exprime à partir des deux allèles, mais il existe un certain nombre de gènes qui s'expriment de façon monoallélique soit à partir de l'allèle paternel soit à partir de l'allèle féminin : on parle de Gènes Soumis à l'Empreinte parentale GSE (Imprinting genes des anglosaxons), dont le nombre est évalué à environ 100 à 200 d'après les données recueillies chez la souris (77, 82). Par exemple l'allèle codant pour l'insulin like growth factor II (IGF II) est exprimé par l'allèle paternel et non exprimé par l'allèle maternel. Il semble que cela soit déterminé par les caractères respectivement non méthylé et méthylé des allèles paternel et maternel. Lors de la gamétogenèse il va y avoir ainsi un jeu subtil de déméthylations et de méthylations de novo qui va pérenniser cet état en fonction de l'origine des deux allèles. De ce fait le risque de survenue d'un diabète ou d'une obésité pourrait être lié à des modifications épigénétiques de l'ADN liées à l'empreinte parentale (77).

6.2.3.3. Expression variable d'un gène et statut de méthylation

Le niveau d'expression d'un gène pourrait être lié au degré de méthylation d'une séquence génétique, voire à la répartition en mosaïque dans différentes cellules de formes

méthylées et non méthyles d'un même gène (83). Des facteurs environnementaux seraient susceptibles d'induire des modifications de la méthylation de l'ADN.

6.3. La méthylation de l'ADN est un indicateur de la fonction des gènes.

6.3.1. Relation entre méthylation et activité d'un gène.

L'examen de l'état de méthylation des gènes résidents et les effets observés de l'introduction d'ADN méthylé ou non méthylé dans des cellules hôtes montrent qu'en général un gène méthylé est un gène inactif et qu'au contraire un gène non méthylé est actif. Ainsi la méthylation de l'ADN apparaît comme un marqueur du silence des gènes. En fait l'absence de groupement méthyl est plutôt associée à la possibilité pour un gène d'être transcrit qu'au processus de transcription lui-même. Le niveau de méthylation pourrait ainsi faire partie d'un changement de conformation de l'ADN nécessaire au déroulement de la transcription sur des sites critiques de la chaîne d'ADN, sur des gènes ou des promoteurs de gènes.

Les îlots CpG, le plus souvent non méthylés dans le génome humain, correspondent au voisinage ou à la localisation de gènes. Ainsi la recherche d'îlots riches en CpG permet d'identifier la localisation probable de gènes actifs. La moitié des îlots CpG correspond à des gènes de ménage et l'autre moitié se situe au niveau des promoteurs de gènes régulés de façon tissu-spécifique.

6.3.2. Les mécanismes de répression de gènes méthylés.

La méthylation d'un îlot CpG au niveau d'un promoteur empêche l'expression du gène en aval. Cette répression est médiée par la fixation de protéines MECP-1 ou MECP-2 sur les groupements méthyls. Ces deux protéines capables d'inhiber la transcription ont besoin de radicaux méthyls pour se fixer sur l'ADN. MECP-1 a besoin de plusieurs radicaux méthylés tandis qu'il suffit à MECP-2 d'un seul radical méthyl.

6.4. Méthylation de l'ADN et cancers.

6.4.1. Mécanismes de l'influence de la méthylation de l'ADN sur la carcinogénèse.

6.4.1.1. Inhibition de la fonction des gènes suppresseurs de tumeur.

L'ADN des cellules tumorales est globalement hypométhylé alors que paradoxalement il existe souvent un état d'hyperméthylation des îlots CpG. Cette situation est en quelque sorte l'opposée de l'état de méthylation de l'ADN des cellules normales qui est globalement plus méthylé et plutôt hypométhylé au niveau des îlots CpG.

La conséquence possible de l'état d'hyperméthylation des îlots CpG dans les cellules néoplasiques est l'inactivation de promoteurs de gènes suppresseurs qui contribue ainsi à l'emballement du cycle cellulaire et du processus de transformation néoplasique.

6.4.1.2. Les mutations ponctuelles de l'ADN.

La conséquence d'une hyperméthylation peut être la survenue de mutations ponctuelles de l'ADN lorsque se produit une déamination d'une cytosine méthylée conduisant à son remplacement par une thymine. Sur l'allèle correspondant c'est une adénine qui remplacera une guanine. Ainsi le gène suppresseur de tumeur p53, en dehors des phénomènes d'inactivation possibles liés à une hyperméthylation de son promoteur, peut également faire l'objet de mutations ponctuelles survenant au niveau de motifs CG méthylés. Il est intéressant de noter qu'elles surviennent préférentiellement au niveau de certains codons "sensibles". La raison de la fréquence anormalement élevée de mutations à ce niveau serait que les sites CG méthylés auraient une grande affinité pour de nombreux agents agressifs tel que le benzo(a)pyrène. Le type de mutation (transversions C ->T, G ->A...) dépend du type de l'agent agresseur et du tissu concerné (poumon, colon...) (84).

6.4.1.3. Le rôle de l'ADN méthyltransférase.

Le processus de survenue de mutations ponctuelles peut être également accéléré par une augmentation de l'expression de l'ADN méthyltransférase (ADNmt) rencontrée à un stade précoce de la transformation cellulaire néoplasique qui augmente le taux de mutations des motifs CG méthylés de l'ordre de 10 à 40 fois la normale et plus pour certains (85). Le rôle de l'ADNmt murine dans la transformation carcinomateuse a été démontré *in vitro* avec l'induction de la transformation de cellules NIH 3T3 secondaire à sa surexpression, et *in vivo* avec l'observation de la diminution de la survenue de tumeurs coliques chez des souris transgéniques dépourvues du gène de l'ADNmt.

6.4.1.4. Hypométhylation globale et transformation néoplasique .

L'hypométhylation globale de l'ADN est semble-t-il associée à un risque majeur de cassures et de délétions de l'ADN susceptibles de jouer un rôle dans la transformation cellulaire néoplasique (86). Expérimentalement on peut induire chez le rat un état d'hypométhylation globale par un régime profondément déficitaire en radicaux méthyles et déplétion du pool disponible de S-adénosylméthionine. On observe alors dans les cellules hépatiques une augmentation de l'expression des ARN messagers de certains oncogènes comme *c-myc*, *c-fos* et *H-ras*. Cette situation est également retrouvée dans les hépatomes induits par des régimes prolongés déficients en radicaux méthyles dans lesquels on observe une augmentation de l'expression de l'ARNm de *Ha-ras* et de *Ki-ras* (87). Les modifications de l'expression de ces oncogènes en relation avec une hypométhylation de l'ADN semblent intervenir précocément dans le processus de transformation cellulaire, et sont réversibles lors du retour à des apports normaux en résidus -CH₃.

6.4.2. Méthylation de l'ADN et tumeurs solides.

Des anomalies de la méthylation de l'ADN ont été décrites dans un certain nombre de tumeurs solides au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs tels que Rb, p53, VHL (gène Von Hippel-Lindau), p16^{INK4} ou RAR β (Retinoic Acid Receptor beta). Le plus souvent il s'agit d'une hyperméthylation du promoteur du gène qui peut intéresser également la portion 5' de la région codante du gène. L'hyperméthylation n'est pas un mécanisme isolé mais peut intervenir en conjonction avec d'autres mécanismes tels que la perte d'allèle, des mutations ponctuelles. Enfin pour p53, la méthylation du gène faciliterait la constitution de mutations ponctuelles dans les zones critiques sous l'effet de certains carcinogènes (tabac).

- Dans les carcinomes rénaux à cellules claires le gène VHL serait hyperméthylé dans 19 % des cas (88) libérant ainsi l'activité du facteur de transcription HIF (Hypoxia inducible Factor). HIF induit la synthèse de TGF α (transforming growth factor α) qui stimule la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de son récepteur R-EGF, et par ailleurs induit la synthèse de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) stimulateur de la néoangiogenèse (89). Cette situation est particulièrement intéressante car la défaillance d'un seul gène conduit conjointement à l'emballement du processus tumoral et à la mise en œuvre des moyens visant à assurer l'apport nutritionnel de la tumeur.

- Dans les cancers colo-rectaux, des élévations variables de l'expression de l'ADNmt ont été décrits, qui participent vraisemblablement aux processus de dérégulation de la croissance cellulaire (90). Des anomalies de la méthylation de gènes suppresseurs tels que p16 (91) ou RAR β (92) ont été décrits dans les cancers du colon.

- Dans les cancers du sein, des hyperméthylations de différents gènes suppresseurs ont été décrits comme l'inhibiteur de l'E-cadhérine (93), le récepteur aux oestrogènes (94), p16 (95), BRCA1 (96) ou RAR β (97-99)

- Dans les cancers du poumon, l'hyperméthylation de p16^{INK4} serait fréquente (100) plus ou moins associée à des pertes alléliques de la région 9p21 sur laquelle est localisé le gène (101). Plus récemment des anomalies de l'expression de la protéine RAR β associées à des pertes alléliques sur le gène correspondant ont été décrites (102) mais le défaut d'expression de RAR β pourrait être également la conséquence d'anomalies de la méthylation du promoteur du gène RAR β (103).

7. Anomalies géniques dans les lésions préneoplasiques

Le cancer bronchique invasif est le résultat de l'accumulation séquentielle d'anomalies génétiques permettant au clone tumoral progressivement sélectionné de se développer en marge des processus de régulation physiologiques homéostasiques. La séquence temporelle des événements successifs n'est pas clairement définie, mais à partir des connaissances acquises sur les tumeurs invasives, des corrélations sont établies entre les modifications morphologiques de l'épithélium respiratoire et un certain nombre d'altérations géniques (9,104). La diversité des populations cellulaires de l'épithélium respiratoire, mais aussi la variété de la nature et de l'intensité des expositions aux agents carcinogènes, expliquent la complexité des événements génétiques et des modifications morphologiques observées. Le caractère diffus des lésions nous amène à la notion de champ de cancérisation, d'autant plus difficile à explorer que la taille des lésions néoplasiques est limitée, invisible à l'œil nu, et que l'endoscopie bronchique n'explore que les bronches proximales. La recherche des anomalies géniques aux stades précoces de la transformation néoplasique par l'étude en autofluorescence

de la muqueuse respiratoire des sujets à risque répond à ce besoin de repousser les limites actuelles du diagnostic clinique. Certains ont également recherché la présence d'anomalies génétiques sur les cellules recueillies dans les produits d'expectoration, d'aspiration bronchique (105-107). Nous avons recueilli les principales données de la littérature concernant les anomalies génétiques identifiées dans les états précancéreux de la muqueuse respiratoire susceptibles d'être utilisées comme outils pour un diagnostic plus précoce.

7.1. Le gène supresseur p53

La plupart des mutations du gène p53 entraînent une stabilisation de la protéine qui s'accumule et devient détectable en immunohistochimie. La protéine p53 est identifiée dans 7% des métaplasies malpighiennes, 25% des dysplasies légères, 70% des dysplasies sévères et CIS, 76% des carcinomes invasifs (9) et 0% dans les muqueuses normales (108). La présence de mutations de p53 a été également identifiée chez des patients fumeurs sans cancer bronchique (105). Le gène p53 est donc impliqué précocement dans le processus de cancérisation.

7.2. Les gènes impliqués directement dans le contrôle du passage G1/S : Rb, p16 et cycline D1

L'altération du gène Rb traduite par une perte d'expression de sa protéine, n'est pas identifiée dans les lésions préinvasives et reste l'apanage des cancers invasifs de type CBPC. Par contre 20% des lésions préinvasives de haut grade (dysplasie sévère et CIS) n'expriment plus la protéine p16. En outre l'expression des cyclines D1 et E serait également augmentée dans les lésions invasives de haut grade permettant le franchissement du point G1 par activation de la phosphorylation de Rb (18, 109).

7.3. Le couple *c-erb-B2/R-EGF*

L'expression de R-EGF et de *c-erb-B2* est augmentée dans la muqueuse d'apparence normale à proximité de lésions cancéreuses du poumon (110), et pour R-EGF jusque dans 48% des lésions précancéreuses identifiées à proximité d'un cancer invasif (57). Ces données sont en faveur d'un rôle précoce dans le mécanisme d'emballement du cycle cellulaire.

7.4. L'oncogène *c-myc*

L'hyperexpression de *c-myc* participe au mécanisme d'emballement du cycle cellulaire dans les CBPC et dans une moindre mesure des CBNPC. Une hyperexpression de ce gène a été identifiée dans ces lésions préneoplasiques à proximité de lésions invasives (111).

7.5. L'oncogène *K-ras*

Classiquement les mutations de *K-ras* sont identifiées au stade d'adénocarcinome invasif mais sont absentes des lésions préinvasives. Des mutations ont rarement été identifiées dans des hyperplasies adénomateuses atypiques identifiées chez des patients porteurs d'adénocarcinomes (112). Cependant, on a récemment identifié des mutations du gène *K-ras* dans des tissus pulmonaires histologiquement normaux chez des patients d'adénocarcinomes bronchiques, dont la plupart étaient du même type sur le tissu sain et la tumeur (113). Cette observation tendrait à plaider pour une survenue plus précoce des mutations de *K-ras* que cela n'est habituellement admis.

7.6. Le gène *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*)

Le gène *FHIT* serait un gène suppresseur (114,115) impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et avec également un rôle proapoptotique (116). Son implication serait précoce dans le processus de cancérisation. Des pertes alléliques seraient plus fréquentes chez les gros

fumeurs (117). La perte d'expression de FHIT est progressive de la métaplasie jusqu'au CIS (104). Au moins une anomalie de la fonction de p53 ou de FHIT est identifiée dans 83% des stades précoces de CBNPC (118).

7.7. L'instabilité génique

L'aneuploïdie est un marqueur tardif établi au stade de cancer invasif. L'étude de microsatellites, séquences répétées de nucléotides réparties sur le génome, permet de mettre en évidence des délétions alléliques, ou pertes d'hétérozygotie (LOH : Loss Of Heterozygoty), souvent localisées au niveau de gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans le cancer bronchique (119). Dans les lésions précancéreuses, des délétions alléliques sont précocement identifiées en 3p, 9p et 17p (120,121). Des anomalies similaires ont été identifiées sur la muqueuse de sujets fumeurs ou anciens fumeurs indemnes de cancer (122,123).

Tableau n°6 : Localisation des principaux gènes dont les délétions alléliques semblent impliquées dans la carcinogenèse bronchique (d'après Brambilla et al 1996) (7)

Zones de pertes alléliques	Gènes impliqués
3p14.2	FHIT
3p24.2	RAR β
9p.21	p16 ^{INK4}
13q	Rb
17p	p53
5q, 6p, 6q, 8p, 8q,..	?

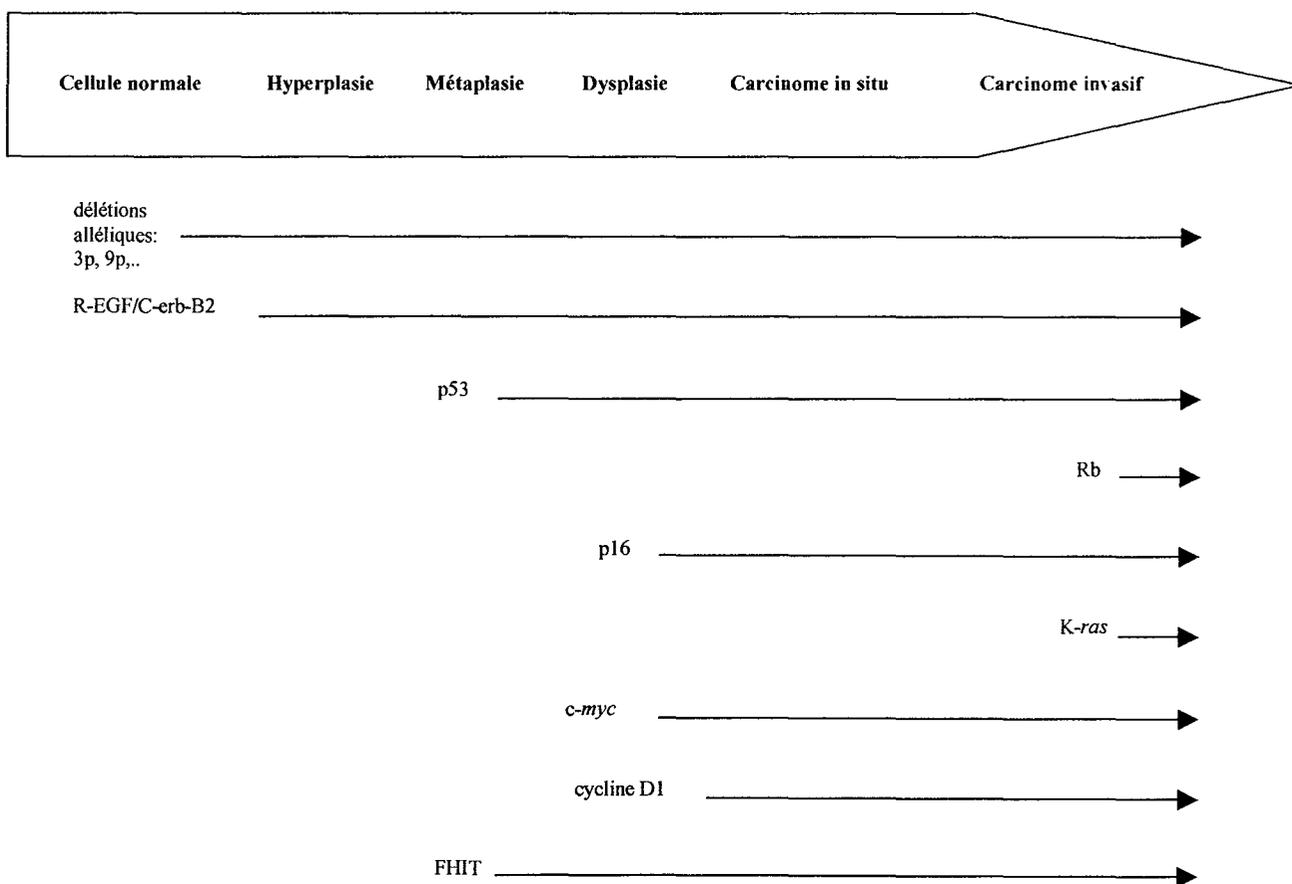
7.8. Déséquilibre du niveau d'expression des gènes impliqués dans le processus apoptotique

Une inversion du ratio Bcl2/Bax est observé dans 30% des lésions préinvasives (124).

7.9. Autres anomalies

On a également décrit: des troubles de l'activité télomérase (125), la participation d'anomalies d'autres gènes supresseur (p15 ...), le rôle éventuel des récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR β , RXR), le rôle de protéases ou de leurs inhibiteurs impliqués dans la dégradation de la matière extra cellulaire (urokinase plasminogène activateur, stromélysine3).

Figure n°8 : Séquence d'apparition des anomalies géniques au cours des étapes de la transformation néoplasique de la muqueuse respiratoire (d'après Sozzi 2001) (104)



III. Les facteurs de pronostic des cancers bronchiques

Le pronostic global des CBNPC est sombre avec un taux de survie à 5 ans de 14 %. L'espoir principal d'une survie longue et d'une guérison reposent sur la possibilité d'une exérèse chirurgicale totale de la tumeur mais malheureusement cela ne concerne qu'environ 25 % des patients au moment du diagnostic.

En effet, dans plus de trois quart des cas, le bilan d'extension révèle soit un envahissement loco-régional trop étendu, soit la présence de métastases. En pratique quotidienne l'évaluation du pronostic repose principalement sur des données cliniques : l'extension de la maladie matérialisée par la "stadification" T.N.M. (126), l'état général et d'autonomie du patient apprécié par l'index de Karnofsky ou l'échelle de l'O.M.S. (Performance Status), la perte de poids et les co-morbidités associées (127).

D'autres éléments ont été proposés pour apprécier le pronostic des CBNPC, le type et le degré de différenciation histologique (128), l'index mitotique et le contenu en DNA, différents marqueurs biologiques dont le marqueur tumoral sérique CYFRA 21 pour les carcinomes épidermoïdes (129,130) mais dont l'intérêt en pratique s'avère limité. Le tableau n°7 reprend les principaux facteurs pronostiques des CB identifiés en analyses multivariées (131). Plus récemment les progrès réalisés en immunohistochimie et en biologie moléculaire, ainsi que l'amélioration des connaissances des mécanismes de la carcinogenèse ont conduit à proposer l'étude de nouveaux marqueurs pronostiques qui pourraient avoir un intérêt en clinique.

1. La classification TNM

La classification TNM proposée par Mountain en 1986 (132) permet de classer les tumeurs en quatre stades de I à IV en fonction de la taille et de l'extension de la tumeur primitive (T=tumor), de l'extension ganglionnaire (N=node), et de l'existence de métastases

(M=metastasis). C'est l'outil de référence unanimement reconnu et utilisé pour l'établissement de l'extension de la maladie cancéreuse, dont découlent la définition des modalités thérapeutiques et l'évaluation du pronostic. La dernière révision de cette classification publiée en 1997 (126), modifie principalement la place des tumeurs T3N0 dont le pronostic est plus proche des stades IIB (auxquelles elles sont désormais rattachées) que des stades IIIA. La classification TNM figure au tableau n°8. On distingue également le bilan d'extension TNM préopératoire clinique cTNM (c=clinical), et post opératoire pTNM (p=pathological) qui intègre les résultats anatomopathologiques de la recoupe bronchique, de l'envahissement pleural éventuel et des ganglions hilaires et médiastinaux.

Le pTNM correspond au bilan d'extension le plus précis pour le patient mais ne concerne que les patients qui ont bénéficié d'une chirurgie d'exérèse soit seulement environ 25% des sujets atteints de CBNPC. La présence de stades IIIB et IV, normalement justiciables d'un traitement chimiothérapique et/ou radiothérapique, dans les séries de sujets opérés s'explique habituellement par la correction du cTNM en un pTNM plus "sévère" du fait des résultats anatomopathologiques post opératoires.

De plus la résection chirurgicale n'est habituellement pas complète pour les pTNM IIIB et IV qui traduisent un envahissement tumoral très important. Le tableau n°9 rapporte les survies à 4 et 5 ans observées dans de grandes séries de sujets opérés de CBNPC. On constate que pour les tumeurs de stade d'extension limité, stades IA, IB et IIA, 20 à 40 % des patients vont décéder d'une réévolution tumorale locale et/ou métastatique en dépit d'un bon état général et d'une chirurgie d'exérèse complète, d'où la démarche actuelle de certains auteurs d'étendre l'indication d'un traitement par voie générale (chimiothérapie) afin de contrôler les éventuels foyers micrométastatiques non identifiés par le bilan d'extension classique.

Une autre approche est de considérer que le stade d'extension TNM est insuffisant pour évaluer le risque évolutif de la maladie cancéreuse, et qu'il faut par conséquent

Tableau n°7 : Principaux facteurs pronostiques de survie dans les cancers bronchiques retrouvés en analyse multivariée (d'après Quoix et al 2000) (131)

Variable :	CBNPC résécable	CBNPC non resécable	CBPC
Index d'activité	++	+++	+++
Amaigrissement		++	
Sexe	+/-	+	++
Age	+/-	+/-	+/-
Stade d'extension	+++	+++	+++
Sites métastatiques		++	++
Sous type histologique	+		
LDH		++	+++
Phosphatases alcalines			++
Albuminémie			++
Natrémie			++
Hyperleucocytose	+	+	

Tableau n°8 : Classification TNM des cancers bronchiques révisée de 1997 (126)

T₁ = Tumeur de moins de 3 cm de diamètre

T₂ = Tumeur de diamètre supérieur ou égal à 3cm ou envahissant une bronche lobaire

T₃ = Tumeur envahissant la plèvre viscérale ou une bronche souche à plus de 2 cm de la carène

T₄ = Tumeur envahissant la plèvre pariétale, la paroi thoracique, les gros vaisseaux (aorte, veine cave supérieure, tronc de l'artère pulmonaire), l'œsophage, un corps vertébral, le cœur, le péricarde

N₀ = Absence de ganglion

N₁ = Présence de ganglion(s) hilairé homolatéral(ux)

N₂ = Présence de ganglion(s) médiastinal(ux) homolatéral(ux)

N₃ = Ganglion susclaviculaire ou controlatéral

M₀ = Absence de métastase

M₁ = Présence de métastase(s)

Stade :	Classification :
occulte	T _x N ₀ M ₀
0	T _{is} N ₀ M ₀
I _A	T ₁ N ₀ M ₀
I _B	T ₂ N ₀ M ₀
II _A	T ₁ N ₁ M ₀
II _B	T ₂ N ₁ M ₀ ou T ₃ N ₀ M ₀
III _A	T ₁ N ₂ M ₀ ; T ₂ N ₂ M ₀ ; T ₃ N ₁ M ₀ ; T ₃ N ₂ M ₀
III _B	tous T N ₃ M ₀ ; T ₄ tous N M ₀
IV	tous T tous N ₀ M ₁
N.B. :	
- is : in situ	
- La présence de nodule(s) ipsilatéral(ux) situé(s) dans le même lobe que la tumeur primitive classe(nt) la tumeur en T ₄	
- La présence de nodule(s) ipsilatéral(ux) situé(s) dans un lobe différent de la tumeur primitive classe(nt) la tumeur en M ₁	

rechercher d'autres outils pour mieux appréhender le pronostic d'où l'intérêt pour les marqueurs accessibles par l'immunohistochimie et la biologie moléculaire.

2. Les nouveaux marqueurs de pronostic des CBNPC

L'identification de nouveaux marqueurs de pronostic des cancers bronchiques à partir des connaissances sur les mécanismes de la carcinogenèse est un objectif essentiel afin de définir une prise en charge thérapeutique plus adaptée. Jusqu'à présent, il n'y a pas de niveau de preuve suffisant quant à l'intérêt de leur étude à visée pronostique en pratique quotidienne. Nous avons choisi de résumer les données récentes concernant les principaux gènes et/ou protéines généralement impliqués(es) dans le contrôle de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire et de l'apoptose, dont l'étude pourrait avoir un intérêt prédictif du pronostic du cancer bronchique.

2.1. Marqueurs de la voie de Rb : p16^{INK4}, cyclines D₁ et E

Cette voie implique deux gènes suppresseurs de tumeur Rb et p16^{INK4} et deux gènes considérés comme des oncogènes, les cyclines D1 et E.

La faible fréquence des anomalies de l'expression de Rb dans les CBNPC ne permet pas d'envisager de l'utiliser comme marqueur de pronostic. Par contre l'expression de p16^{INK4}, qui intervient dans le contrôle de la cycline D1 afin de maintenir Rb sous sa forme phosphorylée, apparaît être un outil intéressant.

La diminution de l'expression de p16^{INK4} est corrélée à une diminution de la survie (133-135) et d'autant plus qu'elle est associée à une hyperexpression de la cycline D1. Ainsi sur une série de 106 CBNPC de stade I et II, les tumeurs p16-/ cycline D1+ sont associées à une survie de 50 % à 49 mois contre 65 % à 120 mois pour les tumeurs p16+/cyclineD1-

Tableau n°9 : Survie à 4 et 5 ans dans de grandes séries de sujets opérés de cancer bronchique (classification TNM révisée de 1997) d'après Lopez-Encuentra (1999) (217)

<i>Auteur :</i>	<i>Bülzebruck 1999</i>	<i>Mountain 1999</i>	<i>Naruke 1999</i>	<i>Lopez-Encuentra 1999</i>	<i>Adebonojo 1999</i>
n	2137	1910	2672	2109	1398
Survie à :	4 ans	4 ans	5 ans	4 ans	5 ans
p I_A	69 %	73 %	80 %	73 %	77 %
p I_B	58 %	62 %	60 %	56 %	62 %
p II_A	37 %	61 %	57 %	68 %	57 %
p II_B	42 %	42 %	48 %	46 %	47 %
p III_A	28 %	26 %	24 %	27 %	28 %
p III_B	17 %		13 %	31 %	20 %
p IV	12 %		0 %	22 %	0 %

($p < 0,001$) (136). L'hyperexpression de la cycline D1 pourrait être un facteur de pronostic péjoratif à part entière, indépendant du stade d'extension TNM et de l'âge (137).

Une hyperexpression de la cycline E a été également corrélée à une survie plus courte seule (138), ou en association avec l'hyperexpression de la cycline D1 (139), ou encore en association avec une diminution de l'expression de la protéine p27 inhibiteur du complexe cdk2-cycline E (140).

2.2. Les marqueurs pronostiques de la voie de p53.

2.2.1. le gène p53

Le gène p53 contrôle plus particulièrement, d'une part la régulation du cycle cellulaire par l'intermédiaire de la protéine p21, et d'autre part l'apoptose par l'intermédiaire de *Bcl2* et *Bax*. Du fait de cette position essentielle dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire, le gène p53 est considéré comme un gardien de l'intégrité du génome capable d'induire la mort par apoptose des cellules trop endommagées ou de laisser le temps de la réparation à d'autres. De nombreux travaux se sont donc attachés à rechercher une corrélation entre la présence d'anomalies de p53 et l'évolution clinique de cohortes des patients porteurs de CBNPC, notamment leur survie à long terme. De nombreux travaux semblent conclure à un rôle pronostique plutôt défavorable corrélé à l'existence d'une anomalie de p53 (hyperexpression de la protéine, mutation du gène de p53 ...). La méta-analyse de Steels (48) montre que pour chaque sous groupe de CBNPC étudié (selon le stade d'extension, le type histologique, l'anticorps utilisé en immunohistochimie ...) la présence d'anomalies de p53 est associée à un mauvais pronostic de survie. Le sous groupe des adénocarcinomes pourrait avoir un pronostic plus sombre encore en cas d'anomalies de p53, notion retrouvée dans un autre travail de méta-analyse conduit par Mitsudomi (141).

Enfin l'hyperexpression de p53 pourrait être un facteur de moindre sensibilité des tumeurs à la chimiothérapie (142,143).

2.2.2. Le couple *Bcl2* / *Bax*

Une meilleure survie est paradoxalement associée à une hyperexpression de *Bcl2* (144,145) dont l'action est pourtant anti-apoptotique. Pour Gessner (135) un marquage *Bax* de la tumeur est associé à une meilleure survie et d'autant plus qu'il existe un marquage p16^{INK4} positif associé. Inversement une diminution de l'expression de *bax* est corrélée à une survie plus courte mais aussi à une moindre chimiosensibilité (146).

2.2.3. La protéine p21^{Waf1}

La protéine p21^{Waf1}, codée par le gène WAF/CIP agit principalement en bloquant le passage de la cellule en G1 par son rôle d'inhibiteur sur les cdk2 et 4 et *in fine* de blocage de la phosphorylation de Rb. L'expression de la protéine p21^{Waf1} par la tumeur serait un élément de pronostic favorable (147).

2.3. Les mutations du gène *K-ras*

Le rôle pronostique des mutations du gène *K-ras* dans les adénocarcinomes bronchiques a été évoqué depuis la fin des années 80 (148,149). Des travaux plus récents sur des séries plus importantes n'ont pas confirmé ce rôle pronostique (150,151), bien que dans une métaanalyse de Huncharek (152) le risque relatif de mortalité à deux ans soit évalué 2,5 fois supérieur en cas de mutation du gène *K-ras*. La combinaison de la recherche de mutations de *K-ras* et d'autres anomalies comme l'hyperexpression de p185 (153) ou p53 et *c-erb-B2* (154) pourrait avoir un intérêt pronostique. Enfin on a montré le rôle pronostique de la présence de mutations du codon 12 du gène *K-ras* chez les sujets porteurs de CBNPC de stade I particulièrement chez la femme (155), et suggéré un risque plus important de cancer métachrone en cas de mutation de *K-ras* (156).

2.4. Autres marqueurs

De nombreux autres marqueurs de pronostic ont été proposés:

- *c-erb-B2* dont le rôle pronostic est controversé (130,153,157),
- Le VEGF impliqué dans les processus d'angiogenèse de la stroma-réaction des cancers dont le degré d'expression a également été proposé comme marqueur de pronostic (157-160),
- PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) dont la diminution de l'expression pourrait constituer un facteur de mauvais pronostic dont l'intérêt est controversé (161,162).

2.5. Les antigènes des groupes sanguins

Les antigènes des groupes sanguins ne sont pas seulement exprimés sur les érythrocytes mais également dans de nombreux autres tissus et notamment certaines cellules épithéliales. L'étude de l'expression des antigènes des groupes sanguins pourrait avoir un intérêt pour prédire le pronostic des CBNPC. Une série de 164 tumeurs de patients opérés de CBNPC a permis de mettre en évidence que l'expression des antigènes A ou AB était un marqueur de mauvais pronostic (163). Un autre travail a montré que la perte du marquage des antigènes des groupes sanguins était corrélée au potentiel métastatique des tumeurs (164). La perte de l'expression des antigènes des groupes sanguins pourrait en fait être liée à une délétion au niveau du bras court du chromosome 9, ce qui est fréquemment observé dans les CBNPC. C'est à ce niveau que sont situés les gènes codant pour les glycosyltransférases responsables de la modification de la molécule précurseur H en antigènes A ou B. Par ailleurs l'expression des antigènes Lewis a et x pourrait avoir un rôle pronostique du fait de leur capacité d'interaction / liaison avec les sélectines exprimées par les cellules endothéliales.

L'augmentation de l'expression des antigènes Lewis a et x sur les cellules tumorales des CBNPC pourrait favoriser leur potentiel métastatique (165).

IV. Bases de la prévention des cancers bronchiques par les rétinoïdes

Parmi les 600 caroténoïdes de source naturelle d'origine végétale ou animale, seuls une cinquantaine sont des précurseurs de la vitamine A. Le terme de vitamine A est un terme générique qui regroupe plusieurs métabolites actifs dérivés des caroténoïdes notamment le rétinol, le rétinaldéhyde (ou rétinol) et l'acide rétinoïque.

1. Le métabolisme des rétinoïdes

1.1. Les principaux rétinoïdes

Les composés à activité vitaminique A appartiennent à la classe des rétinoïdes. Ce sont des composés dont le motif de base comporte une partie cyclique apolaire, le noyau β -ionone, et une chaîne latérale méthylée insaturée polaire, la chaîne isoprénoïde. Selon le degré d'insaturation du noyau β -ionone on distingue :

- la vitamine A1 (rétinol)
- la vitamine A2 (3 – déhydrorétinol)
- et la vitamine A3 (3,4 – didéhydrorétinol).

La fonction alcool en C15 peut être le siège de réactions :

- d'oxydations qui conduisent au rétinol (aldéhyde de vitamine A) et à l'acide rétinoïque (vitamine A acide)
- d'estérification avec différents acides conduisant aux palmitate de rétinol, acétate de rétinol et succinate de rétinol.

1.2. Absorption – distribution – transformation et stockage

Les caroténoïdes, représentés majoritairement par le β -carotène, constituants normaux des tissus et du sang humain et de nombreux animaux, sont absorbés au niveau des entérocytes. Ils sont transformés successivement en rétinal, rétinol et en esters de rétinol. Les esters de rétinol sont véhiculés dans le courant sanguin par des chylomicrons et des fantômes de chylomicrons jusqu'au foie, où ils sont captés et stockés dans les hépatocytes et surtout dans les cellules de Ito. D'autres tissus comme le rein et la rétine peuvent capter et stocker des esters de rétinol, en quantité limitée cependant. Le rétinol libéré par une rétinol-ester-hydrolase est transporté par un complexe protéique comportant une Retinol-binding-protein (RBP), de synthèse principalement hépatique (hépatocytes), associée à la transthyrétine. Le sérum contient environ 1% du pool des 100 à 150 mg de caroténoïdes de l'organisme. On estime que le β -carotène représente 15 à 30 % des caroténoïdes sériques (166).

L'acide rétinoïque est produit à partir du rétinol tout-trans, par deux oxydation successives. L'acide rétinoïque 9-cis est un stéréoisomère de l'acide rétinoïque. Le catabolisme des acides rétinoïques passe par une hydroxylation cytochrome P450-dépendante puis une oxydation donnant des métabolites 4-oxo qui sont conjugués à l'acide glucuronique puis excrétés par la bile.

2. Les récepteurs de la vitamine A

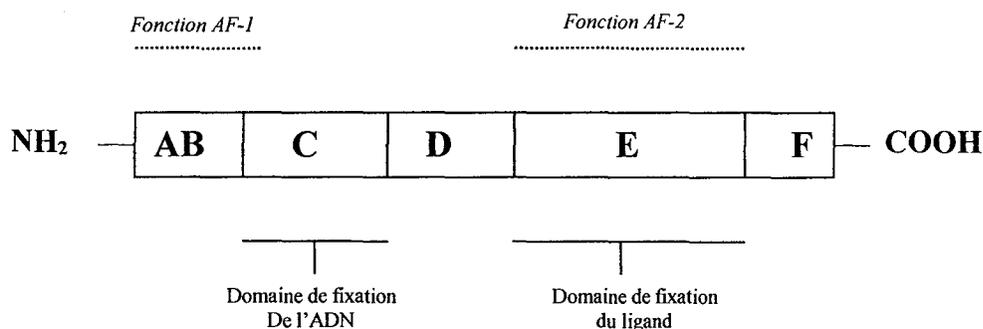
2.1. Les récepteurs nucléaires

La famille des récepteurs nucléaires comprend les récepteurs des hormones thyroïdiennes (œstrogènes, progestérone, androgènes, gluco et minéralo-corticoïdes) et les récepteurs des hormones non thyroïdiennes (vitamine D3, hormone thyroïdiennes proliférateurs du peroxyosome (PPAR)...) dont font partie les récepteurs de la vitamine A, les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs) et les récepteurs des rétinoïdes X (RXRs) (167,168).

Les récepteurs nucléaires comportent plusieurs domaines fonctionnels :

- le domaine de liaison à l'ADN ou domaine C, situé dans la partie centrale, qui assure la liaison du niveau des séquences cibles spécifiques,
- le domaine de fixation du ligand ou domaine E, qui est également impliqué dans la dimérisation des récepteurs et qui contient une séquence activatrice de la transcription (AF2) dont l'activation dépend de la présence du ligand,
- un domaine A/B très phosphorylé dans la région amino-terminale porteur d'une fonction activatrice de la transcription (AF-1) indépendante de la présence du ligand (169, 170).

Figure n°9 : Représentation schématique de l'organisation des récepteurs nucléaires



2.2 Les récepteurs de l'acide rétinoïque et les récepteurs des rétinoïdes X

Deux types de récepteurs des rétinoïdes sont identifiés :

- les RARs ayant une affinité importante pour l'acide rétinoïque tout-trans et moindre pour l'acide rétinoïque 9-cis,
- les RXRs ayant une affinité forte pour l'acide rétinoïque 9-cis.

Les RARs et RXRs comportent trois isotypes α , β , et γ , codés par des gènes différents. Différents isoformes des RARs et RXRs sont synthétisés du fait des mécanismes d'épissage alternatif ou du fait de l'utilisation variable des promoteurs. Le rôle des différents isoformes n'est pas connu mais cela pourrait expliquer la diversité des processus biologiques contrôlés par l'acide rétinoïque tout-trans. L'isoforme RAR β_2 est sous la dépendance d'un promoteur inductible par l'acide rétinoïque tout-trans. L'étude des récepteurs RXR α et RAR β en cristallographie a montré que leur structure tridimensionnelle ménage deux poches hydrophobes capables de recevoir l'acide rétinoïque et qu'en présence du ligand la conformation du récepteur se modifie et active la transcription (171,172).

3. La régulation transcriptionnelle par l'acide rétinoïque

3.1. Notion d'éléments de réponse à l'acide rétinoïque

L'activité transcriptionnelle des gènes cibles de l'acide rétinoïque est contrôlée par les récepteurs de l'acide rétinoïque soit de façon directe par leur liaison à des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RAREs), soit de façon indirecte par leur effet antagoniste sur des facteurs de transcription comme AP-1.

Les RAREs sont des répétitions directes de séquences hexanucléotidiques 5'-Pu (G/T) TCA espacées de 1, 2 ou 5 paires de bases (DR $_1$, DR $_2$ et DR $_5$) (DR: direct Repeat). Des répétitions inversées, complexes et/ou espacées de 8 paires de bases sont possibles. Cette diversité représente un niveau de complexité supplémentaire dans le contrôle de la régulation des gènes cibles par l'acide rétinoïque. De plus les gènes codant par RAR α , β et γ contiennent un RARE dans leur promoteur et sont auto-inductibles. De très nombreux gènes contiennent des RAREs dans leur séquence (173).

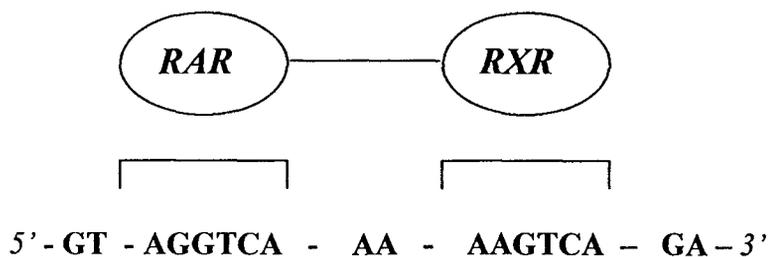
Tableau n°10 : Localisation des gènes codant pour les RARs et RXRs

Récepteur	Localisation chromosomique	Isoformes	Ligand
RAR α	17q21.1	$\alpha 1, \alpha 2$	} Acide rétinoïque tous-trans +9-cis
RAR β	3p24.2	$\beta 1 \text{ à } 4$	
RAR γ	12q13	$\gamma 1, \gamma 2$	
RXR α	9q34.3	$\alpha 1, \alpha 2$	} Acide rétinoïque 9-cis
RXR β	6p21.3	$\beta 1, \beta 2$	
RXR γ	1q22	$\gamma 1, \gamma 2$	

3.2. Notion d'hétérodimérisation des RARs et RXRs

Les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs) fonctionnent à l'état d'hétérodimères RAR/RXR activables par l'acide rétinoïque 9-cis. Ces hétérodimères interagissent avec les éléments de réponses RAREs habituellement de type DR₁, DR₂ et DR₅, les récepteurs RXR et RAR se fixant respectivement sur les motifs 5' et 3' des RAREs.

Figure n°10 : Fixation des récepteurs d'un hétérodimère RAR/RXR sur l'élément de réponse de type DR₂



L'activation de la transcription dépend de la fixation d'un et/ou des deux ligands sur leurs récepteurs RXR et RAR constituant l'hétérodimère. L'interaction d'un récepteur du couple RXR/RAR avec son ligand peut également diminuer l'affinité du partenaire d'hétérodimérisation pour son propre ligand ou peut induire des changements conformationnels du partenaire d'hétérodimérisation comparables à la fixation du ligand spécifique. La fixation des deux ligands spécifiques peut induire une synergie d'action dans l'activation de la transcription (174).

3.3. Rôle des cofacteurs transcriptionnels.

Les interactions des récepteurs nucléaires avec leurs éléments de réponse sont modulées par des protéines co-activatrices qui majorent l'activité du récepteur ou des protéines co-repressives qui inhibent leur activité transcriptionnelle.

4. Pathologie et disponibilité de la vitamine A.

4.1. Durant l'embryogenèse.

Les anomalies de la disponibilité de vitamine A, carence ou excès d'apports, entraînent des conséquences sur le développement et la différenciation cellulaire/tissulaire et sur l'organogenèse. Les récepteurs RARs et RXRs jouent des rôles essentiels au cours du développement embryonnaire et de la placentogenèse (175).

Les carences en vitamine A induisent des troubles majeurs et poly-viscéraux du développement embryonnaire. Sur le plan respiratoire, on constate des lésions de métaplasie et une diminution des cellules ciliées et mucosécrétantes qui se corrigent avec l'apport de vitamine A (176). Les surdosages en vitamine A (acide rétinoïque tout-trans) induisent également des effets tératogènes pluri-viscéraux avec sur le plan respiratoire des anomalies

anatomiques alvéolaires, de la segmentation bronchique distale et de la différenciation cellulaire (177).

4.2. Dans le contrôle de la carcinogenèse.

La vitamine A est impliquée dans la régulation de processus biologiques fondamentaux (178,179).

➤ L'inhibition de la prolifération cellulaire:

Les actions de la vitamine A concourent à l'arrêt du cycle cellulaire au point G₁ par inhibition de la phosphorylation de Rb. Ainsi dans une lignée de cellules bronchiques l'acide rétinoïque tout-trans inhibe la cycline D₁ (180) ou la cycline E (181). De même l'acide rétinoïque tout-trans bloque la synthèse d'ADN dans des cellules lymphocytaires en inhibant les cyclines E et A ainsi que les cdk-2 (182). On constate l'inhibition de l'hyperphosphorylation de Rb d'une lignée d'adénocarcinome bronchique humain traité par un dérivé rétinoïde (183). La présence de RARE pour l'acide rétinoïque dans le promoteur du gène p21^{Waf1} suggère une possibilité de blocage supplémentaire du cycle cellulaire au niveau des complexes cdk/cdk-inhibiteurs (184).

➤ L'induction de la différenciation cellulaire:

L'acide rétinoïque tout-trans induit la différenciation cellulaire épidermoïde dans une lignée de carcinome ORL par l'intermédiaire du récepteur RAR β (185).

➤ La modulation de l'expression de facteurs de croissance, de protéines ou d'enzymes du stroma et de facteurs de transcription:

L'acide rétinoïque active l'expression de nombreux facteurs de croissance, cytokines et récepteurs tels que les TGF β , EGR-R, IGF-II, PDGF-R ..., et inhibe l'expression d'autres tels que les TGF- α , PDGF A et B, IGF-I... La transcription de gènes codant des enzymes et des protéines de la matrice extracellulaire impliquées dans la stroma-réaction et l'invasion tissulaire tumorales est également modulée par l'acide rétinoïque. Les rétinoïdes peuvent moduler l'expression de facteurs de transcription nucléaires tels que AP1 (Activator Protein-1) (186,187).

➤ *Modulation de l'expression de gènes suppresseurs:*

L'apport d'acide 13-cis rétinoïque induit une augmentation de l'expression de p53 sur des lésions préinvasives ORL suivies sur trois mois (188).

➤ *Induction de l'apoptose:*

L'acide rétinoïque tout-trans est capable d'induire l'apoptose sur des lignées de cellules carcinomateuses d'origine mammaire (189) ou oesophagienne (190). Le rôle des RAR α et γ a été suggéré (191,192).

➤ *Autres effets:*

- stimulation de l'immunité, de la cytotoxicité lymphocytaire
- inhibition du potentiel métastatique,
- action antioxydante, inactivation des radicaux libres.

4.3. Dans la carcinogenèse bronchique.

Des données in vitro et chez l'animal plaident en faveur de l'effet des rétinoïdes dans le domaine de la carcinogenèse bronchique (193). Une série de 76 CBNPC opérés étudiés, au

laboratoire, en parallèle avec les tissus sains correspondant (194) a montré une diminution de l'expression de RAR β en immunohistochimie dans 63% des tumeurs, ce qui était très significativement différent des tissus sains ($p < 0.0001$). Dans ce groupe 41 % des patients informatifs (hétérozygotes) présentaient une délétion monoallélique et un patient une délétion biallélique. Inversement 86% des adénocarcinomes et 75% des carcinomes épidermoïdes avec une délétion allélique présentaient une diminution de l'expression de RAR- β . En outre ce travail a montré une diminution de l'expression de RAR γ en RT-PCR dans 41% des tumeurs, et une diminution de l'expression de RXR β dans 18% des cas en immunohistochimie. La diminution de l'expression du récepteur RAR β serait plus spécifiquement associée à une accélération de la croissance tumorale.

L'utilisation *in vitro* d'agonistes sélectifs de RAR β et RAR β/γ serait plus efficace, et par ailleurs des effets additifs ou synergiques de l'administration conjointe d'agonistes RAR et RXR ont été constatés (195). Ces éléments confortent la notion de rôle important que jouent les couples rétinoïdes/hétérodimères RAR-RXR. Notre étude de microsatellites situés à proximité des loci des RARs et RXRs par allélotypage sur une série de 66 lésions préneoplasiques, couplée à l'étude de l'expression de RAR β en immuno-histochimie, a montré la fréquence croissante des délétions alléliques depuis les muqueuses de non fumeurs jusqu'aux lésions de dysplasie et de carcinome *in situ*. Les délétions alléliques de RXR α et de RXR γ étaient également corrélées à l'aggravation des lésions. Les délétions alléliques de RAR β étaient corrélées à une perte d'expression de la protéine correspondante. La fréquence des anomalies de RAR γ apparaissait corrélée à l'importance du tabagisme (196).

L'apport d'acide 13-cis rétinoïque a été associé à la restauration de l'expression de RAR β sur des lésions pré-neoplasiques bronchiques biopsiées identifiées dans l'essai thérapeutique du MD Anderson (197,198). Ces données sont concordantes avec des travaux plus anciens concernant des lésions buccales leucoplasiques: l'apport d'acide 13-cis rétinoïque

délicivré pendant 3 mois dans un essai randomisé versus placebo, malgré des effectifs limités, avait montré une diminution de la taille des leucoplasies dans 67% des cas et une disparition des lésions de dysplasie dans 56% des cas (199).

5. Effets de l'administration préventive de rétinoïdes chez l'homme.

Le manque de perspectives d'aboutissement rapide dans le domaine de la lutte contre le tabagisme, l'absence de stratégie de dépistage précoce clairement établie, et les immenses populations à risque de cancer bronchique (tabac et expositions professionnelles) ont conduit à la mise en oeuvre d'essais de chimioprévention par des rétinoïdes.

Des essais concernant des effectifs limités ont été réalisés dans trois domaines : 1) l'étude des effets de l'administration chronique de rétinoïdes sur des lésions préinvasives bronchiques identifiées par des biopsies bronchiques per-endoscopiques, 2) chez des patients ayant déjà été traités préalablement pour un premier cancer du poumon ou des voies aérodigestives supérieures et 3) dans la prévention de cancer bronchique chez des volontaires sains fumeurs.

5.1. Etudes concernant les lésions épithéliales préinvasives et rétinoïdes

L'étude du MD Anderson (200): 150 sujets fumeurs ont été randomisés en deux bras de traitement par étrétinate versus placebo, sur six mois. Il n'y a pas eu d'effet sur la fréquence des atypies cellulaires identifiées dans l'expectoration.

L'étude de Lee et al (201): sur un groupe de 152 sujets fumeurs ayant subi des biopsies bronchiques sur six sites, ceux qui présentaient un index de dysplasie/métaplasie supérieur à 15 % ont reçu, après randomisation, un traitement de 6 mois par acide 13-cis rétinoïque versus placebo. Parmi les 69 sujets évaluables au terme du traitement, la réduction de l'index de

métaplasie était comparable dans les deux groupes. Par contre, l'arrêt du tabac était associé à une réduction plus importante des métaplasies.

5.2. La prévention de deuxièmes cancers

L'étude de Hong et al (199) : 103 patients traités préalablement par cancer ORL ont reçu à titre préventif après randomisation, soit de l'acide 13-cis rétinol, soit un placebo. Après une médiane de suivi de trente deux mois, on observe un taux de deuxième cancer (ORL, bronchique, oesophagien) de 24 % dans le groupe placebo versus 4 % dans le groupe traitement actif ($p = 0,005$), mais concernant les deuxièmes cancers il est important de noter qu'il ne s'agissait de cancer bronchique que dans 2 cas sur 14.

L'étude de Milan (202): 307 patients opérés de CBNPC de stade I ont été randomisés entre un traitement de palmitate de rétinol pendant 12 mois et un placebo. Après un suivi médian de 46 mois la fréquence de récurrence ou de deuxième cancer bronchique est significativement inférieure ($p=0.045$) dans le groupe avec traitement actif.

L'étude du GETTEC (Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou) (203): 316 patients traités pour cancer ORL de stade d'extension limité ont reçu après randomisation, soit de l'étrétinate, soit un placebo pendant vingt quatre mois. Après un suivi médian de quarante et un mois aucun bénéfice n'est observé dans le groupe étrétinate : 28 deuxième cancer versus 29 dans le groupe placebo (12 et 13 au niveau ORL respectivement).

L'étude EUROSCAN (EUROpean Study on Chemoprevention with vitamin A and N-acetylcystein) (204) : 2592 patients traités pour cancer ORL (60 %) ou du bronchique (40 %) ont été randomisés entre quatre groupes de traitement: palmitate de rétinol, N-acétylcystéine,

les deux associés ou un placebo. Après un suivi médian de quarante neuf mois, aucune différence significative de survie n'était constatée entre les patients traités par vitamine A et les autres, ni aucun bénéfice en terme de prévention de la survenue d'un cancer bronchique. Néanmoins une tendance délétère de la chimioprévention a été constatée, l'incidence des deuxièmes CB primitifs étant inférieure dans le bras placebo.

5.3. La prévention primaire chez des volontaires sains

L'étude finlandaise ATBC du Groupe de Prévention du Cancer (Alpha Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group) (205) : 29133 hommes randomisés en quatre groupes ont reçu soit α -tocophérol (vitamine E), soit β -carotène, soit les deux, soit un placebo. Avec un suivi de cinq à huit ans, on observe plus de cancer bronchique dans les groupes traités par β -carotène (incidences pour 10000 habitants : groupe β -carotène 56,3, groupe non β -carotène 47,5) avec une mortalité de 8 % supérieure par rapport à ceux qui n'en reçoivent pas.

L'étude CARET (β -Caroten And Retinol Efficacy Trial) (206) : 18314 fumeurs, anciens fumeurs et travailleurs exposés à l'amiante sont randomisés en deux groupes recevant soit une association de β -carotène et de rétinol, soit un placebo. Avec un suivi médian de quatre ans on constate un risque relatif de cancer bronchique à 1,28 et un risque relatif de décès par cancer du poumon à 1,46 qui conduit à l'arrêt de l'essai.

L'étude PHS (Physician Health Study) (207) : 22071 hommes médecins dont 11 % du fumeurs actifs et 39 % n'ayant jamais fumé suivis entre 1982 et 1995 sont randomisés entre un traitement par β -carotène ou un placebo. Le nombre de cancers bronchiques s'est avéré comparable dans les deux groupes.

Tableau n°11 : récapitulatif des essais de chimioprévention des cancers bronchiques et ORL (publiés entre 1990 et 2000)

Etude	Effectif (n=)	Population	Durée de traitement	Molécules	Critère(s) d'évaluation	Efficacité du traitement par rétinoïdes ?
Arnold 1992 (200)	150	fumeurs	6 mois	étrétinate vs placebo	atypies cellulaires dans l'expectoration	non arrêt tabac supérieur
Pastorino 1993 (202)	307	CBNPC stade I opérés	12 mois	palmitate de rétinol vs placebo	risque de deuxième cancer	oui diminution fréquence 2ème cancer (ORL et poumon)
Lee 1994 (201)	152	fumeurs	6 mois	acide 13-cis rétinol vs placebo	index de métaplasie/dysplasie (sur n=69)	non index comparables
Hong 1990 (199)	103	cancers ORL	32 mois (médiane)	acide 13-cis rétinol vs placebo	risque de deuxième cancer	oui diminution fréquence 2ème cancer (ORL et poumon)
GETTEC 1994 (203)	316	cancers ORL	24 mois	étrétinate vs placebo	risque de deuxième cancer	non taux comparables
EUROSCAN 2000 (204)	2592	cancers ORL et bronchiques	2 ans	palmitate de rétinol vs N-acétylcystéine vs les 2 vs placebo	risque de deuxième cancer	non tendance délétère
ATBC 1994 (205)	29133	hommes finlandais	5 à 8 ans	β -carotène vs vitamine E vs les 2 vs placebo	risque de cancer bronchique mortalité	non effet délétère
CARET 1996 (206)	18314	.non fumeurs .fumeurs .exposés amiante	4 ans (médiane)	β -carotène et rétinol vs placebo	risque de cancer bronchique	non effet délétère, arrêt essai
P.H.S. 1996 (207)	22071	hommes, médecins	1982 à 1995	β -carotène vs placebo	risque de cancer bronchique	non taux comparables

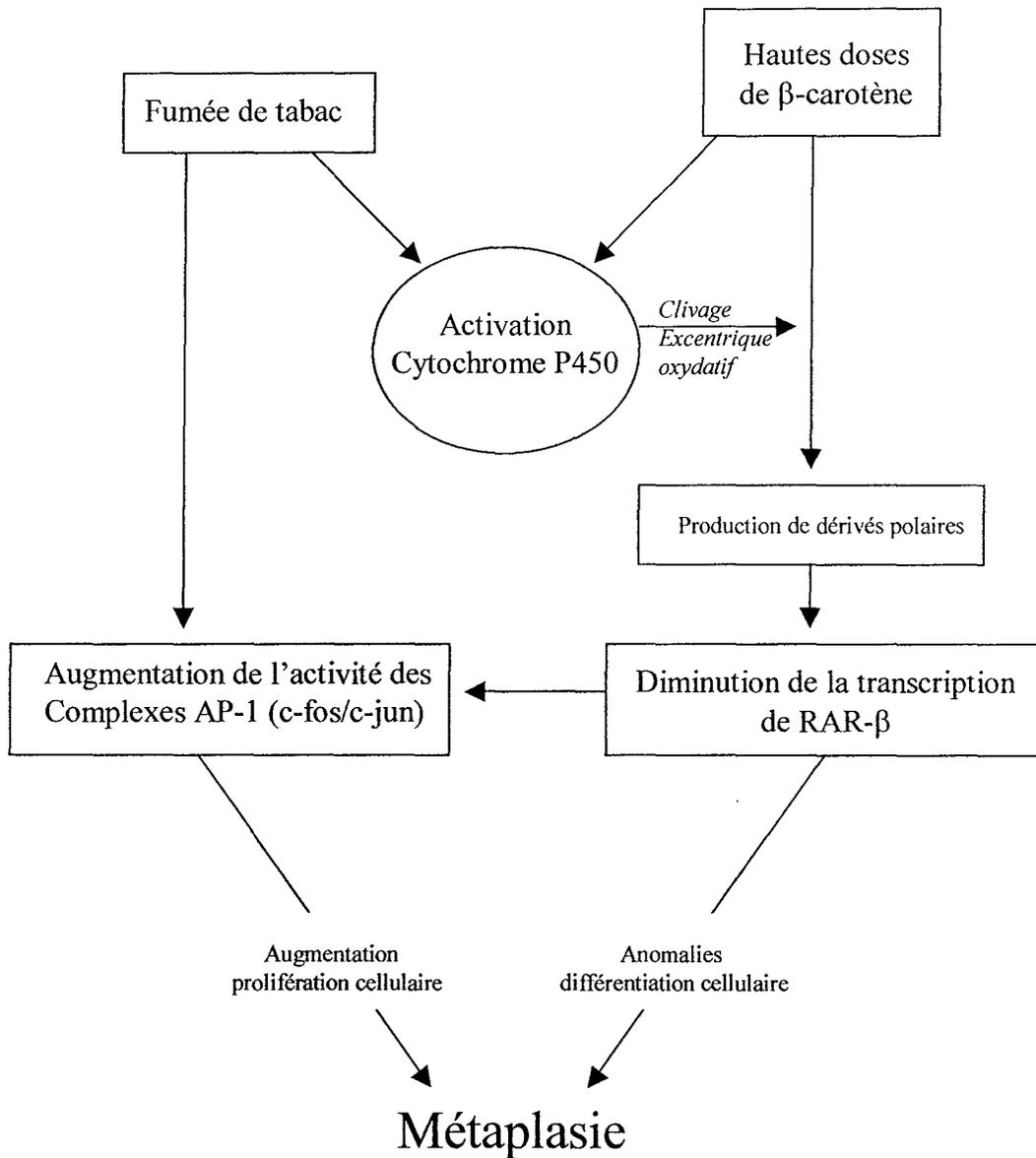
5.4. Constat d'échec des essais de chimioprévention chez l'homme

Les résultats des essais de chimioprévention des cancers bronchiques par les rétinoïdes chez des sujets "sains" fumeurs et non-fumeurs ou ayant des antécédents de cancer bronchique ou ORL sont très décevants (tableau n°11). En effet les études cliniques publiées concernant l'utilisation des rétinoïdes (β -carotène, dérivés de la vitamine A), N-acétylcystéine et vitamine E montrent les limites de travaux reposant sur des bases fondamentales insuffisantes. On a ainsi observé une augmentation paradoxale de la survenue de lésions métaplasiques voire de deuxième cancer chez des fumeurs actifs prenant du β -carotène (207). Cette constatation a également été faite dans un modèle animal chez le furet recevant du β -carotène et exposé à la fumée de tabac (208). Ceci pourrait être expliqué par l'interaction de la poursuite du tabagisme et de la prise concomitante de β -carotène qui conduiraient à une dégradation accélérée (par clivage excentrique oxydatif) de ce dernier en dérivés polaires induisant l'augmentation de l'activité des cytochromes P450 (209). Les conséquences sont d'une part une diminution de l'expression de RAR β normalement impliqué dans la différenciation cellulaire, et d'autre part une stimulation de la prolifération cellulaire par augmentation de l'activité de facteurs de transcription nucléaires de type AP-1 (186,209) (figure n°11).

La stratégie basée sur l'utilisation de vitamine A de faible coût, facilement accessible à tous, comme arme de la prévention du cancer bronchique s'avère un échec et reflète également les faibles niveaux d'investissement et de priorité dans les choix de santé publique (210). Devant ce constat, différentes voies peuvent être explorées:

- le retour à la recherche fondamentale pour parvenir à une meilleure connaissance des mécanismes d'action des rétinoïdes et de leurs récepteurs à l'état normal puis leur

Figure n°11: Hypothèse du mécanisme de l'induction paradoxale de lésions de métaplasies par les rétinoïdes et le tabac (d'après Wang et al 1999) (209)



niveau d'implication à toutes les étapes du processus de transformation néoplasique de l'épithélium,

- le développement de nouvelles molécules plus sélectives,
- la définition des sous-groupes de sujets qui présentent des facteurs de risques particuliers liés à l'hôte ou à l'environnement incluant les notions de susceptibilité sur le plan génétique, de sujets porteurs de lésions pré-cancéreuses, de sujets à risque de deuxième cancer.

Chapitre II : Les objectifs du travail de recherche

Dans une première partie nous avons étudié *les marqueurs pronostiques de survie d'une cohorte de sujets opérés de CBNPC* dans une visée curative dans le Service de Chirurgie Thoracique du CHU de Nancy. Les facteurs pronostiques classiques ont été étudiés : type anatomopathologique, degré de différenciation de la tumeur, stade d'extension TNM ... Nous avons également choisi d'étudier des marqueurs de pronostic proposés plus récemment, explorés par immunohistochimie (p53, *Bcl2*, *c-erb-B2*) ou en biologie moléculaire (mutations de l'oncogène *K-ras*), en raison des données récentes de la littérature internationale et de leur rôle apparemment clef dans les processus de la carcinogenèse de l'épithélium respiratoire.

Ces éléments sont des marqueurs susceptibles d'améliorer à l'avenir les moyens de pronostic des CBNPC et de guider l'adaptation de traitements combinés dans la prise en charge thérapeutique d'une affection au pronostic effroyable.

Dans une deuxième partie nous avons étudié *la méthylation du promoteur du gène RAR β ₂* sur une série de CBNPC opérés. En effet, une diminution de l'expression du gène RAR β ₂ a été décrite dans de nombreux cancers ORL et bronchiques (197,211,212). Le travail récent du groupe de N. Martinet et J-M Vignaud (194) a montré l'existence d'une diminution de l'expression de la protéine RAR β ₂ dans environ 60 % des cas sur une série de CBNPC. La diminution de l'expression du gène RAR β ₂ était associée de façon significative à une délétion allélique de la région 3p24.2, zone dans laquelle se situe le gène RAR β ₂. Néanmoins la diminution de l'expression de RAR β ₂ n'est pas toujours associée à une délétion allélique, et par ailleurs un nombre non négligeable de tumeurs n'est pas informatif lorsqu'on les étudie en allélotypage. D'autres mécanismes interviennent vraisemblablement pour expliquer la diminution d'expression de RAR β ₂ comme des anomalies de la méthylation du promoteur du gène de RAR β ₂ ainsi que cela a été décrit pour d'autres gènes suppresseurs. Nous avons donc

décidé d'étudier parallèlement: l'expression de la protéine RAR β_2 , la présence de délétions alléliques au niveau du chromosome 3p24.2, et l'état de la méthylation du promoteur de RAR β_2 sur une série de CBNPC opérés pour lesquels nous disposons d'un fragment tumoral et d'un fragment de tissu pulmonaire sain correspondant, afin d'affiner la compréhension des mécanismes régissant l'inactivation de l'expression et le rôle des récepteurs aux rétinoïdes dans les CBNPC.

*Chapitre III : Etude des marqueurs pronostiques des
carcinomes bronchiques non à petites
cellules:*

Article n°1

Predictive Survival Markers in Patients with Surgically Resected Non-Small Cell Lung Carcinoma¹

Judith Moldvay,² Philippe Scheid,² Pascal Wild, Karim Nabil, Joëlle Siat, Jacques Borrelly, Béatrice Marie, Guillaume Farré, Taoufik Labib, Gérard Pottier, Richard Sesboüé, Christian Bronner, Jean-Michel Vignaud, Yves Martinet, and Nadine Martinet³

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 14 [J. M., P. S., K. N., G. F., T. L., G. P., N. M.], Fédération Médico-Chirurgicale de Pneumologie [P. S., J. S., J. B., Y. M.], Institut National de la Recherche pour la Sécurité dans le travail [P. W.], and Laboratoire d'Anatomie Pathologique [B. M., J.-M. V.], Faculté de Médecine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 295, 76803 St Etienne du Rouvray [R. S.]; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 184, 67404 Strasbourg [C. B.], France

ABSTRACT

Among patients with resected non-small cell lung carcinoma, about 50% will present a tumor recurrence. Thus, it would be of major importance to be able to predict and try to prevent these relapses by an active chemotherapy and/or radiotherapy.

In an attempt to answer this question, the tumors of 227 patients with a surgically resected non-small cell lung carcinoma were evaluated as follows: tumors were classified as squamous cell carcinoma ($n = 132$) or adenocarcinoma ($n = 95$), and tumor differentiation was evaluated for each type. Then, all tumors were classified in respect to their pathological TNM staging (WHO) and screened by immunohistochemistry for the detection of the expression of the following antigens: Bcl-2, A+B+H blood group antigens, c-erb-b2, p53, and Pan-Ras antigens. Furthermore, adenocarcinomas were screened for the presence of point mutations in Ki-Ras codons 1-31. Finally, the patient blood group was defined, and patient survival was analyzed using nonparametric tests and proportional hazard Cox models.

Using Kaplan-Meier survival curves, disease pathological TNM staging was shown to be a strong predictive factor

of survival for both squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Patients with squamous cell carcinoma experienced fewer relapses than those with adenocarcinoma (42% versus 63%; $P = 0.0002$) and had a significantly better survival.

All evaluated antigens were more often present in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma except for Pan-Ras (three times more frequent in adenocarcinoma).

In patients with squamous cell carcinoma, only tumor staging had a significant prognosis value ($P = 0.01$).

In patients with lung adenocarcinoma, a well-differentiated tumor ($P = 0.009$) as well as a positive Bcl-2 staining ($P = 0.009$) and an A+B+H antigen tumor staining ($P = 0.024$) were associated with a better survival. In contrast, patients with a stage I or II disease and a p53-positive tumor staining and patients with the O blood group ($P = 0.01$) had a shorter survival. Interestingly, no relation with patient survival was related to c-erb-b2 and Pan-Ras staining. Finally, 12 point mutations were found out of 81 tumors (15%) evaluated for Ki-Ras codons 1-31; they involved codon 12 but also 8, 14, and 15 without any relationship to survival.

In respect to lung adenocarcinoma, using Cox proportional hazard models stratified on tumor staging, the following markers were shown to be related to survival: (a) Independent markers of longer survival (*i.e.*, high histological degree of tumor differentiation and positive Bcl-2 and A+B+H blood group antigen expression by tumor cells); and (b) Independent markers of shorter survival (*i.e.*, O blood group for all patients and p53 tumor staining in patients with stage I and II diseases).

This study suggests that, in patients who undergo surgery for lung adenocarcinoma, the presence or absence of these criteria could be used to define a subset of patients who may benefit from a more specific follow-up.

INTRODUCTION

Lung cancer is the first cause of death by cancer in developed countries, and its incidence is steadily rising in the world. The WHO classification separates NSCLC⁴ from SCLC. Among NSCLC, the incidence of adenocarcinoma is regularly increasing in comparison to squamous cell carcinoma. Although SCLC is usually treated by chemotherapy with or without radiotherapy, the best therapeutic opportunity for patients with NSCLC is surgery (1, 2). Indeed, a complete surgical resection remains the only real hope for cure. However, among patients who undergo surgery, about one of two will present a tumor recurrence. Thus, it would be of major importance to be able to identify these relapsing patients and to try to prevent a relapse

Received 6/28/99; revised 12/2/99; accepted 12/9/99.

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

¹ Supported in part by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (Comités of Meuse, Moselle, Haute-Marne, Meurthe-et-Moselle, and Vosges) and the Comité National contre les Maladies Respiratoires et la Tuberculose.

² The first two authors equally contributed to the study.

³ To whom requests for reprints should be addressed, at Faculté de Médecine 9, avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Phone: 33-03-83-59-27-57; Fax: 33-03-83-59-26-85; E-mail: martinet@facmed.u-nancy.fr.

⁴ The abbreviations used are: NSCLC, non-small cell lung cancer; SCLC, small cell lung cancer; pTNM, pathological TNM; RR, relative risk; CI, confidence interval.

by an active chemotherapy and/or radiotherapy. This concept explains the need to describe new prognostic factors for these patients. The pTNM staging is obviously one prognostic factor, but it is not sufficient. In view of the exploding knowledge about lung cancer biology, an active research is presently directed toward the evaluation of new cellular and/or molecular biological markers present in the tumor cells as prognostic factors and/or potential markers for early detection and/or possible targets for therapy. Several studies tend to integrate, in this respect, the present knowledge related to preneoplastic lesions (3, 4), but the results are presently conflicting (5). In this context, the study of a large number of patients with resected NSCLC was undertaken. All subjects underwent diagnosis, surgery, and follow-up in our institution. The classical clinicopathological features, pTNM, several biomarkers, and survival were recorded. The evaluated biomarkers were chosen according to our own experience, and they are among the most often reported ones in the literature as of prognostic importance: oncogenes (Bcl-2, c-erb-b2, Ki-Ras), the tumor suppressor gene p53, and also patient blood group type and blood group antigen expression on tumor tissue because these last two markers were also previously suggested to be related to lung cancer prognosis.

MATERIALS AND METHODS

Population Characteristics. All patients were consecutively referred to the Fédération Médico-Chirurgicale de Pneumologie (CHU de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France) and were operated on by the same surgeon (J. B.) between November 1988 and May 1996. There were 105 primary adenocarcinoma and 141 squamous cell carcinoma patients. None of them had evidence of distant metastatic disease at diagnosis, except for four patients with solitary brain metastasis removed before lung surgery. Recorded patient clinical features included: age, sex, place of birth, occupation, blood type, smoking history, occurrence of previous cancers, presenting symptoms, type of surgery, and additional treatments. In this respect, after surgery, 3 patients were treated by chemotherapy, 105 by radiotherapy, and 7 by radio and chemotherapy. Patient survival was measured in months from the day of surgery until the date of death or the end of January 1998. pTNM grading and tumor typing were done according, respectively, to the recommendations of the American Joint Committee for Cancer Staging (6) and the WHO classification (7). Two pathologists (B. M. and J-M. V.) blindly reviewed each tumor in respect to tumor differentiation. A well-differentiated adenocarcinoma was characterized by a pattern with an acinar or papillary organization, or a bronchioalveolar aspect. The remaining adenocarcinomas, such as those with a solid pattern, were classified as poorly differentiated. For squamous cell carcinoma, a well-differentiated tumor typically showed keratinization and/or intercellular bridges. Due to an invasion by cancer cells of the resection margin, 10 adenocarcinomas and 9 squamous cell carcinomas were removed from the study; thus, 227 patients were fully evaluated.

Immunohistochemistry Studies. All reagents were from Sigma (St. Quentin Les Yvelines, France) unless there were other specific indications. For each antibody, the specific working conditions were determined in preliminary experiments. Serial dilutions of antibodies and various experimental

procedures were tried, including each time negative control of the tumor. Then, 10 tumors were tested together in each of the following experiments, first for the detection of the ki-67 antigen (a biological marker related to cell proliferation used as a control) and next for the detection of the other antigens. In all experiments, one section of each of the 10 tested tumors was used as a negative control.

The procedure was as follows: consecutive representative sections of tumor samples embedded in paraffin were deparaffinized in toluene, rinsed in ethanol, and blocked for 30 min with 0.6% hydrogen peroxide in methanol. They were then rinsed again in ethanol and further washed twice in TNT [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 1% v/v Tween 20]. Antigen demasking was carried out in a pressure cooker in which the sections were immersed during 5 min in boiling 1.8 mM citric acid, 9 mM sodium citrate (pH 6.0) before cooling in running tap water and washing in TNT. All sections were then incubated overnight with the specific antibodies prepared in TNT. A (26A2), B (95.3), and H (AB5) antibodies (Pasteur diagnostic, Marne La Coquette, France) were respectively diluted at 1/50, 1/50, and 1/75; c-erb-b2 (CL-CB 11) at 1/100; p53 (DO 7) at 1/200 (both from Novacastra, Newcastle-upon-Tyne, England); Bcl-2 (124) at 1/40 (Dako, Les Ulis, France); Ki-67/HIB-1 at 1/200 (Immunotech, Lumigny, France); and Pan-Ras (Ab-2) at 1/200 (Oncogene Science, Manhasset, MA). All sections were then washed twice for 5 min in TNT and further incubated for 30 min in TNT containing 0.3% albumin w/v. Between each further incubation, two consecutive 5-min washes in TNT were performed. The second biotinylated goat anti-mouse antibody (dilution in TNT: 1/150, Dako) was applied for 30 min. A third 30-min incubation in a TNT solution of peroxidase-conjugated streptavidin (dilution: 1/250, Dako) was followed by a fourth incubation with a tyramide-biotin conjugate as prepared by Plenat *et al.* [Ref. 8; dilution: 1/100 in 200 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM imidazole containing 1 μ l/ml H₂O₂]. A fifth incubation repeated exactly the third incubation described above. The revelation was performed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing diaminobenzidine tetrahydrochloride, 0.6 mg/ml, Brij 35, 0.29 ml, saponin, 10 ml, Tween 20, 0.05 ml, and 0.1% H₂O₂. The sections were finally counterstained in H&E and mounted for microscopic evaluation. Negative controls using isotype-specific polyclonal mouse immunoglobulins instead of primary antibodies showed no evidence of staining. The scoring and interpretation were simultaneously made by the two pathologists without knowledge of the clinical data. Bcl-2, Pan-Ras, c-erb-b2, and A+B+H blood group staining of tumor cells was defined as either present (with a granular staining in cytoplasm and/or cytoplasmic membrane) or absent. p53 staining was graded positive when seen in at least 30% of 1000 tumor cells counted with an optical grid.

Sequencing of Ki-Ras Codons 1-31. As soon as they were removed, the tumors were kept on ice until their arrival in the laboratory. At the same time, a paired piece of healthy parenchyma was also collected from a tissue as further away as possible from the tumor. The specimens were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. From each, DNA was prepared after tissue proteinase K digestion, phenol extraction, and ethanol precipitation as usual. The puri-

fied DNA was then aliquoted in sterile water at 1 mg/ml and kept at 4°C.

Single-stranded PCR products were generated only from adenocarcinoma DNA samples by asymmetric PCR using a pair of primers KA: GACTGAATATAAACTTGTGGTAGT and KB: CTATTGTTGGATCATATTCGTCC. All reactions were performed in 100 μ l containing 10 μ l of PCR mix, 200 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 0.01 mM KB, 0.05 mM KA, 0.1 mg DNA, and 2 μ l of Taq polymerase (Appligene, Strasbourg, France). The PCR consisted of 40 cycles of 45 s at 91°C, 1 min at 60°C, and 1 min at 70°C, including a hot start and a final 10-min extension step. The asymmetric PCR products were ethanol-precipitated at -20°C, rinsed with a 70% ethanol solution, and vacuum-dried for 1 h. Using KB for sequence priming, the single-stranded products were then sequenced by the dideoxy chain termination method with a Sequenase 2.0 kit and an (³⁵S)-labeled deoxyadenosine triphosphate (Amersham, Les Ulis, France) following the manufacturer's protocol. The sequence reactions were resolved by gel electrophoresis in 6% polyacrylamide denaturing gels. When a mutation was observed, the paired healthy parenchyma was analyzed in a similar fashion. The mutations were furthermore confirmed by sequencing following the Sequenase protocol of symmetric PCR products generated from the found mutated DNA samples as above but using 0.01 mM of each KA and KB, 1 ml of Taq polymerase, and only 28 cycles of PCR. The PCR products were first cloned in the pGEM-T Vector System (Promega, Charbonnières, France), and 30% of the recombinant colonies were then systematically sequenced using KB for sequence priming.

Statistical Analysis. The primary goal of this study was to determine separately for each cancer type the predictive significance of each parameter on the overall survival of the patients. All statistical analyses were done on the subset of 227 patients with complete tumor resection (resection margin free of tumor cells), stratified on tumor stage. Due to the very low number of patients with stage IV (two squamous cell carcinomas, four adenocarcinomas), they were pooled with stage IIIB patients. Patient survival was described by a standard Kaplan-Meier estimate stratified on disease staging. If a patient died during the follow-up, patient survival time was censored at the time of death. Medical history, clinical examination, and radiological evaluation were used to determine whether death resulted from recurrent cancer (relapsing patients) or from any other cause. Survivors were defined as free from clinical and radiological local or distant relapse at the end of the follow-up.

The predictive significance of each parameter was then tested univariately in a nonparametric fashion by a generalized Wilcoxon rank test conducted at the 5% level of significance ($P < 0.05$). These analyses were carried out using the Proc Lifetest from the SAS software (SAS Institute, Cary, NC). To quantify any relationship between evaluated parameters, patient survival, and tumor stage, and because no correlation was observed between evaluated parameters and survival in squamous cell carcinoma, a Cox proportional hazard model stratified on tumor stage was used to assess the simultaneous contribution of the different covariates only in adenocarcinoma. The following variables were considered for entering the model: age, sex, tumor staging, smoking history, extent of surgery, positive or negative detection of each tested antigen (except for ki-67),

blood type, and presence of Ki-Ras mutation. The Cox models were carried out using Proc Phreg from the SAS software (SAS Institute) and were developed in a forward fashion based on changes in log-likelihood. Interactions between tumor staging and the different parameters were considered. Possible confounding by the other factors was systematically assessed. The results of the Cox models are given as RR by which the hazard of relapse is multiplied when the factor is present *versus* when it is absent.

RESULTS

Population Description. No patient was lost to follow-up (18–109 months). The main patient characteristics are detailed in Table 1: the male:female ratio was 126:6 in squamous cell carcinoma and 83:12 in adenocarcinoma. Patients with squamous cell carcinoma were slightly older than those with adenocarcinoma (62 *versus* 60 years; $P = 0.21$). Smoking was significantly heavier in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma (43 ± 21 *versus* 37 ± 22 pack/year; $P = 0.04$). In the squamous cell carcinoma group, two males and one female had never smoked, and 58 had quit smoking about 7 ± 1 years before tumor resection. In the adenocarcinoma group, 10 patients had never smoked (4 males and 6 females), and 48 had quit smoking about 9 ± 8 years before surgery. A history of previous cancer was found in 19% of squamous cell carcinoma patients: 8 lung cancers, 10 orolaryngeal cancers, 3 squamous cell skin cancers, and 4 varied primaries. Among adenocarcinoma patients, 15% had had a previous cancer: two lung cancers, six orolaryngeal cancers, three squamous cell skin carcinoma, and three varied primaries resected >15 years before surgery for lung cancer. Preoperative diagnostic biopsies were obtained in 73% of squamous cell carcinomas and 52% of adenocarcinomas due to the fact that these last tumors are more frequently distal. Surgical resection was more extensive (pneumonectomy) for squamous cell carcinoma than for adenocarcinoma: 55% *versus* 32%. Postoperative deaths were more frequent in squamous cell carcinoma (11.6%) than in adenocarcinoma (6.3%) but were not related to the overall survival ($P = 0.1$). Patients with squamous cell carcinoma tended to die more frequently from other causes than lung carcinoma (22% *versus* 15%; $P = 0.28$). All patients with stage III and IV diseases had the same complementary radiotherapy if they survived for at least 60 days after surgery.

As a first step, patient survival was evaluated with respect to pTNM staging using Kaplan-Meier survival curves (Fig. 1) for both squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Low disease staging was found to be a strong predictive factor of a longer overall survival ($P = 0.01$) in both groups of patients. When each group was independently evaluated, a high pTNM staging was still a pejorative prognosis factor (stage I: $P = 0.07$; stage II: $P = 0.15$; stage III: $P = 0.006$; stage IV: $P \leq 0.05$). In squamous cell carcinoma, about two of three patients with stage I and II were alive at, respectively, 60 months and 45 months after surgery, whereas about only one-third of stage III and IV patients were still alive at about, respectively, 42 months and 22 months after surgery. In adenocarcinoma, 40% patients with stage I survived for 60 months, 20% with stage II for 65 months,

Table 1 Population characteristics

	Tumor staging: pTNM				
	I	II	IIIA	IIIB + IV	All stages
Squamous cell carcinoma					
Male ^a	42	24	43	17	126
Female ^a	3	1	0	2	6
Age (yr)	62.96 ± 9.30	60.16 ± 9.50	61.98 ± 9.65	60.74 ± 9.31	61.79 ± 9.41
Tobacco (pack-yr)	45.18 ± 22.35	40.32 ± 20.83	43.12 ± 20.83	37.47 ± 21.58	42.55 ± 20.49
Nonrelated deaths ^a	11	5	11	2	29 (21.97%)
Relapses ^a	10	8	26	11	55 (41.67%)
Survivors ^a	24	12	6	6	48 (36.36%)
Length of survival (mo)	41.55 ± 27.62	38.68 ± 29.52	27.71 ± 27.95	21.95 ± 23	33.68 ± 28.23
Adenocarcinoma					
Male ^a	39	9	22	13	83
Female ^a	7	2	2	1	12
Age (yr)	63.57 ± 9.26	58.45 ± 8.13	58.50 ± 9.45	54.50 ± 9.03	60.36 ± 9.00
Tobacco (pack-yr)	40.07 ± 25.69	30.64 ± 21.91	37.35 ± 13.03	34.29 ± 19.92	37.44 ± 21.84
Nonrelated deaths ^a	6	2	5	1	14 (14.73%)
Relapses ^a	24	6	18	12	60 (63.16%)
Survivors ^a	16	3	1	1	21 (22.11%)
Length of survival (mo)	35.5 ± 24.90	33.55 ± 26.32	19.64 ± 18.95	28.64 ± 29.48	30.26 ± 24.95

^a In number of patients.

10% with stage IIIA for 50 months, and 10% with stage IIIB for 65 months.

Relapses were significantly less frequent in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma: 42% versus 63% ($P = 0.0002$). And this explains, at least in part, the best overall survival of these patients (36% versus 22%; $P \leq 0.05$). This observation led us to separately analyze patients with squamous cell carcinoma versus patients with adenocarcinoma.

ABO blood typing was similar for squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: O group: 41.66% versus 39.36% ($P > 0.05$); A group: 40.90% versus 40.42% ($P > 0.05$); B group: 13.63% versus 13.8% ($P > 0.05$); and AB group: 3.78% versus 6.38% ($P > 0.05$).

Histology and Immunohistochemistry. Squamous cell carcinomas were more often positively stained than adenocarcinomas for the following antigens: Bcl-2 (30% versus 19%), c-erb-b2 (26% versus 13%), p53 (69% versus 47%), and A+B+H (51% versus 31%). Only for Pan-Ras antibodies were adenocarcinomas more frequently stained than squamous cell carcinomas: 35% versus 12%.

In squamous cell carcinoma patients, besides pTNM, no other evaluated parameter had a significant predictive value in respect to survival in the univariate analysis, and no parameter was related to tumor staging or to any other parameter (Table 2). However, it is worth noting that tumor cell staining with A+B+H antibodies (42% tumors) was related to a tendency to have a better prognosis ($P = 0.07$).

In marked contrast, in adenocarcinoma patients, a histologically differentiated tumor was associated with a longer survival ($P = 0.009$; Table 3). Interestingly, while in all adenocarcinoma sections, Bcl-2 was always detected in relation to stromal lymphocytes, and 19% of tumors also showed an associated cytoplasmic membrane staining of the tumor cells; such a positive staining was associated with a longer survival ($P = 0.009$). No other correlation between Bcl-2-tumor-cell-positive staining and any other parameter was observed.

In all adenocarcinoma tumor sections, endothelial cells were positively stained by the mixture of A+B+H antibodies, but a positive tumor cell staining was observed in only 30% of cases, and this staining was associated with a better prognosis ($P = 0.024$). When looking at blood groups, patients with the O blood group had a shorter survival ($P = 0.01$). Interestingly, among 36 patients with the O blood group, 33 had an A+B+H-unstained tumor (in comparison, 23 of 55 squamous cell carcinoma tumors of patients with the O blood group were A+B+H-unstained).

In adenocarcinoma patients, p53 was detected in tumor cells in 47% of the cases and was associated with a tendency to have a poorer survival ($P = 0.07$). When early stages (stage I + stage II) were isolated, p53 tumor staining was associated with a shortened survival (RR, 4.56; 95% CI, 1.89–11). In contrast, positive p53 staining in the late stages of adenocarcinoma (stages IIIA + IIIB and IV) was not related to survival (RR, 0.50; 95% CI, 0.20–1.2).

A positive tumor cell staining with the Pan-Ras antibody was observed in 33% of the adenocarcinomas, and no significant survival pattern was associated with this staining ($P = 0.4$).

Finally, 13% of the adenocarcinomas were positively stained (overexpression) with the c-erb-b2 antibody, but this staining did not affect patient survival ($P = 0.34$).

Mutations in Ki-Ras Codons 1–31 in Lung Primary Adenocarcinoma. Among the 81 tumors evaluated for point mutations in Ki-Ras codons 1–31, 12 gene mutations were found. In respect to codon 12, six point mutations of the normal GTT (glycine) sequence to GTG (cysteine) were observed, a mutation to GTC (valine) was observed twice (Fig. 2, panels 1, 2, and 3), and one glycine-to-cysteine mutation was associated with a codon 8 TCC-to-TAC mutation (Fig. 2, panel 4). Three other point mutations were observed: twice at codon 14 (GCT to GAT) and once at codon 15 (TAC to TAT; Fig. 2, panels 5 and 6). In all cases, no mutation was observed in the paired normal parenchyma.

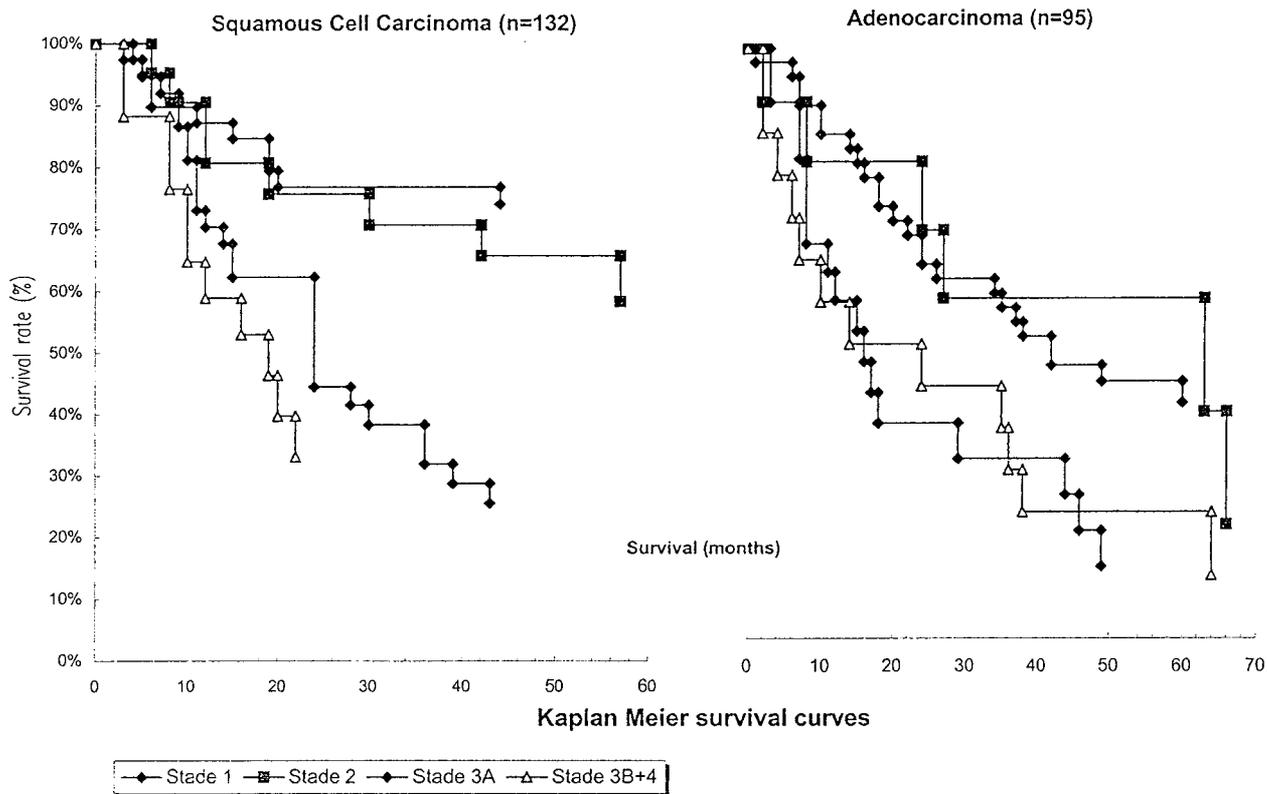


Fig. 1 Kaplan-Meier survival curves. Survival curves were constructed using the Kaplan-Meier classical method, and they included the 227 patients. Cumulative survival is expressed as a percentage, and survival is expressed in months as described in "Materials and Methods."

The sequencing of the cloned symmetric PCR products confirmed in each case the mutations found within the asymmetric PCR products (Fig. 2, panels 1, 2, and 3). Only three patients had both a positive Pan-Ras tumor staining and a Ki-Ras point mutation: once a glycine-to-cysteine mutation, once a codon 14 mutation, and once a codon 15 mutation. Ki-Ras mutations were found in early or late stage diseases (as well as in relapsing patients and in one long survivor) but only in smokers. The Ki-Ras mutations were not predictive markers of a shorter survival ($P = 0.26$).

Cox Models. In the Cox proportional hazard models stratified on tumor staging (Table 4), the stepwise selection procedure resulted in the inclusion of different markers, demonstrating that a high histological degree of tumor differentiation, a positive Bcl-2 tumor cell staining, and an A+B+H-positive tumor cell staining were three independent indicators of longer survival, whereas an O blood group was a pejorative marker in model A. Two alternate models (B and C) with interaction are also shown in Table 4. They demonstrate a shorter survival related to a p53 tumor positive staining in patients with limited (stages I and II) diseases.

DISCUSSION

An exhaustive review of the literature on lung cancer predictive markers is beyond the scope of this report. Only studies directly relevant to this work will be discussed. The

5-year survival rate for all NSCLC combined stages is only 13%, but it reaches 47% for surgically treated early stages. Thus, the presence of a resectable disease is the most commonly used prognostic marker in NSCLC (9). However, one-half of the patients with resected stage I and II tumors will relapse, suggesting different levels of tumor virulence among the same pTNM cases. A large variety of factors has been evaluated to define, among these patients, those with a bad prognosis. Strauss (3) recently reviewed them, underlying the numerous but often conflicting results. The importance of the tumor size and of a careful tumor staging has been constantly recognized as an important prognosis marker, as well as histological typing: patients with a squamous cell carcinoma have a significant lower relapse rate than those with adenocarcinoma (3). A longer survival is also associated with a differentiated adenocarcinoma (3); no clear result for squamous cell carcinoma has been shown in this respect.

In a study of 271 consecutive patients with stage I NSCLC, Harpole *et al.* (10) reported that the male sex was a significant univariate predictor of early recurrence. We also found, in the univariate analysis, that females with resected adenocarcinoma were more likely to survive longer than males, but this was not confirmed after the Cox model building due to the small number of women in this study.

The antigens evaluated in this study are the most often reported in the literature as of prognostic importance, mainly

Table 2 Squamous cell lung carcinoma: predicative significance of each parameter

Tumor cell staining	Covariates					No. of patients	P
	Death from other causes	Survivors	Relapses	Survival (mo)			
Differentiation ^a							
+	16	31	30	39.90 ± 30.50	77	0.30	
-	13	17	25	24.97 ± 22.16	55		
Bcl-2 ^b							
+	13	12	14	30.02 ± 28.04	39	0.99	
-	16	35	41	34.61 ± 27.86	92		
ABH antigens ^b							
+	16	27	25	37.41 ± 29.55	68	0.074	
-	13	21	30	29.71 ± 26.40	64		
p53 ^b							
+	19	34	38	34.73 ± 28.45	91	0.66	
-	10	14	17	31.34 ± 27.93	41		
Pan-Ras ^b							
+	2	8	6	39.28 ± 26.78	16	0.38	
-	27	40	49	32.91 ± 28.45	116		
C-erbB2 ^b							
+	7	12	16	32.45 ± 27.32	35	0.83	
-	22	36	39	34.12 ± 28.67	97		
Blood types							
O	9	24	22	38.71 ± 26.89	55	0.20	
B	4	6	8	37.22 ± 29.97	18	0.74	
A	15	14	25	25.23 ± 26.46	54	0.08	
AB	1	4	0	56.80 ± 34.79	5	0.056	
Sex							
Male	28	53	45	33.70 ± 28.4	126	0.66	
Female	1	3	2	34.00 ± 27.7	6		

^a Tumor histological subtyping: +, well-differentiated; -, moderately or poorly differentiated.

^b Immunohistochemistry: +, positive tumor staining; -, negative tumor staining.

^c Univariate Wilcoxon rank test pooled over tumor stage.

due to their overexpression. To avoid patient recruitment bias, a large patient population of consecutive and carefully staged patients with complete tumor resection was included. All tumors were diagnosed, treated, and followed up in the same institution by the same medical team with the same surgeon, and the biological studies on tumors were done by the same research team; furthermore, to increase the performance of immunohistochemistry, a tyramide-biotin amplification step was carried out, whereas ki-67 antigen detection was used as an internal control of an efficient antigen retrieval for each tumor. This was important to demask the antigens in tissues fixed in formaldehyde for the oldest archived biopsies (from 1988 to 1990).

Bcl-2 is the acronym of the B-Cell Lymphoma/Leukemia-2 gene mapping on chromosome 18q21. The involvement of Bcl-2 through apoptosis dysregulation in cancer development is based on the observation that genetic translocation or transgenic manipulation causing overexpression of Bcl-2 may induce the development of lymphomas. Bcl-2 is abnormally expressed in >50% of SCLCs with no prognosis value (11), but Pezzella *et al.* (12) showed that a lower malignancy was associated with a Bcl-2-positive staining in NSCLC in patients with stage I and II tumors: 20 of 80 squamous cell carcinomas and 5 of 42 adenocarcinomas. In our study, 39 of 92 squamous cell carcinomas were positively stained as well as 18 of 77 adenocarcinomas. Ohsaki *et al.* (13) and Fontanini *et al.* (14) confirmed Pezzella's findings in NSCLC. The association of Bcl-2 overexpression in adenocarcinoma with a better survival is surprising because Bcl-2 is thought to be an oncogene with antiapoptotic activity.

However, Bcl-2 phosphorylation results in the loss of its antiapoptotic function; therefore, high phosphorylated Bcl-2 levels may not prevent apoptosis. Unfortunately, phosphorylation is not detectable by immunohistochemistry. Another possible explanation is related to the involvement of other members of the ever-growing Bcl-2 family, such as Bax (a gene that encodes a dominant inhibitor of Bcl-2) and Bcl-x, because Bcl-2 is not *per se* the critical factor of susceptibility to an apoptotic stimulus. Furthermore, the Bcl-2:Bax ratio may be important (15). Finally, a potential role of Bcl-2 as an inhibitor of tumor angiogenesis has been recently described in NSCLC (16). Taken together, these studies and our work indicate that Bcl-2-positive immunostaining can be used for the everyday assessment of adenocarcinoma patients. This proposal is strengthened by the fact that the test is inexpensive and easy to perform, and the constant staining of stromal lymphocytes is an internal quality control.

A, B, and H blood group antigens are expressed, not only by erythrocytes, but also by several other tissues, including some epithelial and endothelial cells. These antigens also exist as water soluble molecules whose expression is determined by the secretor locus. A precursor oligosaccharide is first fucosylated by a (1, 2) fucosyl transferase encoded by the H blood group locus (or the secretor locus). The resulting H molecule is then the substrate of the glycosyltransferases encoded by the A or the B blood group loci, leading to, respectively, the A and B blood group antigenic determinants (17). These antigens and other blood group carbohydrates have a biological relevance

Table 3 Lung adenocarcinoma: predictive significance of each parameter

Tumor cell staining	Covariates					No. of patients	P
	Death from other causes	Survivors	Relapses	Survival (mo)			
Differentiation ^a							
+	4	25	31	36 ± 25	60	0.009	
-	7	6	22	20.56 ± 22.69	35		
Bcl-2 ^b							
+	4	7	7	41.60 ± 28.91	18	0.009	
-	10	14	53	27.60 ± 23.35	77		
ABH antigens ^b							
+	6	6	17	33.19 ± 22.44	29	0.024	
-	8	15	42	29.30 ± 26.09	65		
p53 ^b							
+	5	5	34	27.53 ± 24.30	44	0.076	
-	9	16	25	32.50 ± 25.75	50		
Pan-Ras ^b							
+	5	7	20	22.81 ± 18.11	32	0.43	
-	9	14	39	23.85 ± 19.27	62		
Ki-RAS mutations							
+	2	1	4	24.13 ± 18.85	12	0.34	
-	12	20	56	18.56 ± 18.19	83		
C-erbB2 ^b							
+	2	4	6	35.05 ± 32.67	12	0.34	
-	12	17	54	29.56 ± 23.80	83		
Blood types							
O	6	7	24	23.09 ± 25.52	37	0.018	
B	1	4	8	42.38 ± 28.03	13	0.32	
A	5	6	27	31.58 ± 20.02	38	0.39	
AB	2	3	1	33.17 ± 32.52	6	0.26	
Sex							
Male	12	17	54	28.17 ± 24.36	83	0.0014	
Female	2	4	6	44.69 ± 25.21	12		

^a Tumor histological subtyping: +, well-differentiated; -, moderately or poorly differentiated.

^b Immunohistochemistry: +, positive tumor staining; -, negative tumor staining.

^c Univariate Wilcoxon rank test pooled over tumor stage.

that exceeds their roles in blood transfusion. Lee *et al.* (18) reported that blood A group antigen expression by tumor cells in NSCLC was strongly correlated with a longer survival when tumor samples were examined at the earliest stage of development (61% of positively stained tumors). Matsumoto *et al.* (19) found a correlation between the metastatic potential of NSCLC and the loss of blood group antigen expression (46% of positively stained tumors). In our study, a positively stained tumor was associated with a tendency to a better prognosis in squamous cell carcinoma and with a clear-cut better prognosis in adenocarcinoma. The A and B antigen deletions observed in most adenocarcinoma could be related to the loss of the short arm of chromosome 9 frequently observed in NSCLC (20) because the transferase genes are located on 9p34. Furthermore, the fucosyl transferase III, encoded by the Lewis blood group located on 19p13.3, may use the secretor H determinant to synthesize the Lewis blood group antigens. The Sialyl Lewis antigen is a ligand for the E-selectin receptor, and its expression has been related to the metastatic potential of cancer cells in some studies but not in others (for review, see Ref. 21). In adenocarcinoma patients with the O blood group, the accumulation of transformed H determinants or Sialyl Lewis antigens may explain our findings of a shortened survival in these patients. However, H determinant transformation is difficult to prove because we used an anti-H monoclonal antibody without a defined antigen specificity. Moreover, a comparison with the

previous findings of Lee *et al.* (18) are difficult because Ulex Europaeus agglutinin I was used in their study for H antigen detection. Other fucosyl transferases may participate in the biosynthesis of Sialyl Lewis antigen and thus play a role in the E-selectin receptor-mediated modulation of the metastatic potential. Interestingly, the survival of patients whose adenocarcinoma strongly expressed fucosyl IV and VI transferases was shown to be significantly shortened (22). Our findings confirm that, in lung adenocarcinoma, an O blood type is a pejorative marker, whereas a positive A+B+H antigen staining by tumor cells is associated with a better survival. In a similar fashion as for Bcl-2, this test is cheap and easy to perform, and the always positive staining of blood vessel cells can be used as an internal quality control.

Mutations of the P53 gene (mapping at 17p13) often result in the production of a p53 protein with an increased stability that explains a positive immunohistochemical staining in mutant cells, in contrast to cells containing the P53 wild type which, generally are not stained due to the shorter life of the wild p53 protein. Although the mutations resulting in p53 immunostaining are frequent enough to allow this technique to be of some practical value, a negative immunostaining does not rule out P53 mutations. Indeed, Casey *et al.* (23) demonstrated that DNA sequence analysis of all P53 exons with p53 immunostaining are both required to detect all known P53 alterations with a high concordance between the presence of P53 missense

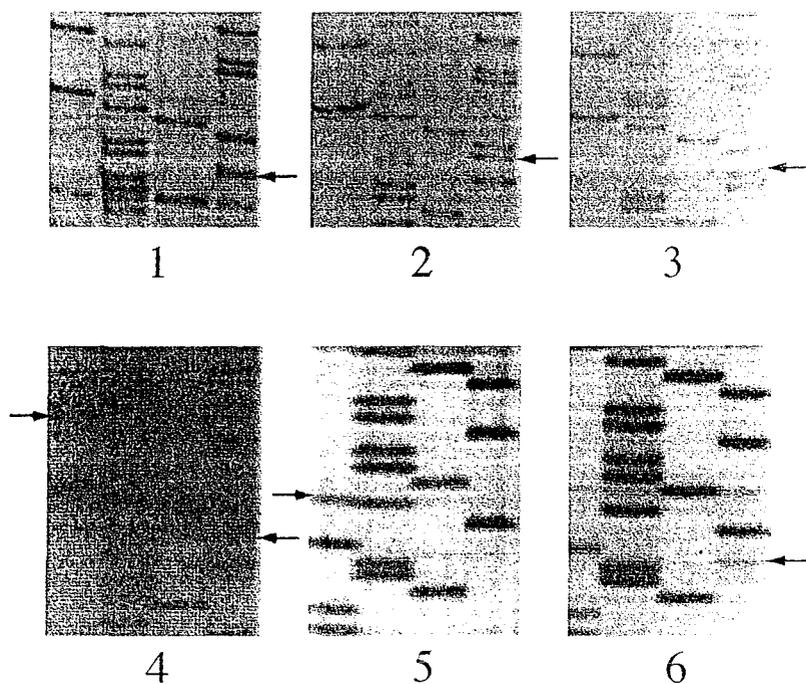


Fig. 2 Sequencing of *Ki-RAS* in adenocarcinoma. Sequencing of *Ki-RAS* cloned symmetric PCR products [*panel 1*, normal codon 12, GTT (glycine); *panel 2*, mutated codon 12, GTG (cysteine); *panel 3*, mutated codon 12, GTC (valine)] and sequencing of *Ki-RAS* asymmetric PCR products [*panel 4*, codon 8 mutation (TCC to TAC) + codon 12 cysteine mutation; *panel 5*, codon 14 mutation from GCT to GAT; and *panel 6*, codon 15 mutation from TAC to TAT].

Table 4 Lung adenocarcinoma: Cox proportional hazard models stratified on tumor staging

	Covariates		
	Univariate Cox model RR and 95% CI	Selected multiple Cox models with interaction: RR and 95% CI	
		A	B
Differentiation ^a	0.41 (0.23–0.72)	0.33 (0.17–0.63)	0.41 (0.22–0.78)
Bcl-2 ^b	0.41 (0.18–0.90)	0.32 (0.14–0.74)	0.33 (0.13–0.79)
A + B + H Antigens ^b	0.66 (0.37–1.19)		0.40 (0.21–0.77)
p53 ^b	1.75 (0.99–3.08)	4.56 (1.89–11) ^c	4.50 (1.89–10.7) ^c
Blood group	1.54 (0.90–2.63)	0.50 (0.20–1.2) ^d	0.45 (0.18–1.13) ^d
		3.01 (1.61–5.64)	

^a Well-differentiated tumors.

^b Positively stained tumor cells.

^c Stages I and II.

^d Stages III and IV.

mutations and positive immunostaining. P53 mutations are known to occur in about one-half of all cancers, and likewise, in one-half of NSCLCs (24). The predictive survival value of these mutations is not formally due to conflicting published data (3). The tumors of about 46% of our patients with adenocarcinoma were positively stained for p53, and a pejorative prognostic value was associated with this staining in early stage diseases (stages I and II). These results are very close to those reported by Nishio *et al.* (25), but other results have been reported (21).

The *c-erb-b2* proto-oncogene, located on chromosome 17 q21, encodes for a 185-kDa transmembrane protein having an intrinsic tyrosine kinase activity and sharing an extensive sequence homology with the epidermal growth factor receptor. In the normal lung, *c-erb-b2* is expressed, at low levels, by ciliated cells, type II pneumocytes, and bronchial submucosal glands.

Furthermore, *c-erb-b2* gene amplification and protein overexpression have been observed in a variety of epithelial tumor locations, including breast, bladder, and NSCLC. In NSCLC, *c-erb-b2* protein overexpression has been linked to a poor prognosis, especially when associated with *Ki-Ras* mutations (26). However, other studies found opposite results (27). The overall interpretation of all published results is difficult because some authors distinguish a cytoplasmic staining from a membranous one, the cutoff values for positive results can vary, and finally, different antibodies have been used. We used the CL-CB11 antibody that recognizes the internal domain of the *c-erb-b2* protein and mainly stains the cytoplasm on paraffin-embedded tissue sections. As recently shown with the same antibody (28), a positive tumor staining is not related to a shortened survival. In an extensive study performed by Pfeiffer *et al.* (29) on

cryostat lung cancer sections with an another antibody, the same lack of prognostic significance was observed.

The transforming potential of *RAS* oncogenes can be due to a single amino acid substitution of the Ras proteins related to cell growth regulation. Point mutations are found in ~30% human tumors. For Slebos *et al.* (30), Ki-Ras mutation is the single most important pejorative prognostic marker in lung adenocarcinoma after adjustment for disease staging. Several mutations have been reported, including codons 13, 18, and 61 but also codon 61 of *N-Ras*, and such mutations have been shown in 21% of squamous cell carcinomas and 14% of large cell carcinomas (31). Rosell *et al.* (32) found Ki-Ras mutations of codons 12, 13, and 61 in about 26% of adenocarcinomas. However, Reynolds *et al.* (33) reported that 86% of lung cancer DNA from smokers contained activated proto-oncogenes related to the *RAS* family; and 30–40% with a Ki-Ras point mutation. Furthermore, Clements *et al.* (34) found Ki-Ras mutations in the healthy parenchyma of patients with lung tumors, but also in the normal lung of smokers without malignancy. Differences in patient sampling and the techniques used to detect the mutations most likely account for some reported discrepancies among these studies; however, direct asymmetric PCR product sequencing and confirmation by classical PCR, as carried out in this study, although not an easy procedure for screening, remain the gold standard techniques for such studies. In respect to our work, codon 61 was not specifically analyzed for activating mutations, and this may contribute to the absence of correlation between Ras mutations and survival. Generally speaking, European groups tend to associate a significant prognostic value to Ki-Ras mutations, whereas United States studies suggest the type of mutation to be a better prognostic indicator than the simple presence of mutations (35). Obviously, studies with larger patient populations are needed to help answer this question.

The previously published Pan-Ras antigen expression analysis by immunohistochemistry yielded somewhat different results from ours: >70% of adenocarcinomas were found to be positive, and a strong staining was associated with more advanced diseases (36). In our study, a positive staining was less frequent and was not associated with a shortened survival either in squamous cell carcinoma or in adenocarcinoma. Furthermore, a positive staining was not related to a specific Ki-Ras-specific genotype, but it was mostly associated with *Ha-Ras* amplification previously detected (and published) by *in situ* hybridization in some tumors (37).

In conclusion, most previous reports on predictive markers of lung cancer usually emphasize only positive results and forget negative ones. The importance of this fact is well illustrated in this study in the case of squamous cell carcinoma. We suggest that, in lung adenocarcinoma, some molecular markers can be evaluated for the follow-up of the patient including: (a) histological tumor differentiation, (b) Bcl-2, (c) A+B+H blood group antigen, and (d) p53 tumor cell staining (but p53 immunostaining does not necessarily correlate with mutations in this tumor suppressor gene), as well as (e) O blood group type. This observation is confirmed by the report by Kwiatkowski *et al.* (38) of a prospective study of 244 stage I and II NSCLCs using some similar markers. Although their study, in comparison to ours, did not involve other disease stages, included large cell

carcinomas, did not involve other Ki-Ras mutations than those involving codon 12, and detected only A blood group antigen presence in carcinoma cells (with no details about patient blood types), their findings, in a Cox model, are closer to ours in respect to the good predictive value of Bcl-2 expression, tumor differentiation, with the presence of mucin, and early tumor staging. Furthermore, a shortened survival was associated with p53 expression by tumor cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the help of Véronique Bannerot, Françoise Duflost, and all physicians for careful assistance in helping with the follow-up of their patients.

REFERENCES

1. El-Torky, M., El-Zeky, F., and Hall, J. Significant changes in the distribution of histology types of lung cancer: a review of 4928 cases. *Cancer (Phila.)*, 65: 2361–2367, 1990.
2. Dev, D., Capewell, S., Sankaran, R., Lamb, D., and Sudlow, N. F. Adenocarcinoma of the lung. Clinical features and survival. *Respir. Med.*, 90: 333–337, 1996.
3. Sundaresan, V., Ganly, P., Hasleton, P., Rudd, R., Sinha, G., Bleeher, N. M., and Rabbits, P. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumors, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene*, 7: 1989–1997, 1992.
4. Kishimoto, Y., Sugio, K., Hung, J., Virmani, A. K., McIntire, D., Minna, J. D., and Gazdar, A. Allele specific loss in chromosome 9 p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small cell lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 1224–1230, 1995.
5. Strauss, G. M. Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 11: 409–434, 1997.
6. Mountain, C. F. A new international staging system for lung cancer. *Chest*, 89: 225S–233S, 1986.
7. World Health Organization. *Histological Typing of Lung Tumors*, 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1981.
8. Plenat, F., Picard, E., Antunes, L., Vignaud, J.-M., Marie, B., Chablayesse, P., and Muhale, F. L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réactions de dérivés de la tyramine. *Ann Pathol.*, 1: 17–23, 1997.
9. Flehinger, B. S., Kimmel, M., and Melamed, M. R. The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer; Implication for screening. *Chest*, 101: 1013–1018, 1992.
10. Harpole, D. H., Herndon, J. E., Wolfe, W. G., Iglehart, J. D., and Marks, J. R. A prognostic model of recurrence and death in stage I NSCLC utilizing presentation, histopathology and oncoprotein expression. *Cancer Res.*, 55: 51–56, 1995.
11. Jiang, S. X., Sato, Y., Kuwano, S., and Kameya, T. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J. Pathol.*, 177: 135–138, 1995.
12. Pezzella, F., Turley, H., Kuzu, I., Tungekar, M. F., Dunnill, M. S., Pierce, C. B., Harris, A., Gatter, K. C., and Mason, D. M. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 329: 690–694, 1993.
13. Ohsaki, Y., Toyoschima, E., Fujiuchi, S., Matsui, H., Hirata, S., Miyokawa, N., Kubo, Y., and Kikuchi, K. Bcl-2 and p53 protein expression in non-small cell lung cancers: correlation with survival time. *Clin. Cancer Res.*, 2: 915–920, 1996.
14. Fontanini, G., Vignati, S., Bigini, D., Mussi, A., Lucchi, M., Angeletti, C. A., Basolo, F., and Bevilacqua, G. Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, 71: 1003–1007, 1995.
15. Reed, J. C. Double identity for proteins of the bcl-2 family. *Nature (Lond.)*, 387: 773–776, 1997.
16. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., O'Byrne, K. J., Whitehouse, R. N., Talbot, D. C., Gatter, K. C., and Harris, A. L. Potential role

of Bcl-2 as a suppressor of tumor angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 74: 565-570, 1997.

17. Oriol, R., Le pendu, J., and Mollicone, R. Genetics of ABO, H. Lewis X and related antigens. *Vox Sang.*, 51: 161-171, 1986.
18. Lee, J. S., Ro, J. Y., Sahin, A. A., Hong, W. K., Brown, B. W., Mountain, C. F., and Hittelman, W. N. Expression of blood-group antigen A: A favorable prognostic factor in non-small cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 324: 1084-1090, 1991.
19. Matsumoto, H., Muramatsu, H., and Shimotakahra, T. Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas. *Cancer (Phila.)*, 72: 75-81, 1993.
20. Martinet, Y., Brambilla, E., Martin, J-P., Martinet, N., and Vignaud, J-M. Biological basis of lung cancer prevention. *Med. Sci.*, 13: 1465-1471, 1997.
21. Greatens, T. M., Nighans, G. A., Rubins, J. B., Jessuru, N. J., Kratzke, R. A., Maddaus, M. A., and Niewoehnel, D. E. Do molecular markers predict survival in NSCLC? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157: 1093-1097, 1998.
22. Ogawa, J. I., Inoue, H., and Koide, S. Expression of a-1,3-fucosyl-transferase type IV and VII genes is related to poor prognosis in lung cancer. *Cancer Res.*, 56: 325-329, 1996.
23. Casey, G., Lopez, M. E., Ramos, J. C., Plummer, S. J., Arboleda, M. J., Shaughnessy, M., Karlan, A., and Slamon, D. J. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene*, 13: 1971-1981, 1996.
24. Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J., Rosenberg, R. K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, A., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science (Washington DC)*, 246: 491-499, 1989.
25. Nishio, M., Koshikawa, T., and Kuroishi, T. Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary resected NSCLC. *J. Clin. Oncol.*, 14: 497-502, 1996.
26. Kern, J. A., Slebos, R. J. C., Top, B., Rodenhuis, S., Lager, D., Robinson, R. A., Weiner, D., and Schwartz, A. C-erbB-2 expression and codon 12 k-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J. Clin. Invest.*, 93: 516-520, 1994.
27. Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S., and Sugimachi, K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 27: 1372-1375, 1991.
28. Giatromanolaki, A., Gorgoulis, V., Chetty, R., Koukourakis, M. I., Whitehouse, R., Kittas, C., Veslemes, M., Gatter, K. C., and Iordanoglou, I. C-erbB-2 oncoprotein expression in operable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.*, 16: 987-994, 1996.
29. Pfeiffer, P., Clausen, P. P., Andersen, K., and Rose, C. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185^{her-2} in patients with systemically untreated non-small cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br. J. Cancer*, 74: 86-91, 1996.
30. Slebos, R. J. C., Kibbelaar, R. E. O., Dalesio, A., Kooistra, A. J., Stam, C. J. L., Meijer, M., Wagenaar, R. G., Vanderschueren, J. R. A., Zandwijk, N., Mooi, W. J., Bos, J. L., and Rodenhuis, S. Ki-RAS oncogene activation as a prognosis marker in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.*, 10: 561-565, 1990.
31. Suzuki, Y., Orita, M., Shiraisi, M., Hayashi, K., and Sekiya, T. Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single strand conformational polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*, 5: 1037-1043, 1990.
32. Rosell, R., Li, S., Skacel, Z., Mate, J. L., Maestre, J., Canela, M., Tolosa, E., Armengol, P., Barnadas, A., and Ariza, A. Prognostic impact of mutated k-ras gene in surgically resected non small cell lung cancer patients. *Oncogene*, 8: 2407-2412, 1993.
33. Reynolds, S. H., Anna, C. K., Brown, K. C., Wiest, J. S., Beattie, E. J., Pero, R. W., Iglehart, J. D., and Anderson, M. W. Activated proto-oncogenes in human lung tumors from smokers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1085-1089, 1991.
34. Clements, N. C., J. R., Nelson, M. A., Wymer, J. A., Savage, C., Aguire, M., and Garewal, H. Analysis of K-ras gene mutations in malignant and nonmalignant endobronchial tissue obtained by fiberoptic bronchoscopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152: 1374-1378, 1995.
35. Rosell, R., Monzo, M., Pifarre, A., Ariza, A., Sanchez, J. J., Moreno, I., Maurel, J., Lopez, M. P., Abad, A., and Maria de Anta, J. Molecular staging of NSCLC according to K-ras genotypes. *Clin. Cancer Res.*, 2: 1083-1086, 1996.
36. Harada, M., Dosaka-Akita, H., Miyamoto, H., Kuzumaki, N., and Kawakami, Y. Prognostic significance of the expression of ras oncogene product in non-small cell lung cancer. *Cancer (Phila.)*, 69: 72-77, 1992.
37. Klein, N., Vignaud, J-M., Sadmi, M., Plenat, F., Borrelly, J., Duprez, A., Martinet, Y., and Martinet, N. Squamous metaplasia expression of proto-oncogenes and p53 in lung cancer patients. *Lab. Invest.*, 68: 26-32, 1993.
38. Kwiatkowski, D. J., Harpole, D. H., Godleski, J., Jr., Herndon, J. E., II, Shieh, D. B., Richards, P., Blanco, R., Xu, H. J., Strauss, G. M., and Sugarbaker, D. J., Molecular pathologic substaging in 244 stage I Non-small-cell lung cancer patients: Clinical implications. *J. Clin. Oncol.*, 16: 2468-2477, 1998.

Etude des marqueurs pronostiques des carcinomes bronchiques non à petites cellules

P. Scheid, J. Moldvay, P. Wild, K. Nabil, J. Borrelly, B. Marie, G. Farré, T. Labib, G. Pottier, R. Sesboüé, C. Bronnner, J.M. Vignaud, Y. Martinet, N. Martinet.
Predictive survival markers for resected non-small-cell lung carcinoma.
Clin Cancer Res 2000; 6:1125-1134.

I. Matériels et méthodes

1. Population étudiée

Nous avons étudié 227 cas de CBNPC, 132 carcinomes épidermoïdes et 95 adénocarcinomes, opérés entre 1988 et 1996, dont l'exérèse chirurgicale était complète, sans métastase à distance. Les caractéristiques cliniques de cette population ont été recueillies : âge, sexe, tabagisme, exposition professionnelle, antécédents de cancer, groupe sanguin, stade d'extension TNM, traitement complémentaire chimiothérapique et/ou radiothérapique, durée de survie (mesurée en mois à partir du jour de l'intervention chirurgicale) et causes de décès soit liées au CBNPC (réévolution locale, métastase) soit à une autre cause.

2. Etude immunohistochimique des tumeurs

Dans ce travail, toutes les tumeurs sont préalablement étudiées pour l'expression de l'antigène Ki-67 (Immunotech, Lumigny, France) utilisé comme contrôle positif de la prolifération tumorale. Puis les tumeurs sont étudiées pour l'expression des antigènes *Bcl2* (Dako, Les Ulis, France), *c-erb-b2* (Novacastra, Newcastle-upon-Tyne, UK), *p53* (Novacastra, Newcastle upon Tyne, UK), des groupes sanguins A B et H (Pasteur diagnostic, Marne la Coquette, France), *pan-ras* (Oncogene science, Manhasset, MA).

La procédure comporte successivement :

- le déparaffinage des coupes par le toluène, puis rinçage à l'éthanol et fixation dans le méthanol à 0,6 % de peroxyde d'hydrogène
- le rinçage dans un Tampon Tris-HCl (pH=7,4 + Tween 20 1 % V/V) (TTT) et l'immersion pour 5 à 15 minutes selon les anticorps dans un tampon citrate (1,8 mM d'acide citrique, 9 mM de citrate de sodium, pH à 6,0) bouillant en cocotte minute,
- l'incubation, après rinçage dans le TTT à +4°C avec les anticorps spécifiques de *Bcl2*, *c-erb-b2*, p53, A+B+H, pan-*ras*, aux dilutions qui ont été définies par une mise au point préliminaire ; puis rinçage dans le TTT,
- l'immersion dans un tampon Tris HCl additionné d'albumine 0,3 % W/V qui servira ensuite de rinçage entre les étapes suivantes,
- l'incubation 30 minutes avec le deuxième anticorps de chèvre biotinylé anti-souris (dako) au 1/150^e,
- l'incubation 30 minutes avec une solution de peroxydase-streptavidine au 1/250^e suivie d'une immersion dans une solution de biotine-tyramine au 1/100^e dans le Tris HCl; cette double étape est répétée une fois,
- la révélation terminale est effectuée par une incubation dans une solution de diaminobenzidine tetrahydrochloride,
- une contre coloration hématoxyline suivie d'un rinçage dans l'éthanol et le toluène avant montage pour lecture.

Pour les antigènes *Bcl2*, *c-erb-B2*, A+B+H, pan-*ras*, le résultat est, soit positif si on constate la présence d'un marquage granuleux dans le cytoplasme et/ou sur la membrane cytoplasmique, soit négatif. Pour p53 le résultat est positif si le marquage nucléaire est retrouvé dans au moins 30 % des cellules tumorales.

3. Etude des mutations du codon 12 du gène K-ras dans les adénocarcinomes

Après chaque intervention chirurgicale on prélève sur la pièce opératoire un fragment tumoral et un fragment de parenchyme sain correspondant qui sont placés à -80°C jusqu'à utilisation. A partir de chaque échantillon une extraction de l'ADN sera effectuée selon une technique classique protéinase K/phénol/chloroforme et l'ADN sera conservé à $+4^{\circ}\text{C}$.

Une amplification de l'ADN par PCR asymétrique est réalisée avec les amorces A: GACTGAATATAAACTTGTGGTAGT (50pM), B: CTATTGTTGGATCATATTCGTCC (10pM), 0,1mg d'ADN, dans 100 μl [(DNTP 200mM de chaque ; Mix 10 μl ; 2 μl de Taq polymérase (Appligène, Strasbourg, France)], sur 40 cycles comportant une dénaturation de 45 sec à 91°C , un appariement de 1 min à 60°C , une élongation de 1 min à 70°C , avec une dénaturation initiale de 10 min à 94°C et une élongation terminale de 10 min à 70°C . Les produits de PCR sont précipités dans l'éthanol à -20°C puis rincés dans l'éthanol à 70% puis séchés et resuspendus dans l'eau.

Le séquençage de l'ADN de l'exon 1 du gène K-ras de part et d'autre du codon 12 est réalisé à partir de l'amorce B en utilisant le kit sequenase 2.0 et un marquage d'ATP-S³⁵ (Amersham, les Ulis, France). La révélation des séquences se fait par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 6% dénaturant. Lorsqu'une mutation est observée, le parenchyme sain correspondant est analysé selon la même technique.

4. Etude statistique

L'objectif principal de cette étude est de déterminer la valeur pronostique de chaque paramètre sur la survie. Les analyses statistiques ont été stratifiées sur le stade d'extension TNM, les stades IIIB et IV (en faible nombres), ayant été regroupés. La survie des patients a été décrite par une courbe de survie de type Kaplan-Meier stratifiée sur le stade d'extension. La valeur pronostique de chaque paramètre a été évaluée par un test de Wilcoxon avec un

intervalle confiance de 5 % ($p < 0,05$). De plus une analyse multivariée stratifiée sur le stade d'extension a été réalisée pour évaluer la contribution des différents facteurs pour les adénocarcinomes.

II. *Les résultats*

1. *Description de la population.*

Le suivi de cette population de 227 sujets a été effectué sur une durée de 18 à 109 mois. Il s'agit majoritairement d'hommes, avec un sexe ratio trois fois supérieur pour les carcinomes épidermoïdes (CE) par rapport aux adénocarcinomes (ADK) (21 vs 6,9), au tabagisme un peu supérieur dans le groupe CE.

On relève dans le groupe CE, par rapport aux ADK, une fréquence supérieure d'antécédents de cancers du poumon (8 vs 2), de cancers oropharyngés (10 vs 6), de pneumonectomies plus fréquentes (55% vs 22%), de mortalité post-opératoire supérieure (11,6% vs 6,3%), de décès d'autres causes que le CBNPC (22% vs 15%) sans pour autant de corrélation avec la survie.

Un stade d'extension TNM faible (I, II) est un facteur de pronostic de longue survie ($p=0,01$) avec une survie globale meilleure dans le groupe des CE ($p < 0,05$) vraisemblablement liée à la fréquence supérieure des rechutes dans le groupe des ADK (63% vs 42%; $p=0,0002$).

Le détail des données apparaît au tableau n°12 et la courbe de survie de Kaplan Meier apparaît en figure n°12.

2. *Histologie et marqueurs immunohistochimiques*

Globalement les CE présentent un marquage immunohistochimique plus fréquent pour l'ensemble des antigènes testés : *Bcl2* (30% vs 19%), *c-erb-b2* (26% vs 13%), *p53* (69% vs

Tableau n°12 : Caractéristiques de la population de CBNPC étudiée pour la recherche des marqueurs de pronostic

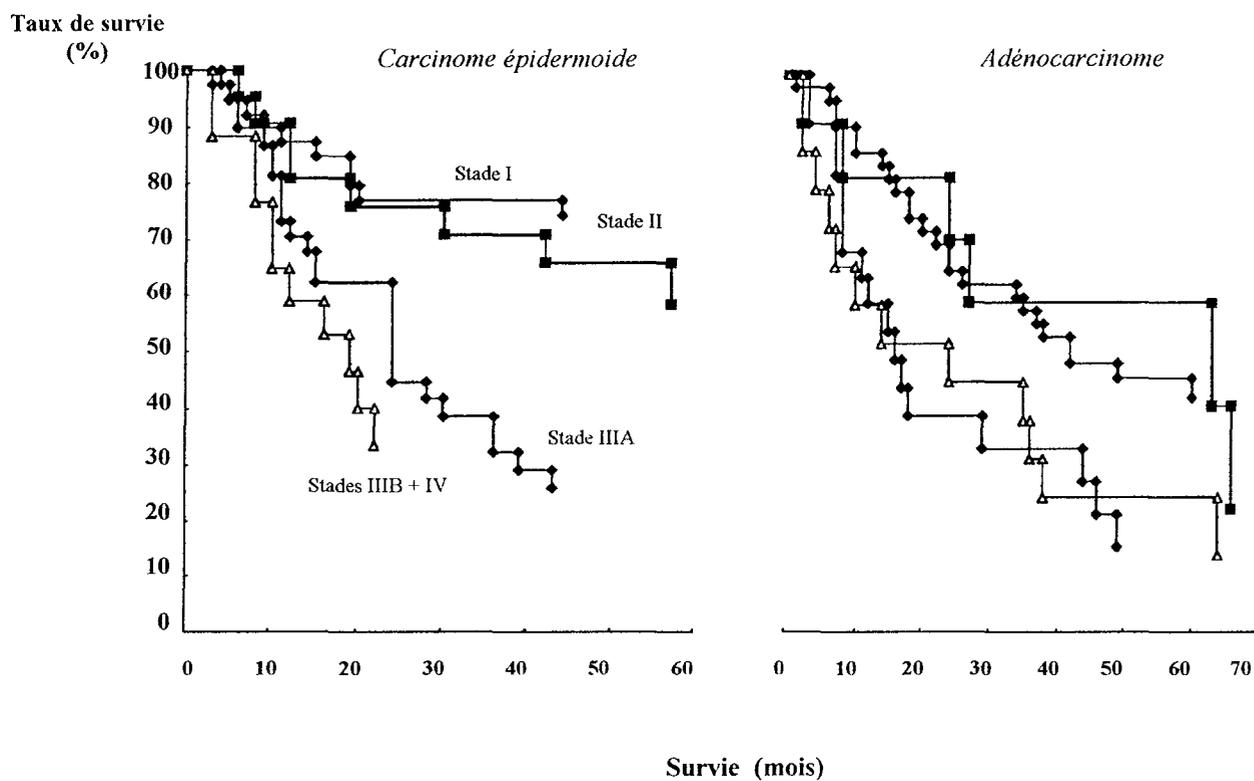
Stade TNM :	I	II	IIIA	IIIB+IV	Tous stades
<i>Carcinomes épidermoïdes</i>					
Homme *	42	24	43	17	126
Femme *	3	1	0	2	6
Age (ans)	62.0 ± 9.3	60.2 ± 9.5	62 ± 9.6	60.7 ± 9.3	61.8 ± 9.4
Tabac (PA)	45.2 ± 22.3	40.3 ± 20.8	43.1 ± 20.8	37.5 ± 21.6	42.5 ± 20.5
Décès d'autres causes *	11	5	11	2	29 (22 %)
Rechute *	10	8	26	11	55 (42 %)
Survivants en RC *	24	12	6	6	48 (36 %)
Durée de survie (mois)	41.5 ± 27.6	38.7 ± 29.5	27.7 ± 27.9	21.9 ± 23	37.7 ± 28.2
<i>Adénocarcinomes</i>					
Homme *	39	9	22	13	83
Femme *	7	2	2	1	12
Age (ans)	63.6 ± 9.3	58.4 ± 8.1	58.5 ± 9.4	54.5 ± 29.0	60.4 ± 9.0
Tabac (PA)	40.1 ± 25.7	30.6 ± 21.9	37.3 ± 13.0	34.29 ± 19.9	37.4 ± 21.8
Décès d'autres causes *	6	2	5	1	14 (%)
Rechute *	24	6	18	12	60 (63 %)
Survivants en RC *	16	3	1	1	21 (22 %)
Durée de survie (mois)	35.5 ± 24.9	33.5 ± 26.3	19.6 ± 18.9	28.6 ± 29.5	30.3 ± 24.9

RC : rémission complète

PA : Paquet-Année

* : en nombre de sujets

Figure n°12 : courbes de survie des sujets opérés de CBNPC suivis dans le cadre de l'étude des marqueurs pronostiques



47%), A+B+H (51% vs 31%), sauf pour pan-*ras* plus fréquent dans les adénocarcinomes (35% vs 12%).

Concernant les CE il n'y a pas de marqueur immunohistochimique associé à une meilleure survie en dehors d'une tendance pour les antigènes des groupes sanguins ($p=0,07$).

Concernant les ADK le caractère différencié de la tumeur ($p = 0,009$), le marquage des cellules tumorales par *Bcl2* ($p=0,009$) ou par les antigènes des groupes sanguins A+B+H ($p=0,024$) sont associés à une meilleur survie.

De plus un marquage p53 sur les ADK de stade faible (I et II) est associé à une survie plus courte et un risque relatif de décès évalué à 4,56 (1,89-11; IC 95 %).

Le détail des résultats est présenté dans le tableau n°13

3. Etude des mutations de l'exon 1 de K-ras (entre les codons 1 et 31)

La recherche de mutations de *Ki-ras* dans la région du codon 12 a été réalisée pour 81 adénocarcinomes. Au total douze mutations chez 11 patients (13,6 %) ont été identifiées dont la moitié de transversion G → T. Les sites de mutation étaient : huit fois le codon 12 [codant normalement pour une Glycine (GTT), muté en Cystéine (GTG) 7 fois et 1 fois en Valine (GTC)], une fois le codon 8 (TCC → TAC) en association avec une mutation du codon 12 ; deux fois le codon 14 (GCT → GAT) et une fois le codon 15 (TAC → TAT).

Aucune mutation n'a été retrouvée dans le parenchyme sain correspondant. L'association d'un marquage pan-*ras* et d'une mutation de *Ki-ras* a été identifié 3 fois. Enfin, dans ce travail, l'existence d'une mutation n'est pas un marqueur de pronostic des adénocarcinomes.

Tableau n°13: valeur pronostique des paramètres immunohistochimiques et des mutations du codon 12 de K-ras, tous stades confondus

	Carcinomes épidermoïdes			Adénocarcinomes		
	n	Survie (mois)	P	n	Survie (mois)	P
Différenciation de la tumeur						
+	77	39.9 ± 30.5	0.30	60	36.0 ± 25.0	0.009
-	55	25.0 ± 22.1		35	20.6 ± 22.7	
Bcl2						
+	39	30.0 ± 28.0	0.99	18	41.6 ± 28.9	0.009
-	92	34.6 ± 27.9		17	27.6 ± 23.3	
Antigènes ABH						
+	68	37.4 ± 29.5	0.074	29	33.2 ± 22.4	0.024
-	64	29.7 ± 26.4		65	29.3 ± 26.1	
P53						
+	91	34.7 ± 28.4	0.66	44	27.5 ± 24.3	0.076
-	41	31.3 ± 27.9		50	32.5 ± 25.7	
c-erb-B2						
+	35	32.4 ± 27.3	0.83	12	35.0 ± 32.7	0.34
-	97	34.1 ± 28.7		83	29.6 ± 23.8	
Pan-ras						
+	6	39.3 ± 26.8	0.38	32	22.8 ± 18.1	0.43
-	116	32.9 ± 28.4		62	23.8 ± 19.3	
Mutations de K-ras						
+	-	-		12	24.1 ± 18.8	0.34
-	-	-		83	18.6 ± 18.2	

Différenciation de la tumeur :

+ bien différenciée et différenciation acinaire, glandulaire ou bronchioloalvéolaire pour les adénocarcinomes

- moyennement et peu différenciée

4. Etude statistique multivariée

Pour le groupe des adénocarcinomes l'analyse multivariée selon le modèle de Cox montre que le caractère bien différencié de la tumeur, un marquage Bcl-2 ou A+B+H, sont des marqueurs de pronostic de longue survie. Le groupe sanguin O est un marqueur de pronostic de survie plus courte, de même que le marquage p53 pour les stades TNM faibles (I et II).

*Chapitre IV : Etude de la méthylation du promoteur du
gène RAR β_2 :
Abstract n°1*

P2844

Retinoic acid receptor β promoter methylation in lung tumors

P. Scheid, E. Picard, G. Farré, C. Rochette-Egly, Y. Martinet, J.M. Vignaud, N. Martinet. *CLERC, Faculté de Médecine, Nancy; ²IGBMC, Strasbourg, France*

We previously reported that Retinoic Acid Receptor β (RAR β) expression is decreased in Non-Small Cell Lung Carcinoma and lung cancer precursor lesions. In this study we have determined that such decrease is often associated with RAR β promoter methylation. 86 lung tumors were screened by immunohistochemistry using a specific antibody (RAR β 1), and a semi quantitative method. DNA was also prepared from the same tumors to study loss of heterozygosity at the D3S1583 marker and aliquots of tumoral and paired normal tissues DNA were demethylated following the method described by Clark. Primer pairs that detect methylated or unmethylated cytosines were used to specifically amplify a 147 pb promoter fragment (950-1076). The results were confirmed by sequencing cloned amplicons. Among tumors demonstrating low RAR β expression, 1 had a small promoter deletion but 40% had methylated promoters that were not observed in the paired healthy tissues. In about a third of the cases, it was most likely biallelic methylation while in an another third it was monallelic methylation. Loss of heterozygosity alone was also seen in informative remaining cases. But none test were positive in 2% of the positive tumors suggesting that other mechanisms are active to explain lower gene expressions like protein phosphorylation but also that other CpG outside of the screened promoter region are possible targets of methylation in lung tumors. These results could restrict retinoids use in lung cancer prevention.

Etude de la méthylation du promoteur du gène RAR β_2

Retinoic acid receptor β promoter methylation in lung tumor.

P. Scheid, E. Picard, G. Farré, C. Rochette-Egly, Y. Martinet, J.M. Vignaud, N. Martinet.

Eur Respir J 2000; 16:396S.

World Congress on Lung Health, 10th European Respiratory Society Annual Congress, Florence, 30 août-3 septembre 2000.

I. Matériels et méthodes

1. Population étudiée

Nous avons étudié 78 carcinomes bronchiques non à petites cellules dont l'exérèse à visée curative a été réalisée dans le service de chirurgie thoracique du CHU de Brabois entre 1990 et 2000. Après leur caractérisation sur le plan anatomopathologique selon la classification de l'OMS, les pièces d'exérèse ont fait l'objet d'un prélèvement en zone tumorale et en zone de parenchyme sain. Ces prélèvements ont été congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour une partie des cas nous ne disposons pas de fragments congelés mais d'échantillons provenant de blocs fixés dans le formol et inclus en paraffine.

Les critères d'opérabilité des CBNPC retenus pour les sujets sont ceux communément reconnus par la communauté médico-chirurgicale. La volonté de réaliser cette étude biologique n'est intervenue à aucun moment dans la décision thérapeutique ni dans le choix des procédures chirurgicales. Aucun sujet n'a reçu une radiothérapie et/ou une chimiothérapie préopératoire. Aucun patient ne prenait de la vitamine A, du β -carotène ni de la vitamine E.

Les données cliniques recueillies pour chaque observation ont été l'âge, le sexe, le tabagisme, le stade pTNM, la survie, la mortalité et la cause éventuelle du décès (récidive locale ou métastatique, autre cause).

2. Etude de l'expression de la protéine RAR β_2 en immunohistochimie.

Cette méthode mise au point par l'équipe de J-M Vignaud (Picard et al 1999) réalise la détection de la protéine RAR β_2 par un anticorps monoclonal spécifique de lapin. Des dilutions de l'anticorps anti-RAR β_2 à 1/5000 et 1/12000 permettent d'obtenir : 1) pour la première dilution, une détection nucléaire sensible de la protéine pour identification des tumeurs exprimant RAR β_2 et, 2) pour la deuxième dilution, une discrimination entre les tumeurs exprimant fortement ou faiblement la protéine RAR β_2 . Les cellules du stroma (fibroblastes et cellules endothéliales) et les cellules pulmonaires normales (pneumocytes, épithélium bronchiolaire, et cellules endothéliales) exprimant les RARs et RXRs à un niveau similaire et constant sont utilisées comme standard interne. Le marquage nucléaire des cellules standard est noté ++. Au niveau de la tumeur l'absence de marquage est notée 0, une diminution de l'expression du marquage est notée + et une augmentation du marquage est notée +++.

D'un point de vue pratique, le travail est réalisé sur des coupes en paraffine de 5 μ m d'épaisseur. Les fragments sont déparaffinés et placés dans un tampon citrate (0,1 M, pH 6,0) pendant 10 min. Les fragments sont ensuite incubés avec l'anticorps anti-RAR β_2 polyclonal à 4°C pendant une nuit. Après rinçage dans le tampon TBS-Tween (Tris HCl 0,05 M [pH 7], NaCl 150 mM, Tween 0,1 % v/v), les anticorps fixés sont révélés par un anticorps anti-lapin biotinylé (Dako, Copenhague, Danemark). Les fragments sont ensuite incubés successivement avec le complexe streptavidine-peroxidase et la solution biotine-tyramine (biotine-tyramine 1 mg/ml, Tris-HCl 0,2 M, imidazole 10 mM [pH 8,8], H₂O₂ 0,01 %) pendant 10 min. Puis après une seconde incubation avec le complexe streptavidine-peroxidase, les sections sont placées dans une solution finale (3,3'-diaminobenzidine 0,6 mg/ml, Tris-HCl 0,05 M, H₂O₂ 0,01 %).

3. Allélotypage par le marqueur D3S1283

Le gène codant pour la protéine RAR β_2 est localisé au niveau du chromosome 3p24.2. La séquence génomique complète de ce locus n'est pas disponible et nous utilisons donc le dinucléotide microsatellite (CA) $_n$, D3S1283, le plus proche de RAR β_2 en position 5' (Genethon/GenBank Accession No. Z16798). Les amorces utilisées de part et d'autre du microsatellite ont les séquences suivantes : 5'-GGCAGTACCACCTGTAGAAATG-3' et 5'-GAGTAACAGAGGCATCGTGTATTC-3'. Une amorce est marquée en 5' avec un fluorochrome (CY5). L'ADN extrait des parenchymes sains est amplifié par une PCR avec un départ à chaud. La dénaturation initiale est réalisée à 94°C pendant 4 min puis l'ADN est amplifié au cours de 28 cycles d'une PCR qui consiste en une dénaturation à 94°C pendant 30 sec, un appariement des amorces à 63° pendant 1 min et une extension à 72°C pendant 1 min. Les produits de PCR (150 à 160 paires de bases) sont séparés en électrophorèse de haute résolution dans un gel de polyacrylamide ultra fin à 6 % sur un séquenceur "Alf Express" et les résultats sont analysés en ligne avec un logiciel d'analyse de fragments "Allele Links". Seules les tumeurs des sujets hétérozygotes sont allélotypées. On compare alors les tissus sains et les tissus tumoraux pour rechercher une délétion d'un allèle du microsatellite.

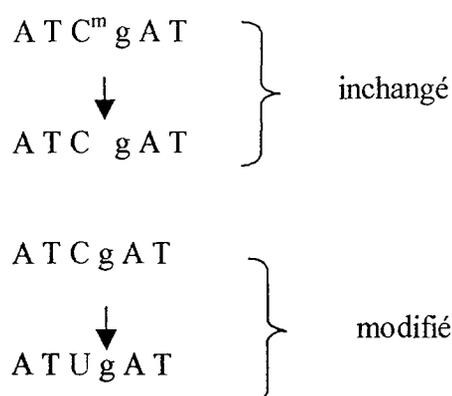
4. Etude de la méthylation du promoteur de RAR β_2

4.1. La bisulfitation de l'ADN

L'identification des cytosines méthylées et des cytosines non méthylées est possible grâce à une réaction de bisulfitation. Lors de la réaction de bisulfitation, les cytosines non méthylées sont transformées en Uraciles par une réaction de déamination. Cela se traduit après amplification PCR par le remplacement des cytosines non méthylées par des thymines permettant ainsi d'identifier de façon indirecte la position des cytosines méthylées.

On réalise pour chaque couple de tumeur et de parenchyme sain correspondant une extraction de l'ADN selon un procédé classique phénol/chloroforme. Puis la bisulfitation est réalisée conformément aux instructions du Kit de bisulfitation CpGenome Kit™ (Appligene/Quantum, Strasbourg, France). Synthétiquement, la bisulfitation est réalisée après dénaturation initiale en milieu alcalin (NaOH), puis suivie d'une précipitation et de rinçages successifs dans l'éthanol, puis d'une resuspension dans du TE (TRIS 10mM, EDTA 0,1mM). L'ADN "bisulfité" peut être utilisé immédiatement ou être conservé à -20°C .

Figure n°13: La bisulfitation des cytosines non méthylées les modifie en uraciles alors que les cytosines méthylées restent inchangées (C^m : cytosine méthylée)

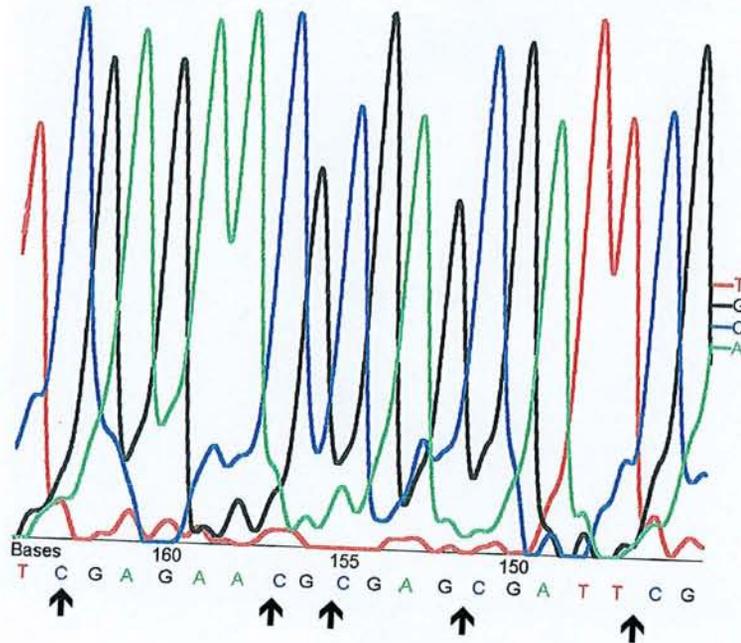


4.2. Identification des cytosines méthylées sur des lignées de cancers bronchiques n'exprimant pas $RAR\beta_2$

Nous avons identifié trois lignées de cancers bronchiques qui se sont avérées négatives pour l'expression de $RAR\beta_2$ en RT-PCR. L'ARN des cellules a été extrait selon une technique classique (Trizol™, Sigma), puis purifié (cDNA first strand kit™, Amersham/Pharmacia), puis "amplifié" en ADN complémentaire. Les conditions de la RT-PCR effectuée avec la paire d'amorces 5'-GCCATTTGCCTCCACACCTA-3' (sens) et 5'-TCTTGGTCCTTCTTGAGTTT-3' (antisens) prévoient une dénaturation initiale de 10 min à 94°C suivie de 28 cycles comportant une dénaturation à 94°C de 30 secondes, un appariement

Figure n°14 : Identification de la position des cytosines méthylées sur une portion de la séquence du promoteur de RAR- β par séquençage avant (séquence A) et après (séquence B) traitement de l'ADN par bisulfite. (La position des cytosines méthylées est indiquée par des flèches).

A



B

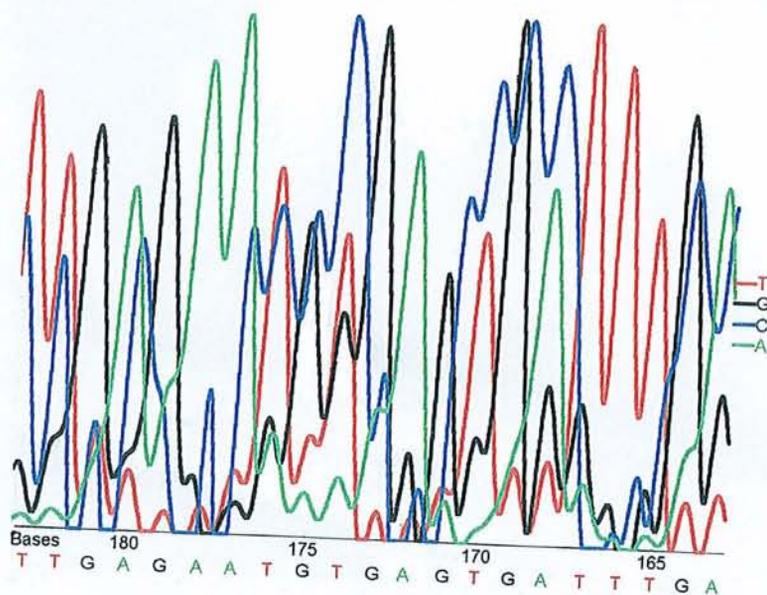


Figure n°15 : Positions des cytosines méthylées sur la séquence du promoteur de RARβ₂

5'-¹CCAGAACACACAGCTGGTAAGTGGCAGACCTGGAATTGGAATCTAGTTCAGTTTGATTCCCCAACCCATG
 CTCTTGACCACTATACTGTTTTTTCAAGTCCAGATCTGAAATCTCATTTTTCTGTGTGGCTGTGTGTTTGG
 GACAGGGGTAACCAATTCCTGACTACTCTATATGCGACATAGAACCTGGAGAGGATTTTTCAAAGTAAAT
 GAATCTCGAAAGCTGGATTGCAGAGCAAAACGAGTGCAGTCAATTCAGCCAGGGGCTTGCAAGAGGGAGAA
 AGAGAAAAAGACTGTGGAATGGAAAGTTTCCCAACCCAAGCCTTTCCCAAGGGGTAGCCATTCTCTGTTC
 TACAGTTTAGGGCTTGCATGTGCTTTTTCTGGAGTGGAAAAATACATAAGTTATAAGGAATTTAACAGAC
 AGAAAGGCGCACAGAGGAATTTAAAGTGTGGGCTGGGGCGAGGCGGTGGGCGGGAGGCGAGCGGGCGCAG
 GCGGAACACCGTTTTCCAAGCTAAGCCGCCGCAAATAAAAAGGCGTAAAGGGAGAGAAGTTGGTGCTCAA
 CGTGAGCCAGGAGCAGCGTCCCGGCTCCTCCCCTGCTCATTTTAAAGCACTTCTTGTATTGTTTTTAAG
 GAGAGAAATAGGAAAGAAAAAGCGCCGGCTTGTGCGCTCGCTGCCTGCCTCTCTGGCTGTCTGCTTTTGCAG
 GGCTGCTGGGAGTTTTTAAGCTCTGTGAGAATCCTGGGAGTTGGTGATGTCAGACTAGTTGGGTCATTTG
 AAGGTTAGCAGCCCGGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCACTCGCATATATTAGGCAATTCAATCTTTCATTC
 TGTGTGACAGAAGTAGTAGGAAGTGTGAGCTGTTAGAGGGCCAGGAGGGTCTATTCTTTGCCAAAGGGGGGA
 CCAGAATCCCCCATGCGAGCTGTTTGAGGACTGGGATG⁹⁵⁰CCGAGAACGCGAGCGATCCGAGCAGGGTTG
 TCTGGGCACCGT¹⁰⁹⁵CGGGGTAGGATCCGGAAACGCATT¹⁰⁹⁵CGGAAGGCTTTTTGCAAGCATTACTTGGAAAGGAG
 AACTTGGGATCTTTCTGGGAACCC¹⁰⁹⁵CCGCCCGGCTGGATTGGC¹⁰⁹⁵GAGCAAGCCTGGAAAATGGTAAATG
 ATCATTTGGATCAATTACAGGCTTTTAGCTGGCTTGTCTGTCATAATTCATGATT¹⁴⁶⁹CGGGGCTGGGAAAAA
 GACCAACAGCCTACGTGCCAAAAAAGGGCAGAGTTTGTGAGGTTGGGTGGACTTTTCTATGCCATTG
 CCTCCACACCTAGAGGATAAGCACTTTTGCAGACATTAGTGCAGGGAGATCATGTTTACTGTATGGA
 TGTCTGTGAGTGCCTGGGCAAATCCTGGATTCTACACTGCGAGTCCGTCTTCTGCATGCTCCAG
 GAGAAAGCTCTCAAAGCATGCTTCAGTGGATTGACCCAAACCGAATGGCAGCATCGGCACACTGCTCAA¹⁴⁶⁹ -3'

C = cytosines possiblement méthylées

 = Amorces sens/antisens MSP

à 60°C de 60 secondes et une élongation à 72°C de 90 secondes puis une élongation terminale de 10 min à 72°C.

Le promoteur du gène $RAR\beta_2$ a été séquencé à partir de l'ADN de ces lignées cellulaires avant et après bisulfitation ce qui a permis d'identifier la position des cytosines méthylées. La position de ces dernières s'est avérée être la même que celle décrite précédemment pour un lignée d'adénocarcinome colique (84). La figure n°14 montre le séquençage de la même portion de la séquence du promoteur de $RAR\beta_2$ avant et après bisulfitation, ce qui permet d'identifier la position des cytosines méthylées. La figure n°15 montre la position des cytosines méthylées sur le promoteur de $RAR\beta_2$.

4.3. La PCR spécifique de la méthylation (MSP)

Cette technique (213) permet de distinguer pour une même séquence de l'ADN l'existence d'une méthylation ou non au niveau des cytosines. En effet, la bisulfitation de l'ADN modifiant la séquence et conduisant au remplacement de cytosines non méthylées par des thymines il est possible de confectionner deux paires d'amorces, l'une spécifique d'un ADN méthylé et l'autre spécifique d'un ADN non méthylé. Le choix de la position des amorces est essentiel car il doit se situer dans une zone riche en cytosines méthylées sur les lignées cellulaires cancéreuses.

Des amorces dites "méthylées" du promoteur $RAR\beta_2$ ($RAR\beta_2$ -M) correspondant à un ADN méthylé et des amorces dites "non méthylées" correspondant à un ADN non méthylé ($RAR\beta_2$ -U) ont été synthétisées permettant d'amplifier un fragment de 146 pb dans le promoteur de $RAR\beta_2$. Les positions des amorces et du fragment amplifié sont indiquées sur la figure n°17. Une paire d'amorces dites "sauvages" ($RAR\beta_2$ -W) sert de contrôle pour attester de l'efficacité du traitement par bisulfite.

Figure n°16 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR spécifique de la méthylation

	<u>Amorces sens</u>	<u>Amorces anti-sens</u>
RAR β 2-M	5'-TCGAGAACGCGAGCGATTTCG-3'	5'-CCGCCCCGGCTGGATTGGCC-3'
RAR β 2-U	5'-TTGAGAATGTGAGTGTTTGA-3'	5'-GACCAATCCAACCGAAACGA-3'
RAR β 2-W	5'-CCGAGAACGCGAGGGATCCG-3'	5'-AACCAATCCAACCAAAACAA-3'

Pour chaque échantillon d'ADN "bisulfite" (tumoral et parenchyme sain, deux PCR sont effectuées avec les deux paires d'amorces spécifiques RAR β 2-U et RAR β 2-M, dans les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 10 min à 94°C puis 35 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, un appariement à 54°C pendant 30 secondes et un élongation à 72°C pendant 30 secondes, puis une élongation terminale de 10 min à 72°C. Les échantillons de PCR sont analysés en électrophorèse en gel d'agarose à 1,6 %.

5. Analyse statistique

L'objectif de ce travail est de confirmer une association entre la méthylation du promoteur de RAR β 2 et la diminution de l'expression de la protéine RAR β , et de rechercher les corrélations avec les paramètres cliniques et pronostiques. L'analyse statistique utilise le test du CHI² de Pearson ou le test de Mann-Whitney avec un intervalle de confiance de 5%.

II. *Les résultats*

1. *Expression de la protéine RAR β_2*

Dans la population de 78 CBNPC et leurs parenchymes correspondant on identifie en immunohistochimie une diminution de l'expression de RAR β_2 dans 71 % des cas. Aucune différence n'est retrouvée entre les tumeurs de type adénocarcinome et carcinomes épidermoïdes. La figure n°17 illustre l'aspect du marquage immunohistochimique de deux CBNPC présentant respectivement soit une expression normale de RAR β_2 , soit une absence de marquage de RAR β_2 .

2. *Allélotypage de la région 3p24.2*

L'identification d'une délétion allélique n'est simple à identifier que si la tumeur est hétérozygote d'où le terme de perte d'hétérozygotie (Loss Of Heterozygosity). En effet chez l'hétérozygote, en cas de perte allélique, la disparition d'un des deux pics dans la tumeur par rapport au tissu sain correspondant est mise en évidence. Les tumeurs présentant un seul pic correspondant à une situation d'homozygotie pour l'étude du microsatellite D3S1283 ne permettent pas une analyse de la perte d'un allèle.

Ainsi nous avons mis en évidence dans cette population 43 % de tumeurs hétérozygotes, qui sont dites "informatives", parmi lesquelles 53 % présentent une délétion allélique. Lorsque l'on considère le groupe des tumeurs informatives ayant une diminution ou une abolition de l'expression de RAR β_2 on constate que 70 % d'entre elles présentent une délétion allélique. La figure n°18 illustre la mise en évidence d'une délétion allélique par la perte d'un pic dans la tumeur à hauteur du fragment attendu en regard du marqueur de taille de 150 pb.

Figure n°17 : Etude de l'expression de la protéine RAR β en immunohistochimie sur deux CBNPC. La coupe A montre une diminution de l'expression de RAR β dans les cellules tumorales alors que la coupe B montre une expression normale. (T : tumeur, S : stroma)

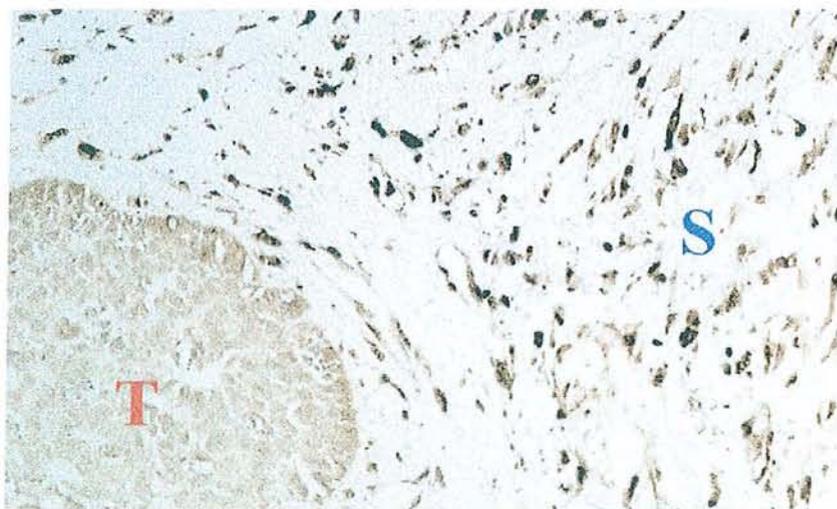
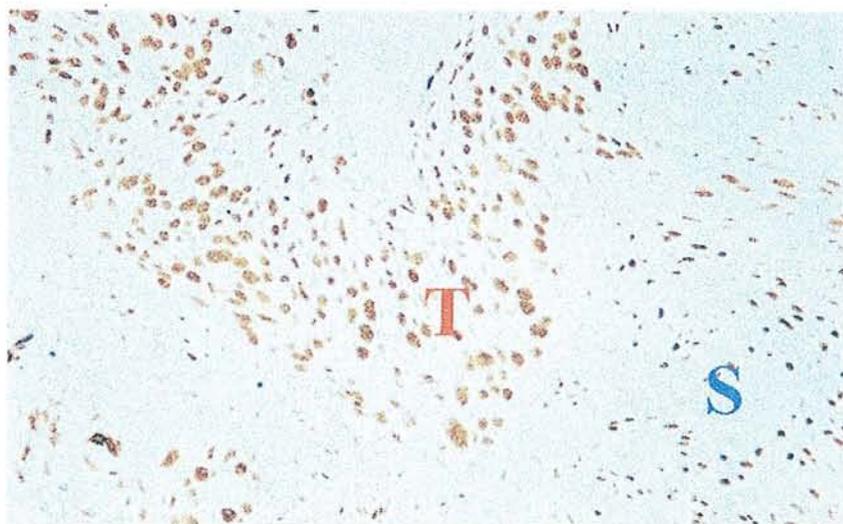
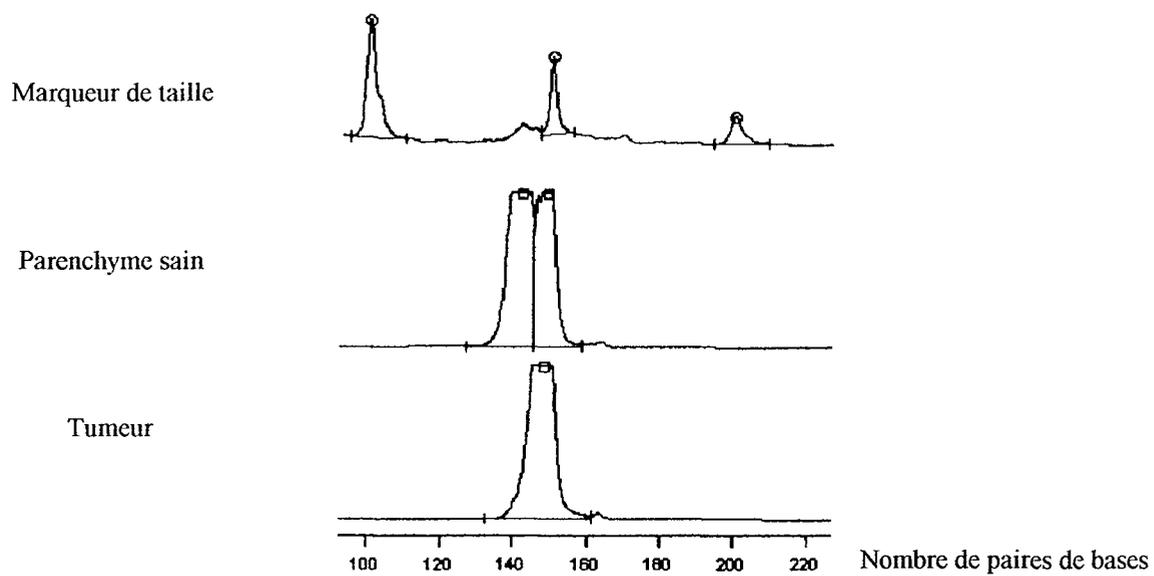
A**B**

Figure n° 18 : Allélotypage d'un CBNPC identifiant la perte d'un allèle pour le microsatellite D3S1283 sur la tumeur par rapport au parenchyme sain correspondant



3. Etude de la méthylation du promoteur du gène RAR β_2

Nous avons observé dans 46% de l'ensemble des tumeurs étudiées une méthylation du promoteur du gène RAR β_2 , qui n'existait pas dans le parenchyme normal. La figure n°19 montre une PCR spécifique de la méthylation pour un coupe tumeur de type CBNPC et parenchyme sain. On identifie une méthylation anormale de l'ADN tumoral étudié.

Lorsque l'on considère uniquement les tumeurs présentant une diminution de l'expression de la protéine RAR β_2 , on observe une méthylation du promoteur de RAR β_2 dans 65 % des cas. Dans ce même groupe de tumeurs avec une diminution de l'expression de RAR β_2 on observe l'association d'une délétion allélique et d'une méthylation du promoteur de RAR β_2 dans 18 % des cas.

Quand on ne considère que les tumeurs hétérozygotes, dites "informatives", pour l'allélotypage (43% des tumeurs), dans le groupe ayant une diminution de l'expression de RAR β_2 on constate que 29% d'entre elles associe une délétion allélique et une hyperméthylation du promoteur de RAR β_2 .

La figure n°20 montre la synthèse des résultats concernant le statut de RAR β_2 étudié dans notre travail sur une série de 78 CBNPC.

4. Corrélations avec les caractéristiques cliniques de la population

Aucune association n'est identifiée entre les caractéristiques cliniques de la population (âge, sexe, extension de la maladie, survie) et les résultats de l'expression de RAR β_2 , ni de la méthylation du promoteur de RAR β_2 ni de l'allélotypage pour D3S1283. On identifie une nette corrélation ($p=0,0001$) entre la diminution de l'expression de RAR β_2 et l'existence d'une méthylation du promoteur de RAR β_2 .

Figure n°19 : PCR spécifique de la méthylation pour un parenchyme sain (2 et3) et la tumeur correspondante (4 et5) comportant une amplification avec des amorces spécifiques de l'ADN non méthylé (2 et 4) et avec des amorces spécifiques de l'ADN méthylé (3 et 5). La bande visible sur la ligne 5 correspond à la présence d'un contingent de cellules tumorales dont l'ADN est anormalement méthylé.

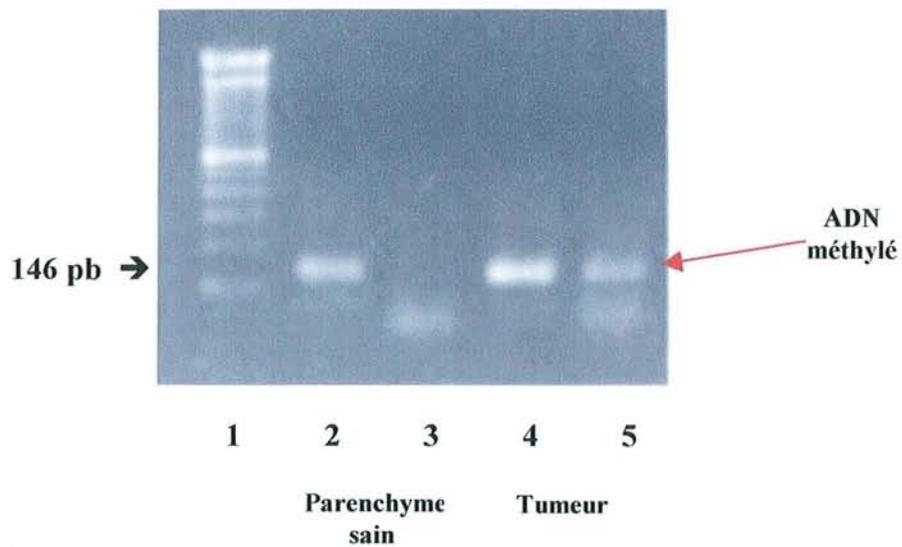
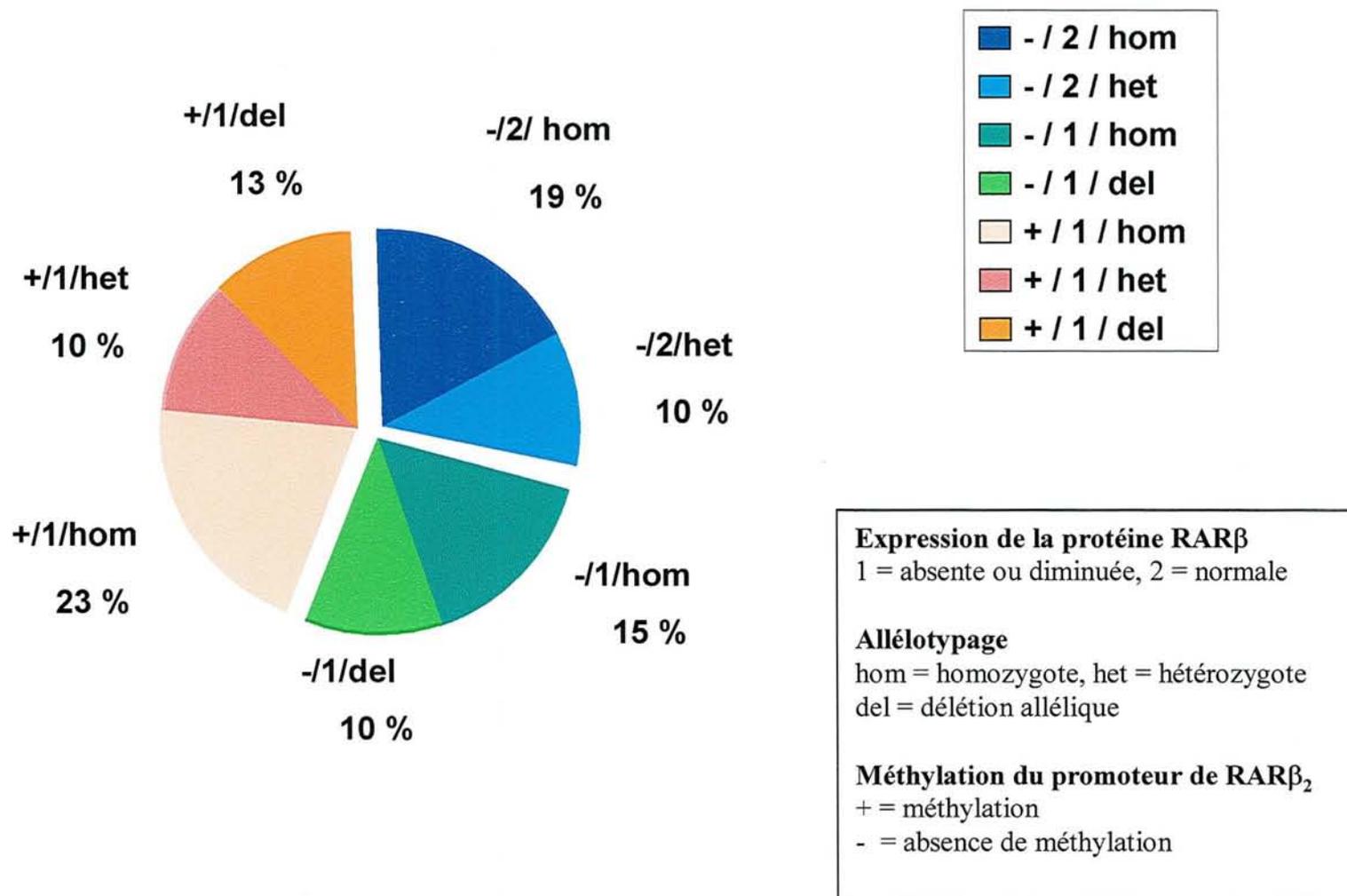


Figure n°20 : Synthèse des résultats concernant le statut de l'expression de la protéine RAR β , la recherche de délétions alléliques du microsatellite D3S1283 et la présence d'une méthylation du promoteur du gène RAR β_2



Sur le plan clinique on relève un âge moyen plus jeune pour les sujets atteints d'adénocarcinomes par rapport à ceux présentant un carcinome épidermoïde. Par ailleurs le pronostic de survie est corrélé au stade d'extension de la maladie, ce qui est tout à fait classique.

Chapitre V : Discussion

Le cancer du poumon a un pronostic effroyable avec une survie, tous stades confondus, qui se situe autour de 14% pour les travaux les plus optimistes (214). Seul environ un quart des sujets porteurs de CBNPC peut prétendre à une chirurgie d'exérèse à visée curative au terme du bilan d'extension et de la définition du cTNM, ce dernier étant le principal critère d'opérabilité (126, 215). Dans notre travail les résultats à 5 ans révèlent une survie médiocre de 36% pour les carcinomes épidermoïdes et de 22% pour les adénocarcinomes. Cela est en rapport avec le nombre important de stades III A (29%) et III B/VI (14,5%) dans cette population. En effet dans la plupart des séries, la survie à 5 ans des patients opérés se situe globalement autour de 50%, mais cela souligne néanmoins l'insuffisance des moyens de pronostic dont nous disposons. Cette constatation nous interpelle d'autant plus que l'on s'intéresse aux stades pTNM les plus faibles IA et IB, sans envahissement ganglionnaire identifié, pour lesquels dans les travaux publiés on ne constate respectivement qu'environ 70 à 80% et 55 à 60% de survie à 5 ans (216, 217). Dans notre étude, environ deux tiers des cas carcinomes épidermoïdes des sujets porteurs de stade I sont vivants à 5 ans contre 40 % pour les adénocarcinomes. Le pronostic globalement plus défavorable des adénocarcinomes, plus fréquent chez les hommes jeunes et chez les femmes, est vraisemblablement lié au fort taux de récurrence (métastatique particulièrement) que nous retrouvons, 63% versus 42% par rapport aux carcinomes épidermoïdes. Dans le groupe des adénocarcinomes nous avons néanmoins noté que le caractère bien différencié de la tumeur, est associée à une survie plus longue en analyse multivariée. Ces constatations et le rôle probable de foyers micrométastatiques viscéraux ou ganglionnaires (218) sont des supports à la démarche actuelle qui vise à appliquer un traitement néoadjuvant y compris dans les stades d'extension faible (219). L'objectif de l'intensification du traitement en néoadjuvant ou en adjuvant, radiothérapique et/ou chimiothérapique, est d'obtenir une meilleure survie. Au delà

il semble qu'une fois ce palier de 5 ans atteint, le pronostic ultérieur à 10 ans est excellent de l'ordre de 90 % dans certaines séries (220, 221).

Les marqueurs immunohistochimiques que nous avons choisis d'étudier font partie de ceux qui sont impliqués dans les mécanismes soit de la prolifération, soit de l'apoptose. L'intérêt de notre travail réside également dans l'effectif important de la population étudiée, dont la prise en charge a été réalisée dans un seul centre, la Fédération Médico-Chirurgicale de Pneumologie du CHU de Nancy. Concernant les carcinomes épidermoïdes, seul le marquage des antigènes des groupes sanguins est associé à une tendance de meilleur pronostic ($p=0,07$). Ceci est également retrouvé dans le groupe des adénocarcinomes ($p=0,024$) et est à rapprocher des travaux de Lee (163) qui rapporte que l'expression des antigènes des groupes sanguins A et B est associée au pronostic des tumeurs bronchiques. En effet la perte de matériel chromosomique en 9p, où se situent les gènes codant pour les enzymes responsables de la modification des antigènes des groupes sanguins (H modifié en A ou B), est associée à la perte simultanée d'autres gènes suppresseurs de tumeur situés dans la même région comme p16^{INK4} ou p19^{ARF} (164). Concernant les adénocarcinomes, le groupe sanguin O (exprimant uniquement l'antigène H) est associé à un pronostic plus péjoratif dans notre travail, peut être en rapport avec le potentiel métastatique. En effet l'antigène H devient ligand du récepteur de l'E-selectine après modifications successives par une fucosyltransférase et une glycosyltransférase (165) et peut ainsi favoriser l'adhésion des cellules néoplasiques métastatiques au niveau de l'endothélium vasculaire.

Une augmentation de l'expression de p53 n'a été identifiée comme facteur de mauvais pronostic de survie que pour les adénocarcinomes de stade d'extension pTNM limité, ce qui correspond aux résultats de travaux de méta-analyses récentes (48, 142). Le gène p53 est impliqué à la fois dans le contrôle de la prolifération cellulaire, par l'intermédiaire de p21^{Waf1}

et gadd, et dans le contrôle de l'apoptose en maintenant un équilibre subtil entre inhibition et induction de celle-ci, laissant tantôt à la cellule le temps de réparer son ADN ou induisant tantôt la mort cellulaire par apoptose.

Dans notre travail, l'augmentation de l'expression de *Bcl2*, facteur anti-apoptotique, est associée paradoxalement à un meilleur pronostic de survie ainsi que précédemment montré (144, 145, 157). L'action de *Bcl2* est contrebalancée par celle de *Bax* si bien que c'est plutôt le ratio *Bax/Bcl2* qui détermine le contrôle de l'apoptose. Par ailleurs, *Bcl2* interviendrait comme inhibiteur du VEGF (222) et de l'angiogénèse (223).

La fréquence des mutations de *K-ras* identifiée dans les adénocarcinomes n'est que de 13,6 % (en dépit de la technique de référence utilisée) contre 20 à 30 % dans d'autres séries (75, 224), mais nous n'avons étudié que la région initiale de l'exon 1, entre les codons 1 et 31, alors que d'autres mutations ont été décrites également au niveau du codon 61. Aucune corrélation pronostique n'a été identifiée, en ce qui concerne l'oncogène *K-ras* tant pour la présence de mutations que pour l'existence d'un marquage immunohistochimique pan-*ras*. L'intérêt de la recherche de ces mutations reste encore incertain, en dépit d'espoirs initialement très importants. La faible fréquence des anomalies de *c-erb-B2* n'a pas conduit à identifier un intérêt pronostique seul ou en association avec des anomalies de *ras*.

Concernant la recherche de facteurs pronostiques à associer au stade TNM nous avons confirmé l'intérêt potentiel de la recherche du marquage de p53 et *Bcl2*, voire des antigènes des groupes sanguins (A+B+H), ainsi que du caractère bien différencié de la tumeur, pour le groupe des adénocarcinomes. Seul le stade TNM s'est avéré d'intérêt pronostique pour les carcinomes épidermoïdes. La place des données épidémiologiques est à préciser notamment pour le risque d'adénocarcinome du sujet jeune qui serait plus fréquent chez l'homme en cas d'antécédent de cancer du poumon chez un parent du premier degré (RR=2,6) ou d'antécédent de cancer du fumeur chez un sujet de moins de 46 ans dans la famille (RR=5,6) (4).

Les progrès lents de la compréhension des facteurs de pronostic des CBNPC et des adaptations de la prise en charge qui en découlent, ainsi que l'absence d'un espoir de réduction rapide de leur incidence, lié à la difficulté de la lutte anti-tabac et à la latence de son efficacité, ont conduit à évaluer les bénéfices de la chimioprévention, principalement par des rétinoïdes (acide 13-cis rétinoïque, palmitate de rétinol, β -carotène, acide tout-trans rétinoïque, ...). Une majorité de travaux menés sur de larges populations conclut à une inefficacité de la chimioprévention par rétinoïdes, voire à un effet délétère constaté dans trois essais (EUROSCAN, ATBC et CARET) (tableau n°11) ayant conduit parfois à leur arrêt. L'association de l'apport de rétinoïdes et de la poursuite du tabagisme, induirait la production de dérivés polaires responsables de la diminution des taux de récepteurs à l'acide rétinoïque et de l'activation du facteur de transcription nucléaire AP1 proinflammatoire avec pour conséquence l'induction de lésions de métaplasies (208,209). Les travaux du groupe de N Martinet et J-M Vignaud (194) ont montré que l'expression du récepteur de l'acide rétinoïque β (RAR β) est diminué dans environ 60% des CBNPC et que dans cette population environ 40% des sujets présentent une délétion allélique de la région du gène codant pour RAR β . Nous avons démontré sur notre série de CBNPC que 46% des tumeurs présentent une méthylation anormale du promoteur de RAR β_2 fortement corrélée avec la diminution de l'expression de la protéine RAR β ($p=0,0001$). Ce mécanisme physiopathologique joue vraisemblablement un rôle majeur puisque lorsque l'on ne considère que les tumeurs présentant une diminution de l'expression de RAR β environ deux tiers d'entre elles présentent une méthylation du promoteur de ce gène et environ une sur cinq associe les deux mécanismes (méthylation du promoteur et délétion allélique). Aucune corrélation n'a été identifiée entre la survie et l'existence d'anomalies de l'expression de la protéine RAR β et/ou d'une méthylation du promoteur du gène RAR β .

Nos constatations sont concordantes avec les résultats publiés récemment qui montrent également une hyperméthylation du promoteur de RAR β dans 40 % des cas sur une série de 107 CBNPC (225) et dans 41 % des cas sur une série de 127 CBNPC (226).

L'amélioration des connaissances des mécanismes physiopathologiques de la carcinogenèse et des raisons de l'échec des tentatives de chimioprévention permettent d'adapter les solutions thérapeutiques et préventives. Dans le domaine de la chimioprévention, l'arrivée de rétinoïdes de nouvelle génération plus spécifiques, l'utilisation d'agents déméthylants capables de restaurer l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (225) ou l'expression des récepteurs de l'acide rétinoïque (227, 228), permettront peut être d'apporter une solution efficace à la problématique actuelle.

DEUXIEME PARTIE

*Applications des connaissances des anomalies géniques
des maladies respiratoires à la compréhension et à la
modulation des mécanismes de l'inflammation des voies
aériennes dans la mucoviscidose*

Introduction

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans les pays d'Europe et d'Amérique du Nord. En France les données de l'Observatoire National de la Mucoviscidose recensent 3388 patients pour l'année 2000 (229). Des progrès considérables ont été réalisés puisque l'espérance de vie des patients à la naissance dépasse désormais 40 ans alors que la survie ne dépassait pas l'âge de 10 ans il y a trente ans. La médiane de vie actuelle est estimée à 32,1 ans en France en 2000 (229), et atteint les 40 ans dans les pays scandinaves (Danemark et Suède). Le dépistage néonatal de la mucoviscidose, en cours d'installation pour toute la France en 2002, est un des moyens de permettre une prise en charge très précoce dans l'espoir de contrôler le plus tôt possible l'évolution sur le plan respiratoire. En effet, l'atteinte du poumon est précoce et associe une composante inflammatoire et une composante infectieuse qui justifient des interventions préventives et/ou thérapeutiques le plus tôt possible. La relation très étroite entre inflammation et infection des voies aériennes reste une question d'actualité d'autant que le pronostic vital de ces patients est lié dans 90 % des cas à la sévérité de l'atteinte respiratoire.

Dans une première partie nous exposerons les principales données bibliographiques concernant le gène de la mucoviscidose et la protéine échangeuse d'ions qu'il code, puis les connaissances actuelles concernant la physiopathologie de l'atteinte respiratoire. Dans une deuxième partie nous rapporterons nos travaux de recherche dans le domaine des mécanismes de l'inflammation de la muqueuse des voies aériennes et des moyens envisageables pour les moduler par:

- 1) L'étude de la relation entre l'inflammation des voies aériennes et l'adhérence bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*),

- 2) L'étude de la réduction de l'inflammation de l'épithélium respiratoire par la modulation de l'activité du facteur de transcription nucléaire NF-KappaB (NFκB).

Chapitre I : Données de la littérature

I. Du gène à la protéine de la mucoviscidose

1. Le gène *CFTR*

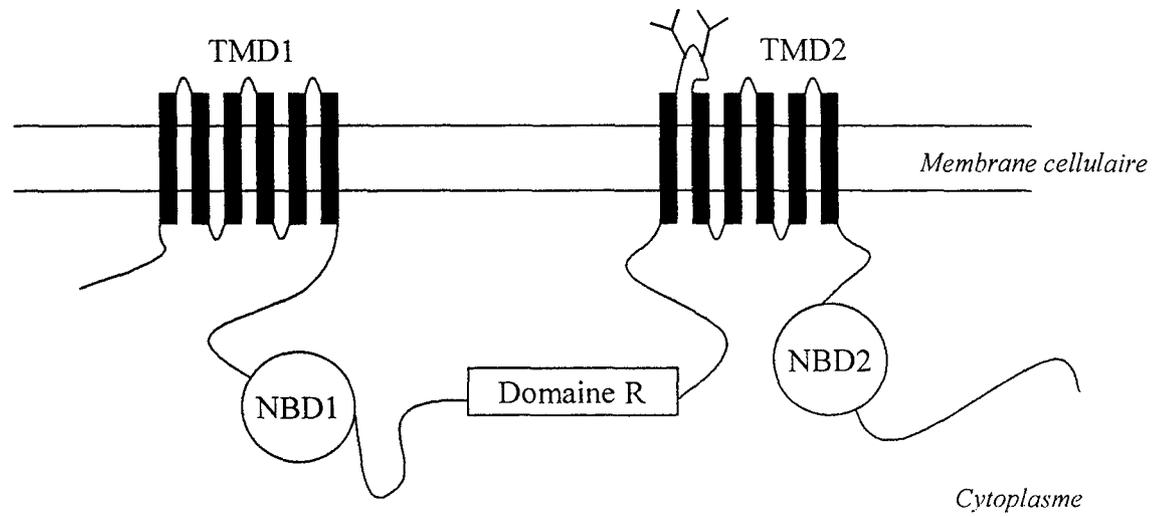
La mucoviscidose est une maladie à transmission autosomique récessive. Le gène de la mucoviscidose a été identifié en 1989, sur le bras long du chromosome 7. Il est appelé gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator ou régulateur de la conductance transmembranaire dans la mucoviscidose), par analogie avec la protéine effectrice qu'il code qui est un canal échangeur de chlore présent notamment à la surface des cellules de l'épithélium et des glandes sous muqueuses bronchiques (230-232). Le gène *CFTR* comporte environ 250000 pb, contient 27 exons et code la protéine *CFTR* qui normalement, après une phase de maturation au décours de son cheminement dans le cytoplasme, va aller se positionner à la surface des cellules et y jouer un rôle de canal échangeur d'ions chlore.

Il existe des variations tissu-dépendantes du site d'initiation ou des conditions de la transcription du gène *CFTR*, qui sont responsables de polymorphismes dont le rôle n'est pas bien élucidé.

2. La structure et la maturation de la protéine *CFTR*

La protéine *CFTR* est une protéine transmembranaire d'une longueur de 1480 acides aminés comportant une symétrie de structure. En fait chaque "moitié" est constituée d'un domaine transmembranaire (TMD: TransMembrane Domain) comportant six régions, et d'un domaine de fixation des nucléotides intracytoplasmiques (NBD: Nucleotide Binding Domain). Les deux moitiés sont séparées par un domaine régulateur intracytoplasmique qui est un site de fixation de l'AMP cyclique (AMPc) (figure n°21).

Figure n°21: La structure de la protéine CFTR. (TDM: transmembrane domain, NBD: nucleotide binding domain)



Les caractéristiques de la protéine CFTR font qu'elle appartient à la famille des protéines ABC (ATP-Binding Cassette transporter). Après la transcription, la maturation de la protéine CFTR comporte une étape dans le reticulum endoplasmique où après prise en charge par des molécules chaperones (Hsc-70), deux groupes glycosylés sont fixés sur la zone correspondant à sa future quatrième boucle extracellulaire. Ces groupes glycosylés seront modifiés lors du passage de la protéine dans l'appareil de Golgi, puis cette protéine "mature", résistante aux protéases, sera transportée jusqu'à la membrane de la cellule où elle prendra sa place et sa fonction de canal échangeur de chlore.

En fait il semble que le processus de maturation de la protéine CFTR normale soit peu efficace puisque seulement 25 % de la quantité de protéine produite arrive à sa forme finale et peut être transportée jusqu'à la membrane cellulaire après passage dans l'appareil de Golgi. Le reste est détruit, après ubiquitination, par le complexe du protéasome S-26 qui permet de dégrader ainsi les protéines dont la maturation est défectueuse. Les processus des modifications post transcriptionnelles de la protéine CFTR sont complexes, d'autant plus qu'ils font intervenir également des molécules chaperones (Hsc-70) et co-chaperones (CHIP) dont la propre régulation peut interférer avec le processus de maturation/dégradation de la protéine CFTR. Enfin, la protéine CFTR normale atteint la surface de la cellule.

Elle subit une internalisation par un mécanisme d'endocytose, puis une dégradation par les lysosomes mais elle peut être recyclée et ramenée au niveau de la membrane cellulaire (233).

3. Les fonctions de la protéine CFTR

3.1. La protéine CFTR est un canal chlore

La protéine CFTR est un canal chlore qui permet à cet anion de sortir de la cellule. La fixation d'AMPc permet la phosphorylation du domaine R par l'intermédiaire d'une protéine

kinase A. Cela autorise la fixation d'ATP sur NBD1, son hydrolyse permettant l'ouverture du canal pour le passage des ions chlore. La phosphorylation complète du domaine R permet la fixation d'ATP sur NBD2 ce qui stabilise l'ouverture du canal. Lors de l'hydrolyse de l'ATP sur NBD2 et la libération de l'ADP des deux NBD le canal se referme. Les cycles d'ouverture et de fermeture du canal chlore sont rythmés par la fixation et l'hydrolyse de l'ATP sur les NBD et ce tant que le domaine R reste phosphorylé. La déphosphorylation du domaine R bloque le canal en position fermée (234).

3.2. La régulation d'autres canaux échangeurs d'ions

L'inhibition du canal sodium épithélial (ENac):

En l'absence de protéine CFTR, l'AMPc augmente l'absorption de sodium par l'intermédiaire de l'ENac. Ceci est concordant avec la constatation que chez les sujets mucoviscidosiques, il existe une déshydratation des sécrétions liée à la réabsorption importante de sodium qui est accompagnée d'eau (235). Le mécanisme exact de cette régulation est controversé.

L'activation du canal chlore rectifiant sortant (ORCC: Outwardly Rectifying Chloride Channel):

L'activation du canal ORCC requiert la phosphorylation du domaine R et la sortie d'ATP par le canal CFTR. La fixation de l'ATP extracellulaire sur le récepteur du canal ORCC induit son activation (236, 237).

Le contrôle d'autres canaux échangeurs :

La protéine CFTR intervient également dans la régulation 1) des échanges d'ATP par d'autres canaux, 2) des échanges de potassium, de chlore (par son action sur le canal chlore calcium dépendant), 3) ainsi que dans la régulation du volume cellulaire.

Au niveau intracellulaire :

La protéine CFTR serait impliquée dans les échanges ioniques entre les différents compartiments intracellulaires. Ainsi l'altération du transport de chlore dans les compartiments intracellulaires (appareil de Golgi ...) conduirait à une perturbation des conditions de pH, un défaut de glycosylation des glycoprotéines avec une diminution de leur sialylation (238). Or il a été montré que la présence d'asialoglycosides GM₁ en quantité importante à la surface des cellules épithéliales favoriserait l'adhésion de certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (PA) (239).

4. Les mutations du gène CFTR

Depuis la découverte du gène de la mucoviscidose en 1989, plus de 900 mutations différentes et 300 polymorphismes ont été identifiées (240). La plus fréquente est la mutation $\Delta F508$ retrouvée chez environ 80 % des sujets en France, fréquemment à l'état homozygote. Elle correspond à la délétion de trois bases sur le gène, matérialisée par la perte d'une phénylalanine en position 508 sur la protéine. En France la recherche de 30 mutations permet d'identifier environ 85 % des mutations de la population. Certaines mutations n'ont été isolées qu'une seule fois. Selon la localisation (le domaine de la protéine touchée) et le type d'anomalie (mutation stop, décalage du cadre de lecture, délétion...) sur le gène CFTR, la fonction de la protéine sera diversement affectée. Une classification en quatre classes de mutations a été établie par Welsch (241) en fonction du mécanisme de l'anomalie et du degré de gravité de celle-ci appréciée par le fait qu'il persiste ou non une certaine quantité de protéine CFTR produite et une certaine fonction résiduelle. Les progrès de la connaissance du gène, des relations génotype/phénotype, ont conduit à proposer une classification en 5 puis 6 classes (figure n° 22).

Les mutations de classe I sont des mutations dites sévères: mutation stop, mutation non sens, ou par décalage du cadre de lecture, qui conduisent à l'absence totale de protéine ou à la production d'une protéine tronquée, non fonctionnelle et rapidement dégradée.

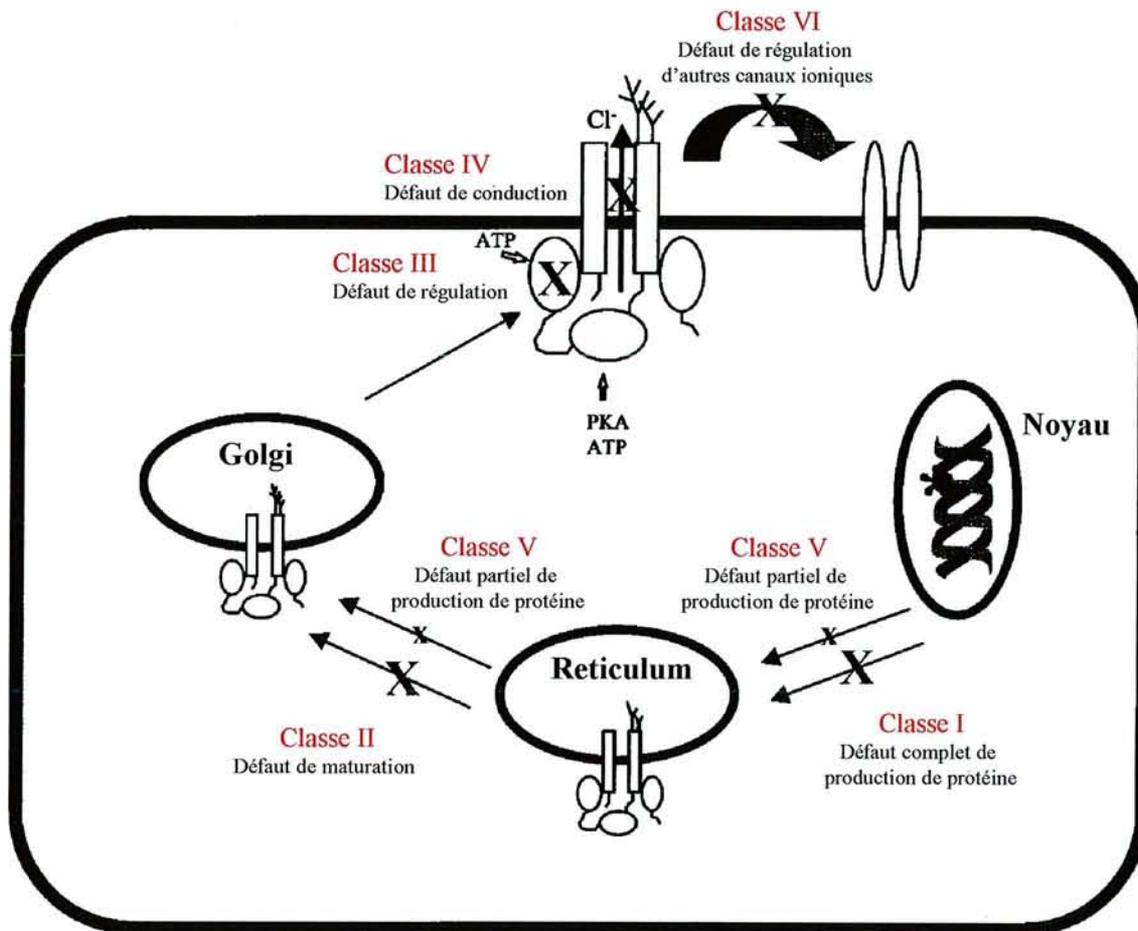
Les mutations de classe II sont les plus fréquentes, principalement du fait de l'appartenance de la mutation $\Delta F508$ à ce groupe, et correspondent à une défaillance du processus de maturation de la protéine qui reste bloquée dans le reticulum endoplasmique et le surcharge, avant d'être dégradée par le système ubiquitines/protéasome S-25. Une petite quantité de protéine peut être exprimée mais son instabilité conduit à une dégradation accélérée par rapport à la protéine normale.

Les mutations dites de classe III (exemple : G551D) surviennent dans des zones impliquées dans la régulation de l'activité "canal chlore" c'est à dire principalement les sites de fixation et d'hydrolyse de l'ATP sur les domaines NBD₁ et NBD₂. La conséquence est une diminution de la capacité de transport du chlore.

Les mutation de classe IV affectent les domaines transmembranaires et sont responsables d'une diminution de la conductivité du canal pour les ions chlore, alors que par ailleurs les processus d'activation (fixation d' ATP) et de régulation (AMPC-protéine kinase A) sont normaux (exemple : R117H). Ces mutations sont considérées comme de gravité modéré car il persiste une certaine activité CFTR et car elles sont le plus souvent associées à une expression moins sévère de la maladie.

Les mutations de classe V correspondent à une diminution de la quantité de protéine CFTR produite. Elles sont considérées de gravité modérée. On les retrouve également

Figure n°22 : Les différentes classes de mutations du gène CFTR (D'après Welsh et Vankeerberghen) (234)



associées à certaines situations cliniques frontières de la mucoviscidose comme certaines stérilités par agénésie bilatérale des canaux déférents, aspergilloses bronchopulmonaires allergiques, broncheectasies (242) ou pancréatites chroniques.

Les mutations de classe VI qui affectent les capacités de régulation de la protéine CFTR sur les autres canaux ENac, ORCC ... Ainsi la présence d'un domaine R fonctionnel est nécessaire à l'activation d'un canal d'échange d'ATP spécifique (243). De même la présence des domaines NBD₁ et R est nécessaire à la régulation de canal ORCC (244).

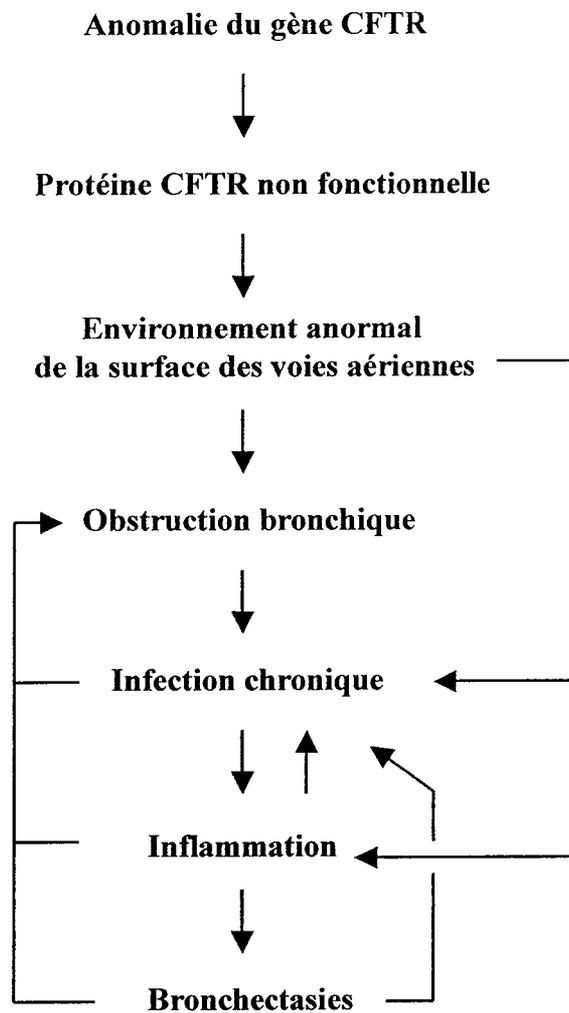
II. *Les mécanismes de l'atteinte pulmonaire*

Le poumon des enfants atteints de mucoviscidose est histopathologiquement normal à la naissance, en dépit de l'importance de l'expression du gène CFTR durant la vie fœtale, notamment au niveau des voies aériennes distales et des glandes sous-muqueuses. Les premières modifications post natales apparaissent au niveau des glandes sous-muqueuses (245).

L'atteinte pulmonaire se traduit *in fine* par la constitution de broncheectasies diffuses, d'un trouble ventilatoire obstructif sévère et d'un état d'insuffisance respiratoire chronique. Les broncheectasies sont la conséquence de la diminution de la clairance mucociliaire, du fait de la rhéologie anormale des sécrétions, et de l'inflammation chronique de la muqueuse respiratoire entretenue par la colonisation bactérienne (infection chronique), particulièrement à *Staphylococcus aureus* (SA) et *Pseudomonas aeruginosa* (figure n°23).

En fait la séquence des évènements n'est pas aussi simple puisque d'une part les troubles de la composition du liquide de surface des voies aériennes ne sont pas que d'ordre rhéologique et que d'autre part l'atteinte inflammatoire ne serait pas uniquement secondaire à

Figure n°23 : Les conditions de la constitution de bronchectasies dans la mucoviscidose (d'après Konstan 1997) (296)



l'infection des voies aériennes mais relèverait également d'un mécanisme primaire directement en rapport avec la protéine CFTR anormale.

1. *Le liquide de surface des voies aériennes*

La protéine CFTR anormale ou absente ne peut plus jouer son rôle physiologique de canal échangeur de chlore ni de régulateur d'autres canaux ioniques, de façon plus ou moins complète selon les différentes classes de mutations du gène. Cependant le mécanisme exact qui conduit à l'altération de la clairance mucociliaire, et à l'infection précoce et chronique des voies aériennes, n'est pas formellement élucidé. Deux hypothèses physiopathologiques prévalent concernant le mécanisme prédominant: 1) la diminution du volume des sécrétions (par "déshydratation") ou 2) la concentration élevée en sodium du liquide de surface bronchique (246).

1.1. *L'hypothèse de la diminution du volume des sécrétions*

La protéine CFTR exerce physiologiquement une répression de l'activité du canal sodium épithélial ENaC. Lors de la perte de la fonction CFTR, la conductance du sodium se trouve nettement augmentée par l'ENaC au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse bronchique (247). L'absorption de sodium entraînerait une absorption d'eau, ainsi que de chlore par des voies accessoires au niveau du pôle basolatéral des cellules, ce qui maintiendrait une isotonicité du liquide des voies aériennes considérée comme proche de celle du plasma, comme chez les sujets normaux (248) ou porteurs de bronchite chronique. La conséquence de la réabsorption isotonique d'un volume important de sécrétions bronchiques conduirait à une déshydratation et à une diminution de l'épaisseur de la couche de sécrétions bronchiques, observée jusqu'au tiers de sa valeur initiale en vingt quatre heures sur un modèle

in vitro (249). Cet état de déshydratation des sécrétions est difficile à restaurer durablement (250, 251).

1.2. L'hypothèse de l'élévation de la concentration de sodium dans les sécrétions bronchiques

La protéine CFTR étant un canal échangeur d'anions, son absence ou sa défaillance réduit la conductance transépithéliale du chlore. Zabner (252) a montré *in vitro* que le liquide de surface au pôle apical de cellules mucoviscidosiques (CF) est approximativement deux fois plus riche en sodium que celui de cellules non-mucoviscidosiques (non-CF).

Ainsi dans les bronches de sujets atteints de mucoviscidose, comme dans les canaux sudoraux, le blocage de l'absorption de chlore par défaillance du canal CFTR conduirait à un blocage rapide de la réabsorption de sodium du fait de la charge négative qui se constitue dès qu'une petite quantité de celui-ci a été réabsorbée (253). Cette hypothèse de l'augmentation de la concentration de sodium dans les sécrétions est confortée par les travaux de Smith (254). En effet, il a mis en évidence une diminution de l'activité bactéricide du liquide apical de surface d'une culture de cellules épithéliales CF par rapport aux cellules non-CF. L'activité bactéricide a été restaurée lorsque la concentration en sodium a été abaissée. Ce travail conforte l'hypothèse de l'existence d'une augmentation de la concentration en sodium dans les sécrétions au pôle apical des cellules de l'épithélium respiratoire, en même temps qu'il suggère la présence d'une activité antibiotique naturelle dans les sécrétions bronchiques, médiée par des β -défensines 1 (255).

Par ailleurs l'élévation de la concentration en chlore du liquide de surface bronchique induit une forte augmentation de la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) (puissant facteur chimiotactique des polynucléaires neutrophiles) par les cellules CF par rapport à des cellules non-CF (256). Les polynucléaires neutrophiles eux-mêmes exposés à une élévation de la concentration extracellulaire de chlore, réagissent par une augmentation de leur sécrétion

d'IL-8, une diminution de leur activité bactéricide anti-*Pseudomonas aeruginosa* et par une augmentation de leur apoptose, cette dernière conduisant en outre à la libération de médiateurs pro-inflammatoires (257).

1.3. L'activité antimicrobienne du liquide de surface bronchique

Le liquide de surface bronchique constitue la première ligne de défense antimicrobienne: d'une part grâce à ses caractères physiques et rhéologiques avec une phase muqueuse de surface et une phase sol séreuse permettant l'élimination des agents agresseurs par le tapis mucociliaire, et d'autre part grâce à des composants anti-microbiens non spécifiques, lactoferrine, lysosyme, cathélicidine et les β -défensines-1 humaines. Ces dernières sont des peptides cationiques d'environ 100 acides aminés, thermostables, doués d'une activité antimicrobienne large contre les bactéries gram positives et négatives, les champignons et les virus (255, 258). Dans la mucoviscidose, il semble que l'activité de ces β -défensines-1 soit inhibée par une concentration anormalement élevée des sécrétions bronchiques en sodium. Il semble cependant qu'il existe dans le liquide de surface bronchique d'autres facteurs antimicrobiens non sensibles à la concentration en sodium (259).

2. L'infection des voies aériennes

La composition du liquide de surface des voies aériennes des sujets atteints de mucoviscidose crée les conditions favorables à l'infection et à la colonisation bactérienne. L'hyperviscosité des sécrétions bronchiques liée à leur état de "déshydratation" est aggravée par l'augmentation de la concentration en ADN provenant principalement de la lyse des polynucléaires neutrophiles sur le site de l'infection (260, 261). Le volume d'expectoration est augmenté du fait de l'hypersécrétion de mucus par les glandes bronchiques, conséquence des désordres hydroélectrolytiques (augmentation de la concentration de chlore) et de la libération

de médiateurs proinflammatoires sur le site de l'infection (élastase, radicaux libres de l'oxygène ...). Les troubles de la mobilité ciliaire et les plages de desquamation épithéliales plus ou moins associées à des zones de métaplasie, conséquences des agressions infectieuses et inflammatoires, complètent les conditions d'une altération de la clairance mucociliaire.

2.1. *Les germes responsables*

Les germes les plus fréquemment isolés dans l'expectoration sont *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (SA) et *Pseudomonas aeruginosa* (PA). L'infection respiratoire est précoce et les données de l'Observatoire National de la Mucoviscidose de 1999 pour le groupe des enfants de 0 à 4 ans montre que plus de 50 % sont porteurs de SA et 22 % de PA. Ces chiffres s'élèvent respectivement à 65 % et 45 % pour la tranche d'âge de 10 à 14 ans, et à environ 50 % et 80 % au delà de 20 ans (262).

La fréquence de l'implication de PA dans l'atteinte respiratoire de la mucoviscidose, et son caractère presque inéluctable avec le temps en dépit des mesures de prophylaxie, font évoquer d'autres causes que la réduction de la clairance mucociliaire ou le déficit fonctionnel des β -défensines-1 pour expliquer ce tropisme particulier.

La primo-infection peut être traitée efficacement par une antibiothérapie à large spectre et conduire à l'éradication du germe. L'évolution vers des souches dites mucoïdes sécrétrices d'alginate constituant un "film protecteur" empêchant la phagocytose, ou sous forme de microcolonies "quiescentes" peu accessibles aux antibiotiques (263), rend l'éradication impossible et le traitement de plus en plus délicat, d'autant que l'on assiste à l'émergence progressive de souches de plus en plus antibiorésistantes (264, 265).

2.2. Facteurs de l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1. L'adhésion au mucus bronchique

L'affinité de PA pour le mucus trachéobronchique est très importante et dépend de très nombreux récepteurs (266, 267). Chez le sujet normal le faible niveau d'adhérence à l'épithélium et l'efficacité de la clairance mucociliaire permettent l'épuration rapide des bactéries alors que chez le sujet porteur de bronchectasies notamment dans la mucoviscidose les bactéries ont le temps de produire et de déverser des toxines, puis d'établir une infection source de dommage tissulaire (268).

La production excessive de mucus peut être la conséquence de trois mécanismes: 1) une hyperexpression des gènes des mucines, 2) une hypertrophie des glandes muqueuses, ou 3) une libération des mucines préformées et stockées dans les cellules muqueuses (269). Les trois mécanismes interviennent dans la mucoviscidose. En particulier l'inflammation de la mucoviscidose est associée à une augmentation de la transcription des gènes MUC2 et MUC5AC, stimulés par l'Interleukine-1 (IL-1) et le TNF α pour MUC2 (270, 271).

2.2.2. Le rôle des pili bactériens

Les capacités d'adhésion de PA à l'épithélium respiratoire sont principalement liées à la présence de Pili à la surface de la bactérie (la fixation se fait par l'intermédiaire de l'extrémité C-terminale de la protéine des Pili), et dans une moindre mesure à d'autres substances, exoprotéine-S, alginates, protéines du flagelle (268, 272).

2.2.3. Les récepteurs asialoGM1 médiateurs de l'adhérence de PA

L'adhésion des Pili de PA se fait préférentiellement sur des glycolipides de type gangliotétraosylcéramide, contenant le motif GalNAc β 1-4Gal, situés sur la membrane des cellules épithéliales. L'adhérence de PA est particulièrement importante sur les formes

asialylées de ces gangliosides, d'où leur nom d'asialoGM1, très peu représentés chez le sujet normal mais qui sont présents en grandes quantités à la surface des cellules CF (273, 274). Le défaut de sialylation de ces gangliosides est à rattacher au déficit d'activité sialyltransférase identifié dans les cellules mucoviscidosiques (238) et dont la relation exacte avec les mutations du gène CFTR reste à élucider. Cependant, la transfection du gène CFTR normal par un vecteur liposomal a permis de diminuer l'adhérence de PA sur un modèle de cellules épithéliales nasales de sujets CF (275).

Les récepteurs asialoGM1 sont exprimés sur l'épithélium respiratoire dédifférencié en cours de réparation et encore plus sur les cellules CF (239, 276). Dans ce contexte, les infections virales de l'enfance notamment à VRS représentent des facteurs aggravants susceptibles de favoriser la colonisation à PA.

Enfin, la production de neuraminidase par PA est majorée dans des conditions d'hyperosmolarité (277). Or, cette enzyme est capable de libérer l'acide sialique à partir des gangliosides membranaires et peut donc constituer un facteur supplémentaire favorisant l'apparition de récepteurs de type asialoGM1. L'utilisation d'un inhibiteur de la neuraminidase permet, de réduire significativement l'adhérence de PA sur des cellules épithéliales nasales de sujets mucoviscidosiques (278).

2.2.4. Corrélations entre adhérence bactérienne et mutations du gène CFTR

La réduction de l'adhérence de PA constatée après transfection de cellules épithéliales nasales mucoviscidosiques par le gène CFTR normal (275), permet d'évoquer un lien étroit entre l'anomalie génétique et l'adhérence bactérienne de PA, et peut être de SA bien que ce dernier semble plus adhérent aux composants du mucus (279). Dans un autre travail l'adhérence d'une souche de PA s'est avérée supérieure pour les cellules mucoviscidosiques

nasales homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ par rapport aux cellules porteuses d'autres mutations ou hétérozygotes non-CF (280).

Enfin, la transfection des cellules trachéales normales avec un plasmide produisant une quantité anormale du domaine R de la protéine CFTR conduirait à une augmentation de l'adhérence bactérienne d'une souche de PA, comparable à celle de cellules exprimant la mutation $\Delta F508$ (281).

2.3. Destruction de *Pseudomonas aeruginosa* par internalisation CFTR dépendante ?

La protéine CFTR jouerait un rôle dans l'élimination de PA en participant directement à l'internalisation du germe par les cellules épithéliales respiratoires (282, 283). Le premier domaine extra membranaire de la protéine CFTR serait un récepteur pour PA indépendamment de la fonction de canal ionique (284). L'absence de protéine CFTR à l'apex des cellules épithéliales respiratoires participerait ainsi directement aux conditions initiales favorables à l'établissement de la colonisation bronchique bactérienne à PA (283). Néanmoins d'autres équipes ont montré que l'internalisation de PA, étudiée *in vitro* sur une lignée de cellules bronchiques normales, serait plutôt liée à la défaillance des jonctions intercellulaires (285) et à des anomalies de polarité des cellules (285, 286), que l'on peut rencontrer notamment dans les épithélia en cours de réparation. Dans ces derniers les jonctions intercellulaires sont anormales au niveau et au pourtour des lésions (287), et les cellules bronchiques expriment à leur surface des molécules (récepteurs pour PA) normalement présentes uniquement à leur pôle basolatéral (288).

3. L'inflammation des voies aériennes

3.1. L'inflammation est un événement précoce et persistant

L'inflammation des voies aériennes basses est un phénomène identifié précocement, persistant et sévère (289). Le poumon, anatomiquement normal à la naissance, présente dès les premières semaines et mois de la vie, les stigmates d'une atteinte inflammatoire.

3.1.1. Inflammation du liquide de lavage bronchioloalvéolaire

L'étude des lavages bronchioloalvéolaires (LBA) de 16 enfants CF (290) d'âge moyen de 6 mois (1 à 12 mois) a mis en évidence une augmentation considérable du nombre des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des taux d'IL-8, cinq à dix fois supérieurs aux sujets non-CF, en présence ou en l'absence d'une infection bactérienne documentée. Ce dernier point a fait évoquer la participation d'un mécanisme primaire lié à l'anomalie génétique elle-même, en partie responsable de l'état inflammatoire de la muqueuse, point sur lequel nous reviendrons plus loin.

D'autres travaux ont confirmé l'augmentation importante du nombre de PNN (en dehors des exacerbations infectieuses) (260, 291-293) et d'IL-8 (292, 293) dans le LBA des sujets atteints de mucoviscidose y compris chez des adultes porteurs de formes "légères" de la maladie sur le plan respiratoire (291). L'étude de l'expectoration peut représenter une alternative intéressante et moins invasive pour évaluer l'inflammation des voies aériennes (294).

3.1.2. Le couple polynucléaire neutrophile – Interleukine-8

L'IL-8 est le principal facteur chimiotactique des PNN bien que d'autres substances soient impliquées comme la fraction C5a du complément et le leucotriène LTB4 (295). Il existe une corrélation entre le nombre de PNN et le taux d'IL-8 dans le LBA (290, 292). Les

cellules capables de synthétiser de l'IL-8 sont principalement les cellules épithéliales bronchiques, les macrophages et les PNN eux-mêmes, sous l'influence de différents stimuli en particulier l'IL-1 et le TNF α (265, 296). L'élévation de la concentration de cytokines proinflammatoires, comme l'IL-1, le TNF α et l'interleukine-6 (IL-6), constatée dans le LBA et l'expectoration, participe à l'amplification de l'inflammation des voies aériennes (297, 298). L'exposition à des agents microbiens comme une culture de PA ou des extraits d'une culture de PA induit la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales respiratoires (299, 300).

Le travail de Di Mango (299) met en évidence l'importance des pili (et flagelles bactériens) de PA dans l'induction de la sécrétion d'IL-8 *in vitro* par les cellules épithéliales respiratoires. Les cellules épithéliales nasales secrètent de l'IL-8 après une exposition au virus respiratoire syncytial auquel sont particulièrement exposés les enfants en bas âge (301, 302). Tager (257) a montré sur un modèle *in vitro* que l'augmentation de la concentration en chlore dans le milieu extracellulaire augmente la production d'IL-8 par les polynucléaires neutrophiles, diminue leur pouvoir bactéricide sur PA et accélère leur lyse notamment par apoptose (257).

3.1.3. Le déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases

L'afflux massif de PNN aux niveaux bronchique et alvéolaire s'accompagne de la libération d'importantes quantités de protéases, élastase, cathepsine G, collagénase ... La rupture de l'équilibre de la balance protéases/anti-protéases (290, 291, 293) participe activement à la destruction anatomique du poumon et à la constitution de bronchectasies.

L'élastase leucocytaire est un médiateur majeur de l'agression du poumon. Sa libération par les PNN est induite pas les bactéries opsonisées, le TNF α , l'IL-8... (265, 303).

L'élastase leucocytaire est responsable de :

- la dégradation de l'élastine, du collagène et des protéoglycans (304) ...,

- la rupture des jonctions intercellulaires et de la mise à nu de la membrane basale,
- l'inhibition de l'activité ciliaire,
- la stimulation de la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales,
- la stimulation de la sécrétion de mucus par les glandes muqueuses (305) peut être favorisée par un contact étroit entre PNN et les cellules muqueuses par l'intermédiaire de molécules d'adhésion ICAM1 et L-sélectine (306),
- la perturbation de l'opsonisation des bactéries par clivage des anticorps opsonisants (307), de facteurs du complément (C3bi), de récepteurs du complément (CR-1) des phagocytes (308), et de la fibronectine,
- l'inactivation des protéines protectrices particulièrement l'alpha-1 antitrypsine (α 1-AT) qui est clivée et retrouvée dans le LBA sous forme de produits de dégradation de bas poids moléculaire (293).

3.1.4. La production de radicaux libres de l'oxygène

La protéine CFTR est impliquée dans la régulation du pH des organelles intracellulaires (238, 309). Une dérégulation à ce niveau contribue vraisemblablement à la génération de radicaux libres de l'oxygène persistants (310), d'autant plus délétère que les niveaux de glutathion plasmatique et dans le liquide de surface bronchique apparaissent diminués chez le sujet atteint de mucoviscidose (311). Ainsi le polymorphisme de la glutathion transférase GSTM3 a été associé à une atteinte respiratoire plus sévère de la maladie (312).

3.1.5. *Le rôle de l'interleukine-10*

L'interleukine-10 (IL-10) est une cytokine "anti-inflammatoire" produite par de très nombreuses cellules dont les macrophages, les cellules épithéliales bronchiques, les lymphocytes T ... Elle exerce d'une part une inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires en diminuant l'activité du facteur de transcription nucléaire NF κ B dont elle diminue la localisation nucléaire (313), et d'autre part une inhibition post transcriptionnelle sur les ARN messagers de l'IL-1 α , l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6, l'IL-8 ... (314). Par ailleurs l'IL-10 diminue la libération de radicaux libres de l'oxygène, interfère avec la fonction des récepteurs de l'IL-1, possède des fonctions immunosuppressives (diminution de l'expression de molécules d'adhésion ICAM1 et B7, diminution de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ...) et immunostimulantes (augmentation de l'activité des lymphocytes T CD8 et NK ...). Les taux d'IL-10 dans le liquide de LBA (315), et dans l'expectoration (316) des sujets CF sont moindres que chez les sujets non-CF. La production d'IL-10 par les cellules bronchiques épithéliales est également diminuée chez les sujets CF (315).

La réaction inflammatoire liée à l'infection chronique des voies aériennes par PA chez la souris transgénique KO pour le gène de l'IL-10, peut être modulée par l'administration d'IL-10 recombinante délivrée par voie intrapéritonéale, ce qui permet de diminuer la morbidité et la mortalité, et de réduire le taux de PNN dans le LBA (317). Sur un modèle d'infection aiguë à PA chez ces souris, on constate dans le LBA par rapport aux groupes contrôles, des taux supérieurs et persistants des PNN, TNF α , IL-6, IL-1 et MIP-2 (équivalent de l'IL-8 chez la souris), ainsi qu'une activation prolongée du facteur de transcription nucléaire NF κ B.

4. Inflammation primaire ou secondaire à l'infection ?

4.1. Les constatations cliniques

L'infection joue un rôle clairement essentiel dans la génération de l'inflammation des voies aériennes mais la question de l'existence d'une inflammation primaire, préexistante à l'infection (318), a été posée par certaines observations cliniques sur les LBA de nourrissons âgés de quelques semaines à quelques mois. En effet, dans la série de Khan (290), les recherches micro-biologiques (bactériennes, virales, mycologiques) étaient négatives pour 7 des 16 LBA de sujets CF étudiés, mais les taux de PNN et d'IL-8 étaient malgré tout significativement supérieurs à ceux des sujets non-CF. Les critères d'absence d'infection étaient pourtant exigeants puisque le seuil de sensibilité pour le diagnostic d'infection bactérienne était estimé à 2×10^2 unités formant colonie (ufc)/ml.

Des résultats de travaux cliniques comparables ont été rapportés (292, 319) mais sont contestés principalement par les équipes australiennes, qui ont une pratique des LBA systématiques et itératifs dès le plus jeune âge, et pour lesquelles l'infection reste la cause de l'inflammation (320, 321). Ces résultats divergents peuvent peut être trouver des explications, d'une part dans l'interprétation bactériologique et la définition des seuils à partir desquels on considère qu'il y a infection, et d'autre part dans des variations régionales des paramètres inflammatoires qui ont été décrites dans les poumons de sujets atteints de mucoviscidose (322).

4.2. Les modèles cellulaires

L'augmentation de la sécrétion d'IL-8 à l'état basal par des lignées cellulaires CF bronchiques et trachéales de surface ou des glandes muqueuses a été constatée par différents auteurs (256, 323, 324). La stimulation de ces lignées par PA (323, 324), l'IL-1 β (324), le TNF α , ou une augmentation de la concentration de chlore (323) majorent encore la sécrétion

d'IL-8. On a évoqué la modification des compétences cellulaires liée à la mise en culture cellulaire pour contredire l'hypothèse d'une inflammation primaire.

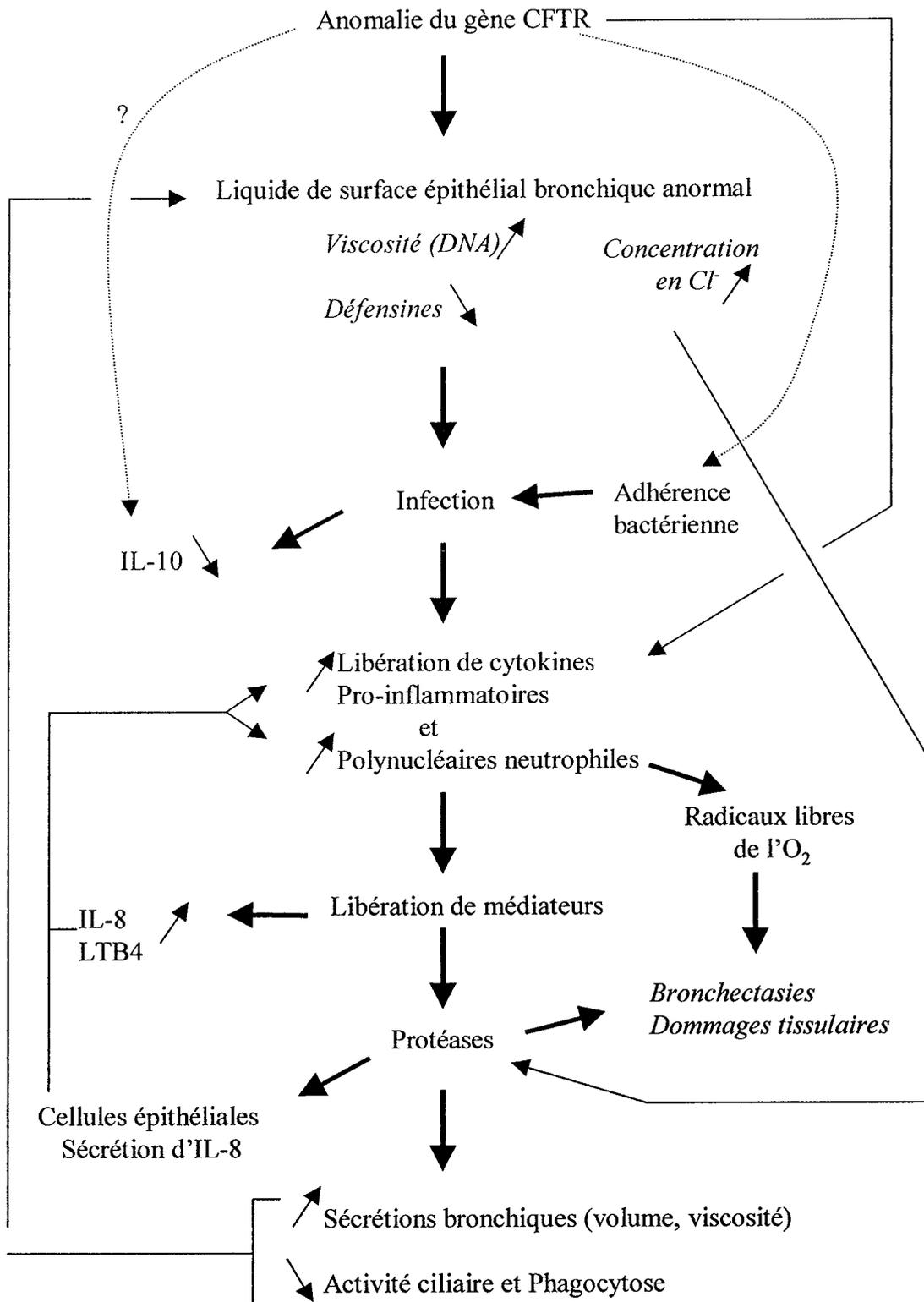
4.3. Apport des xénogreffes de bronches fœtales

L'étude de l'inflammation de la muqueuse respiratoire grâce à l'utilisation de xénogreffes de bronches fœtales CF et non-CF sur des souris porteuses d'un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) apporte un éclairage nouveau concernant la préexistence d'un état inflammatoire aux phénomènes infectieux (325). La maturation histologique de l'épithélium de surface et des glandes muqueuses se fait sans contamination bactérienne, et de façon comparable dans les bronches fœtales non-CF et CF. Ces dernières présentent les caractéristiques typiques du déficit de transport ionique transépithélial lié à la maladie.

A l'état basal : 1) toutes les xénogreffes présentent une colonisation muqueuse par des leucocytes (mastocytes, macrophages, et lymphocytes T), 2) les xénogreffes CF montrent en plus des amas sous muqueux de leucocytes (humains et murins) et une concentration d'IL-8 dans les sécrétions environ dix fois supérieure par rapport aux non-CF.

Après exposition à PA : les xénogreffes CF présentent précocement une desquamation épithéliale, une invasion bactérienne jusqu'à la membrane basale et au mésenchyme sous jacent, ainsi qu'une migration transépithéliale de leucocytes. Dans les xénogreffes de tissus non-CF, l'atteinte est plus tardive et beaucoup moins intense. Ces éléments renforcent l'hypothèse d'une inflammation primaire ainsi que d'une réaction inflammatoire plus importante après une agression (292, 323, 324, 326). Ce concept d'inflammation primaire préexistante dans des bronches anatomiquement normales à la naissance (en dehors de quelques hypertrophies de glandes muqueuses observables), s'aggravant dramatiquement à l'occasion des premières infections respiratoires est concordant avec les observations cliniques habituelles, où l'on constate en général l'absence d'atteinte respiratoire évidente avant les

Figure n°24: Les mécanismes de l'inflammation des voies aériennes dans la mucoviscidose



premiers accidents infectieux aigus. Les lésions épithéliales et la période de réparation conduisent à l'expression de récepteurs favorisant l'adhérence et la persistance de bactéries, notamment de PA, permettant l'établissement d'une colonisation (239, 327). La figure n°24 résume les mécanismes supposés responsables de l'inflammation de voies aériennes.

4.4. *Le rôle clef du facteur de transcription nucléaire Kappa B (NFκB)*

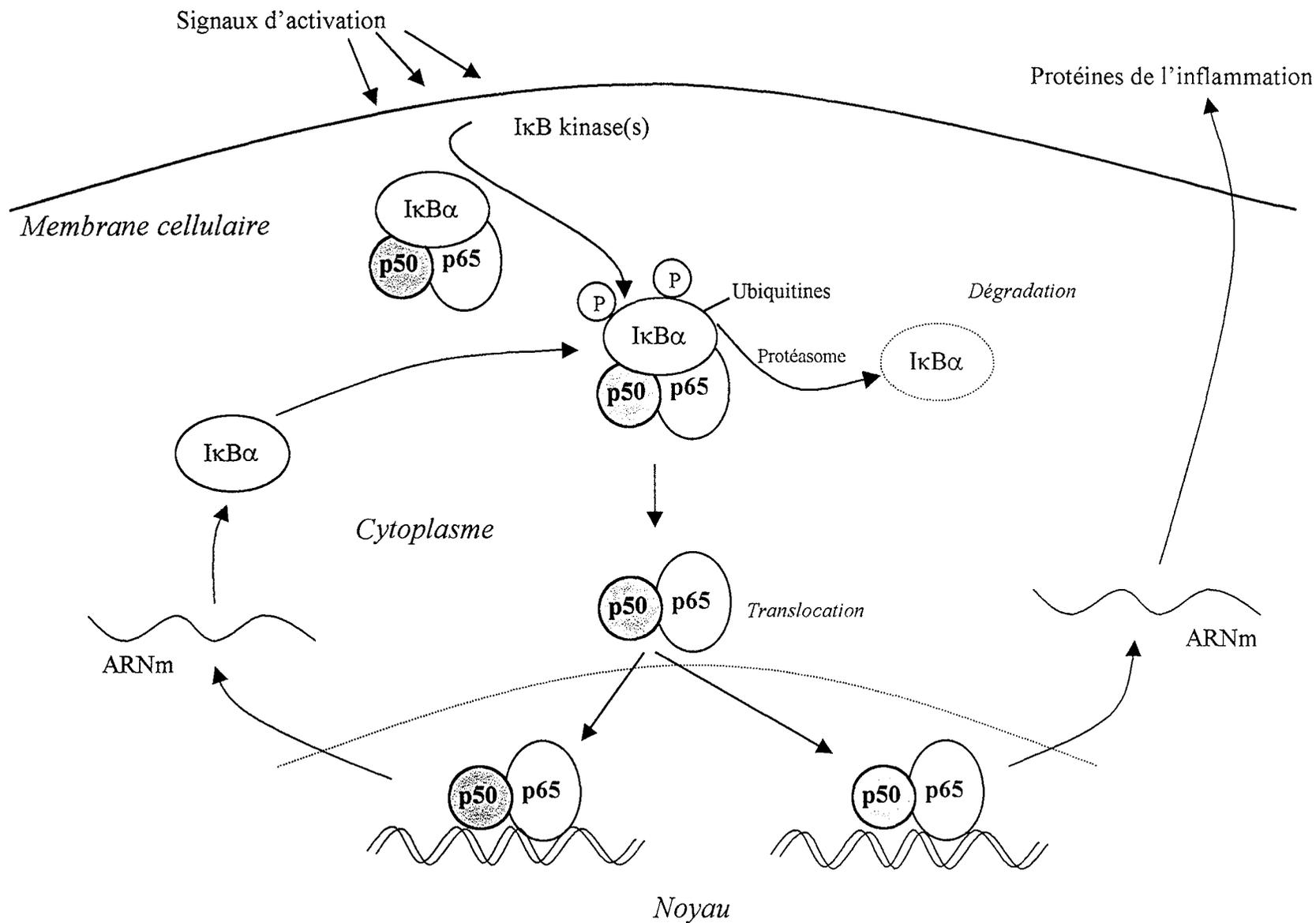
4.4.1. *Structure et mode d'activation de NFκB*

NFκB est un facteur de transcription nucléaire ubiquitaire impliqué dans la production de très nombreuses cytokines, molécules d'adhésion, récepteurs et enzymes,... impliqués notamment dans la réaction inflammatoire (tableau n°14). La fixation de NFκB sur des éléments de réponse situés dans les promoteurs des gènes cibles induit leur transcription avec, par exemple la production d'IL-8, IL-6, TNFα ...

En fait NFκB est constitué de deux sous-unités qui appartiennent à la famille des protéines Rel. Les protéines Rel comprennent deux groupes : 1) celui de p50 (NFκB₁) et de p52 (NFκB₂) qui dérivent respectivement de protéines précurseurs de 105 et 100 kDa, et 2) celui incluant p65 (RelA), RelB, c-Rel,... sécrétés sans précurseurs. Ainsi NFκB est un hétérodimère ou un homodimère des protéines Rel.

NFκB est maintenu dans le cytoplasme sous sa forme inactive par l'intermédiaire d'inhibiteurs, notamment IκBα et β. La stimulation d'une cellule, par exemple du TNFα ou de l'IL-1 (tableau n°15), induit l'apparition de protéines kinases qui provoquent une phosphorylation de IκBα, qui est ensuite dégradé par l'intermédiaire du système ubiquitines/protéasome S26. NFκB est alors libéré et effectue sa translocation vers le noyau pour induire la transcription des gènes cibles (328-330) (figure n°25).

Figure n°25: Régulation de l'activation du facteur de transcription nucléaire NFκB (d'après Barnes 1997)



<i>Cytokines proinflammatoires</i>	<i>Enzymes</i>
TNFα	iNOS
IL-1β, IL-2, IL-6	COX-2
GM-CSF, M-CSF	5-lipoxygénase ...
<i>Chemokines</i>	<i>Molécules d'adhésion</i>
IL-8	ICAM1, VCAM1
MIP-1α	E-sélectine
MCP-1	
Eotaxine ...	<i>Récepteurs</i>
	IL-2Rα
	TCRβ

Tableau n°15 : Les principaux stimuli activant NFκB

- Cytokines
 - TNFα
 - IL-1β
- PAF (Platelet Activating Factor)
- Oxydants
 - H₂O₂
 - Ozone
- Virus
 - Rhinovirus, Influenza virus,*
 - EBV, CMV
 - Adenovirus*
- Lipopolysaccharides bactériens

Le gène de l'inhibiteur $I\kappa B\alpha$ possède un élément de réponse pour $NF\kappa B$ qui permet l'induction de la synthèse d' $I\kappa B\alpha$ qui vient se fixer sur $NF\kappa B$ pour en bloquer l'activité (330). Paradoxalement l'inhibiteur $I\kappa B\beta$ peut maintenir $NF\kappa B$ sous sa forme active et prolonger son action pro-inflammatoire (331).

4.4.2. Activation endogène (primaire) de $NF\kappa B$ dans la mucoviscidose

L'activation de $NF\kappa B$ in vitro dans les cellules anormales et mucoviscidosiques peut être induite par la stimulation exogène par PA ou uniquement par les Pili de PA (324). Néanmoins la lignée cellulaire mucoviscidosique IB3 ($\Delta F508/W1282X$) présente à l'état basal une activation au $NF\kappa B$ (324, 332), qui n'existe pas dans la lignée cellulaire correspondante corrigée C38 (porteuse d'un gène CFTR normal). De plus les cellules IB3 présentent à l'état basal et après stimulation par le $TNF\alpha$, une augmentation de la production et de la localisation nucléaire de l'inhibiteur $I\kappa B-\beta$ (332).

Pour expliquer cette augmentation de l'activation de $NF\kappa B$ à l'état basal certains ont évoqué la responsabilité de la surcharge du réticulum endoplasmique. En effet le groupe de Baeuerle (333) a montré que l'accumulation de protéine virale dans le réticulum endoplasmique constitue un stress responsable d'une activation de $NF\kappa B$. Cette hypothèse semble être confirmée par Knorre (334) qui a constaté que l'activation endogène de $NF\kappa B$ peut être provoquée par l'expression de la protéine mutante $\Delta F508$ et la surcharge du réticulum endoplasmique.

Enfin, il semble que l'élévation de la concentration en NaCl soit directement liée à une augmentation de l'expression de $NF\kappa B$, une diminution de l'expression de $I\kappa B\alpha$ et *in fine* une augmentation de la sécrétion d'IL-8 (335).

5. Place actuelle du traitement anti-inflammatoire dans la mucoviscidose

L'inflammation de la muqueuse des voies aériennes basses est précoce et sévère chez les sujets atteints de mucoviscidose avec la participation de mécanismes primaires (endogène) et secondaire (lié à l'infection).

Devant ce constat, on a proposé des tentatives de traitements anti-inflammatoires au long cours, donnés précocement dès les premières années de la vie. L'utilisation de corticoïdes par voie orale à fortes doses chez le jeune enfant permet de ralentir le déclin respiratoire mais au prix d'effets secondaires inacceptables (336). L'administration de corticoïdes par voie inhalée n'a pas fait la preuve de son efficacité avec des résultats divergents selon les équipes (337, 338). L'anti-inflammatoire non stéroïdien Ibuprofène donné au long cours par voie orale a montré une efficacité chez l'enfant de moins de 13 ans (339).

Enfin, compte tenu des résultats spectaculaires de l'érythromycine dans la panbronchiolite diffuse des japonais (340) et des données *in vitro* attestant notamment d'une efficacité sur la modulation de la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques (341, 342), l'utilisation des macrolides a été proposée. Ainsi l'utilisation d'Azithromycine a apporté certains succès (343, 344).

L'apport d'acides gras polyinsaturés en grandes quantités a permis d'observer *in vivo* chez des souris "mucoviscidosiques" la quasi disparition des marqueurs de l'inflammation et a relancé l'intérêt pour cette approche (345, 346). Des essais thérapeutiques sont en cours dans ce domaine. Pour l'instant il est néanmoins impossible d'envisager l'administration de quantités comparables aux patients, et par ailleurs on ne connaît pas les éventuels effets délétères d'un traitement prolongé à fortes doses.

Chapitre II : Les objectifs des travaux de recherche

L'inflammation de la muqueuse des voies aériennes est un phénomène précoce et persistant qui joue un rôle majeur dans la dégradation progressive des performances fonctionnelles respiratoires. Une controverse persiste entre les deux hypothèses principales actuellement avancées: d'une part l'inflammation primaire (endogène) liée directement à l'anomalie génique et d'autre part l'inflammation secondaire liée à l'infection des voies aériennes. L'interleukine-8, dont la production est contrôlée par le facteur de transcription nucléaire NFκB, joue un rôle de premier plan par son activité chimiotactique pour les polynucléaires neutrophiles.

Dans une première partie nous étudions la sécrétion d'IL-8 et le niveau d'activation de NFκB sur : 1) des lignées cellulaires mucoviscidiques, 2) chez la souris et 3) sur des cellules épithéliales nasales fraîchement recueillies afin d'approcher au plus près la situation chez l'homme et de façon non invasive. Nous étudions plus particulièrement d'une part le rôle des mutations du gène CFTR de type II, potentiellement génératrice de stress cellulaire par surcharge du réticulum endoplasmique, et d'autre part l'adhérence bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*) aux cellules épithéliales ciliées et ses liens avec les paramètres de l'inflammation.

Dans une deuxième partie nous étudions les résultats de la tentative de modulation de l'activité de NFκB et de la sécrétion d'IL-8 par la transfection dans une lignée cellulaire mucoviscidique, soit du gène de l'inhibiteur IκBα de NFκB, soit d'oligonucléotides complémentaires de la séquence de consensus nucléaire de NFκB. Les objectifs de ces deux approches sont de démontrer la possibilité de réduire les paramètres de l'inflammation.

*Chapitre III : Etude des mécanismes de l'inflammation
de l'épithélium des voies aériennes:
Abstract n°2 et Article n°2*

268 Sécrétion élevée d'interleukine-8 par les cellules épithéliales nasales dans la mucoviscidose : liée à l'adhérence de *Pseudomonas Aeruginosa*

P. SCHEID (1, 2), J.C. DAVIES (1), Y. MARTINET (2), D.M. GEDDES (1), E.W.F.W. ALTON (1)

(1) Ion Transport Unit, National Heart and Lung Institute, London, UK, (2) Pneumologie A, CHU de Brabois, Nancy, France.

L'interleukine-8 (IL-8), puissant facteur chimiotactique des polynucléaires neutrophiles, est un acteur important de la réaction inflammatoire de la muqueuse respiratoire dans la mucoviscidose. Nous avons étudié la sécrétion d'IL-8 de cellules épithéliales nasales fraîchement recueillies chez des patients atteints de mucoviscidose et chez des sujets témoins, avant et après mise en présence d'une culture d'une souche non mucoïde de *Pseudomonas aeruginosa* (PA). La sécrétion basale d'IL-8, en l'absence de PA, est supérieure pour les cellules mucoviscidosiques (CM) (309 ± 59 pg/ml, $n = 16$), par rapport aux cellules témoins (CT) (150 ± 33 pg/ml, $n = 12$) mais non significative ($p = 0,08$). La production d'IL-8 à 24 heures est significativement supérieure en présence de PA ($p < 0,002$) chez les CM ($8\,729 \pm 2\,150$ pg/ml, $n = 19$) par rapport aux CT ($2\,987 \pm 659$ pg/ml, $n = 16$), mais pas en l'absence de PA CM ($4\,516 \pm 1\,227$ pg/ml, $n = 19$), CT ($2\,997 \pm 683$ pg/ml, $n = 16$), $p = 0,23$. Les CM produisent plus d'IL-8 à 24 heures après incubation avec PA ($P < 0,02$). L'adhérence de PA aux CM est d'environ 2,5 à 4,5 fois supérieure (DAVIES J.C. *et al. Am J Resp Cell Mol Biol* 1997 ; 16 : 657-63). Des dilutions adaptées de la culture de PA ont permis d'atteindre des niveaux d'adhérence proches ($p = 0,28$) pour les CM ($5,4 \pm 0,5$ PA/10 cellules) et pour les CT ($4,5 \pm 0,6$ PA/10 cellules). Dans ces conditions, la sécrétion d'IL-8 rapportée à l'index d'adhérence n'est plus significativement différente ($p = 0,43$) entre les CM (771 ± 109 pg/ml/PA/10 cellules, $n = 13$) et les CT (553 ± 111 pg/ml/PA/10 cellules, $n = 7$). Ainsi la production

élevée d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales de patients atteints de mucoviscidose apparaît-elle liée à l'augmentation de l'adhérence de PA. Cela est probablement lié à la présence d'asialogangliosides en grand nombre à la surface des cellules mucoviscidosiques, connus pour être des récepteurs pour PA.

Travail réalisé grâce au soutien de la SPLF et du Laboratoire Boehringer Ingelheim.

Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence

P. Scheid*, L. Kempster*, U. Griesenbach*, J.C. Davies*, A. Dewar[#], P.P. Weber[¶],
W.H. Colledge⁺, M.J. Evans[§], D.M. Geddes*, E.W.F.W. Alton*

Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. P. Scheid, L. Kempster, U. Griesenbach, J.C. Davies, A. Dewar, P.P. Weber, W.H. Colledge, M.J. Evans, D.M. Geddes, E.W.F.W. Alton. ©ERS Journals Ltd 2001.

ABSTRACT: It is unclear whether inflammation in the cystic fibrosis (CF) lung relates predominantly to bacterial infection, or occurs as a direct consequence of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein.

Interleukin (IL)-8 secretion from CF and non-CF cell lines, and from CF and non-CF human primary nasal epithelial cells incubated with or without *Pseudomonas aeruginosa*, was measured. Activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in unstimulated CF and non-CF nasal epithelial cells, cell lines and murine tissues was measured by gel-shift assays.

No significant difference in basal IL-8 production or NF- κ B activation was observed between CF and non-CF primary nasal cells. However, CF cells exhibited a significantly ($p < 0.01$) increased IL-8 secretion following *P. aeruginosa* stimulation. Equalization of the increased *P. aeruginosa* adherence observed in CF cells, to non-CF levels, resulted in comparable IL-8 secretion. Further, IL-8 production did not differ with mutations which result in either correctly localized CFTR, or in partial/total mislocalization of this protein. Similar levels of NF- κ B activation were observed in a number of organs of wild-type and CF mice. Finally, IL-8 secretion and NF- κ B activity were not consistently increased in CF cell lines. Cos-7 cell transfection with plasmids expressing Δ F508 or G551D mutant CFTR protein resulted in increased activation of a p50-containing NF- κ B complex, but IL-8 secretion was similar to wild-type cells.

The authors conclude that the stimulus produced by *Pseudomonas aeruginosa* is the predominant inflammatory trigger in their models.

Eur Respir J 2001; 17: 27–35.

*Dept of Gene Therapy, Imperial College at the National Heart and Lung Institute, London, UK, [#]Electron Microscopy and [¶]Microbiology Dept, Royal Brompton and Harefield Hospital, London, UK, ⁺Dept of Physiology, University of Cambridge, Cambridge, UK, and [§]School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, UK.

Correspondence: E.W.F.W. Alton, Dept of Gene Therapy, National Heart and Lung Institute, Manresa Road, London, SW3 6LR, UK.
Fax: 44 2073518340

Keywords: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, endoplasmic reticulum, interleukin-8, nuclear factor- κ B, *Pseudomonas aeruginosa*

Received: April 3 2000

Accepted after revision July 31 2000

This study was supported by the Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose, the Société de Pneumologie de Langue Française, the European Respiratory Society, the North Atlantic Treaty Organization, the Cystic Fibrosis Research Trust and a Wellcome Trust Senior Clinical Fellowship.

Over the last two decades, the life expectancy of patients with cystic fibrosis (CF) has improved dramatically, allowing median survival to reach thirty years. Cloning of the CF gene and subsequent investigations into the molecular physiology of the gene product have led to a better understanding of the disease. The CF gene encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein (CFTR), a chloride channel localized to the apical surface of epithelial cell membranes. More than 800 CF mutations are classified into five groups based on the mechanism by which the function of CFTR is disrupted. Broadly, these include those in which no protein is produced (class I), protein which does not reach its correct location (class II), and those in which smaller amounts or less functional protein are correctly localized (classes III–V) [1]. The deletion of the amino acid phenylalanine

at position 508 (Δ F508) in the CFTR protein accounts for >70% of CF alleles in Caucasians and is an example of a class II mutation.

The most common cause of death in CF is respiratory failure as a result of chronic pulmonary infection and inflammation [2]. However, it is not clear whether the inflammation is simply a secondary response to infection, or whether the primary defect in CFTR is more directly linked to the generation of this inflammatory process. A number of lines of evidence link mutant CFTR with an increased susceptibility to infection. Most studies suggest that CF subjects show reduced mucociliary clearance, perhaps related to the primary defect. This, in turn, will predispose to infection by a variety of organisms [2]. Local host antimicrobial defences, such as β -defensins [3], may show impaired function as a result of alterations in

airway surface fluid (ASF) electrolytes, although it is presently unclear whether CF ASF is indeed abnormal with regard to sodium or chloride content [4]. A controversial hypothesis suggests that there is a defect in ingestion of *Pseudomonas aeruginosa* by respiratory epithelial cells [5], likely to facilitate infection. Finally, the receptor for *P. aeruginosa*, the asialoglycolipid asialo-GM1, is significantly increased on the apical cell membrane of CF respiratory epithelium and may, therefore, promote infection by increasing adherence [6]. Thus, several studies support the hypothesis that mutant CFTR can lead to increased bacterial colonization and resultant inflammation.

The hypothesis of primary (endogenous) inflammation is based firstly on clinical observations of inflammation preceding detectable infection in CF neonates and young children. Thus, bronchoalveolar lavage fluid showed neutrophil infiltration, increased levels of interleukin (IL)-8 [7, 8] and a protease/antiprotease imbalance, but was negative for bacterial culture [7]. A recent study adds weight to the concept of endogenous inflammation [9]. Early inflammation was examined in human foetal airway xenografts in severe combined immunodeficient (SCID) mice. Significant increases in IL-8 secretion were seen from CF proximal airway grafts prior to infection, when compared to non-CF grafts. Neutrophil recruitment to the basal membrane and movement to the epithelial surface was also evident. This was slower and less marked in non-CF proximal airways. In distal airway xenografts, neutrophil migration was again observed in CF airways, but was not seen in non-CF tissues. One possible explanation for endogenous inflammation is that mutant (mistrafficked) CFTR protein may directly increase activation of the transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B) [10]. NF- κ B, and particularly the p50/p65 heterodimer, is involved in the regulation of a large number of proinflammatory mediators [11]. In addition, "protective" cytokines such as IL-10 which serve to terminate inflammation, and are also under the control of NF- κ B, have been shown to be significantly reduced in CF [12].

IL-8 is a powerful chemoattractant and is transcriptionally regulated by NF- κ B. IL-8 is involved in recruitment of neutrophils into the lung [13] or nasal mucosa [14] and is a central factor in the inflammatory response of the airways [15]. This study has examined whether there is evidence for basally increased IL-8 production and NF- κ B activation to support the hypothesis directly linking mutant CFTR to inflammation. To assess the alternative hypothesis of inflammation following infection, it has been studied whether in CF, stimulation with *P. aeruginosa* results in exaggerated production of IL-8, and whether this in turn relates to the characteristically increased adherence level of these organisms.

Materials and methods

Patient population

The study used 29 adult CF patients (21 males) with a mean (range) age of 29.2 (17–44) yrs. None were using

nasally inhaled, oral or intravenous steroids and no patient was studied during an acute exacerbation. The genotype of each subject is included in the Results section. Eighteen nonsmoking healthy volunteers (11 males) with a mean age of 32.7 (23–50) yrs served as controls. The protocol was approved by the Royal Brompton Hospital Ethics Committee and all subjects gave informed consent.

Nasal epithelial cell harvesting

Nasal epithelial cells were obtained by brushing the mucosa of the inferior turbinate of both nostrils with a 3 mm cytology brush (Diagmed, Thirsk, UK). Recovered cells were suspended in Ham's F12 medium (Gibco BRL, Paisley, UK), washed once and pelleted by pulse centrifugation ($13,000 \times g$) in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in Ham's F12. Cell numbers were quantified by microscopic examination in a standard haemocytometer counting chamber (Sigma, Poole, UK) and viability evaluated using the trypan blue exclusion assay. Subsequently, samples were divided into two groups for assessment of IL-8 secretion and bacterial adherence. Viability was again quantified after 24 h.

Bacterial strain

A laboratory reference strain of *P. aeruginosa* (international antigenic typing scheme (IATS) serotype 0:1 (National Collection of Type Cultures 11440, American Type Culture Collection 3348), nonmucoid, piliated and gentamycin-sensitive) was used [16]. The bacteria were grown on blood agar plates for four consecutive days before overnight culture in tryptone soya broth (Unipath Ltd, Basingstoke, UK) to ensure piliation. Piliation status was confirmed by transmission electron microscopy. Briefly, bacteria were suspended in distilled water, placed onto formvar coated grids (Agar Scientific Ltd, Stansted, UK) and negatively stained with 0.65% sodium phosphotungstate. Subsequently, bacteria were pelleted by centrifugation at $160 \times g$ for 10 min, supernatant was removed and the pellet resuspended in 1 mL of phosphate buffered saline (PBS). Bacterial concentration was quantified by spectrophotometry, with an optical density at 620 nanometers, of 0.1 corresponding to $\sim 2.5 \times 10^8$ bacteria, as previously described [17]. Bacterial dilutions were prepared in PBS.

Pseudomonas stimulation assay

Nasal epithelial cells were divided into two 400- μ L aliquots. *P. aeruginosa* at a final concentration of $\sim 5.2 \times 10^7$ bacterial mL^{-1} was added to one aliquot, whilst the second aliquot was used to determine basal IL-8 secretion in the absence of stimulation. Both aliquots were incubated at 37°C with 5% carbon dioxide. After 1 h, 50 μ L of supernatant were removed from each sample and immediately stored at -20°C for subsequent IL-8 analysis. Gentamycin (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

was added to each sample and the incubation was continued under the same conditions. After 24 h, 50 μL of supernatant were removed from each aliquot and stored at -20°C . IL-8 quantification was carried out using a standard enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Genzyme, Billingham, UK), with results expressed as IL-8 production $\cdot 10^{-5}$ live cells present at the start of the incubation.

Assessment of bacterial adherence by scanning electron microscopy

Adherence was assessed by a previously described technique [17]. Briefly, after incubation at 37°C for 1 h, nasal brushings were spun through a 50% Percoll gradient (Pharmacia-Biotech, St Albans, UK) at 4°C at $13,000 \times g$ for 20 min, to separate the nonadherent bacteria from bacteria attached to epithelial cells. The nonadherent bacteria pelleted at the base of the tube, whereas bacteria attached to epithelial cells remained at the percoll/PBS interface. This fraction was removed and cytopun at $20 \times g$ onto a thermanox coverslip (Emitech, Ashford, Kent, UK). Cells were fixed overnight with 2.5% cacodylate-buffered glutaraldehyde, washed in sodium cacodylate buffer and dehydrated with serial concentrations of ethanol and hexamethyldisilazane (TAAB Laboratories, Aldermaston, UK). Coverslips were then mounted onto aluminium stubs, coated with gold, and analysed through field-emission scanning electron microscopy (Hitachi S4000, Nissei Sangyo, Tokyo, Japan). Samples were coded and examined with the observer blinded to the incubation conditions. Bacterial binding, defined as direct contact of *P. aeruginosa* with the ciliated surface of the cells, was assessed in a mean \pm SEM of 41 ± 3 cells per sample. Adherence data are expressed as the mean \pm SEM of adherent bacteria per 10 cells.

Equalization of Pseudomonas aeruginosa adherence

As increased IL-8 secretion levels produced by CF cells may simply reflect the increased receptor number, the authors attempted to equalize bacterial adherence in CF and non-CF cells. Decreasing dilutions of the *P. aeruginosa* standard culture were applied to CF cells, until similar adherence levels were seen in CF and non-CF cells.

Electrophoretic mobility shift assay

Cell pellets were washed twice in ice-cold PBS (Sigma, Poole, UK) and lysed in 70 μL of extraction buffer as previously described by PAHL *et al.* [18]. The authors assayed total cellular protein, since irrespective of intracellular localization, only activated NF- κB can form deoxyribonucleic acid (DNA)/protein complexes, and thus be visualized using the electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Briefly, cells were resuspended in extraction buffer (20 mM N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), pH 7.9, 350 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Nonidet (NP40), 0.5 mM

ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.5 mM dithiothreitol (DTT) plus protease inhibitors (0.2 trypsin inhibitor units (TIU) mL^{-1} aprotinin, 500 μM 4-(2-aminoethyl)benzoesulphonyl fluoride (AEBSF), 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride) and incubated on ice for 30 min. Cell debris was removed through centrifugation ($14,000 \times g$ 5 min) and the protein concentration was determined by a modified Folin-Lowry method [19]. The gel shift assay system from Promega (Southampton, UK) was used and EMSA was carried out according to manufacturers recommendations. An oligonucleotide probe containing the κ light chain enhancer consensus sequence binding site for NF- κB (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') was end-labelled with radiolabelled adenosine triphosphate (^{32}P -ATP) (Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK). Each reaction used 10 μg of cellular protein. Reaction products were resolved on 5% nondenaturing polyacrylamide gels (Anachem, Luton, UK) at 10 mA for 3 h at 20°C . Gels were then dried for 2 h at 80°C and exposed to Kodak Biomax MS film at -80°C . To identify the specificity of NF- κB binding, competition studies with an approximate 50-fold excess of unlabelled NF- κB consensus oligonucleotide were carried out. For supershift analysis, 2 μg of either anti-p50, anti-p52, anti-cRel, anti-RelB or anti-p65 antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) were added after the addition of labelled oligonucleotide and reactions were incubated for a further 45 min at room temperature. Quantification of NF- κB complexes was carried out by densitometry using LabScan and ImageMaster 1D software (Amersham Pharmacia Biotech, St. Albans, UK).

Mice

Lungs, trachea, liver, spleen and kidneys were removed from ΔF508 homozygote CF mice (CFTR^{*tm2Cam*}) [20] and non-CF littermates (age 6–12 weeks). To determine NF- κB activity the tissues were mechanically homogenized in 1 mL of extraction buffer and processed for EMSA as described above. Each reaction used 20 μg total protein.

Cell culture

Human CF cell lines used were tracheal epithelium ($\Sigma\text{CFTE29o-}$, $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$), submucosal epithelium (CFSMEo-, $\Delta\text{F508}/\text{unknown}$) and nasal polyp (CF-NPE9o-, unknown/unknown). Human non-CF cell lines used were bronchial epithelium (16HBE14o-), tracheal epithelium (9HTEo-) and tracheo-bronchial epithelium (TBEO-). All cell lines were provided by Dieter Gruenert (University of California, San Francisco, CA, USA). CFNP9o-, $\Sigma\text{CFTE29o-}$, CFSMEo- and 16HBE14o- cells were cultured in minimal essential medium (MEM); 9HTEo- and TBEO- cells were grown in Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM). Both media were supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 1% penicillin-streptomycin solution and cells

grown in a 5% CO₂ atmosphere. All media, FCS and antibiotic solutions were obtained from Sigma (Poole, UK). Cultures were assayed for mycoplasma contamination using an ELISA assay (Boehringer Mannheim UK, Lewes, UK) and were shown to be free of infection. IL-8 secretion during 24 h incubation was determined in semiconfluent monolayers using a standard ELISA assay. To determine NF- κ B activation cells were grown to 70% confluence, scraped into surrounding medium and pelleted at 160 \times g for 5 min at room temperature and protein lysates were prepared as described above. The degree of cell confluence in immortalized cell culture may influence activation of NF- κ B proteins. Thus, care was taken to ensure that all cell cultures were assayed at 70% confluence. Cos-7 cells (supplied by ATCC) were cultured under routine procedures in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% streptomycin/penicillin.

Transfections

The 6.2 kb wild-type, Δ F508 and G551D CFTR complementary deoxyribonucleic acids (cDNAs) were cloned into the Not I site of the eukaryotic expression vector pCMV β (Clontech Laboratories UK Ltd, Basingstoke, UK), from which the β -galactosidase reporter gene was removed through Not I digestion. DNA was prepared using Qiagen columns (Qiagen Ltd, West Sussex, UK), according to manufacturers recommendations. Transient transfection of semiconfluent Cos-7 cells was carried out using plasmids complexed to the cationic lipid DC-Cholesterol/dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) at a ratio of 1:3 (44.8 μ g plasmid: 134.4 μ g lipid per 80 cm² flask) in Optimem (Sigma). The medium was replaced with normal growth medium 24 h after transfection. IL-8 was determined 48 h after transfection and NF- κ B activity was determined as described above.

Statistical analysis

The Mann-Whitney U-test was used to compare means and the Wilcoxon rank sum test to assess significance of changes from background levels. The null hypothesis was rejected at $p < 0.05$. Data are presented as mean \pm SEM for convenience. Numbers of human subjects or mice are indicated by n numbers, where appropriate.

Results

Interleukin-8 secretion by nasal epithelial cells

In the absence of added *P. aeruginosa*, IL-8 secretion at 24 h from freshly obtained CF (n=19) and non-CF (n=16) primary nasal epithelium was not significantly different (fig. 1). Incubation with *P. aeruginosa* resulted in a significant ($p < 0.05$) increase in IL-8 secretion after 24 h from CF, but not from non-CF nasal cells. Thus, in the presence of *P. aeruginosa*, IL-8 secretion from CF cells was approximately three-fold higher than from

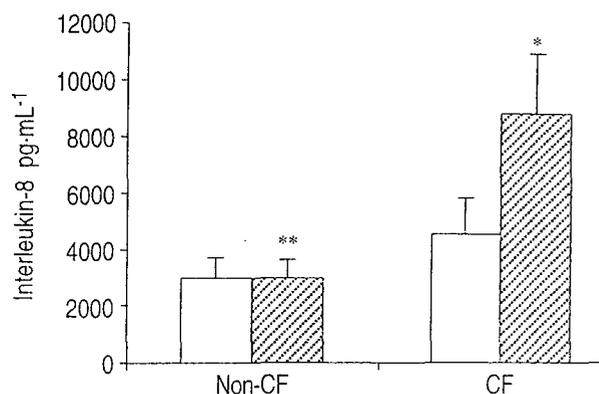


Fig. 1. – Interleukin-8 secretion assayed over 24 h from nasal epithelial cells under basal conditions and following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* (cystic fibrosis (CF) n=19, non-CF n=16). Error bars indicate SEM. □: without *P. aeruginosa*; ▨: with *P. aeruginosa*; *: $p < 0.05$ versus unstimulated CF cells; **: $p < 0.01$ versus stimulated CF cells.

non-CF cells ($p < 0.01$). Assessment of cell viability by trypan blue exclusion and evidence of ciliary beating demonstrated that there was no significant difference in the number of live cells at 24 h after stimulation (CF: $1.8 \pm 0.6 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, n=11; non-CF: $1.7 \pm 0.5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, n=8).

Equalization of *Pseudomonas aeruginosa* adherence levels in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis cells

It has previously been demonstrated using these methods that *P. aeruginosa* adherence to CF cells is ~ 3 –4 times greater than to non-CF cells [17]. As this may have been the stimulus for IL-8 production, the authors attempted to equalize the numbers of adherent bacteria to CF and non-CF cells. The authors first assessed the highest concentration of *P. aeruginosa* which could be applied to non-CF cells without affecting their viability, as assessed by trypan blue exclusion and evidence of ciliary beating. A 1:4 dilution of the standard *P. aeruginosa* culture, corresponding to 1.6×10^8 bacteria $\cdot \text{mL}^{-1}$, was the maximum tolerated concentration resulting in 4.5 ± 0.6 *P. aeruginosa* adhering per 10 cells (n=7).

Next, the *P. aeruginosa* concentration applied to CF cells was reduced to produce similar levels of binding to that seen in non-CF cells (fig. 2a). This level of binding was reached for CF cells with a *P. aeruginosa* solution approximately six times less concentrated than for non-CF, corresponding to 2.5×10^7 bacteria $\cdot \text{mL}^{-1}$. Viability, assessed at 24 h, using these two concentrations of *P. aeruginosa* was not different in CF and non-CF cells.

Interleukin-8 secretion under conditions of similar *Pseudomonas aeruginosa* adherence

When levels of *P. aeruginosa* adherence were approximately equal, IL-8 production by CF (n=13) and non-CF cells (n=7) did not differ over a 24 h period (fig. 2). Note that IL-8 values for this comparison were normalized for the number of adherent bacteria

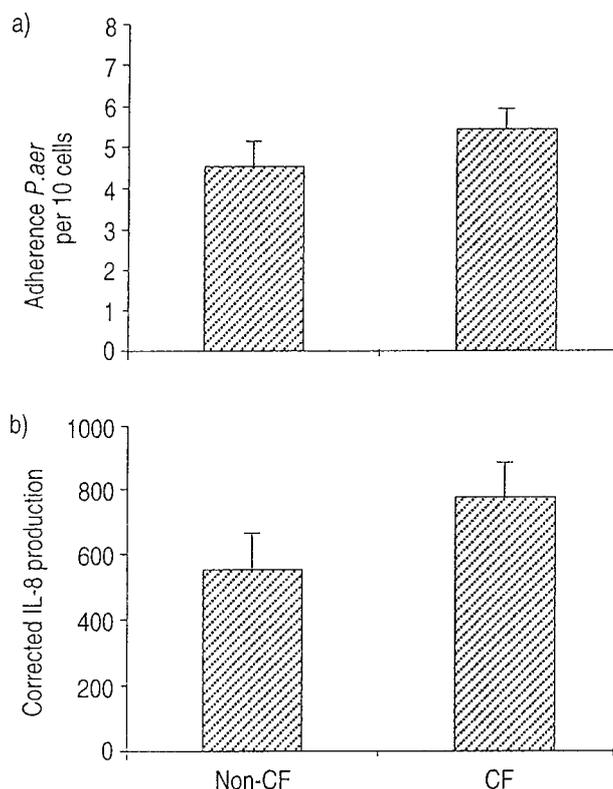


Fig. 2. - a) Equalization of *Pseudomonas aeruginosa* adherence between cystic fibrosis (CF) and non-CF cells. Cells were incubated with final concentrations of 1.6×10^8 and 2.5×10^7 bacteria·mL⁻¹, respectively. b) Interleukin-8 (IL-8) secretion from the same cells measured 24 h after stimulation (non-CF n=7, CF n=13). Note that the vertical axis represents IL-8 in units of pg·mL⁻¹, corrected for the number of adherent organisms in each individual sample. Error bars indicate SEM.

demonstrated for each subject to try to ensure greater accuracy. Because of this correction, values differ in magnitude from those shown in figure 1. As different concentrations of bacteria were applied to CF and non-CF cells, adherence to the basolateral membrane was also examined to rule out any effects this may have on IL-8 secretion. No significant difference in the degree of basolateral adherence was observed between CF and non-CF cells (CF: $3.0 \pm 0.5 \cdot 10$ cells⁻¹; non-CF: $2.0 \pm 0.4 \cdot 10$ cells⁻¹).

Influence of genotype

To determine whether CF genotype influences *P. aeruginosa* induced-IL-8 secretion, patients were classified into three groups. Group 1 (n=13) with mistrafficking mutations on both alleles ($\Delta F508$ homozygotes and a $\Delta F508/I507$ compound heterozygote), group 2 (n=6) with only one mistrafficking mutation ($\Delta F508$ compound heterozygotes, the second mutation being R553X $\times 2$, 1717-1G→A, 621+1G→T, G551D $\times 2$), and group 3 (n=3) without mistrafficking mutations (genotypes being G542X/3849+10κB G→T, G542X/R553X, 1717-1G→A/G551D). No difference was found in IL-8 secretion between the three groups (fig. 3).

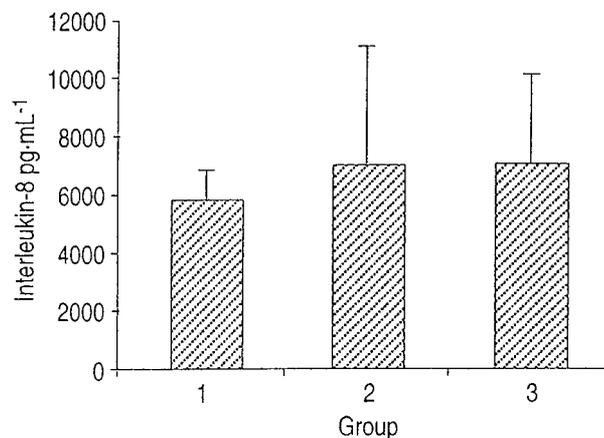


Fig. 3. - Influence of cystic fibrosis genotype on interleukin-8 secretion. Group 1: mistrafficking mutation on both alleles (n=13); Group 2: one mistrafficking mutation (n=6); Group 3: both nonmistrafficking mutations (n=3). Error bars indicate SEM.

Nuclear factor- κB activity in primary nasal epithelial cells and in cystic fibrosis murine tissues

EMSA assays using NF- κB consensus oligonucleotides resulted in the appearance of three specific DNA/protein complexes in all systems studied. A typical example from unstimulated 9HTEo- cell lysates is shown in figure 4. Only DNA/protein complexes I and II are increased after tumour necrosis factor- α (TNF- α) and *P. aeruginosa* stimulation in cell lines and in mice (unpublished data). Complexes I and II were, therefore, quantified in combination in subsequent experiments as a marker of activated NF- κB . Super-shifts indicated that complex II contains p50 protein, but the composition of complex I could not be determined (fig. 4). To eliminate any variations in complex I and II band density due to individual gel experimental procedures, bands of interest were standardized to the band density of a nonspecific band in each lane. NF- κB activity was similar in freshly obtained primary nasal epithelial cells derived from CF (n=4) and non-CF subjects (n=5) (fig. 5).

These observations were extended to a comparison of CF and non-CF murine organs. There was also no significant difference in NF- κB activation in lung, trachea, spleen, kidney and liver of $\Delta F508$ CF mice (n=6) and wild-type littermates (n=6) (fig. 5). For technical reasons it was not possible to assess the intestinal tract.

Nuclear factor- κB activity and interleukin-8 secretion in immortalized cell lines

CFNP9o- cells exhibited a significant decrease in activation of NF- κB (n=6, $p < 0.001$) and no difference in IL-8 secretion when compared with the mean of the three non-CF cell lines (fig. 6). In CFSMEo- cells NF- κB activity was increased (n=6, $p < 0.01$), but IL-8 secretion was not different (n=6). Σ CFTE29o- cells showed an increased activation of NF- κB (n=6, $p < 0.001$) and IL-8 secretion (n=6, $p < 0.001$). The increased NF- κB activity in CFSMEo- and Σ CFTE29o- cells was largely due to an increase in complex II.

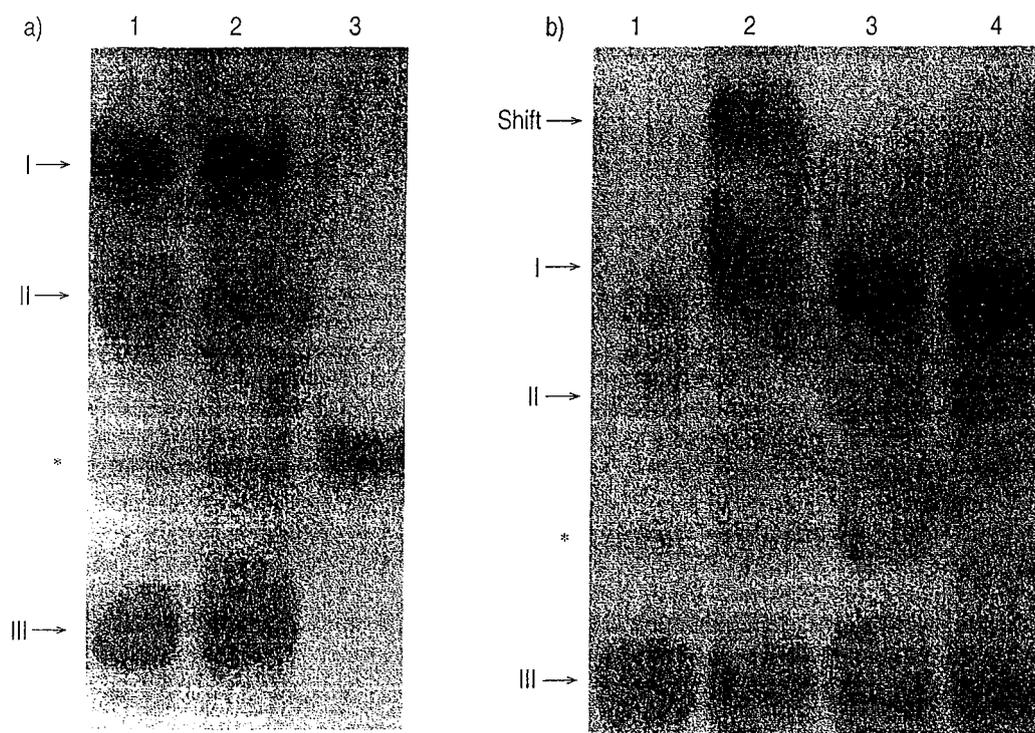


Fig. 4. – Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using unstimulated 9HTEo- cell lysates. EMSA assays carried out using a nuclear factor- κ B (NF- κ B) consensus binding site resulted in three specific protein/deoxyribonucleic acid complexes. a) A typical example using lysate from unstimulated 9HTEo- cells. Lanes 1 and 2: Duplicate 10 μ g lysates incubated with radiolabelled NF- κ B consensus binding site. Complexes I, II (p50 containing) and III are indicated. Lane 3: competition with unlabelled consensus oligonucleotide. *: nonspecific complex. b) Supershift assay using unstimulated 9HTEo- lysates. Lane 1: no added antibodies. Lanes 2–4: addition of antibodies specific to p50 (lane 2), p65 (lane 3) or c-Rel (lane 4) containing components of NF- κ B. A shift occurred only with the anti-p50 antibody.

The effects of transfection with wild-type, Δ F508 and G551D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on nuclear factor- κ B activity and interleukin-8 secretion

Cos-7 cells transfected with either Δ F508 or G551D CFTR plasmids, exhibited a significant increase in p50-containing complex II when compared to wild-type transfectants ($n=10$, $p<0.01$) (fig. 7). No significant increase in complex I was observed. IL-8 secretion was not significantly different in any of the transfectants (fig. 7). Successful transfection was confirmed through plasmid-specific reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR; data not shown). Following transfection with a β -galactosidase reporter gene $11\pm 3\%$ ($n=6$) of cells were positive for an X-gal immunohistochemical assay. However, this assay is known to underestimate the overall transfection efficiency [21].

Discussion

In the present study, using freshly obtained human nasal epithelial cells, it has been demonstrated that the elevated IL-8 secretion produced by CF cells in the presence of *P. aeruginosa* is a direct consequence of increased bacterial binding. No increase in basal NF- κ B activity could be detected in primary CF nasal epithelial cells or in CF mice. NF- κ B activity and IL-8 secretion varied greatly between CF cell lines and neither was

consistently increased, nor did they correlate with each other. Overexpression of Δ F508 and G551D mutant CFTR increased p50 activity in Cos-7 cells when compared to overexpression of wild-type CFTR; however, this increase was not accompanied by an increase in IL-8 secretion. Each of these studies has its limitations, but taken together the present findings lend support to the view that inflammation in CF relates predominantly to the bacterial burden in the airways of these patients.

There are substantial clinical data supporting the role of micro-organisms as the key initiator of CF inflammation [22, 23]. Many pathogens are implicated in bronchial infection in CF including *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* and respiratory syncytial virus (RSV). Each of the bacteria, and in particular *P. aeruginosa*, bind to asialo-GM1 receptors *via* pili, inducing subsequent IL-8 production; no IL-8 upregulation is observed using unpiliated *P. aeruginosa*. Thus, these findings are in keeping with the authors' suggestion that the characteristic CF inflammation is linked to the increase in *P. aeruginosa* adherence. The increased numbers of asialo-GM1 receptors on CF cells may be a direct result of a CF mutation-related sialylation defect [24]. Thus, a reduction of *P. aeruginosa* adherence to nasal epithelial cells has been shown following transfection of wild-type CFTR [17].

Whilst *P. aeruginosa* adherence clearly triggers CF inflammation, other clinical studies suggest that inflammation may precede bacterial colonization. This is

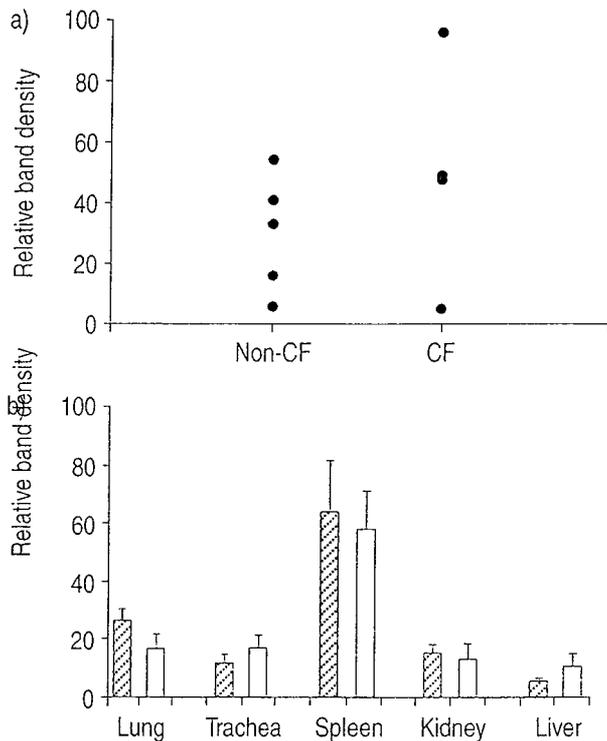


Fig. 5. - Quantification of total nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity in cystic fibrosis (CF) and non-CF primary nasal epithelial cells and CF and non-CF murine tissues. a) Nasal epithelial cells from non-CF ($n=5$) and $\Delta F508$ CF subjects ($n=4$). b) Tissues from wild-type (▨) and $\Delta F508$ CF littermates (□). Because separate organs were analysed on individual gels, inter-organ comparison of NF- κ B activity cannot be made. Error bars indicate SEM.

based on the detection in bronchoalveolar lavage of inflammatory cells and IL-8 in the absence of demonstrable micro-organisms [7, 8]. An alternative explanation for these findings is that the inflammatory response has been successful in eradicating the organism which initially induced it [25]. Several laboratory studies have also suggested a role for mutant CFTR directly inducing inflammation [10, 26]. In keeping with the clinical studies showing normal IL-8 levels after resolution of infection, no evidence for elevated IL-8 in unstimulated primary CF nasal epithelial cells could be found. Of nasal swabs from 12 of the CF subjects taken to assess bacterial colonization, one was positive for *S. aureus*, whilst the remaining 11 showed no evidence of bacterial growth. Furthermore, no increase in NF- κ B activation in CF, either in human nasal epithelium or in tissues obtained from $\Delta F508$ CF mice could be detected. Clearly, one limitation of the whole lung EMSA analysis is the dilution effect of nonepithelial cells which are unlikely to express CFTR. However, the similarity of findings in the human epithelial cells support these data. Consistent with data published by DiMANGO *et al.* [10] increased NF- κ B activity and IL-8 secretion in Σ CFTE290- cells was also detected when compared to three wild-type cell lines. However, measurements in two other CF cell lines (CFSME0-, CFNPE90-) showed that an increase of NF- κ B and IL-8 was not a consistent characteristic of

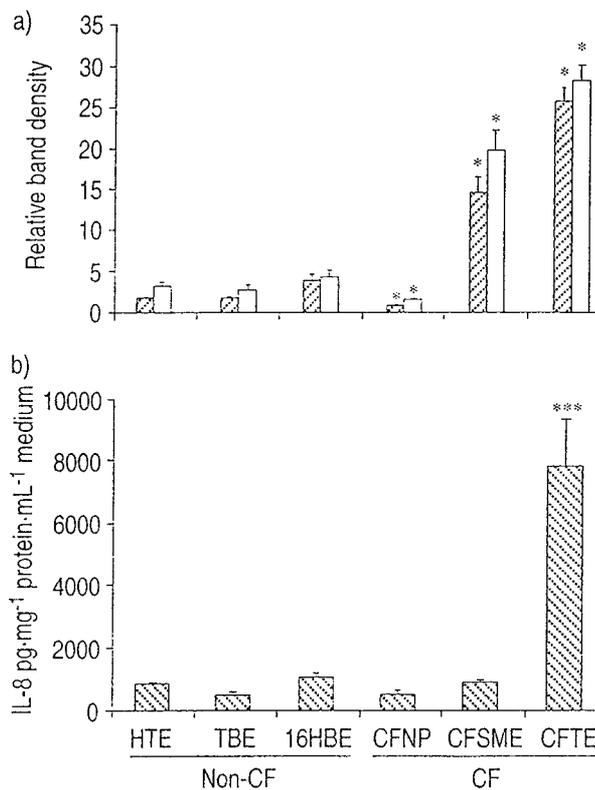


Fig. 6. - Nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and interleukin-8 (IL-8) secretion in unstimulated cystic fibrosis (CF) and non-CF cell lines. Quantification of a) complex II (▨), complex I+II (□) and b) IL-8 secretion ($n=6$, *, $p<0.001$, versus mean of non-CF values). Error bars indicate SEM.

such immortalized CF cell lines. Indeed, all combinations of elevated or reduced NF- κ B activation and changes in IL-8 could be demonstrated. Whilst the $\Delta F508$ homozygous line (Σ CFTE290-) produced higher levels of IL-8 than the other CF cell lines, a recent paper has demonstrated a similar variability, including that between two $\Delta F508$ homozygous cell lines [27].

BAEUERLE *et al.* [28] have suggested that endoplasmic reticulum (ER) retention of proteins such as mutant CFTR may lead to activation of NF- κ B and hence expression of pro-inflammatory cytokines. Cooling of $\Delta F508$ CF cells has been shown to promote trafficking of $\Delta F508$ CFTR to the apical membrane. A recent report has suggested that such a reduction in temperature also reduces NF- κ B activity and IL-8 secretion [10]. However, cooling is likely to affect a number of cellular processes, and the present study followed this up by promoting CFTR trafficking using trimethylamine N-oxide (TMAO), which increases $\Delta F508$ trafficking to the apical membrane in Σ CFTE290- cells. TMAO could restore cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent chloride efflux, but did not alter NF- κ B activity and IL-8 secretion in these cells (data not shown), consistent with the present data, showing lack of effect of different CFTR mutations. Clearly, however, these results may be interpreted as TMAO inducing a low level of trafficking sufficient to restore chloride function, but leaving the vast majority of mutant CFTR mistrafficked.

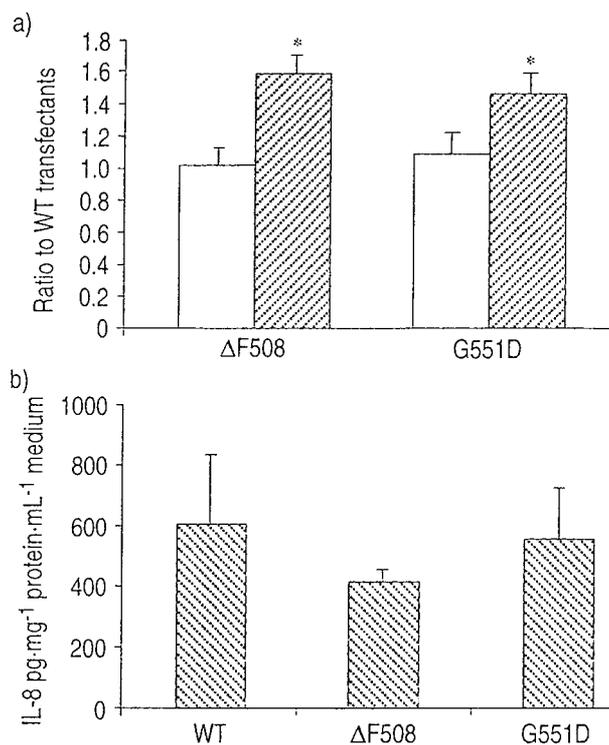


Fig. 7. – Effect of wild-type and mutant cystic fibrosis membrane regulator (CFTR) overexpression on nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity and interleukin-8 (IL-8) secretion. Cos-7 cells were transfected with plasmids expressing wild-type (WT), Δ F508 and G551D CFTR for 48 h. a) NF- κ B complexes (\square) and II (p50 containing) (\boxplus) were quantified and data were expressed as ratios between wild-type and Δ F508 or G551D mutant protein ($n=10$, *: $p<0.01$ expressed as significance from a ratio of one). b) IL-8 secretion was measured 48 h after transfection ($n=6$).

In an attempt to further determine the effect of ER overload, the present study transiently overexpressed wild-type, Δ F508 or G551D CFTR protein in Cos-7 cells. These were chosen for their relatively high transfection efficiency and also because these cells have the capability to respond to an inflammatory stimulus, such as TNF- α , with increased IL-8 secretion (data not shown). A significant increase in a p50 containing protein/DNA complex (complex II) was detected after Δ F508 or G551D overexpression when compared to overexpression of the wild-type protein. However, the increased p50 activity was not accompanied by an increase in IL-8 secretion. At present it is uncertain to what extent p50 homo- or heterodimers contribute to IL-8 regulation. ZHU *et al.* [29] have demonstrated that p65/p65 homodimers are responsible for the regulation of IL-8 secretion in human nasal epithelial cells. However, other studies indicate that IL-8 secretion is regulated through p50/p65 heterodimers [30] and it is likely that regulation varies between cell types.

The present findings are in keeping with the view that increased bacterial adherence contributes significantly to the inflammatory response in cystic fibrosis airways. Host inflammatory responses in cystic fibrosis may be considered in two phases during disease progression. The first phase is characterized by increased bacterial

adherence and a preserved capacity for elimination of pathogens, associated with enhanced inflammatory markers as witnesses of recent infection. However, the effects of a chronic inflammatory response, and the continued presence of bacteria (related to increased adherence, excess mucus and probably many other factors), lead to the second phase where the inflammatory process is no longer sufficiently effective to produce bacterial clearance. The present data cannot rule out a direct contribution of the mutant protein on inflammation, but it is suggested that this may be a less significant factor. If these views are correct, novel treatments aimed at reducing bacterial adherence would be expected to play an important role early in life in cystic fibrosis patients. Reducing inflammation at this time may prove harmful, by reducing the appropriate host response to an increased burden. The impact of such treatments later in life will clearly depend on the balance between "useful" and "inappropriate" inflammation. It is likely that only trials of anti-inflammatory treatment can distinguish these possibilities.

Acknowledgements. The authors thank the volunteers who provided the nasal samples, and the staff of the Royal Brompton Hospital Cystic Fibrosis Clinic for their help. In addition, the authors thank T. Pitt for providing the *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strain, D. Gruenert for the cell lines, L. Huang for the DC-Cholesterol/dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and J. Rommens for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) plasmids.

References

1. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251–1254.
2. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1229–1256.
3. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Prasad-Kari U, Zasloff M, Wilson JM. Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; 88: 553–560.
4. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, *et al.* Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest* 1997; 100: 2588–2595.
5. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12088–12093.
6. Imundo L, Barasch J, Prince A, al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3019–3023.
7. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1075–1082.
8. Balough K, McCubbin M, Weinberger M, Smits W,

- Ahrens R, Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1995; 20: 63-70.
9. Tirouvanziam R, De Bentzman S, Hinnrasky J, Jacquot J, Teault B, Puchelle E. Early inflammation is a hallmark of proximal and distal human CF foetal airway xenografts. *Pediatr Pulmonol* 1999; 19: 309.
 10. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF κ B by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 2598-2606.
 11. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
 12. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13: 257-261.
 13. Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA. Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 1993; 264: L413-L418.
 14. Douglass JA, Dhami D, Gurr CE, et al. Influence of interleukin-8 challenge in the nasal mucosa in atopic and non atopic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1108-1113.
 15. Strieter RM, Standiford TJ, Rolfe MW, Kunnel SL. Cytokines of the Lung. New York, Dekker 1993; pp. 291-305.
 16. Pitt TL. Preparation of agglutinating antisera specific for the flagella antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 1981; 14: 251-260.
 17. Davies JC, Stern M, Dewar A, et al. CFTR gene transfer reduces the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to cystic fibrosis respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 657-663.
 18. Pahl HL, Baeuerle PA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF- κ B. *EMBO* 1995; 14: 2580-2588.
 19. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83: 346-356.
 20. Colledge YM, Abella BS, Southern KW, et al. Generation and characterization of a Δ F508 cystic fibrosis mouse model. *Nature Genet* 1995; 10: 445-452.
 21. Bebök ZA, Abai M, Dong J-Y, et al. Efficiency of plasmid delivery and expression after lipid-mediated gene transfer to human cells *in vitro*. *JPET* 1996; 279: 1462-1469.
 22. Dean TP, Dai Y, Shute JK, Church MK, Warner JO. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1993; 34: 159-161.
 23. Armstrong DS, Grimwood K, Carlin JB, et al. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1197-1204.
 24. Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert DC, al-Awqati Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 1991; 352: 70-73.
 25. Copenhaver S, Sage A, Vasil A, et al. BALF PCR and ELISA identification of non-culturable *Pseudomonas aeruginosa* in infants and toddlers with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996; 13: 291.
 26. Tabary O, Zahm JM, Hinnrasky J, et al. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells *in vitro* and *in vivo*. *Am J Pathol* 1998; 153: 921-930.
 27. Schwiebert LM, Estell K, Propst SM. Chemokine expression in CF epithelia: implications for the role of CFTR in RANTES expression. *Am J Physiol* 1999; 276: C700-C710.
 28. Baeuerle PA, Baltimore D. NF κ B: Ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
 29. Zhu Z, Tang W, Gwaltney JM, Wu Y, Elias JA. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 *in vivo* and *in vitro*: role of NF κ B. *Am J Physiol* 1997; 273: 814-824.
 30. Anrather D, Millan MT, Palmetshofer A, et al. Thrombin activates nuclear factor- κ B and potentiates endothelial cell activation by TNF. *J Immunol* 1997; 159: 5620-5628.

Etude des mécanismes de l'inflammation de l'épithélium des voies aériennes

Scheid P, Davies JC, Martinet Y, Geddes DM, Alton EW. Sécrétion élevée d'interleukine-8 par les cellules épithéliales nasales dans la mucoviscidose : liée à l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Mal Respir 1999, 16:1S122. (Abstract)
3^{ème} Congrès de Pneumologie de Langue Française, Paris, 27-30 janvier 1999.

Scheid P, Kempster L, Griesenbach U, Davies JC, Dewar A, Weber PP, Colledge WH, Evans MJ, Geddes DM, Alton EW. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence. Eur Respir J 2001, 17:27-35.

I. Matériels et méthodes

1. La population étudiée

L'étude a été réalisée chez 29 sujets adultes atteints de mucoviscidose (21 hommes et 8 femmes) d'un âge moyen de 29,2 ans (17-44) suivis à la consultation de mucoviscidose pour adultes du Royal Brompton Hospital à Londres. Aucun des sujets ne suivait un traitement anti-inflammatoire notamment par des stéroïdes inhalés ou par voie orale. Aucun sujet n'a été étudié au décours d'une exacerbation infectieuse aiguë. La population contrôle est composée de 18 volontaires sains non fumeurs (11 hommes et 7 femmes) d'un âge moyen de 32,7 ans (23-50). Cette étude a été conduite après l'accord du Comité d'Ethique Local et avec le consentement écrit des sujets.

2. Le recueil des cellules épithéliales nasales

Les cellules épithéliales nasales sont recueillies par brossage (Diagmed, Thirsk, UK) de la muqueuse du cornet inférieur de chaque narine. Les cellules recueillies sont placées dans un milieu de survie F12 de Ham (Gibco BRL, Paisley, UK), rincées dans un tampon phosphate (PBS) puis resuspendues dans du milieu F12 de Ham. Les cellules sont comptées et

leur viabilité est évaluée par le test d'exclusion du bleu trypan aux temps 0 et 24 heures. Enfin un écouvillonnage narinaire est effectué pour la recherche de germes au niveau nasal.

3. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* (PA01)

Une souche de référence de PA de sérotype 01, non mucoïde, sensible à la gentamycine est cultivé sur gélose au sang. Quelques colonies sont placées dans un milieu tryptone soja (Unipath Ltd, Basingstoke, UK) durant 24 heures la veille du test d'adhérence. La "piliation" de la souche de PA01 est vérifiée en microscopie électronique à transmission.

4. Etude de la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales

4.1. A l'état basal et après stimulation par PA

Les cellules épithéliales incubées à 37°C à 5 % de CO₂ sont séparées en deux aliquots, le premier est utilisé pour l'étude de la sécrétion d'IL-8 à l'état basal et le deuxième après stimulation par PA. La quantification de la production d'IL-8 est effectuée sur un échantillon de surnageant prélevé après 24 heures d'incubation, conservé à -20°C jusqu'à la réalisation d'un test ELISA (Genzyme, Billinghamurst, UK). Les résultats sont donnés en concentration d'IL-8 par 10⁵ cellules vivantes présentes au début de l'incubation

4.2. En parallèle avec l'étude de l'adhérence bactérienne

La sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales a été évaluée après incubation avec des concentrations décroissantes de PA jusqu'à l'obtention de conditions d'adhérence bactérienne similaires pour les cellules CF et non-CF.

5. Evaluation de l'adhérence de PA en microscopie électronique à balayage

Les cellules épithéliales nasales sont placées en présence de PAO1 pendant une heure dans les mêmes conditions que précédemment. L'ensemble est ensuite centrifugé à +4°C à 13.000 g dans un gradient de 50 % de Percoll (Pharmacia-Biotech, St Albans, UK) afin de séparer les bactéries libres qui migrent au fond du tube, et les bactéries adhérentes aux cellules épithéliales qui restent à l'interface PBS/Percoll. Cette dernière fraction est récupérée et déposée par centrifugation à 450 tours/minute sur des lamelles thermanox (Emitech, Ashford, UK). Les cellules sont fixées par du glutaraldéhyde à 2,5 % pendant une nuit, puis déshydratées par passages successifs dans l'éthanol et l'hexaméthylsilazane (TAAB Laboratoires, Aldermaston, UK). Les lames sont ensuite montées sur des pièces d'aluminium, recouvertes d'or et analysées en microscopie électronique à balayage (Hitachi 54000, Nissei Sangyo, Tokyo, J). L'adhérence bactérienne est évaluée pour une moyenne de 41±3 cellules par échantillon et les résultats sont exprimés en nombre de bactéries adhérentes pour 10 cellules.

6. Etude de l'activation de NFκB

6.1. Les cultures cellulaires

Les lignées cellulaires "mucoviscidosiques" utilisées sont : CFTE (Cystic Fibrosis Tracheal Epithelium, ΔF508/ΔF508), CFSME (Cystic Fibrosis Tracheal Epithelium, ΔF508/inconnu) et CFNPE (Cystic Fibrosis Nasal Polyp Epithelium, inconnu/inconnu). Les lignées cellulaires non mucoviscidosiques utilisées sont : 16HBE (Human Bronchial Epithelium), 9HTE (Human Tracheal Epithelium) et TBE (TracheoBronchial Epithelium). Enfin la lignée cellulaire Cos-7 qui n'exprime pas le gène CFTR et est facile à transfecter. Les cultures cellulaires sont réalisées à 37°C et 5 % de CO₂ dans un milieu MEM (Minimum

Essential Medium) ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de sérum de veau fœtal à 10 % et d'une solution de pénicilline-streptomycine à 1% (Sigma, Poole, UK).

Les cultures cellulaires sont conduites jusqu'à semi-confluence (environ 70 %). Un échantillon du surnageant est utilisé pour le dosage de la concentration d'IL-8. Puis les cellules sont resuspendues dans le surnageant de culture et centrifugées à 160g pendant 5 minutes et le culot cellulaire est récupéré pour l'étude de l'activation de NFκB.

6.2. Etude in vivo chez la souris

Des souris CF (Colledge et al, 1995) et non-CF élevées conjointement ont été sacrifiées. Les poumons, trachée, foie, rate et reins sont été prélevés, broyés et homogénéisés dans un tampon d'extraction pour étude de l'activation de NFκB. Les réactions utilisent 20 mg de protéines.

6.3. Transfection du gène CFTR dans les cellules Cos-7

Les ADN complémentaires du gène CFTR normal ou des gènes porteurs des mutations ΔF508 ou G551D sont été clonés au site Not1 du vecteur plasmidique pCMVβ (Clontech laboratories Ltd, Basingstoke, UK). L'ADN plasmidique préparé (Qiagen Ltd, Sussex, UK) est transfecté dans les cellules Cos-7 par l'intermédiaire de liposomes cationiques DC-cholesterol/dioleylethanolamine (DOPE) avec un ratio de 1/3 (plasmides/liposomes) et une incubation de 24 heures dans un milieu Opti-MEM (Sigma, Poole, UK) Le milieu de culture est changé à 24 heures. Le taux d'IL-8 dans le milieu est déterminé après 24 heures d'incubation et la détermination de l'activation de NFκB est effectuée sur les cellules récupérées par centrifugation comme précédemment.

6.4. Etude de l'activité de NFκB et identification des sous-unités de NFκB en électrophorèse

Les culots de cellules précédemment obtenues sont rincés dans un tampon PBS puis placés dans un tampon d'extraction tel que décrit par Pahl (348) à + 4°C pendant 30 minutes. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation la quantité de protéines est évaluée; dix mg de protéines seront utilisés par réaction.

La détection de NFκB est réalisée par EMSA (ElectroMobility Shift Assay) (Promega, Southampton, UK) qui réalise une incubation avec une sonde oligonucléotidique spécifique de la séquence de consensus de NFκB (5'AGTTGAGEGGACTTTCCCAGG-C-3') marquée par la phosphore 32 (³²P-ATP) (Amersham Life Science Ltd, Little Chalfont, UK). Les produits des réactions sont identifiés par migration en gel de polyacrylamide à 5 % non dénaturant (Anachem, Luton, UK), puis sont révélés après séchage par autoradiographie à - 80°C (Kodak Biomax MS film).

La spécificité de la liaison oligonucléotides-NFκB est testée par une réaction témoin avec un oligonucléotide spécifique non marqué en excès qui doit "éteindre" les bandes correspondant à NFκB sur le gel.

Pour l'étude des sous-unités de NFκB (supershift analysis), 2 µg des anticorps anti sous-unités NFκB, anti p50, anti p52, anti p65, anti RelB et anti c-Rel (Santacruz biotechnology Inc, CA) sont ajoutés à la réaction.

La quantification des complexes NFκB est réalisée par densitométrie utilisant le logiciel Labscan and Image-Master 1D (Amersham Pharmacia Biotech, St Albans, UK).

II. Résultats

1. La sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales

La sécrétion basale d'IL-8 à 24 heures des cellules CF (n=19) et non-CF (n=16) est comparable. Par contre après incubation avec la souche de PA la sécrétion d'IL-8 par les cellules CF est environ trois fois supérieure à celle des cellules normales ($p < 0,01$) (Figure n°26). Le nombre de cellules vivantes 24 heures après stimulation par PA n'est pas significativement différent entre les cellules CF et non-CF.

2. Egalisation de l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa* et conséquences sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales

L'adhérence de PA est environ 3 à 4 fois supérieure aux cellules CF par rapport aux cellules non CF (275). Nous avons donc artificiellement ramené l'adhérence de PA pour les cellules CF au niveau de l'adhérence des cellules non CF en réduisant la concentration de PA d'un facteur de 6 environ dans le milieu d'incubation des cellules CF.

Dans des conditions d'adhérence comparables pour les cellules CF ($5,8 \pm 0,6$ /10 cellules, n=13) et non CF ($4,2 \pm 0,4$ /10 cellules, n=7) ($p = 0,26$), la production d'IL-8 n'est plus significativement différente entre les deux groupes de cellules ($p = 0,43$). Pour chaque échantillon, la production d'IL-8 a été rapportée au nombre de cellules adhérentes pour donner des résultats les plus précis possibles (Figure n°27).

3. L'influence du génotype sur la production d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales

Trois groupes de cellules CF ont été constitués selon que les sujets présentent: 1) deux mutations de type II (responsables d'un défaut de maturation de la protéine CFTR et d'une surcharge du réticulum endoplasmique) (n=13), 2) une seule mutation de type II (n=3), ou

Figure n°26 : Sécrétion d'interleukine-8 à 24 heures par des cellules épithéliales nasales à l'état basal et après stimulation par *Pseudomonas aeruginosa*.

CF n=19 et non-CF n=16

* : $p < 0,05$ versus CF non stimulées, ** : $p < 0,01$ versus non-CF stimulées

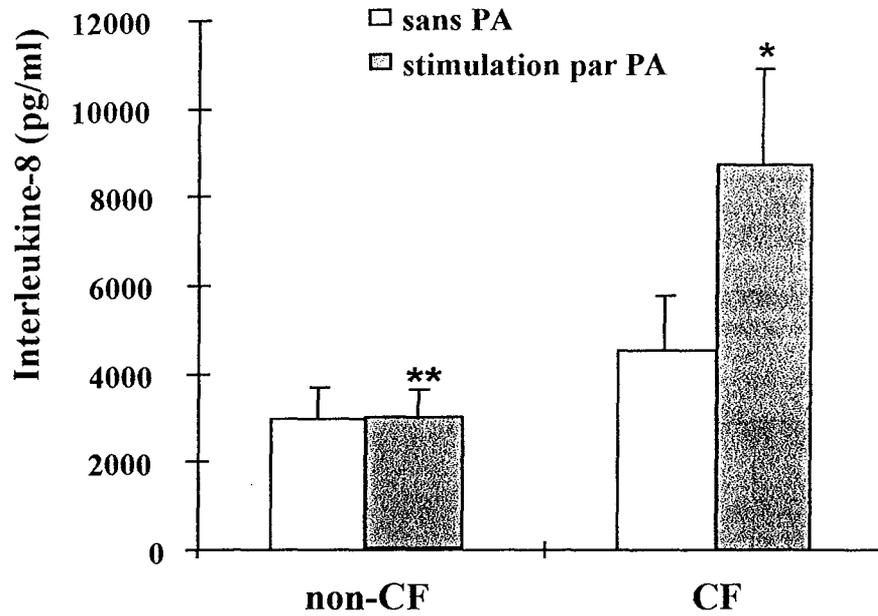


Figure n°27 : a) Egalisation de l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa* entre les cellules non-CF et CF, b) Sécrétion d'interleukine-8 à 24 heures après stimulation par *Pseudomonas aeruginosa* (CF: n=13, non-CF: b=7). (L'axe vertical représente le taux d'IL-8 corrigé pour le nombre de cellules adhérentes pour chaque échantillon)

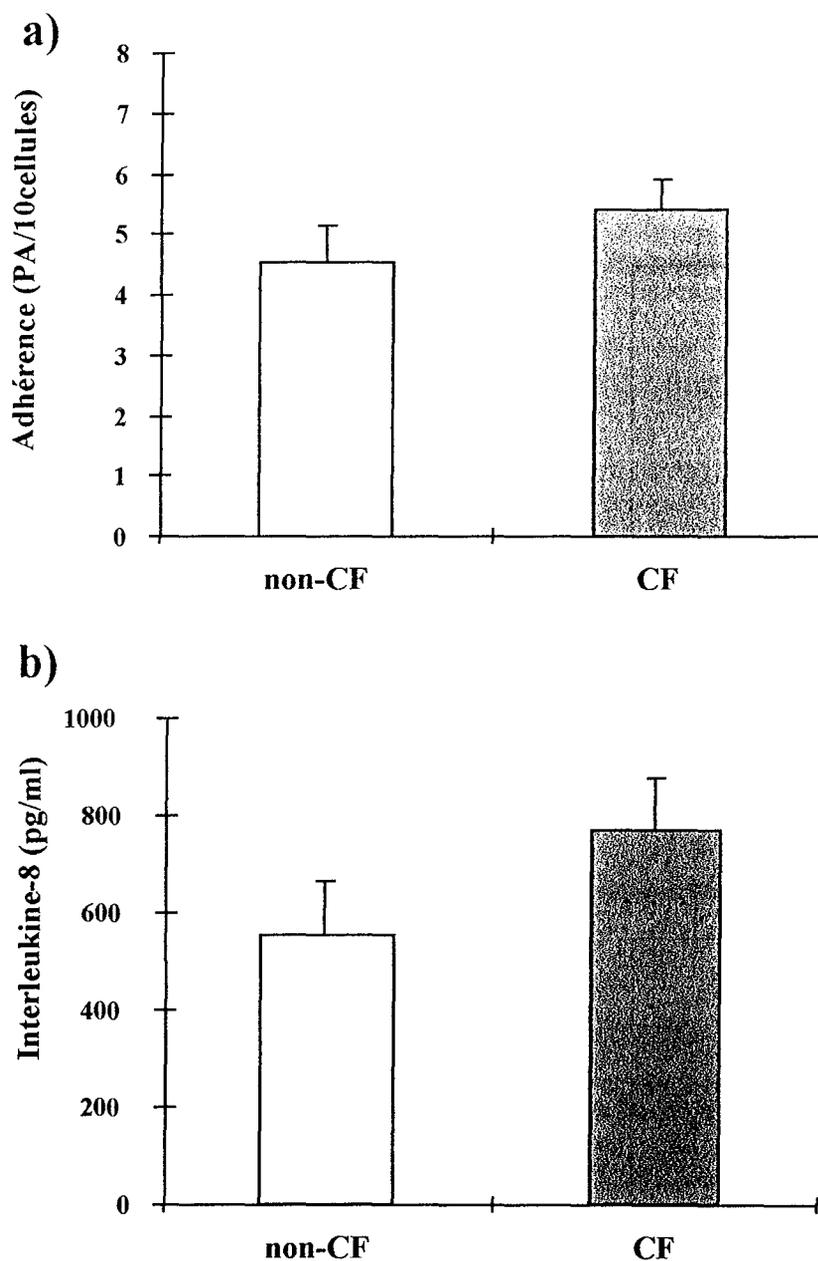
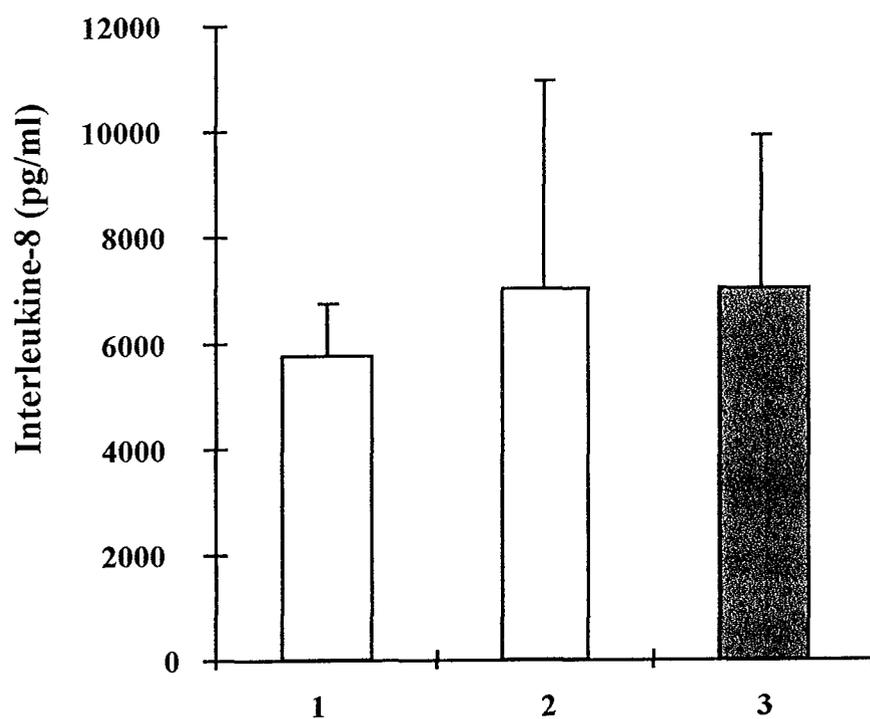


Figure n°28 : Absence d'influence du génotype sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales (groupe 1: 2 mutations de type II, n=13; groupe 2: 1 mutation de type II, n=6; groupe 3: pas de mutation de type II, n=3)



3) l'absence de mutation de type II (n=3). On ne constate pas de différence de production d'IL-8 entre ces trois groupes de cellules (figure n°28).

4. *Activité de NFκB dans les cellules épithéliales nasales et les tissus murins*

L'étude de l'activité de NFκB montre la présence de trois complexes protéines-oligonucléotides (I, II et III) dans tous les systèmes étudiés. En fait, ce sont principalement les complexes I et II qui représentent les marqueurs d'activité de NFκB, compte tenu des résultats précédemment observés *in vitro* après stimulation de cellules 9HTE par du TNFα et PA. Pour l'expression des résultats, la quantification des complexes I et II est rapportée à la même bande non spécifique retrouvée pour chaque échantillon afin d'éviter des variations artificielles d'origine technique.

L'activation de NFκB est comparable entre les cellules épithéliales nasales CF (n=4) et non CF (n=5). De même aucune différence significative concernant l'activité de NFκB n'a été mise en évidence sur les extraits protéiques des viscères de "souris CF et non-CF" (figure n°29).

L'utilisation des anticorps contre les différentes sous-unités de NFκB a permis de montrer que le complexe II contient la sous-unité p50.

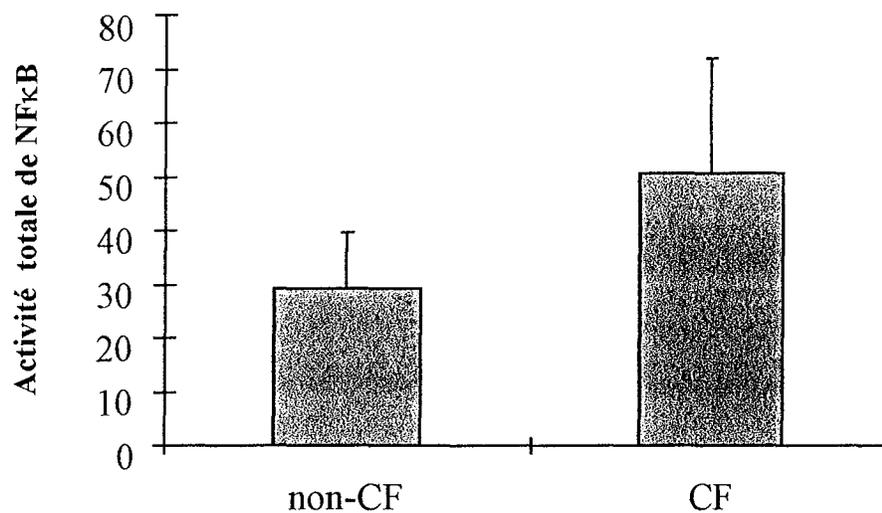
5. *Activité de NFκB et production d'IL-8 dans les modèles de lignées cellulaires*

Trois cas de figures discordants sont identifiés: 1) la lignée CFNP avec diminution de l'activation de NFκB et absence de sécrétion d'IL-8, 2) la lignée CFSME avec augmentation de l'activation de NFκB et absence de sécrétion d'IL-8, et 3) la lignée CFTE avec augmentation de l'activation de NFκB et de la sécrétion d'IL-8. Dans notre travail l'augmentation de l'activation de NFκB se fait essentiellement par l'augmentation de l'activité du complexe p50 (figure n°30).

Figure n°29 : Quantification de l'activité totale de NF κ B sur: a) des cellules épithéliales nasales CF (n=4) et non-CF (n=5); b) des tissus murins CF (n=6) et non-CF (n=6).

(Pour un échantillon l'activité de NF κ B correspond à la somme des densités des complexes I et II rapportée à la densité de la bande d'activité non spécifique retenue)

a)



b)

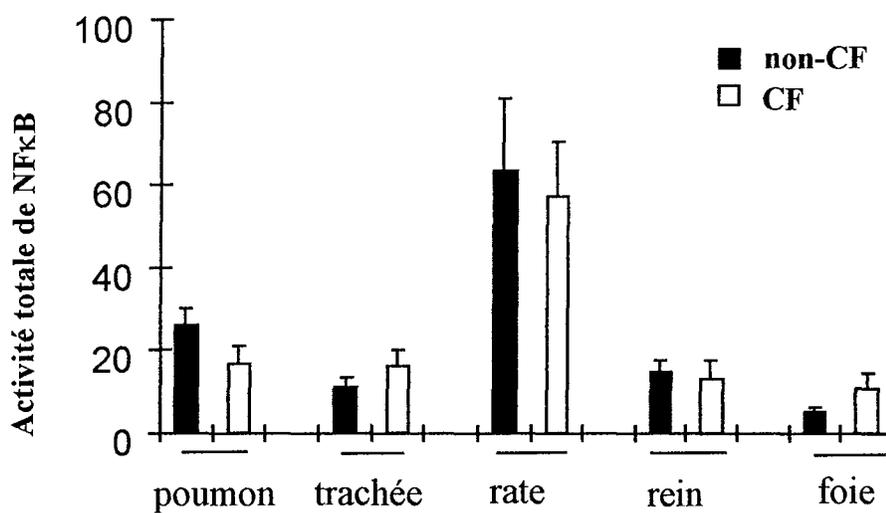
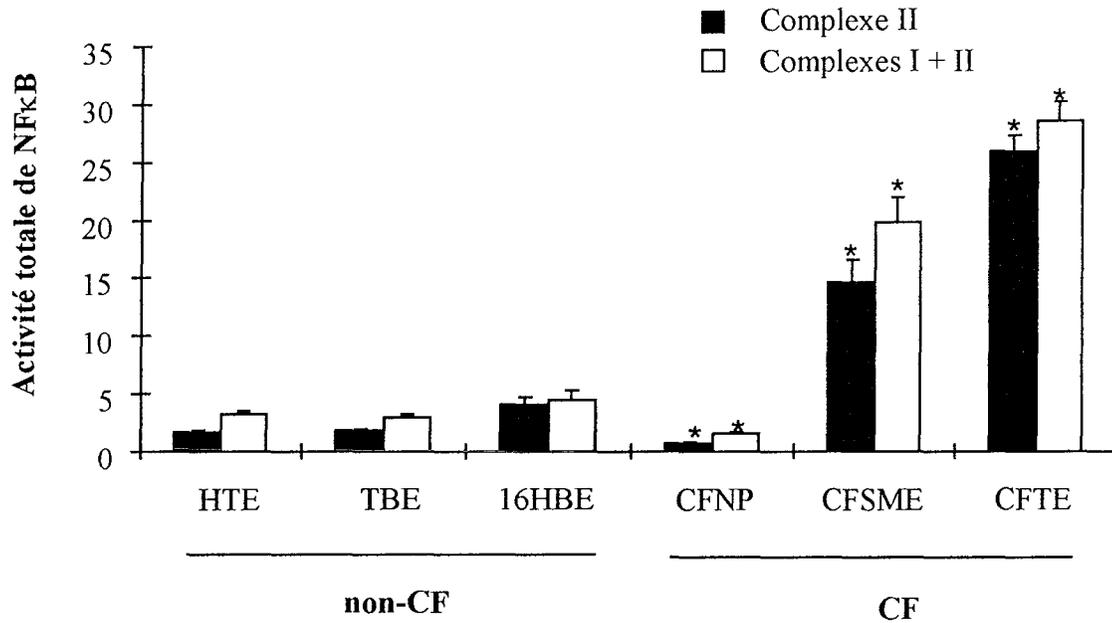


Figure n°30 : Activation de NFκB et sécrétion d'IL-8 à l'état basal par des lignées cellulaires CF et non-CF (n=6)
 * : $p < 0,001$ versus la moyenne des non-CF

a)



b)

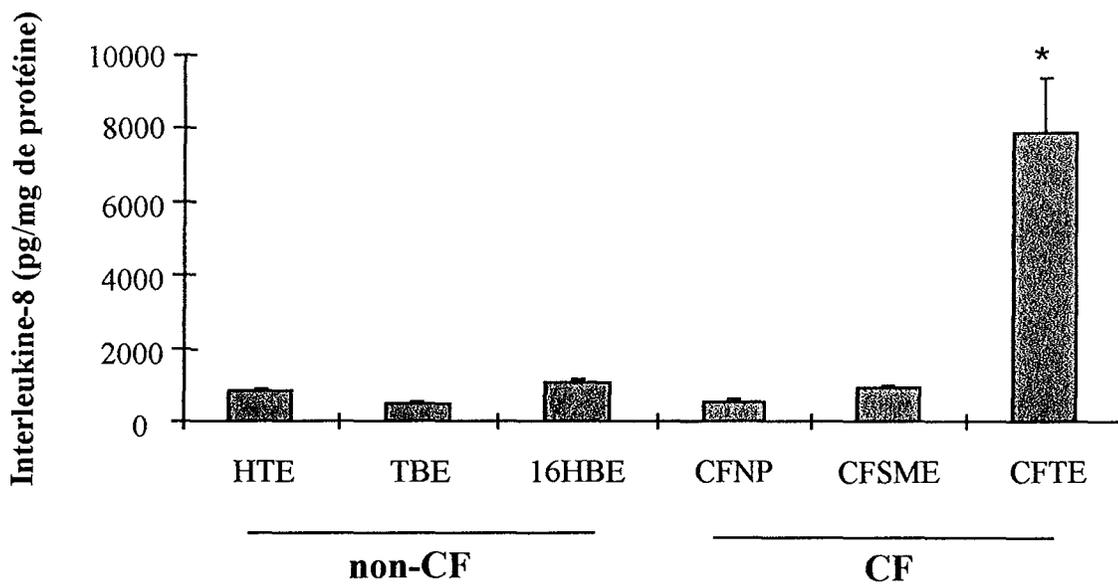
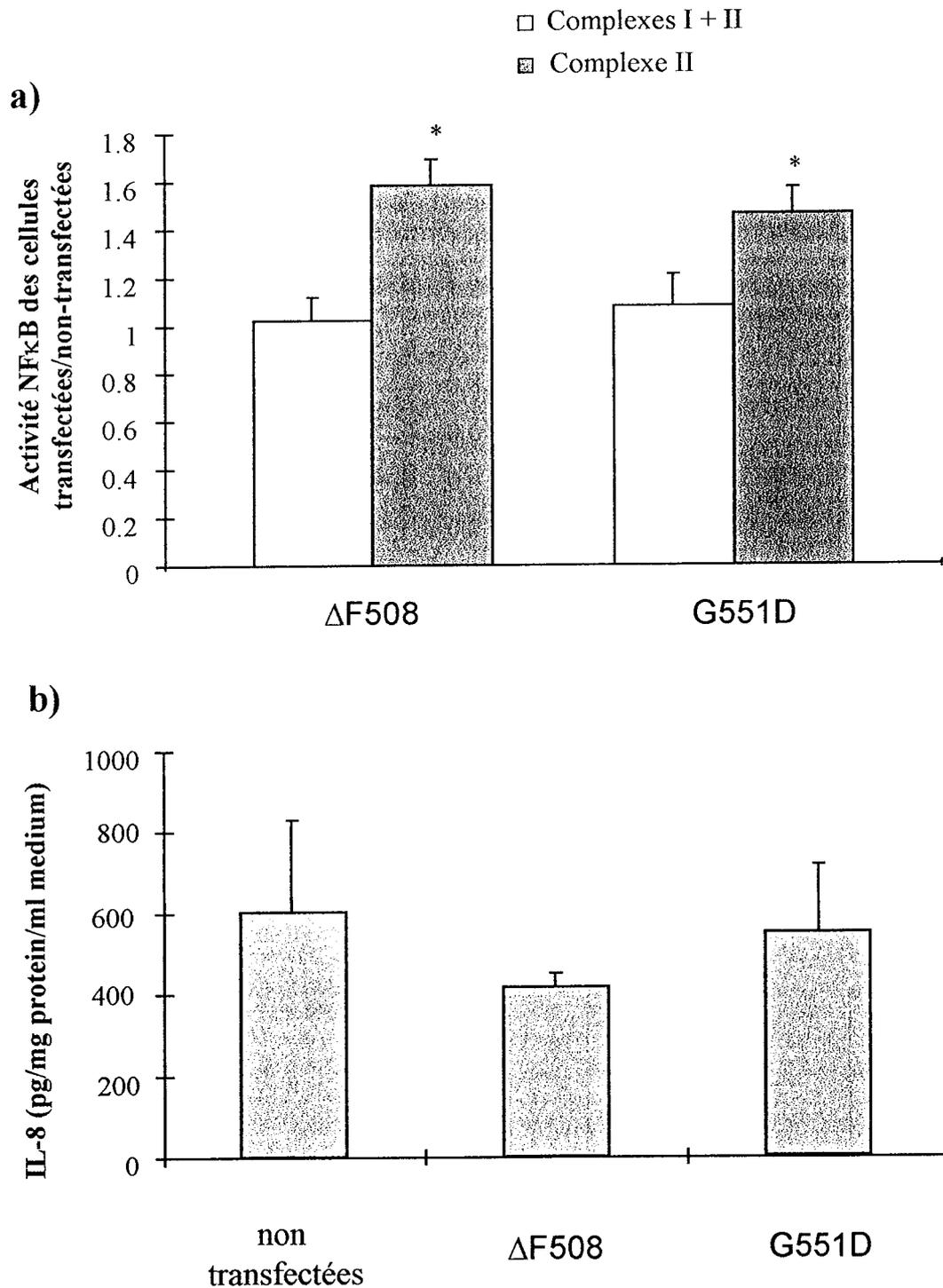


Figure n°31: Influence de la transfection du gène CFTR muté ($\Delta F508$ ou G551D) sur l'activité de NF κ B et sur la sécrétion d'IL-8 (n=10).

* : $p < 0,01$ par rapport au ratio de 1



6. Effets de la transfection du gène CFTR normal, ou porteur d'une mutation $\Delta F508$ ou G551D.

La transfection des cellules cos-7 par le gène CFTR muté $\Delta F508$ ou G551D conduit à une augmentation de l'activité du complexe II de NF κ B par rapport à la transfection du gène CFTR normal ($p < 0,01$), sans pour autant de modification de la sécrétion d'IL-8 (Figure n°31).

*Chapitre IV : Modulation de l'activité de NFκB in vitro par transfert génique:
Abstract n°3 et Article n°3*

P217 INTERLEUKIN-8 PRODUCTION BY AIRWAY EPITHELIUM AND THE EFFECT OF LIPOSOME-MEDIATED I κ B GENE TRANSFER

P SCHEID¹, U GRIESENBACH¹, J DAVIES¹, Z SIDDIQUE¹, DC GRUENERT², DM GEDDES¹ and EFW ALTON¹

¹Ion Transport Unit, National Heart and Lung Institute, Manresa Road, London SW3 6LR, ²Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco CA 94143 0911

Interleukin-8 (IL-8) is a major chemoattractant for neutrophils, present in the CF lung in large numbers. We measured basal and stimulated IL-8 secretion from CF and non CF airway epithelial cell lines (CFTE and 16HBE cells, respectively) as well as from Cos7 cells in a controlled *in vitro* environment. Basal IL-8 secretion was significantly higher in CFTE cells (8110 ± 2286 pg/mg protein) than in 16HBE (1113 ± 123 pg/mg protein) and Cos7 (497 ± 138 pg/mg protein) [$n=6$, $p<0.05$]. Following TNF- α stimulation IL-8 secretion increased 8 ± 0.9 fold in CFTE, 2 ± 0.4 fold in 16HBE and 2.7 ± 0.2 fold in Cos7 cells. Preliminary data in freshly obtained human nasal cells also indicate an increased basal secretion of IL-8 (non CF: 62 ± 10 pg/ml $n=16$, CF: 165 ± 37 pg/ml $n=12$, $p<0.05$). The response to addition of *Pseudomonas aeruginosa* to these cells as measured by IL-8 secretion was also increased in CF (3279 ± 656 pg/ml $n=10$, $p<0.05$) when compared to non CF samples (817 ± 143 pg/ml $n=8$). Thus it appears that the IL-8 response is disproportionately greater in CF cells. It is likely that new treatment aimed at reducing IL-8 levels will be beneficial in CF. Nuclear factor kappa B (NF κ B) is a transcription factor that regulates expression of inflammatory mediators including IL-8. NF κ B is kept in an inactive state by association with a specific inhibitor (I κ B). We investigated the effects of liposome-mediated overexpression of I κ B in CFTE and Cos7 cells. Despite successful transfection, as confirmed by RT-PCR in both cell types, we did not detect an alteration of basal or TNF- α stimulated IL-8 secretion. This is most likely related to low levels of gene expression. In conclusion, we have shown that CF cells lines as well as CF primary cells produce increased levels of secreted IL-8 in the basal as well as in a stimulated state. Reduction of IL-8 secretion is likely to be beneficial and might be achieved by reducing NF κ B activity through overexpression of I κ B.

Anti-inflammatory gene therapy directed at the airway epithelium

U Griesenbach¹, P Scheid¹, E Hillery¹, R de Martin², L Huang³, DM Geddes¹ and EFW Alton¹

¹Department of Gene Therapy, National Heart and Lung Institute, London, UK; ²Department of Vascular Biology and Thrombosis Research, University of Vienna, Vienna, Austria; and ³Laboratory of Drug Targeting, University of Pittsburgh, PA, USA

Cystic fibrosis (CF) is characterised by chronic airway inflammation. Pro-inflammatory mediators in the lung are regulated by the transcription factor nuclear factor kappa B (NF κ B). We have assessed the effect of adenovirus and liposome-mediated overexpression of the NF κ B inhibitor I κ B α , as well as liposome-mediated transfection with oligonucleotides resembling NF κ B consensus binding sites (decoys) in a cystic fibrosis airway epithelial cell line (CFTE). Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were used to assess NF κ B activity and secretion of the pro-inflammatory cytokine interleukin-8 (IL-8) was measured by ELISA. At a MOI of 30, Ad-I κ B α significantly decreased IL-8 secretion to 60% and 43% of control unstimulated and TNF- α stimulated

cells, respectively. At this MOI, approximately 70% of cells are transduced. EMSA showed an approximately 50% decrease in NF κ B activation. Liposome-mediated transfection of I κ B α did not reduce IL-8 secretion, probably due to low transfection efficiency (approximately 5% of cells). Liposome-mediated transfection of CFTE cells with rhodamine-labeled decoy oligonucleotides indicated a transfection efficiency close to 100%. TNF- α stimulated IL-8 secretion was reduced by approximately 40% using this approach. EMSA confirmed a significant decrease of NF κ B activation. Decoy oligonucleotides may be a promising approach for reduction of NF κ B-mediated pulmonary inflammation. Gene Therapy (2000) 7, 306–313.

Keywords: NF κ B; inflammation; gene therapy

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is characterised by chronic airway inflammation. The inflammation is neutrophil predominated, and while these cells clearly have a key role in the killing of micro-organisms,¹ uncontrolled release of their cytotoxic contents leads to mucus hypersecretion and progressive lung damage. This cycle ultimately contributes to the morbidity and mortality in the vast majority of patients.^{2,3}

Persistent bacterial colonisation, specifically by *Pseudomonas aeruginosa* (PA), is a characteristic feature of the CF lung, and may be the primary stimulus for neutrophil infiltration.⁴ Thus, PA infection has been shown directly to stimulate secretion of the pro-inflammatory cytokine interleukin-8 (IL-8), a major neutrophil chemoattractant, in the airways,⁵ which is produced by several cell types, including epithelial cells. Recently we have shown, that the degree of IL-8 stimulation in primary airway epithelial cells is directly related to the number of PA bound to the cell surface.⁶

Cytokine secretion is predominantly regulated at the level of gene transcription. The transcription factor nuclear factor kappa B (NF κ B) is a central regulator of inflammatory and immune responses,^{7,8} and belongs to the REL-family of transcription factors.⁹ Various homo-

and heterodimer isoforms have been identified, but the heterodimer consisting of the REL proteins p50 and p65 (Rel A) appears to be most prominent in the regulation of the inflammatory response.¹⁰ NF κ B is constitutively expressed in most cell types, but in unstimulated cells it is retained in an inactive form in the cytoplasm, because of its association with inhibitory proteins (I κ Bs), of which several are known (α , β , γ , ϵ);¹¹ I κ B α is the best studied member of this family.

NF κ B is activated by a large number of stimuli, including micro-organisms, cytokines and oxidative stress. These stimuli lead to phosphorylation and subsequent degradation of the I κ B proteins,^{12,13} which is followed by the rapid translocation of NF κ B from the cytoplasm into the nucleus where it binds to consensus binding sites in the promoter region of its target genes.¹⁴ Recently, it has been shown that PA infection of both non-CF and CF respiratory epithelial cells activates NF κ B.^{15,16} NF κ B activation is also important in asthma, highlighted in a recent report showing that NF κ B activation is increased in sputum and biopsies of asthmatics when compared with healthy controls.¹⁷ Further, many commonly prescribed anti-inflammatory drugs, such as glucocorticoids and aspirin decrease NF κ B activity.¹⁸ Recently, it was shown that NF κ B activation can also be altered through gene therapy based interventions. Thus, I κ B α overexpression, or transfection with NF κ B decoy consensus binding sites decreased NF κ B activity in endothelial and stromal cells and monocytes *in vitro*.^{19–21} This has been extended to animal models of inflammation such as ischemia-reperfusion injury and septic shock.^{22,23}

In this study we have determined the anti-inflammatory effect of NF κ B decoys and I κ B α overexpression in a cystic fibrosis airway cell line and demonstrate for the first time their anti-inflammatory effect in airway epithelial cells.

Results

IL-8 secretion following adenovirus- and liposome-mediated I κ B α overexpression

CFTE cells show basal secretion of IL-8 and this can be stimulated further by TNF- α (Figure 1). CFTE cells were transduced with adenovirus expressing I κ B α or a control virus expressing β -galactosidase using MOIs of 0.3, 3 and 30. Expression of vector-specific I κ B α mRNA was confirmed through RT-PCR (data not shown). Adenovirus infection increased basal IL-8 secretion approximately two-fold (Figure 1a). Ad-I κ B α transduction at a MOI of 30 reduced IL-8 secretion by approximately 60% when compared with Ad- β transduction ($P < 0.01$), but did not reduce IL-8 secretion below the levels secreted from uninfected cells (Figure 1a). TNF- α stimulation increased IL-8 secretion of uninfected cells about seven-fold (Figure 1b), but there was no further increase in IL-8 secretion due to virus infection. IL-8 secretion in Ad-I κ B α transduced cells was significantly reduced ($P < 0.01$) when compared with either Ad- β transduced or uninfected cells.

In contrast, liposome-mediated transfection produced

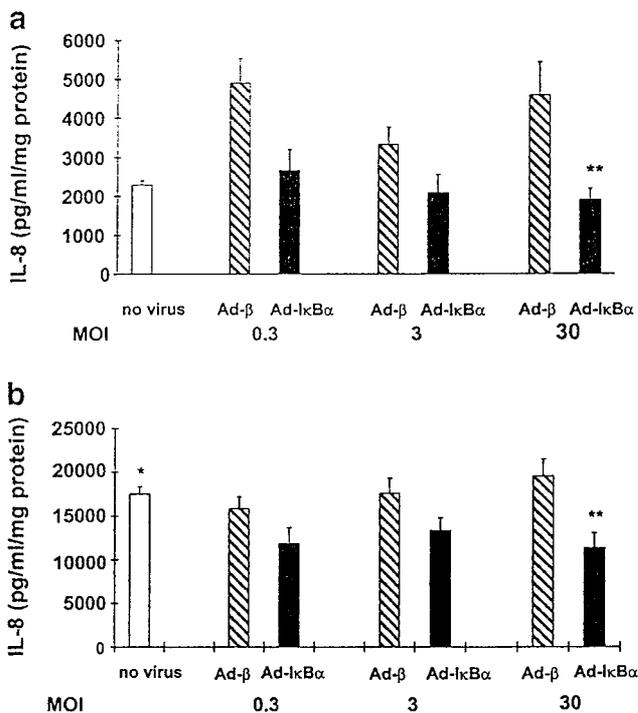


Figure 1 IL-8 secretion after adenovirus-mediated I κ B α overexpression. CFTE cells were transfected with adenovirus expressing I κ B α (Ad-I κ B α) or a β -galactosidase expressing control virus (Ad- β) at multiplicity of infection units (MOI) of 0.3, 3 and 30. 48 h after transfection cells were either unstimulated (a) or stimulated with TNF- α (b) for 1 h. IL-8 secretion was determined 6 h after stimulation. Error bars indicate s.e.m. $n = 10-15$ for all experiments, ** = $P < 0.01$ compared with respective Ad- β control; * = $P < 0.01$ compared with no virus control (open bars).

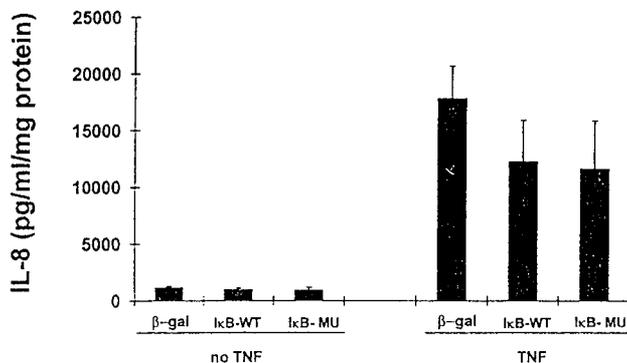


Figure 2 IL-8 secretion after liposome-mediated I κ B α overexpression. Cells were transfected with wild-type (I κ B α -WT) or mutant (I κ B α -MU) plasmid complexed to DC-cholesterol/DOPE, or with a β -galactosidase expressing control plasmid. 48 h after transfection the cells were stimulated with TNF- α for 1 h or remained unstimulated. Secreted IL-8 was measured 6 h after stimulation. Error bars indicate s.e.m. $n = 8$ for all experiments.

no significant decrease in IL-8 secretion either in unstimulated or TNF- α stimulated cells (Figure 2). However, the presence of plasmid-derived I κ B α mRNA could be demonstrated by RT-PCR (Figure 3). Transfection efficiency of virus- and liposome-mediated gene transfer in this system was assessed using β -galactosidase expression (Figure 4). The number of X-gal-positive cells after liposome transfection ($4.6\% \pm 1.7$, $n = 3000$) was comparable to that achieved using the lowest virus titer (MOI 0.3; $2.2\% \pm 0.4$, $n = 3000$). At an MOI of 30, $68.0\% \pm 4.0$ ($n = 3000$) of cells were transfected. Thus, for I κ B α overexpression to produce a significant reduction in IL-8 secretion *in vitro* more than 15% of cells need to be transduced or transfected.

EMSA following adenovirus-mediated I κ B α overexpression

EMSA using a NF κ B consensus oligonucleotide result in the appearance of multiple bands. To determine which of these protein complexes is relevant to an inflammatory state, we stimulated CFTE cells with TNF- α for 1 h and determined subsequent NF κ B activity. As shown in Figure 5a only NF κ B/DNA complexes I and II were

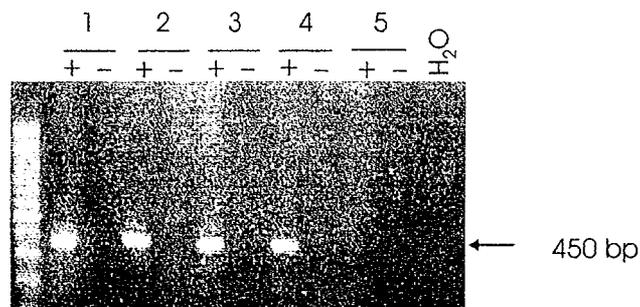


Figure 3 RT-PCR following liposome-mediated I κ B α overexpression. CFTE cells were transfected with wild-type (lanes 1 and 2) or S32/36A mutant (lanes 3 and 4) I κ B α cDNA complexed to DC-Cholesterol/DOPE or a control plasmid expressing β -galactosidase (lane 5). 48 h after transfection total RNA was prepared and RT-PCR carried out to detect recombinant I κ B α RNA. For all samples a reaction with (+) and without (-) reverse transcriptase was carried out. Arrow indicates expected 450 bp band. Left hand lane contains size marker (100 bp ladder).

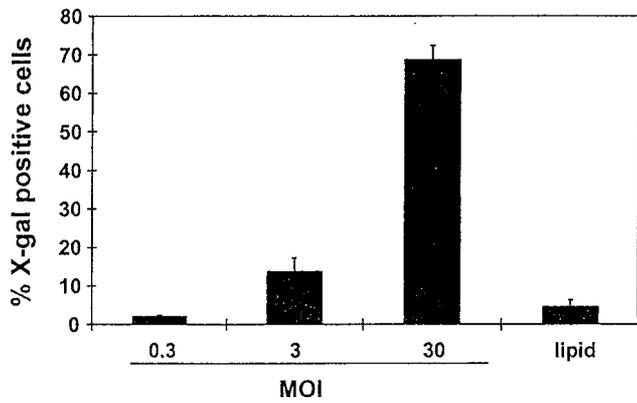


Figure 4 Transduction and transfection efficiency. CFTE cells were transduced with adenovirus expressing β -galactosidase at MOIs of 0.3, 3 and 30 or with a β -galactosidase expression plasmid complexed to DC-Cholesterol/DOPE for 48 h. β -Galactosidase expression was determined by X-gal assays. Error bars indicate s.e.m., $n = 10$ optical fields (3000 cells).

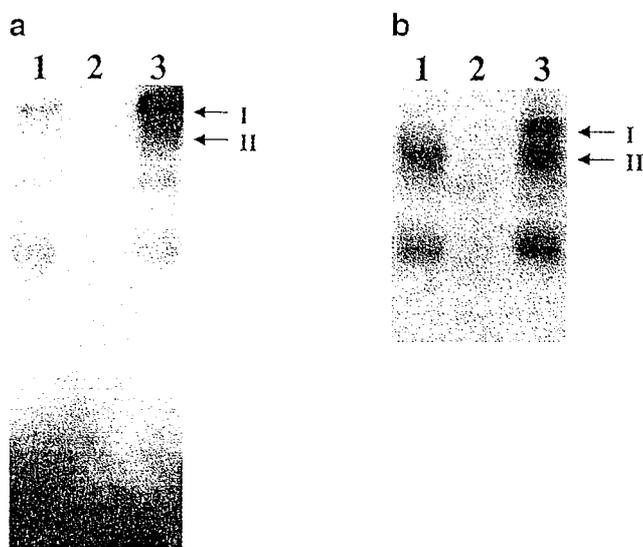


Figure 5 Electrophoretic mobility shift assays. (a) CFTE cells remained unstimulated (lane 1) or were stimulated with TNF- α (lane 3). One hour after stimulation NF κ B activity was measured in cell extracts. (b) C57Bl/6 control (lane 1) or mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* (lane 3). NF κ B activity was determined in lung protein extracts 2 h after infection. The specificity of the DNA/protein binding was determined in reactions using unlabeled specific competitor (lane 2, both assays). NF κ B/DNA complexes labeled as I and II, increase after TNF- α and *Pseudomonas aeruginosa* stimulation.

increased. Infection of wild-type C57Bl/6 with *Pseudomonas aeruginosa* also resulted in increases of complexes I and II, 2 h after infection (Figure 5b). These bands were therefore used as indicators of NF κ B activity induced by an inflammatory stimulus. Transduction of CFTE cells with Ad-I κ B α produced an approximately 50% decrease in complexes I and II after TNF- α stimulation (Figure 6) in keeping with the IL-8 data noted above.

Transfection efficiency of decoy oligonucleotides complexed to liposomes

Liposome-mediated transfection efficiency of decoy oligonucleotides was determined using rhodamine-labeled decoys. One tenth of the decoys (0.56 μ g) were labeled

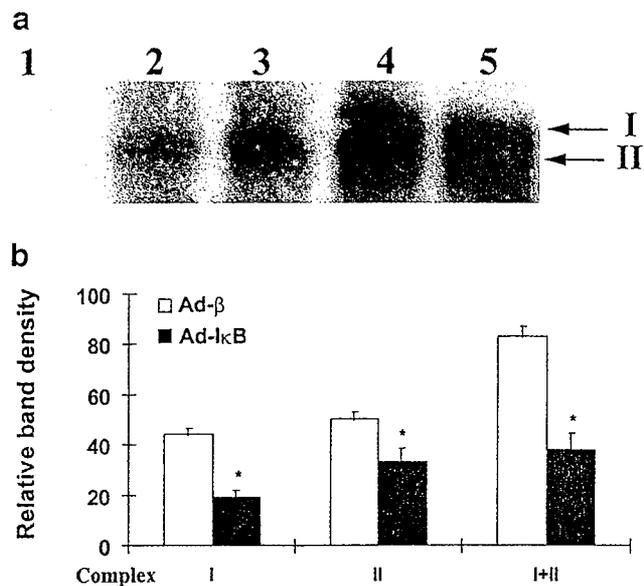


Figure 6 EMSA quantification after adenovirus-mediated I κ B α over-expression. (a) CFTE cells were transduced with Ad-I κ B α (lanes 2 and 3) or a β -galactosidase expressing control virus (lanes 4 and 5) at an MOI of 30. 48 h after transduction, cells were stimulated with TNF- α for 1 h, after which protein extracts were prepared. NF κ B/DNA complexes I + II are indicated. The specificity of the DNA/protein binding was determined in reactions using unlabeled specific competitor (lane 1). (b) NF κ B complexes I + II were quantified ($n = 6$). Error bars indicate s.e.m., * = $P < 0.05$ compared with respective Ad- β control.

and mixed with 5.04 μ g of unlabeled decoys before complexing with DC-cholesterol/DOPE. A representative field of CFTE cells is shown in Figure 7, with fluorescent signal visible in the nucleus and cytoplasm, including the perinuclear region. Quantitative analysis of the fluorescence in nucleus and cytoplasm showed a 100% (mean fluorescence 4.4 ± 0.8 versus 0.4 ± 0.06 in controls, $n = 15$, $P < 0.005$) and 86% (mean fluorescence 3.4 ± 0.6 versus 0.4 ± 0.07 in controls, $n = 15$, $P < 0.005$) transfection efficiency, respectively. For comparison Cos 7 cells show a mean fluorescent signal approximately five-fold higher in the nucleus and three-fold higher in the cytoplasm than CFTE cells (data not shown), consistent with the characteristically higher transfection efficiency of Cos 7 cells.

IL-8 secretion and EMSA following decoy transfection

Transfection of CFTE cells with scrambled control oligonucleotides complexed to liposomes increased IL-8 secretion about 2.5-fold over untransfected levels (Figure 8). A small, but non-significant increase following transfection was also seen in the presence of TNF- α . Transfection with NF κ B decoy oligonucleotides resulted in an approximately 40% significant ($P < 0.05$) decrease of IL-8 secretion after TNF- α stimulation, but did not reduce basal secretion (Figure 8). Transfection of cells with NF κ B decoy, but not scrambled oligonucleotides, reduced NF κ B activity in EMSA assays by over 90% in TNF- α stimulated and unstimulated cells (Figure 9).

Discussion

We have shown that secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8, a representative marker of inflammation,

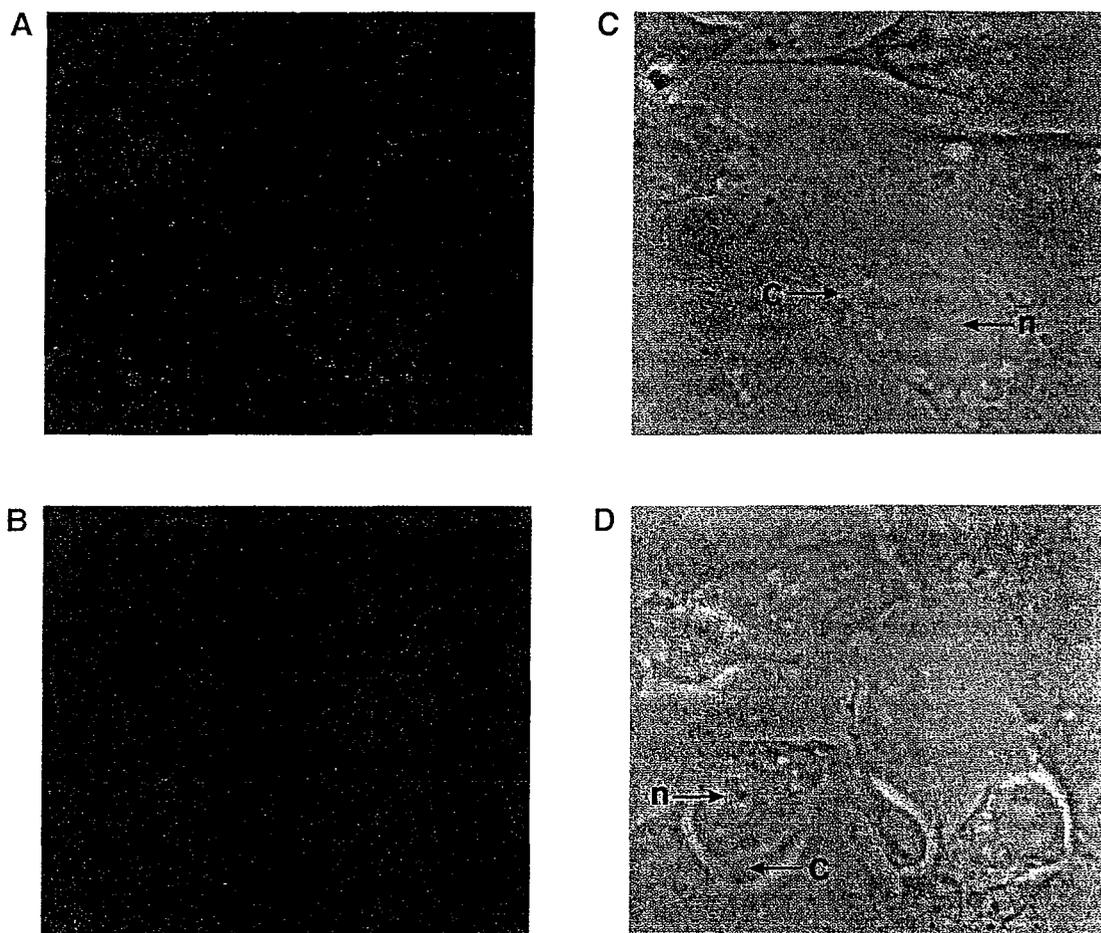


Figure 7 Liposome-mediated transfection of decoy oligonucleotides. CFTE cells were transfected with decoys complexed to DC-Cholesterol/DOPE for 24 h. One tenth (0.56 μg per six-well plate) of the decoys was end-labeled with tetramethylrhodamine-5-UTP. Fluorescence was determined using confocal microscopy (left panel, 100 \times) and was visible in cytoplasm (c), nucleus (n) and the perinuclear region of transfected (A), but not control cells (B). Corresponding bright field images (C and D).

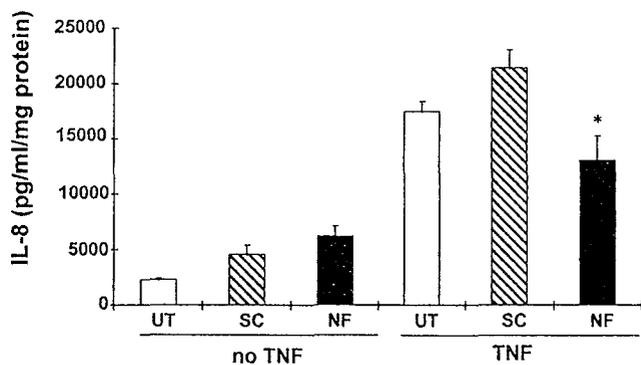


Figure 8 IL-8 secretion after liposome-mediated transfection with NF κ B decoys. CFTE cells were transfected with NF κ B decoys (NF) or scrambled (SC) oligonucleotides complexed to DC-Cholesterol/DOPE or remained untransfected (UT). Twenty-four h after transfection cells remained unstimulated or were stimulated with TNF- α for 1 h. IL-8 secretion was measured 6 h after stimulation (n = 6 each experiment). Error bars indicate s.e.m., * = P < 0.05 compared with scrambled oligonucleotide.

can be attenuated by decreasing NF κ B activity in a cystic fibrosis airway epithelial cell line. Adenovirus-mediated, but not liposome-mediated I κ B α overexpression significantly reduced IL-8 secretion and NF κ B activity. Transfection with decoy/liposome complexes also significantly decreased TNF- α stimulated IL-8 secretion and NF κ B activation.

NF κ B is a central regulator of inflammation in the airways and other organs²⁴ and presents an attractive target for anti-inflammatory lung gene therapy. In CF, excessive secretion of IL-8 and hence neutrophil infiltration, contribute dramatically to the chronic lung injury. A potential source of IL-8 in the airways is the respiratory epithelium,^{25,26} which although at present a challenge for gene transfer, is ultimately likely to be an appropriate target for anti-inflammatory gene therapy, because of its accessibility. This study was designed to provide proof-of-principle that IL-8 secretion can be attenuated by decreasing NF κ B activation in a simulated inflammatory environment generated in cystic fibrosis airway epithelial cells. Adenovirus-mediated overexpression of I κ B α reduced IL-8 secretion and NF κ B activity in a dose-dependent fashion. We have shown that a significant proportion of cells need to be transduced to achieve this anti-inflammatory effect. However, despite their success

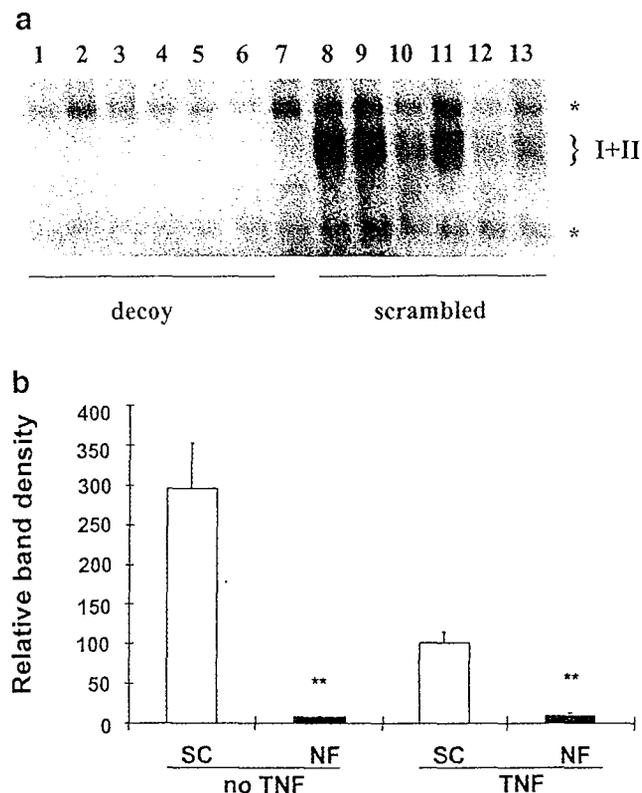


Figure 9 EMSA after NF κ B decoy transfection. (a) CFTE cells were transfected with NF κ B decoy (lanes 1–7) or scrambled oligonucleotides (lanes 8–13). Twenty-four h after transfection, cells were stimulated with TNF- α for 1 h, after which protein extracts were prepared. NF κ B/DNA complexes I + II are indicated. The specificity of the DNA/protein binding was determined in reactions using unlabeled specific competitor (lane 7). The asterisks mark non-specific bands. (b) Quantification of NF κ B/DNA complexes I + II in NF κ B decoy (NF) and scrambled oligonucleotide (SC) transfected cells, either unstimulated or TNF- α stimulated ($n = 6$). Error bars indicate s.e.m. ** = $P < 0.01$ compared with scrambled oligonucleotides.

in vitro, the use of adenovirus-mediated I κ B α overexpression might be limited *in vivo*. Even though adenoviruses possess a natural tropism for the lung, the virus does not transfect airway epithelium efficiently,²⁷ and thus I κ B α overexpression may not be achievable *in vivo*. In addition, virus infection, particularly at high titers induces inflammation, here seen as a two-fold increase in IL-8 production when compared with uninfected controls. However, in the presence of TNF- α which may mimic the chronic inflammatory environment in a CF lung, virus infection does not further increase IL-8 secretion.

Liposome-mediated I κ B α overexpression did not decrease IL-8 secretion *in vitro*, most likely due to insufficient transfection efficiency. Thus, under optimised conditions less than 5% of CFTE cells expressed the β -galactosidase reporter gene. Similar efficiencies have been reported for other cell lines using labeled plasmid DNA/liposome complexes.²⁸ Liposome-mediated transfection of the lung epithelium has also been shown to be an inefficient process,²⁹ although recent reports indicate ways in which this may be augmented.³⁰ However, it is unlikely that liposome-mediated I κ B α overexpression will achieve a reduction of NF κ B activity *in vivo*. Apart from I κ B α , several other inhibitors for NF κ B (I κ B β , I κ B ϵ)

have recently been cloned.¹¹ The relative contribution of these in controlling particularly chronic inflammation remains to be established.

Transfection with rhodamine-labeled decoys complexed to liposomes resulted in transfection efficiencies close to 100% in CFTE cells, when approximately 10^6 oligonucleotides per cell were added, although we did not assess the minimum number of oligonucleotides needed per cell. Liposome-mediated decoy transfection decreased TNF- α stimulated IL-8 secretion by about 40% and NF κ B activity by over 90%. The discrepant reduction of NF κ B is likely a reflection of decoys present in the cytoplasm and nucleus which can act as specific competitors during the electrophoretic mobility shift assay. It is unclear why decoys did not reduce basal IL-8 secretion in CFTE cells. One possibility is that basal IL-8 secretion relates to a different transcription pathway. Thus transcription factors involved in regulating the basal expression might not bind to the same promoter consensus binding sites as proteins regulating the stimulated secretion and might therefore not recognize the same decoy molecules. However, in an inflamed lung IL-8 secretion and NF κ B activation are likely to be stimulated through TNF- α -related pathways and thus susceptible to decoy inhibition.

Decoy/liposome complexes may overcome some of the limitations associated with virus- and liposome-mediated I κ B α transfection *in vivo*. In contrast to the relatively poor transfection efficiency of plasmids when complexed to liposomes, the decoy oligonucleotide/liposome complexes used in the study transfect cytoplasm and nucleus of CFTE and Cos 7 cells very efficiently. It has recently been demonstrated that there is a marked difference in the extent and kinetics of nuclear uptake between oligonucleotides and plasmids.³¹ Oligonucleotides accumulate in the nucleus of transfected cells within hours of transfection, whereas plasmids can only be detected in the nucleus after overnight incubation. Cell division may not be required for intranuclear uptake of oligonucleotides, since they enter the nucleus rapidly and their accumulation is temperature and energy-independent.^{29,32} In contrast, plasmid uptake into the nucleus appears to be enhanced through cell division³³ and this process is energy- and temperature-dependent.³⁴ In contrast to I κ B α overexpression, decoys do not require protein expression, a further potential advantage. Thus, the decoy approach warrants evaluation in animal models of pulmonary inflammation.

In conclusion, we have demonstrated that NF κ B activity and IL-8 secretion can be decreased in a CF airway epithelial cell line through overexpression of I κ B α or NF κ B decoy transfection. Anti-inflammatory lung gene therapy based on nucleotide gene transfer may offer promise for inflammatory diseases of the lung.

Materials and methods

Cell culture

Tracheal epithelial cells derived from a Δ F508 homozygote cystic fibrosis patient (CFTE) and green monkey kidney cells (Cos 7) were grown in MEM and DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and 1% streptomycin/ampicillin (Gibco BRL, Paisley, UK), respectively, and passaged under routine tissue culture

procedures. In studies of tumor necrosis factor alpha stimulation (TNF- α ; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) 200 units/ml medium were added for 1 h, after which the medium was replaced with unconditioned medium.

Adenovirus and plasmid preparation

The adenovirus I κ B α (AdI κ B α) has been previously described.¹⁸ The virus has an E1 deletion and carries the porcine I κ B α cDNA in combination with the SV40 large T antigen nuclear localization signal (NLS). An E1-deleted adenovirus expressing nuclear localized β -galactosidase³⁵ was used as a control virus. Purification of the recombinant adenovirus was carried out using two consecutive cesium chloride centrifugations, as previously described.³⁶ The wild-type human inhibitor kappa B alpha cDNA (I κ B α) and a mutant carrying the S32/36A mutation to increase its stability³⁷ were blunt-ended and cloned into the *Sma*I site of the eukaryotic expression plasmid pCI (Promega, Southampton, UK), which uses the CMV immediate-early promoter/enhancer region to regulate expression.

Decoy oligonucleotides

Phosphorothioated, HPLC purified oligonucleotides (Genosys Biotechnologies, London, UK) included the following sequences (NF κ B consensus sequences are shown in bold letters): NF κ B decoy: 5'-CCT TGA AGG GAT TTC CCT CC-3', 3'-GGA ACT TCC CTA AAG GGA GG-5', scrambled decoy: 5'-TTG CCG TAC CTG ACT TAG CC-3', 3'-AAC GGC ATG GAC TGA ATC GG-3'. The synthetic oligonucleotides were washed in sterile TE buffer (10 mM tris(hydroxy-methyl)-aminomethane, 1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid). The supernatant was purified over NAP10 columns (Pharmacia, St Albans, UK) and quantified spectrophotometrically. The single-stranded oligonucleotides (3 nM) were annealed for 2 h with decreasing temperatures from 80°C to 25°C. For some experiments the double-stranded NF κ B decoys were 3'hydroxy end-labeled with tetramethylrhodamine-5-UTP (Boehringer, Mannheim, Germany) using terminal transferase (Boehringer).

Cell transduction and transfection

Transductions and transfections were carried out on semi-confluent cells, grown in six-well tissue culture plates (7 cm²) in the absence of serum for 18–20 h, after which the medium was replaced with normal growth medium. For the adenovirus transductions, cells were infected with doses ranging from 1.1×10^5 to 1.1×10^7 plaque forming units (p.f.u.) per 6-cm well, corresponding to multiplicity of infection units (MOI) of 0.3 to 30. Decoy oligonucleotides were complexed to the cationic lipid DC-cholesterol:DOPE³⁸ at a ratio of 1:3 (5.6 μ g oligonucleotides:16.8 μ g lipid) in Opti-MEM (Sigma, Poole, UK). For immunohistochemistry cells were grown on glass coverslips. After transfection with rhodamine-labeled or unlabeled oligonucleotides cells were acid-washed (0.2 M acetic acid, 0.5 M NaCl in PBS) for 5 min at 4°C, washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min. Subsequently the coverslips were mounted and fluorescence was determined using confocal microscopy in the nucleus and cytoplasm of 15 individual cells.

Measurements of secreted IL-8 through ELISA

Ad-I κ B α transduced cells were stimulated with TNF- α 48 h after virus infection and secreted IL-8 was measured in stimulated and unstimulated cells 6 h after stimulation, using a standard ELISA (Genzyme Corporation). Twenty-four hours following the start of transfection with decoys, the cells were stimulated with TNF- α or remained unstimulated and secreted IL-8 was assayed as described above.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Protein lysates were prepared as previously described.³⁹ In brief, cells were scraped into the surrounding medium and pelleted at 4°C (5 min, 1100 g). The pellets were washed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 30 μ l extraction buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 350 mM NaCl, 20% glycerol, 1% NP40, 0.5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM DTT) for 30 min on ice. Cell debris was removed through centrifugation (5 min, 14 000 g) and the protein concentration in the supernatant was determined by a modified Folin-Lowry method.⁴⁰ The gel shift assay system from Promega was used and EMSAs were carried out according to the manufacturer's recommendations. An oligonucleotide probe containing the κ -light chain enhancer NF κ B consensus binding site (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') was end-labeled with ³²P-ATP (Amersham, Little Chalfont, UK). Ten micrograms of cellular proteins were used for each reaction. Proteins were resolved on 5% non-denaturing polyacrylamide gels at 10 mA for 3 h. Subsequently, gels were dried (80°C, 2 h) and exposed with intensifying screens to Kodak XAR-5 film (Sigma) for 24 h at -80°C. Quantification of NF κ B complexes was carried out by densitometry.

Pseudomonas aeruginosa infection of mice

Pseudomonas aeruginosa serotype 0:1 (a non-mucoid pilated laboratory strain) was grown overnight in tryptone soya broth (Unipath, Basingstoke, UK). Bacteria were pelleted by centrifugation for 10 min at 1100 g and resuspended in 1 ml of PBS. Bacterial concentration was quantified by spectrophotometry, with an OD₂₆₀ of 0.1 corresponding to 2.5×10^8 /ml bacteria, as previously described.⁴¹ C57Bl/6 mice were infected with 10^7 bacteria in 100 μ l PBS through nasal instillation as previously described.⁴²

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen), following the manufacturer's recommendations. The samples were treated with 1 unit DNase (Pharmacia)/ μ g DNA. Reverse transcription was performed using 3 μ g RNA, 0.5 mM of each dNTP, 100 μ M random hexamer primers (Pharmacia), 300 units RNA guard (Pharmacia), 10 mM dithiothreitol (DTT), 5 \times RT-buffer (BRL) and 200 units Superscript reverse transcriptase (BRL) in a total volume of 20 μ l. The reaction was incubated at 37°C for 1 h and heat-inactivated for 10 min at 95°C. RT-PCR reactions were performed with primers specific for the I κ B α cDNA, which amplify a 450 bp cDNA specific product (forward primer: 5'-AGT CTC GAA CTT AAG CTG-3', reverse primer 5'-ATC ACT TCC ATG GTC AGT-3') using 150 ng cDNA, 200 μ M dNTP, 50 ng of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 10 \times PCR buffer (BRL) and 1 unit Taq polymerase in a total volume

of 20 μ l. Thermal cycling was carried out for 30 cycles (20 s 92°C, 30 s 55°C, 60 s 72°C). Negative controls without reverse transcriptase were performed for all samples. PCR products were separated on 2% agarose gels.

X-gal assay

Cells were washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.3) and fixed for 15 min (0.2% glutaraldehyde, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3). After fixation, cells were washed three times for 20 min in wash buffer (2 mM MgCl₂, 0.02% NP40, 0.01% sodium deoxycholate in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3). To visualize β -galactosidase expression, cells were stained at 37°C for 1 h in X-gal staining solution (1 mg/ml 4-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galacto-pyranoside (X-gal, Gibco BRL) in di-methyl formamide, 5 mM potassium ferrocyanide (Sigma), 5 mM potassium ferricyanide (Sigma) in wash buffer). A total of 3000 cells in 10 optical fields were counted in two independent experiments.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) for convenience. The Mann-Whitney test was used to compare means and the null hypothesis rejected at $P < 0.05$.

Acknowledgements

We thank Patrick Baeuerle for the I κ B α cDNA, Judy St George for the Adeno- β gal, Ty Pitt for the *Pseudomonas* bacteria, Dieter Gruenert for the CFTE cells and Naruya Tomita for advice in using NF κ B decoys. The study was funded by the Wellcome Trust, the Cystic Fibrosis Trust, by NIH grant DK44935 (LH) and a Wellcome Senior Clinical Fellowship (EWFVA).

References

- Burnett D. Neutrophils. In: Stockely RA (ed). *Pulmonary Defenses*. John Wiley: New York, 1997, pp 113–127.
- Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Resp Dis* 1990; 141: 471–501.
- Nadel JA. Protease actions on airway secretions. Relevance to cystic fibrosis. *Ann NY Acad Sci* 1991; 624: 286–296.
- Dean TP et al. Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1993; 34: 159–161.
- DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 1995; 96: 2204–2210.
- Scheid P et al. Inflammation in cystic fibrosis airways: relationship to increased bacterial adherence (submitted for publication).
- Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 141–179.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl J Med* 1997; 336: 1066–1071.
- Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ. NF-kappa B and Rel: participants in a multifunctional transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993; 143: 1–62.
- Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J* 1991; 10: 3805–3817.
- Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J* 1997; 16: 1413–1426.
- Brown K et al. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 1995; 267: 1485–1488.
- Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J* 1994; 13: 5433–5441.
- Kunsch C, Rosen CA. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Molec Cell Biol* 1993; 13: 6137–6146.
- DiMango E et al. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 2598–2605.
- Li JD et al. Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5718–5723.
- Hart LA et al. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 1998; 158: 1585–1592.
- Lee JI, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 981–993.
- Tomita N et al. Transcription factor decoy for nuclear factor-kappa B inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *J Hypertens* 1998; 16: 993–1000.
- Makarov SS et al. NF-kappa B as a target for anti-inflammatory gene therapy: suppression of inflammatory responses in monocytic and stromal cells by stable gene transfer of I kappa B alpha cDNA. *Gene Therapy* 1997; 4: 846–852.
- Wrighton CJ et al. Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B. *J Exp Med* 1996; 183: 1013–1022.
- Morishita R et al. In vivo transfection of cis element 'decoy' against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nature Med* 1997; 3: 894–899.
- Bohrer H et al. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997; 100: 972–985.
- Blackwell TS et al. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 1996; 157: 1630–1637.
- Becker S, Koren HS, Henke DC. Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1993; 8: 20–27.
- Marini M, Vittori E, Hollemborg J, Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allerg Clin Immunol* 1992; 89: 1001–1009.
- Grubb BR et al. Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature* 1994; 371: 802–806.
- Zabner J et al. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; 270: 18997–19007.
- Kitson C et al. The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Therapy* 1999; 6: 534–546.
- Sorgi FL, Bhattacharya S, Huang L. Proteamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer. *Gene Therapy* 1997; 4: 961–968.
- Zelphati O, Liang XW, Hobart P, Felgner PL. Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 15–24.
- Leonetti JP et al. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2702–2706.
- Chin DJ et al. Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxynucleotides. *New Biol* 1990; 2: 1091–1100.

- 34 Dean DA. Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* 1997; 230: 293–302.
- 35 Kaplan JM *et al*. Potentiation of gene transfer to the mouse lung by complexes of adenovirus vector and polycations improves therapeutic potential. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1469–1479.
- 36 Graham FL, Van der Eb AJ. A simple technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; 52: 456–467.
- 37 Traenckner EB *et al*. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* 1995; 14: 2876–2883.
- 38 Sorgi FL, Huang L. Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. *Int J Pharm* 1996; 144: 131–139.
- 39 Pahl HL, Baeuerle PA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NFkappaB. *EMBO J* 1995; 14: 2580–2588.
- 40 Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83: 346–356.
- 41 Davies JC *et al*. CFTR gene transfer reduces the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to cystic fibrosis respiratory epithelium. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1997; 16: 657–663.
- 42 Lee ER *et al*. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1701–1717.

Modulation de l'activité de NFκB in vitro par thérapie génique

Scheid P, Griesenbach U, Davies JC, Siddique Z, Gruenert DC, GeddesDM, Alton EW. Interleukin-8 production by airway epithelium and the effect of liposome-mediated IκB gene transfer. *Thorax* 1998, 53:A78. (Abstract)
British Thoracic Society, Winter meeting, Londres, 2-4 décembre 1998.

Griesenbach U, Scheid P, Hillery E, de Martin R, Huang L, Geddes DM, Alton EW. Anti-inflammatory gene therapy directed at the airway epithelium. *Gene Ther* 2000, 7:306-13.

I. Matériels et méthodes

Les cultures cellulaires des lignées CFTE et Cos-7 sont effectuées comme précédemment décrit (chap III, I.6.1). De même pour l'évaluation de l'activation NFκB qui est réalisée par EMSA (chap III, I.4.).

1. Préparation des adénovirus

Les adénovirus utilisés transportent au niveau de leur domaine E₁ délété: 1) soit la séquence de l'ADN complémentaire du gène de l'inhibiteur IκBα humain, 2) soit le gène de la β-galactosidase (qui sera utilisé pour évaluer l'efficacité de la transfection). La préparation est réalisée comme décrit précédemment (349).

2. Les oligonucléotides "leurres" utilisés

On utilise des oligonucléotides "leurres" (decoy) complémentaires de la séquence de consensus nucléaire de NFκB: 5'-CCTTGAAGGGATTTCCTCC-3', et 3'-GGAACTTCCCTAAAGGGAGG-5' ; ainsi que des oligonucléotides leurres non

fonctionnels (Scrambled) : 5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3' et 3'-AACGGCATGGAC TGAATCGG-3'.

3. Transfection des lignées cellulaires

La transfection a été réalisée sur des cellules en culture semi-confluentes, 1) par des doses d'adénovirus à $1,1 \times 10^5$, $1,5 \times 10^6$ et $1,1 \times 10^7$ pfu (plaque forming unit) correspondant respectivement à 0,3, 3 et 30 MOI (Multiplicity Of Infection unit), ou 2) avec des liposomes cationiques DC-cholestérol/DOPE avec un ratio de 1/3 (nucléotides/liposomes) dans un milieu opti-MEM.

4. Sécrétion d'IL-8 par les cellules transfectées

La stimulation des cellules CFTE par $\text{TNF}\alpha$ est effectuée à 48 heures après transfection par adénovirus et à 34 heures après transfection par liposomes. Les cellules sont mises en présence du $\text{TNF}\alpha$ (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) à 200 U/ml de milieu pendant une heure, puis placées dans un nouveau milieu dont un échantillon est prélevé au bout de 6 heures pour dosage de l'IL-8 (de même sur un milieu contrôle de cellules CFTE transfectées non stimulées).

5. Infection à *Pseudomonas aeruginosa* chez la souris

Des souris C57 B1/6 non porteuses de mutation du gène CFTR ont été infectées par instillation nasale de 10^7 bactéries d'une culture de PA de la même souche que précédemment (chap III, I.3.).

6. Efficacité de la transfection par mesure de l'expression de la β galactosidase

Brièvement, après rinçage dans un tampon phosphate, les cellules sont fixées dans une solution contenant 0,2 % de glutaraldéhyde. Puis après passage de 4-bromo-4-chloro-3-indolyl-Dgalacto-pyranoside (Xgal, Gibco BRL), les comptages cellulaires sont faits sur environ 3000 cellules dans 10 champs optiques différents.

7. Identification de l'ADN complémentaire de $I\kappa B\alpha$ par RT-PCR

L'ARN total d'une culture de cellules transfectées est isolé en utilisant le kit Rnesy Mini Kit (Qiagen Ltd, Sussex, UK). La RT-PCR permet d'amplifier un fragment de 450 pb spécifique de l'ADN complémentaire (ADNc) de $I\kappa B\alpha$, identifié en gel d'agarose à 2 %.

8. Etudes statistiques

La comparaison des moyennes est réalisée par le test de Mann-Whitney avec un intervalle de confiance de 5, %.

II. Résultats

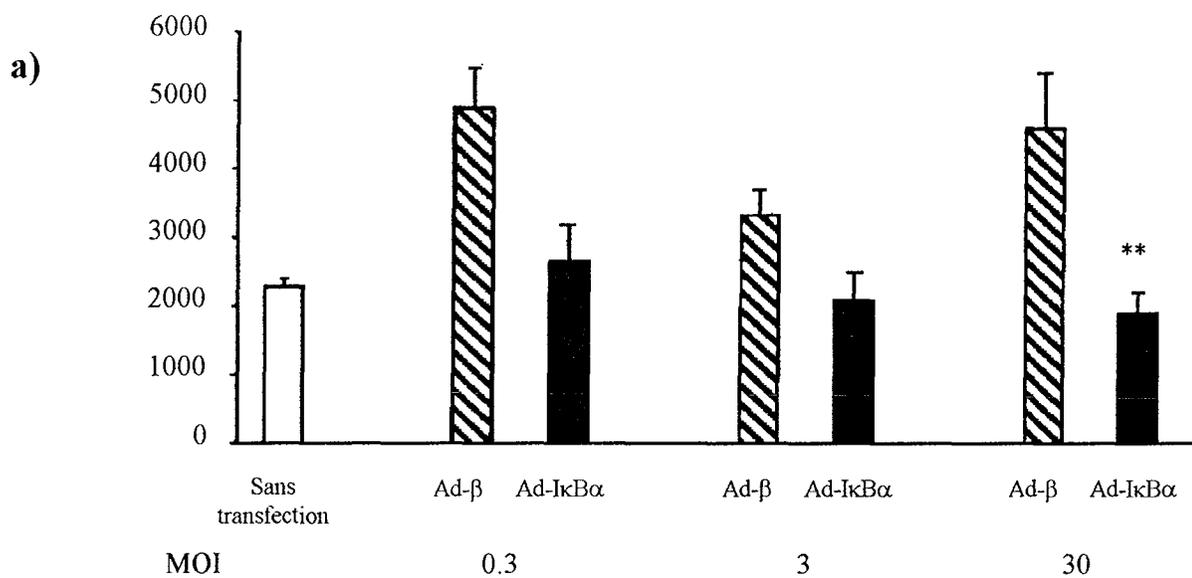
1. Sécrétion d'IL-8 après transfection par $I\kappa B\alpha$

A l'état basal (Figure n°32a):

La transfection par adénovirus augmente la production d'IL-8 à toutes les concentrations. La transfection de la concentration la plus forte du complexe adénovirus- $I\kappa B\alpha$ (MOI=30) induit une diminution de 60 % de la sécrétion d'IL-8 par rapport à la transfection d'adénovirus seul ($p < 0,01$), mais pas de réduction significative en dessous du niveau de base sans transfection virale.

Figure n° 32 : Sécrétion d'IL-8 par les cellules CFTE à 48 heures après transfection d'I κ B α par le vecteur adénoviral (aux concentrations 0,3, 3 et 30) ou le gène de la β -galactosidase, a) sans ou b) après stimulation par le TNF α . (*: $p < 0,01$ par rapport aux cellules non transfectées non stimulées; **: $p < 0,01$)

Interleukine-8
(pg/ml/mg de protéines)



Interleukine-8
(pg/ml/mg de protéines)

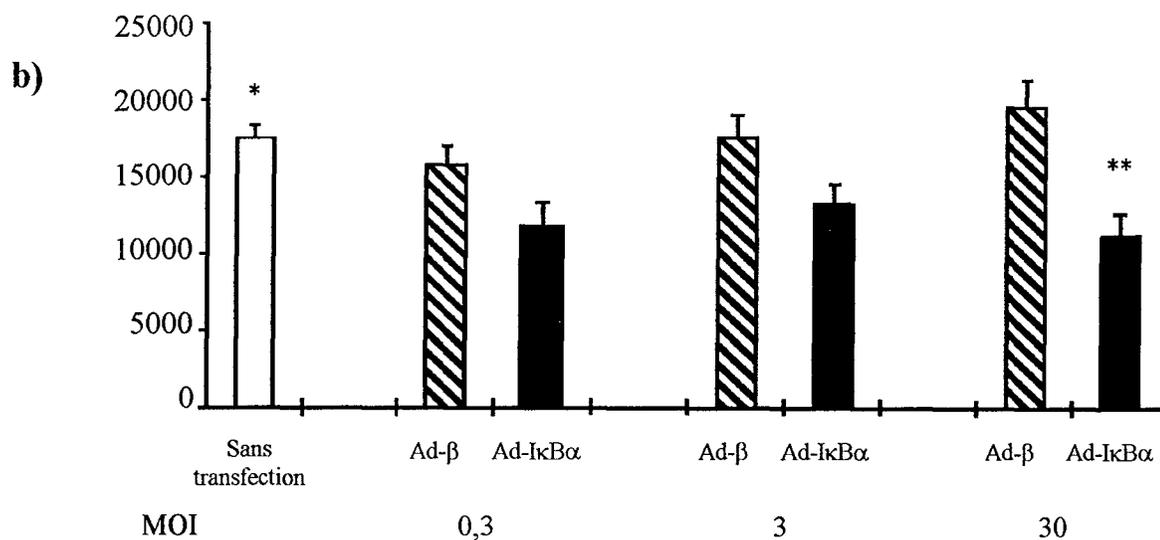


Figure n°33 : Sécrétion d'IL-8 après transfection du gène *IκBα* (normal ou anormal) ou de la β -galactosidase par le vecteur liposomal DC-Chol/DOPE, avec ou sans stimulation par le $TNF\alpha$

Interleukine-8
(pg/ml/mg de protéines)

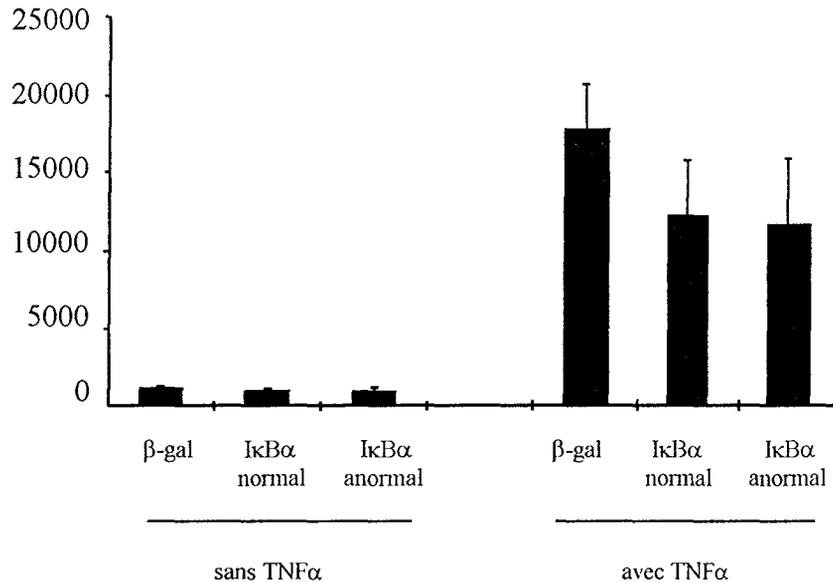
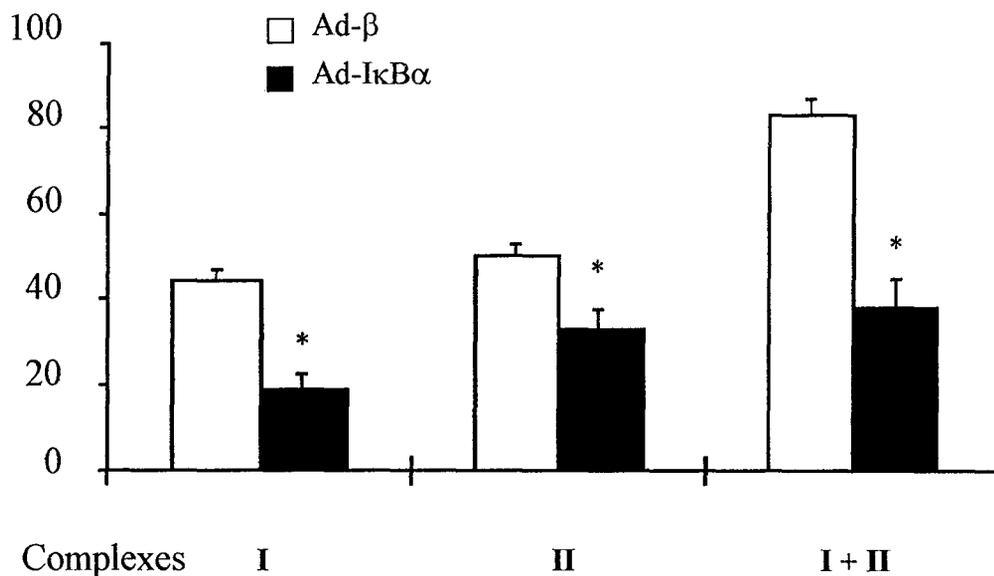


Figure n°34 : Réduction de l'activité des complexes I et II de $NF\kappa B$ après transfection par la construction adénovirus-*IκBα* versus la construction adénovirus- β -galactosidase. L'activité des complexes est évaluée 48 h après la transfection et après stimulation par le $TNF\alpha$ (*: $p < 0.05$)

Densité relative



Lors de la stimulation par TNF α (Figure n°32b):

La stimulation par TNF α induit la sécrétion d'IL-8 par les cellules CFTE non infectées par adénovirus qui est majorée d'un facteur environ de 7. Après transfection par adénovirus la stimulation par TNF α ne majore pas la sécrétion d'IL-8. Par contre la transfection par la plus forte concentration de la construction adénovirus-I κ B α réduit significativement la sécrétion d'IL-8 par rapport aux cellules non transfectées et par rapport aux cellules transfectées par le complexe adénovirus- β galactosidase ($p < 0,01$).

Enfin la transfection de I κ B α par liposomes ne modifie pas la sécrétion d'IL-8 ni à l'état basal ni après stimulation par TNF α (Figure n°33). En fait le taux de transfection par liposomes s'avère trop faible ($4,6 \% \pm 1,7$ des cellules CFTE), d'un niveau comparable à celui obtenu avec la plus petite concentration d'adénovirus ($2,2 \% \pm 0,4$ des cellules CFTE). Par comparaison la plus haute concentration d'adénovirus transfecte $68 \% \pm 4$ des cellules CFTE.

2. Activation de NF κ B après transfection par la construction adénovirus-I κ B α

Les cellules CFTE présentent à l'état basal une augmentation de l'activité du complexe II de NF κ B (Chap. III, I.5.). Leur stimulation par du TNF α se traduit par une augmentation des complexes I et II de NF κ B, que l'on retrouve sur les extraits protéiques de poumons de souris C57BP/6 infectées par PA. Les complexes I et II sont considérés comme des marqueurs de l'activité de NF κ B. La transfection des cellules CFTE par le complexe adénovirus-I κ B α permet une diminution de l'activité d'environ 50 % des complexes I et II après stimulation par le TNF α (Figure n°34).

Figure n°35 : Réduction de la sécrétion d'IL-8 par les cellules CFTE après transfection par les complexes oligonucléotides-liposomes avec ou sans stimulation par le $TNF\alpha$.

(NT: cellules non transfectées, ONF: oligonucléotides non fonctionnels, OC: oligonucléotides complémentaires, *: $p < 0,05$)

Interleukine-8
(pg/ml/mg de protéines)

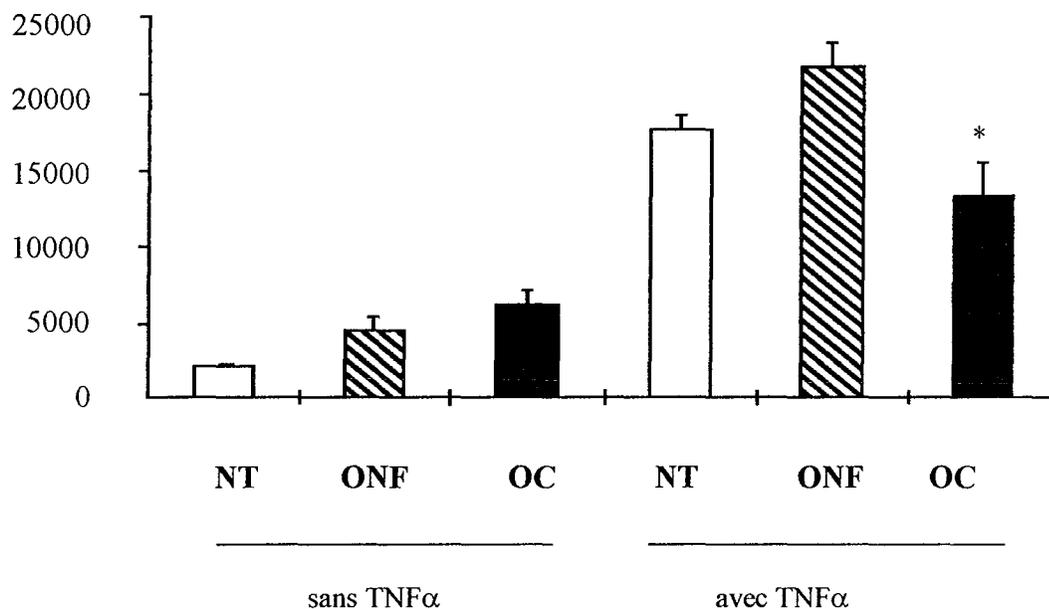
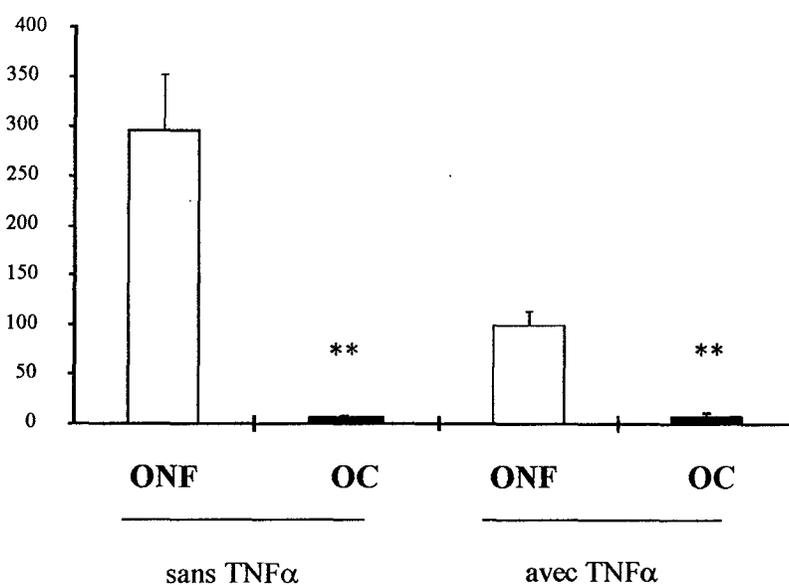


Figure n°36 : Activité de $NF\kappa B$ (complexes I+II) après transfection des cellules CFTE par des oligonucléotides complémentaires (OC) de la séquence de consensus de $NF\kappa B$ ou d'oligonucléotides non fonctionnels (ONF). **: $p < 0,01$

Densité relative



3. Efficacité de la transfection d'oligonucléotides complémentaires de la séquence de consensus de NFκB (decoy)

L'efficacité de transfection des complexes oligonucléotides-liposomes est excellente, de l'ordre de 100 % pour le noyau et de 86 % pour le cytoplasme des cellules CFTE.

La sécrétion d'IL-8 à l'état basal est augmentée d'un facteur de 2 à 3 dans les cellules transfectées par liposomes par rapport aux cellules non transfectées. La sécrétion d'IL-8 après stimulation par TNFα est significativement diminuée dans les cellules transfectées par le complexe liposomes-oligonucléotides leurres (decoy) par rapport aux cellules non transfectées ($p < 0,05$) et par rapport aux cellules transfectées par les complexes liposomes-oligonucléotides non fonctionnels (scrambled) ($p < 0,05$) (Figure n°35).

L'activation de NFκB est diminuée de façon majeure dans les cellules transfectées par les oligonucléotides leurres (decoy) à l'état basal et après stimulation par TNFα ($p < 0,01$) (Figure n°36).

Chapitre V : Discussion

La chronologie et les mécanismes de l'installation de l'inflammation des voies aériennes des sujets atteints de mucoviscidose restent controversés. L'importance respective d'un mécanisme primaire lié aux mutations du gène CFTR et d'une cause secondaire liée à l'infection précoce, reste imprécise.

Dans notre travail nous démontrons que la sécrétion d'IL-8 par des cellules épithéliales nasales fraîchement recueillies est directement liée à l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces résultats sont concordants avec, d'une part le lien établi entre l'état de piliation de PA et la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales respiratoires (299), et d'autre part le rôle reconnu des récepteurs de type asialoGM1 exprimés sur ces mêmes cellules pour l'adhérence de PA (273, 274) notamment en phase de réparation après une agression de la muqueuse (239, 276). En outre Davies a montré que la transfection du gène CFTR normal diminue les capacités d'adhérence de PA (275). Dans notre modèle, l'utilisation de cellules épithéliales nasales fraîchement recueillies permet de s'affranchir des modifications phénotypiques potentielles liées à la mise en culture des cellules. Ainsi les cellules nasales CF et non-CF utilisées, placées dans les mêmes conditions, produisent des quantités similaires d'IL-8, ce qui est en accord avec les observations sur lavages bronchioloalvéolaires des équipes australiennes (320, 321). Nous avons écarté le rôle potentiel d'une infection par culture d'écouvillonnages nasaux (1 seul prélèvement positif à SA sur 12 effectués). Enfin, nous n'avons pas mis en évidence d'activation de NF κ B à l'état basal dans les cellules épithéliales nasales (non stimulées par PA) ni dans les tissus murins CF. Les trois lignées cellulaires CF étudiées montrent à l'état basal des résultats très différents concernant l'état d'activation de NF κ B et la sécrétion d'IL-8. Par rapport aux cellules non-CF seule une lignée sur trois (CFTE) montre une activation de NF κ B associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-8. Compte tenu de la

variabilité des études utilisant les lignées cellulaires (324, 350), ce sont les travaux du groupe de Puchelle (325) sur des xénogreffes de bronches fœtales CF sur souris SCID qui apportent le soutien le plus important à la thèse de l'inflammation primaire.

Ainsi les conditions d'une amplification des phénomènes inflammatoires en réaction à une agression tissulaire sont réunis au niveau de la muqueuse respiratoire, à la fois par l'intensité et par la rapidité de la réponse inflammatoire (325), et dans le maintien de conditions d'adhérence bactérienne (272, 276) qui favorisent la persistance des germes. La constatation par certains auteurs (292, 291, 299, 297) de la persistance de marqueurs inflammatoires élevés après traitement des exacerbations infectieuses aiguës pourrait être le témoin d'une élimination incomplète des microorganismes responsables, ce qui serait en accord avec la notion de colonisation bactérienne bien établie dans cette maladie. Sans remettre en cause l'existence d'un mécanisme inflammatoire primaire, les phénomènes inflammatoires secondaires à l'infection apparaissent prédominants et de nouvelles approches thérapeutiques pour réduire l'adhérence bactérienne sont envisageables (275, 278).

La compréhension de l'activation de NF κ B reste incomplète. L'hypothèse de la responsabilité d'une surcharge du réticulum endoplasmique (333, 334) se limite aux mutations de type II (234, 241) qui sont associées à un défaut de maturation de la protéine CFTR. De plus la nature des sous-unités des protéines Rel qui composent NF κ B et les signaux qui en découlent, après translocation nucléaire et fixation sur son élément de réponse, restent encore mal connus et probablement différents en fonction des tissus. Pour certains les homodimères p65/p65 sont responsables de la sécrétion d'IL-8 (351) alors que pour d'autres ce sont les hétérodimères p65/p50 (352). Les résultats que nous rapportons concernant les transfections de cellules Cos-7 par le gène CFTR porteur de la mutation Δ F508 ou G551D montrent que l'augmentation de l'activité de NF κ B qui en résulte est essentiellement liée à une augmentation de la sous-unité p50. Or, récemment, dans des travaux chez la souris et le rat, la

sous-unité p50 a été associé à une réduction de l'activation des macrophages (353, 354) et les homodimères p50/p50 à la phase de résolution de l'inflammation notamment par le biais d'une régulation négative du promoteur de l'iNOS et par une modulation pro-apoptotique (par l'intermédiaire du gène suppresseur p53) (355). NFκB serait donc impliqué à la fois dans l'installation et dans la "terminaison" de la réaction inflammatoire, mais les influences respectives des sous-unités de NFκB restent encore mal comprises.

Par contre, quel que soit le stimulus responsable, l'activation de NFκB passe par une phosphorylation et une dégradation de son inhibiteur IκBα. Certains ont proposé l'utilisation d'inhibiteurs de protéine tyrosine-kinases comme la génistéine pour augmenter la quantité d'IκB disponible et limiter l'activation de NFκB (356, 357).

Nous avons montré que dans des conditions de stimulation (par du TNFα), la transfection d'IκBα par un vecteur adénoviral permet de diminuer l'activation de NFκB et la production d'IL-8 d'une lignée cellulaire CF. L'efficacité de la transfection de IκBα est un facteur limitant, l'utilisation de liposomes DC-cho/DOPE (ne permettant la transfection que de moins de 5 % des cellules CFTE) s'avère insuffisante. Par une approche similaire Park (358) a montré que la transfection d'IκBα par un vecteur adénoviral, rendu résistant à la dégradation par phosphorylation (IκBα-SR), permet de bloquer sélectivement l'activation de NFκB et la sécrétion d'IL-8.

Enfin nous avons également montré que l'activation de NFκB dans des cellules épithéliales bronchiques peut être bloquée par l'utilisation d'oligonucléotides complémentaires de la séquence de consensus nucléaire de NFκB ainsi que précédemment démontré dans d'autres types cellulaires (359, 360). Le niveau de transfection de ces oligonucléotides par une construction oligonucléotides-liposomes est excellent. L'accumulation des oligonucléotides dans le noyau des cellules cibles intervient rapidement dès les premières heures, et l'activité des oligonucléotides ne requiert pas de mise en route de la machinerie cellulaire (synthèse

protéique et division cellulaire) (361, 362). Ainsi l'efficacité d'un traitement spécifique anti-inflammatoire par thérapie génique est elle démontrée sur un modèle *in vitro* en interférant avec le processus d'activation de NF κ B.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans deux domaines distincts de la pathologie respiratoire nous avons présenté les applications potentielles des nouvelles connaissances acquises au plan génique.

Ainsi dans le domaine de la carcinogénèse bronchique, les anomalies de l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (p53) et de l'apoptose (p53, *bcl2*) sont des outils pronostiques potentiels. De même l'expression ou les anomalies de certains oncogènes comme *K-ras* ou *c-erb-B2* ont été avancées comme marqueurs de pronostic dans les adénocarcinomes. C'est dans ce cadre de recherche de moyens susceptibles d'améliorer nos capacités de prédiction de l'évolution des CB, peut-être uniquement pour certains sous-groupes de sujets, que nous continuons actuellement un travail prospectif concernant les adénocarcinomes bronchiques primitifs en immunohistochimie pour p53, *bcl2*, la cycline-B₁, *ras*, l'ostéopontine, les antigènes des groupes sanguins ...

Dans le domaine de la chimioprévention, les échecs constatés sont vraisemblablement en partie attribuables à l'absence d'expression de récepteurs pour les dérivés rétinoïdes, et au manque de spécificité des molécules utilisées. Une meilleure connaissance des mécanismes responsables de l'absence de récepteurs de l'acide rétinoïque comme les délétions alléliques et les anomalies de la méthylation du gène *RARβ* permettront de mieux cibler les sous-groupes de patients susceptibles de bénéficier d'un traitement par rétinoïdes. De même l'évaluation des rétinoïdes de nouvelle génération pourra être conduite de façon plus précise et plus ciblée. Les moyens récemment acquis de diagnostic des lésions préneoplasiques par autofluorescence dont nous disposons à Nancy devraient nous permettre de développer un travail prospectif clinique et fondamental dans cette thématique.

Dans le domaine de l'inflammation de la muqueuse respiratoire dans la mucoviscidose nous n'avons pas mis en évidence de lien direct entre les anomalies géniques et les paramètres inflammatoires. Par contre l'adhérence bactérienne dont le rôle paraît essentiel dans notre travail, représente une cible pour des traitements modulateurs nouveaux.

Enfin, l'activation du facteur de transcription nucléaire NF κ B semble impliquée quel que soit le mécanisme de l'inflammation primaire ou secondaire. Dès lors, le blocage de l'activation de NF κ B, par transfert génique de son inhibiteur I κ B α ou d'oligonucléotiques complémentaires de sa séquence de consensus nucléaire de NF κ B, apparaissent comme des moyens de moduler les paramètres de l'inflammation. Néanmoins l'application pratique de ces modèles efficaces sur des lignées cellulaires représente un niveau de complexité très élevé, compte tenu des multiples facettes de l'action et de la régulation de NF κ B ainsi que de ses effets probablement tissus-dépendants.

Table des matières des tableaux

Tableau n°1 : Classification internationale de l'OMS des tumeurs Bronchopulmonaires.....	24
Tableau n°2 : Classification des proliférations et néoplasies neuroendocrines.....	26
Tableau n°3 : Les principaux agents carcinogènes pour le poumon.....	31
Tableau n°4 : Principaux gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose contrôlés par p53.....	41
Tableau n°5 : Fréquence des anomalies de p53 détectées en immunohistochimie et en PCR-SSCP dans les CBNPC.....	42
Tableau n°6 : Localisation des principaux gènes dont les délétions semblent impliquées dans la carcinogenèse bronchique.....	63
Tableau n°7 : Principaux facteurs pronostiques de survie dans les cancers bronchiques retrouvés en analyse multivariée.....	67
Tableau n°8 : Classification TNM des cancers bronchiques révisée de 1997.....	68
Tableau n°9 : Survie à 4 et 5 ans dans de grandes séries de sujets opérés de cancer bronchique (classification TNM révisée de 1997) d'après Lopez-Encuentra (1999).....	70
Tableau n°10 : Localisation des gènes codant les RARs et RXRs.....	78
Tableau n°11 : Récapitulatif des essais de chimioprévention des cancers bronchiques et ORL.....	86
Tableau n°12 : Caractéristiques de la population de CBNPC étudiée pour la recherche des marqueurs pronostiques.....	107
Tableau n°13 : Valeur pronostique des paramètres immunohistochimiques et des mutations du codon 12 de K- <i>ras</i> tous stades confondus.....	110
Tableau n°14 : Les principales protéines dont la synthèse est contrôlée par NFκB...	162
Tableau n°15 : Les principaux stimuli activant NKκB.....	162

Table des matières des figures

Figure n°1 :	Hypothèses actuelles concernant l'origine cellulaire des différents types histologiques de cancers bronchiques.....	19
Figure n°2 :	Hypothèses de filiation des étapes successives conduisant à la transformation carcinomateuse de l'épithélium bronchique.....	22
Figure n°3 :	Principe de la carcinogenèse bronchique avec la sélection progressive d'un clone ayant un avantage mitotique.....	32
Figure n°4 :	Le contrôle de l'entrée en phase S par la protéine Rb.....	35
Figure n°5 :	Régulation et activité anormale de la protéine <i>ras</i> mutée.....	48
Figure n°6 :	Méthylation de l'ADN par l'intervention d'une ADN méthylase	52
Figure n°7 :	La méthylation de maintenance	54
Figure n°8 :	Séquence d'apparition des anomalies génique au cours des étapes de la transformation néoplasique de la muqueuse respiratoire.....	64
Figure n°9 :	Représentation schématique de l'organisation des récepteurs nucléaires.....	76
Figure n°10:	Fixation des récepteurs d'un hétérodimère RAR/RXR sur l'élément de réponse de type DR ₂	78
Figure n°11:	Hypothèse du mécanisme de l'induction paradoxale de lésions de métaplasies par les rétinoïdes et le tabac.....	88
Figure n°12:	Courbe de survie des sujets opérés de CBNPC suivis dans le cadre de l'étude des marqueurs pronostiques.....	108
Figure n°13:	La bisulfitation des cytosines non méthylées.....	117
Figure n°14:	Identification de la position des cytosines méthylées sur une portion de la séquence du promoteur RAR- β par séquençage avant et après traitement de l'ADN par bisulfite.....	118
Figure n°15:	Position des cytosines méthylées sur le promoteur de RAR- β_2	119
Figure n°16:	Séquences des amorces utilisées pour la PCR spécifique de la méthylation...	121
Figure n°17:	Etude de l'expression de la protéine RAR- β en immunohistochimie sur deux CBNPC.....	123

Figure n°18: Allélotypage d'un CBNPC identifiant la perte d'un allèle pour le microsatellite D3S1283 sur la tumeur par rapport au parenchyme sain correspondant.....	124
Figure n°19: PCR spécifique de la méthylation pour un parenchyme sain et la tumeur correspondante.....	126
Figure n°20: Synthèse des résultats concernant le statut de RAR- β_2 , la recherche de délétions alléliques et la présence d'une méthylation du promoteur de RAR- β_2 sur la population étudiée de 78 CBNPC.....	127
Figure n°21: La structure de la protéine CFTR.....	138
Figure n°22: Les différentes classes de mutations du gène CFTR.....	143
Figure n°23: Les conditions de la constitution de bronchectasies dans la mucoviscidose...	145
Figure n°24: Les mécanismes de l'inflammation des voies aériennes dans la mucoviscidose.....	159
Figure n°25: Régulation de l'activation du facteur de transcription nucléaire NF κ B.....	161
Figure n°26: Sécrétion d'Interleukine 8 à 24 heures par des cellules nasales épithéliales en conditions basales et après exposition à <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	183
Figure n°27: Production d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales après "égalisation" des conditions d'adhérence de PA.....	184
Figure n°28: Influence du génotype sur la production d'IL-8 par les cellules épithéliales nasales.....	185
Figure n°29: Quantification de l'activité totale de NF κ B sur des cellules épithéliales nasales CF et non CF et des tissus murins.....	187
Figure n°30: Activation de NF κ B et sécrétion d'interleukine-8 à l'état basal par des lignées cellulaires CF et non-CF.....	188
Figure n°31: Influence de la transfection du gène CFTR muté (Δ F508 ou G551D) sur l'activité de NF κ B et sur la sécrétion d'IL-8.....	189
Figure n°32: Sécrétion d'IL-8 après transfection d'I κ B par le vecteur adénoviral.....	204
Figure n°33: Sécrétion d'IL-8 après transfection d'I κ B par le vecteur liposomal DC-cholesterol/DOPE.....	205
Figure n°34: Réduction de l'activité des complexes I et II de NF κ B après transfection par la construction Adénovirus-I κ B α	205
Figure n°35: Réduction de la sécrétion d'IL-8 après transfection par les complexes oligonucléotides-liposomes.....	207

Figure n°36: Activité de NFκB (complexes I+II) après transfection des cellules CFTE par des oligonucléotides complémentaires (OC) de la séquence de consensus de NFκB ou d'oligonucléotides non fonctionnels (ONF)..... 207

BIBLIOGRAPHIE

1. LEVI F, LUCCHINI F, LaVECCHIA C, NEGRI E. Trends in mortality from cancer in the European Union, 1955-94. *Lancet* 1999;354:742-43.
2. Observatoire Régional de la Santé et des Affaires Sociales en Lorraine 1994, fiches 7.1, 7.2, 7.4.
3. Observatoire Régional de la Santé et des Affaires Sociales en Lorraine 1998, fiches 7.1, 7.2.
4. KREUZER M, KREIENBROCK L, GERKEN M, HEINRICH J, BRUSKE-HOHLFELD I, MULLER K, WICHMANN HE. Risk factors for lung cancer in young adults. *Am J Epidemiol* 1998;147:1028-37.
5. BALDINI EH, STRAUSS GM. Women and lung cancer: waiting to exhale. *Chest* 1997, 112(suppl 4): 229S-234S.
6. MARTINET Y, MOULIN JJ. Cancer bronchique. In: Les maladies respiratoires d'origine professionnelle. Y Martinet, D Anthoine, G Petiet. Masson, Paris, 1999,136-60.
7. BRAMBILLA E, GOUYER V, GAZZIERI S, BOLLON I, BRAMBILLA C. Mécanismes de la carcinogenèse bronchique. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Pneumologie*, 6-002-G25,1996,12p.
8. MORI M, TESUKA F, CHIBA E, FUNAE Y, WATANABE M, NUKIWA T, TAKAHASHI T. Atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human lung: their heterology in form and analogy in immunohistochemical characteristics. *Cancer* 1996, 77:665-74.
9. VIGNAUD JM. Aspects cytologiques, histologiques et moléculaires. *Rev Mal Respir* 1999, suppl 3 :S107-11.
10. AGUAYO SM, MILLER YE, WALDRON JA, BOGIN RM, SUNDAY ME, STATON GW, BEAM WR, KING TE. Brief report: idiopathic diffuse hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells and airways disease. *N Engl J Med* 1992, 327:1285-8.
11. BRAMBILLA E. Nouvelle classification anatomo-pathologique de l'OMS. *Rev Mal Respir* 1999, 16 :S105-12.
12. TRAVIS WD, COLBY TV, CORRIN B, SHIMOSATO, BRAMBILLA. In collaboration with pathologists of 14 countries. Histological typing of lung and pleural tumors. In: World Health Organisation international histological classification of tumors. Third edition, Geneva 1999.
13. THUN MJ, LALLY CA, FLANNERY JT, CALLE EE, FLANDERS WD, HEATH CW. Cigarette smoking and changes in histopathology of lung. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1580-6.
14. VIGNAUD JM, MARIE B, PICARD E, NABIL K, SIAT J, GALATEAU-SALLE F, BORRELLY J, MARTINET Y, MARTINET N. Tumor stroma formation in lung cancer. In: Clinical and biological lung cancer prevention. Y Martinet, FR Hirsch, N Martinet, JM Vignaud. Birkhäuser Verlag, Basel, 1998,75-93.
15. SCHEID P, VIGNAUD JM, MARTINET N, MARTINET Y. Perspectives de chimioprévention du cancer bronchique. *Rev Pneumol* 2001, 57:193-99.
16. CUTTITA F, CARNEY DN, MULSHINE J, MOODY TW, FEDORKO J, FISCHLER A, MINNA JD. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 1985, 316:823-6.
17. WEIBERG RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995, 81:323-30.

18. SCHAUER IE, SIRIWARDANA S, LANGAN TA, SCLAFANI RA. Cyclin D1 overexpression vs. retinoblastoma inactivation: implications for growth control evasion in non-small cell and small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:7827-31.
19. OKAMOTO A, DEMETRICK DJ, SPILLARE EA, HAGIWARA K, HUSSAIN SP, BENNET WP, FORRESTER K, GERWIN B, SERRANO M, BEACH DH. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:11045-9.
20. GAZZERI S, GOUYER V, VOUR'CH C, BRAMBILLA C, BRAMBILLA E. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 1998, 16:497-504.
21. ROM WN, HAY Jg, LEE TC, JIANG Y, TCHOU6WONG KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am j Respir Crit Care Med* 2000, 161:1355-67.
22. YOKOTA J, AKIYAMA T, FUNG YK, BENEDICT WF, NAMBA Y, HANAOKA M, WADA M, TERASAKI T, SHIMOSATO Y, SUGIMURA T. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988, 3:471-5.
23. HOROWITZ JM, PARK SH, BOGENMANN E, CHENG JC, YANDELL DW, KAYE FJ, MINNA JD, DRYJA TP, WEINBERG RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87:2775-9.
24. GOUZER V, GAZZERI S, BRAMBILLA E, BOLON I, MORO D, PERRON P, BENABID AL, BRAMBILLA C. Loss of heterozygosity at the RB locus correlates with loss of RB protein in primary malignant neuro-endocrine lung carcinomas. *Int J Cancer* 1994, 58:818-24.
25. XU HJ, SUMEGI J, HU SX, BANERJEE A, UZVOLGYI E, KLEIN G, BENEDICT WF. Intraocular tumor formation of RB reconstituted retinoblastoma cells. *Cancer Res* 1991, 51:4481-5.
26. BRAMBILLA E, MORO D, GAZZERI S, BRAMBILLA C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 1999, 188:351-60.
27. LANE DP, CRAWFORD LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979, 278:261-3.
28. LANE DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358:15-6.
29. FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989, 57:1083-93.
30. TAKAHASHI T, NAU MM, CHIBA I, BIRRER MJ, ROSENBERG RK, VINOCOUR M, LEWITT M, PASS H, GAZDAR AF, MINNA JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989, 246:491-4.
31. ZAMBETTI GP, LEVINE AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* 1993,7:855-65.
32. LI FP, FRAUMENI JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969, 71:747-52.
33. MALKIN D, LI FP, STRONG LC, FRAUMENI JF JR, NELSON CE, KIM DH, KASSEL J, GRYKA MA, BISCHOFF FZ, TAINSKY MA. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990, 250:1233-8.

34. WESTON A, WILLEY JC, MODALI R, SUGIMURA H, MCDOWELL EM, RESAU J, LIGHT B, HAUGEN A, MANN DL, TRUMP BF. Differential DNA sequence deletions from chromosomes 3, 11, 13, and 17 in squamous-cell carcinoma, large-cell carcinoma, and adenocarcinoma of the human lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:5099-103.
35. FUGIWARA T, GRIMM EA, MUKHOPADHYAY T, CAI DW, OWEN-SCHAUB LB, ROTH JA. A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1993, 53:4129-33.
36. HARPER JW, ADAMI GR, WEI N, KEYOMARSI K, ELLEDGE SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993, 75:805-16.
37. EL-DEIRY WS, TOKINO T, VELCULESCU VE, LEVY DB, PARSONS R, TRENT JM, LIN D, MERCER WE, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993, 75:817-25.
38. GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994, 54:4855-78.
39. WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994, 369:574-8.
40. WU X, BAYLE JH, OLSON D, LEVINE AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993, 7:1126-32.
41. XIAO ZX, CHEN J, LEVINE AJ, MODJTAHEDI N, XING J, SELLERS WR, LIVINGSTONE DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995, 375:694-8.
42. BATES S, PHILLIPS AC, CLARK PA, STOTT F, PETERS G, LUDWIG RL, VOUSDEN KH. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 1998, 395:124-5.
43. POMERANTZ J, SCHREIBER-AGUS N, LIEGEOIS NJ, SILVERMAN A, ALLAND L, CHIN L, POTES J, CHEN K, ORLOW I, LEE HW, CORDON-CARDO C, DePINHO RA. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998, 92:713-23.
44. CARRIER F, SMITH ML, BAE I, KILPATRICK KE, LANSING TJ, CHEN CY, ENGELSTEIN M, FRIEND SH, HENNER WD, GILBER TM. Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J Biol Chem* 1994, 269:32672-7.
45. SMITH ML, CHEN IT, ZHAN Q, BAE I, CHEN CY, GILMER TM, KASTAN MB, O'CONNOR PM, FORNACE AJ. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994, 266:1376-80.
46. AZAM N, VAIRAPANDI M, ZHANG W, HOFFMAN B, LIEBERMANN DA. Interaction of CR6 (GADD45 γ) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem* 2001, 276:2766-74.
47. EVAN GI, WYLLIE AH, GILBERT CS, LITTLEWOOD TD, LAND H, BROOKS M, WATERS CM, PENN LZ, HANCOCK DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992, 69:119-28.

48. STEELS E, PAESMANS M, BERGHMANS T, BRANLE F, LEMAITRE F, MASCAUX C, MEERTAP, VALLOT F, LAFITTE JJ, SCULIER JP. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J* 2001, 18:705-19.
49. GORGOLIS VG, RASSIDAKIS GZ, KARAMERIS AM, PAPASTAMATIOU H, TRIGIDOU R, VESLEMES M, RASSIDAKIS AN, KITTAS C. Immunohistochemical and molecular evaluation of the mdm-2 gene product in bronchogenic carcinoma. *Mod Pathol* 1996, 9:544-54.
50. GAZZERI S, DELLA VALLE V, CHAUSSADE L, BRAMBILLA C, LARSEN CJ, BRAMBILLA E. The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1998, 58:3926-31.
51. BRAMBILLA E, NEGOESCU A, GAZZERI S, LANTUEJOUL S, MORO D, BRAMBILLA C, COLL JL. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 1996, 149:1941-52.
52. SUZUKI H, TAKAHASHI T, KUROISHI T, SUYAMA M, ARIYOSHI Y, TAKAHASHI T, UEDA R. p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: association between mutations and smoking. *Cancer Res* 1992, 52:734-6.
53. DENISSENKO MF, PAO A, TANG M, PFEIFER GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996, 274:430-2.
54. SMITH LE, DENISSENKO MF, BENNETT WP, LI H, AMIN S, TANG M, PFEIFER GP. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:803-11
55. BREY J, SOLARY E, EYMIN B. p73, nouveau médiateur de l'apoptose. *Medecine/Sciences* 2001, 17 :647-9.
56. CERNY T, BARNES DM, HASLETON P, BARBER PV, HEALY K, GULLICK W, THATCHER N. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human lung tumours. *Br J Cancer* 1986, 54:265-9
57. RUSCH V, KLIMSTRA D, VENKATRAMAN E, PISTER PW, LANGENFELD J, DMITROVSKY E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 1997, 3:515-22.
58. SCHECHTER AL, HUNG MC, VAIDYANATHAN L, WEINBERG RA, YANG-FENG TL, FRANCKE U, ULLRICH A, COUSSENS L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985, 229:976-78.
59. LIU C, TSAO MS. In vitro and in vivo expressions of transforming growth factor-alpha and tyrosine kinase receptors in human non-small-cell lung carcinomas. *Am J Pathol* 1993, 42:1155-62.
60. YOKOTA J, YAMAMOTO T, TOYOSHIMA K, TERADA M, SUGIMURA T, BATTIFORA H, CLINE MJ. Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. *Lancet* 1986, 1:765-7.
61. WEINER DB, NORDBERG J, ROBINSON R, NOWELL PC, GAZDAR A, GREENE MI, WILLIAMS WV, COHEN JA, KERN JA. Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 1990, 50:421-5.

62. PRINS J, De VRIES EG, MULDER NH. The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res* 1993, 13:1373-85.
63. SHIRAIISHI M, NOGUCHI M, SHIMOSATO Y, SEKIYA T. Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas. *Cancer Res* 1989, 49:6474-9.
64. BERGH JC. Gene amplification in human lung cancer. The myc family genes and other protooncogenes and growth factor genes. *Am Rev Respir Dis* 1990, 142:S20-6.
65. GAZZERI S, BRAMBILLA E, CARON de FROMENTEL, GOUYER V, MORO D, PERRON P, BERGER F, BRAMBILLA C. p53 genetic abnormalities and myc activation in human lung carcinoma. *Int J Cancer* 1994, 58:24-32.
66. BARBACID M. Ras genes. *An Rev Biochem* 1987, 56:779-827.
67. HALL A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 1990, 24:635-40.
68. BOURNE HR, SANDERS DA, McCORMICK F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991, 349:117-27.
69. MIYAMOTO H, HARADA M, ISOBE H, AKITA HD, HANEDA H, YAMAGUCHI E, KUZUMAKI Y. Prognostic value of nuclear DNA content and expression of the ras oncogene product in lung cancer. *Cancer Res* 1991, 51:6346-50.
70. HARADA M, DOSAKA-AKITA H, MIYAMOTO H, KUZUMAKI N, KAWAKAMI Y. Prognostic significance of the expression of ras oncogene product in non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992, 69:72-7.
71. RODENHUIS S, SLEBOS RJ, BOOT AJ, EVERS SG, MOOI WJ, WAGENAAR SS, VanBODEGOM PC, BOS JL. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 1988, 48:5738-41.
72. KOBAYASHI T, TSUDA H, NOGUSHI M, HIROHASHI S, SHIMOSATO Y, GOYA T, HAYATA Y. Association of point mutation in c-Ki-ras oncogene in lung adenocarcinoma with particular reference to cytologic subtypes. *Cancer* 1990, 66:289-94.
73. MITSUDOMI T, VIALLET J, MULSHINE JL, LINNOILA RI, MINNA JD, GAZDAR AF. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 1991, 6:1353-62.
74. RODENHUIS S, SLEBOS RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992, 52:2665s-2669s.
75. SLEBOS RJ, HRUBAN RH, DALESIO O, MOOI WJ, OFFERHAUS GJ, RODENHUIS S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 1991, 83:1024-7.
76. YOU M, CANDRIAN U, MARONPOT RR, STONER GD, ANDERSON MW. Activation of the Ki-ras protooncogene in spontaneously occurring and chemically induced lung tumors of the strain A mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:3070-4.
77. JUNIEN C. L'empreinte parentale : de la guerre des sexes à la solidarité entre générations. *Medecine/ Sciences* 2000, 16:336-44.

78. OKANO M, BELL DW, HABER DA, LI E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999, 99: 247-57.
79. HSIEH CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 1999, 19:8211-8.
80. BHATTACHARYA SK, RAMCHANDANI S, CERVONI N, SZYF M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999, 397:579-83.
81. BOURC'HIS D, JEANPIERRE M, VIEGRAS-PEQUIGNOT E. Méthylation et maladies humaines : le cas du syndrome ICF. *Medecine/Sciences* 2000, 16:105-7.
82. MORISON IM, REEVE AE. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum Mol Genet* 1998, 7:1599-609.
83. WOLFF GL, KODELL RL, MOORE SR, COONEY CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J* 1998, 12:949-57.
84. CHEN JX, ZHENG Y, WEST M, TANG MS. Carcinogens preferentially bind at methylated CpG in the p53 mutational hot spots. *Cancer Res* 1998, 58:2070-5.
85. LAIRD PW, JAENISCH R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 1994, 3:1487-95.
86. POGRIBNY IP, BASNAKIAN AG, MILLER BJ, LOPATINA NG, POIRIER LA, JAMES SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res* 1995, 55:1894-901.
87. WAINFAN E, POIRIER LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992, 52:2071s-2077s.
88. HERMAN JG, LATIF F, WENG Y, LERMAN MI, ZBAR B, LIU S, SAMID D, DUAN DS, GNARRA JR, LINEHAN WM. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:9700-4.
89. DE PAULSEN N, GROULX I, LEE S. Inactivation du gene VHL (Von Hippel-Lindau) et tumorigenèse: un rôle essentiel du TGF α . *Medecine/Sciences* 2001, 17:801-2.
90. DE MARZO AM, MARCHI VL, YANG ES, VEERASWAMY R, LIN X, NELSON WG. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1999, 59:3855-60.
91. HERMAN JG, MERLO A, MAO L, LAPIDUS RG, ISSA JP, DAVIDSON NE, SIDRANSKY D, BAYLIN SB. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995, 55:4525-30.
92. COTE S, SINNETT D, MOMPALER RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998, 9:743-50.
93. OKA H, SHIOZAKI H, KOBAYASHI K, INOUE M, TAHARA H, KOBAYASHI T, TAKATSUKA Y, MATSUYOSHI N, HIRANO S, TAKEICHI M. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993, 53:1696-701.

94. OTTAVIANO YL, ISSA JP, PARL FF, SMITH HS, BAYLIN SB, DAVIDSON NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994, 54:2552-5.
95. HUSCHTSCHA LI, NOBLE JR, NEUMANN AA, MOY EL, BARRY P, MELKI JR, CLARK SJ, REDDEL RR. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1998, 58:3508-12.
96. DOBROVIC A, SIMPFENDORFER D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997, 57:3347-50.
97. BOVENZI V, LE NL, COTE S, SINNETT D, MOMPARDLER LF, MOMPARDLER RL. DNA methylation of retinoic acid receptor beta in breast cancer and possible therapeutic role of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Anticancer Drugs* 1999, 10:471-6.
98. ARAPSHIAN A, KUPPUMBATTI YS, MIRA-Y-LOPEZ R. Methylation of conserved CpG sites neighboring the beta retinoic acid response element may mediate retinoic acid receptor beta gene silencing in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene* 2000, 19:4066-70.
99. WIDSCHWENDTER M, BERGER J, HERMANN M, MULLER HM, AMBERGER A, ZESCHNIGK M, WIDSCHWENDTER A, ABENDSTEIN B, ZEIMET AG, DAXENBICHLER G, MARTH C. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:826-32.
100. PATEL AC, ANNA CH, FOLEY JF, STOCKTON PS, TYSON FL, BARRETT JC, DEVEREUX TR. Hypermethylation of the p16 (Ink4a) promoter in B6C3F1 mouse primary lung adenocarcinomas and mouse lung cell lines. *Carcinogenesis* 2000, 21:1691-700.
101. SANCHEZ-CESPEDES M, DECKER PA, DOFFEK KM, ESTELLER M, WESTRA WH, ALAWI EA, HERMAN JG, DEMEURE MJ, SIDRANSKY D, AHRENDT SA. Increased loss of chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers. *Cancer Res* 2001, 61:2092-6.
102. PICARD E, SEGUIN C, MONHOVEN N, ROCHETTE-EGLY C, SIAT J, BORRELLY J, MARTINET Y, MARTINET N, VIGNAUD JM. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 16;91(12):1059-66.
103. VIRMANI AK, RATHI A, ZOCHBAUER-MULLER S, SACCHI N, FUKUYAMA Y, BRYANT D, MAITRA A, HEDA S, FONG KM, THUNNISSEN F, MINNA JD, GAZDAR AF. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:1303-7.
104. SOZZI G. Molecular biology of lung cancer. *Eur J Cancer* 2001, 37 (Suppl 7):S63-73.
105. KERSTING M, FRIEDL C, KRAUS A, BEHN M, PANKOW W, SCHUERMAN M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* 2000, 18:3221-9.
106. PALMISANO WA, DIVINE KK, SACCOMANNO G, GILLILAND FD, BAYLIN SB, HERMAN JG, BELINSKY SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000, 60:5954-8.

107. JACOSON DR. K-ras mutations as molecular markers of lung cancer. In: Clinical and biological lung cancer prevention. Y Martinet, FR Hirsch, N Martinet, JM Vignaud. Birkhäuser Verlag, Basel, 1998,169-83.
108. BENNETT WP, COLBY TV, TRAVIS WD, BORKOWSKI A, JONES RT, LANE DP, METCALF RA, SAMET JM, TAKESHIMA Y, GU JR. p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res* 1993, 53:4817-22.
109. LONARDO F, RUSCH V, LANGENFELD J, DMITROVSKY E, KLIMSTRA DS. Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 1999, 59:2470-6.
110. SOZZI G, MIOZZO M, TAGLIABUE E, CALDERONE C, LOMBARDI L, PILOTTI S, PASTORINO U, PIEROTTI MA, DELLA PORTA G. Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. *Cancer Res* 1991, 51:400-4.
111. BROERS JL, VIALLET J, JENSEN SM, PASS H, TRAVIS WD, MINNA JD, LINNOILA RI. Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993, 9:33-43.
112. WESTRA WH, BAAS IO, HRUBAN RH, ASKIN FB, WILSON K, OFFERHAUS GJ, SLEBOS RJ. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Res* 1996, 56:2224-8.
113. KEOHAVONG P, MADY HH, GAO WM, SIEGFRIED JM, LUKETICH JD, MELHEM MF. Topographic analysis of K-ras mutations in histologically normal lung tissues and tumours of lung cancer patients. *Br J Cancer* 2001, 85:235-41.
114. SIPRASHVILI Z, SOZZI G, BARNES LD, MCCUE P, ROBINSON AK, ERYOMIN V, SARD L, TAGLIABUE E, GRECO A, FUSETTI L, SCHWARTZ G, PIEROTTI MA, CROCE CM, HUEBNER K. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:13771-6.
115. JI L, FANG B, YEN N, FONG K, MINNA JD, ROTH JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999, 59:3333-9.
116. SARD L, ACCORNERO P, TORNIELLI S, DELIA D, BUNONE G, CAMPIGLIO M, COLOMBO MP, GRAMEGNA M, CROCE CM, PIEROTTI MA, SOZZI G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:8489-92.
117. SOZZI G, SARD L, DE GREGORIO L, MARCHETTI A, MUSSO K, BUTTITTA F, TORNIELLI S, PELLEGRINI S, VERONESE ML, MANENTI G, INCARBONE M, CHELLA A, ANGELETTI CA, PASTORINO U, HUEBNER K, BEVILAQUA G, PILOTTI S, CROCE CM, PIEROTTI MA. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res* 1997, 57:2121-3.
118. SOZZI G, PASTORINO U, MOIRAGHI L, TAGLIABUE E, PEZZELLA F, GHIRELLI C, TORNIELLI S, SARD L, HUEBNER K, PIEROTTI MA, CROCE CM, PILOTTI S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res* 1998, 58:5032-7.
119. SANCHEZ-CESPEDES M, DECKER PA, DOFFEK KM, ESTELLER M, WESTRA WH, ALAWI EA, HERMAN JG, DEMEURE MJ, SIDRANSKY D, AHRENDT SA. Increased loss of

chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers. *Cancer Res* 2001, 61:2092-6.

120. MAO L, HRUBAN RH, BOYLE JO, TOCKMAN M, SIDRANSKY D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1994, 54:1634-7.

121. SUNDARESAN V, HEPPELL-PARTON A, COLEMAN N, MIOZZO M, SOZZI G, BALL R, CARY N, HASLETON P, FOWLER W, RABBITS P. Somatic genetic changes in lung cancer and precancerous lesions. *Ann Oncol* 1995, 6(Suppl 1):27-31.

122. WISTUBA II, LAM S, BEHRENS C, VIRMANI AK, FONG KM, LERICHE J, SAMET JM, SRIVASTAVA S, MINNA JD, GAZDAR AF. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:1366-73.

123. MAO L, LEE JS, KURIE JM, FAN YH, LIPPMAN SM, LEE JJ, RO JY, BROXSON A, YU R, MORICE RC, KEMP BL, KHURI FR, WALSH GL, HITTELMAN WN, HONG WK. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89:857-62.

124. BRAMBILLA E, GAZZERI S, LANTUEJOUL S, COLL JL, MORO D, NEGOESCU A, BRAMBILLA C. p53 mutant immunophenotype and deregulation of p53 transcription pathway (Bcl2, Bax, and Waf1) in precursor bronchial lesions of lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998, 4:1609-18.

125. MAURO LJ, FOSTER DN. Regulators of telomerase activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 26:521-4.

126. MOUNTAIN CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997, 111:1710-7.

127. PICCIRILLO JF, FEINSTEIN AR. Clinical symptoms and comorbidity: significance for the prognostic classification of cancer. *Cancer* 1996, 77:834-42.

128. STRAUSS GM. Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997, 11:409-34.

129. PUJOL JL, GRENIER J, BOHER JM, QUANTIN X, PARRAT E, DAURES JP. Nouvelles données sur les marqueurs sériques des cancers bronchiques. *Rev Mal Respir* 2000, 17:389-98.

130. REINMUTH N, BRANDT B, KUNZE WP, JUNKER K, THOMAS M, ACHATZY R, SCHELD HH, SEMIK M. Ploidy, expression of erbB1, erbB2, P53 and amplification of erbB1, erbB2 and erbB3 in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J* 2000, 16:991-6.

131. QUOIX E, MOREAU L. Les variables déterminantes du pronostic des cancers bronchiques. *Rev Mal Respir* 2000, 17:399-410

132. MOUNTAIN CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986, 89:225S-233S.

133. KRATZKE RA, GREATENS TM, RUBINS JB, MADDAUS MA, NIEWOEHNER DE, NIEHANS GA, GERADTS J. Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res* 1996, 56:3415-20.

134. KAWABUCHI B, MORIYAMA S, HIRONAKA M, FUJII T, KOIKE M, MORIYAMA H, NISHIMURAY, MIZUNO S, FUKAYAMA M. p16 inactivation in small-sized lung adenocarcinoma: its association with poor prognosis. *Int J Cancer* 1999, 84:49-53.

135. GESSNER C, LIEBERS U, KUHN H, STIEHL P, WITT C, SCHAUER J, WOLFF G. BAX and p16INK4A are independent positive prognostic markers for advanced tumour stage of non small cell lung cancer. *Eur Respir J* 2002, 19:134-40.
136. JIN M, INOUE S, UMEMURA T, MORIYA J, ARAKAWA M, NAGASHIMA K, KATO H. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer* 2001, 34:207-18.
137. KEUM JS, KONG G, YANG SC, SHIN DH, PARK SS, LEE JH, LEE JD. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1999, 81:127-32.
138. FUKUSE T, HIRATA T, NAIKI H, HITOMI S, WADA H. Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000, 60:242-4.
139. ANTON RC, COFFEY DM, GONDO MM, STEPHENSON MA, BROWN RW, CAGLE PT. The expression of cyclins D1 and E in predicting short-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2000, 13:1167-72.
140. HAYASHI H, OGAWA N, ISHIWA N, YAZAWA T, INAYAMA Y, ITO T, KITAMURA H. High cyclin E and low p27/Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2001, 34:59-65.
141. MITSUDOMI T, HAMAJIMA N, OGAWA M, TAKAHASHI T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000, 6:4055-63.
142. KAWASAKI M, NAKANISHI Y, KUWANO K, YATSUNAMI J, TAKAYAMA K, HARA N. The utility of p53 immunostaining of transbronchial biopsy specimens of lung cancer: p53 overexpression predicts poor prognosis and chemoresistance in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997, 3:1195-200.
143. RODRIGUEZ-SALAS N, PALACIOS J, MORENO G, DE CASTRO J, GONZALEZ-BARON M, GAMALLO C. Correlation of p53 oncoprotein expression with chemotherapy response in small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2001, 34:67-74.
144. GHOSH M, CROCKER J, MORRIS AG. CD40 and Bcl2 expression in squamous cell carcinoma of the lung: correlation with apoptosis, survival, and other clinicopathological factors. *J Pathol* 1999, 189:363-7.
145. LAUDANSKI J, CHYCZEWSKI L, NIKLINSKA WE, KRETOWSKA M, FURMAN M, SAWICKI B, NIKLINSKI J. Expression of bcl-2 protein in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathology and patient survival. *Neoplasma* 1999, 46:25-30.
146. KRAJEWSKI S, BLOMQVIST C, FRANSSILA K, KRAJEWSKA M, WASENIUS VM, NISKANEN E, NORDLING S, REED JC. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995, 55:4471-8.
147. MARCHETTI A, DOGLIONI C, BARBARESCHI M, BUTTITTA F, PELLEGRINI S, GAETA P, LA ROCCA R, MERLO G, CHELLA A, ANGELETTI CA, DALLA PALMA P, BEVILACQUA G. Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1998, 75:187-92.

148. RODENHUIS S, VAN DE WETERING ML, MOOI WJ, EVERS SG, VAN ZANDWIJK N, BOS JL. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1987, 317:929-35.
149. SLEBOS RJ, KIBBELAAR RE, DALESIO O, KOOISTRA A, STAM J, MEIJER CJ, WAGENAAR SS, VANDERSCHUEREN RG, VAN ZANDWIJK N, MOOI WJ. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990, 323:561-5.
150. ROSELL R, MONZO M, PIFARRE A, ARIZA A, SANCHEZ JJ, MORENO I, MAUREL J, LOPEZ MP, ABAD A, DE ANTA JM. Molecular staging of non-small cell lung cancer according to K-ras genotypes. *Clin Cancer Res* 1996, 2:1083-6.
151. GRAZIANO SL, GAMBLE GP, NEWMAN NB, ABBOTT LZ, ROONEY M, MOOKHERJEE S, LAMB ML, KOHMAN LJ, POIESZ BJ. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17:668-75.
152. HUNCHAREK M, MUSCAT J, GESCHWIND JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis* 1999, 20:1507-10.
153. KERN JA, SLEBOS RJ, TOP B, RODENHUIS S, LAGER D, ROBINSON RA, WEINER D, SCHWARTZ DA. C-erbB-2 expression and codon 12 K-ras mutations both predict shortened survival for patients with pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest* 1994, 93:516-20.
154. SCHNEIDER PM, PRAEUER HW, STOELTZING O, BOEHM J, MANNING J, METZGER R, FINK U, WEGERER S, HOELSCHER AH, ROTH JA. Multiple molecular marker testing (p53, C-Ki-ras, c-erbB-2) improves estimation of prognosis in potentially curative resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000, 83:473-9.
155. NELSON HH, CHRISTIANI DC, MARK EJ, WIENCKE JK, WAIN JC, KELSEY KT. Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:2032-8.
156. SUGIO K, FUKUYAMA Y, SAKADA T, NISHIOKA K, YAMAZAKI K, USHIJIMA C, TSUKAMOTOS, ISHIDA T, SUGIMACHI K. Second primary cancers after resection of lung adenocarcinoma with ras gene mutation. *Anticancer Res* 1998, 18:3395-8.
157. MATTERN J, KOOMAGI R, VOLM M. Characteristics of long-term survivors of untreated lung cancer. *Lung Cancer* 2002, 36:277-82.
158. NIKLINSKA W, BURZYKOWSKI T, CHYCZEWSKI L, NIKLINSKI J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC): association with p53 gene mutation and prognosis. *Lung Cancer* 2001, 34 (Suppl 2):S59-64.
159. LIAO M, WANG H, LIN Z, FENG J, ZHU D. Vascular endothelial growth factor and other biological predictors related to the postoperative survival rate on non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001, 33:125-32.
160. BRATTSTROM D, BERGQVIST M, HESSELIUS P, LARSSON A, LAMBERG K, WERNLUND J, BRODIN O, WAGENIUS G. Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2002, 37:57-63.
161. SASAKI H, TANAHASHI M, YUKIUE H, MOIRIYAMA S, KOBAYASHI Y, NAKASHIMA Y, KAJI M, KIRIYAMA M, FUKAI I, YAMAKAWA Y, FUJII Y. Decreased peroxisome

proliferator-activated receptor gamma gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2002, 36:71-6.

162. THEOCHARIS S, KANELLI H, POLITI E, MARGELI A, KARKANDARIS C, PHILIPPIDES T, KOUTSELINIS A. Expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma in non-small cell lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Lung Cancer* 2002, 36:249-55.

163. LEE JS, RO JY, SAHIN AA, HONG WK, BROWN BW, MOUNTAIN CF, HITTELMAN WN. Expression of blood-group antigen A--a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1991, 324:1084-90.

164. MATSUMOTO H, MURAMATSU H, SHIMOTAKAHARA T, YANAGI M, NISHIJIMA H, MITANI N, BABA K, MURAMATSU T, SHIMAZU H. Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas. *Cancer* 1993, 72:75-81.

165. TOGAYACHI A, KUDO T, IKEHARA Y, IWASAKI H, NISHIHARA S, ANDOH T, HIGASHIYAMAM, KODAMA K, NAKAMORI S, NARIMATSU H. Up-regulation of Lewis enzyme (Fuc-TIII) and plasma-type alpha1,3fucosyltransferase (Fuc-TVI) expression determines the augmented expression of sialyl Lewis x antigen in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 1999, 83:70-9.

166. BENDICH A, OLSON JA. Biological actions of carotenoids. *FASEB J* 1989, 3:1927-32.

167. MANGELSDORF DJ, THUMMEL C, BEATO M, HERRLICH P, SCHUTZ G, UMESONO K, BLUMBERG B, KASTNER P, MARK M, CHAMBON P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995, 83:835-9.

168. CHAMBON P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996, 10:940-54.

169. TANEJA R, ROCHETTE-EGLY C, PLASSAT JL, PENNA L, GAUB MP, CHAMBON P. Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *EMBO J* 1997, 16:6452-65.

170. ROCHETTE-EGLY C, GAUB MP, LUTZ Y, ALI S, SCHEUER I, CHAMBON P. Retinoic acid receptor-beta: immunodetection and phosphorylation on tyrosine residues. *Mol Endocrinol* 1992, 6:2197-209.

171. BOURGUET W, RUFF M, CHAMBON P, GRONEMEYER H, MORAS D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*. 1995, 375:377-82.

172. RENAUD JP, ROCHEL N, RUFF M, VIVAT V, CHAMBON P, GRONEMEYER H, MORAS D. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 1995, 378:681-9.

173. GIGUERE V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 1994, 15:61-79.

174. MINUCCI S, OZATO K. Retinoid receptors in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1996, 6:567-74.

175. WENDLING O, CHAMBON P, MARK M. Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:547-51.

176. MCDOWELL EM, KEENAN KP, HUANG M. Restoration of mucociliary tracheal epithelium following deprivation of vitamin A. A quantitative morphologic study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984, 45:221-40.
177. CARDOSO WV, WILLIAMS MC, MITSIALIS SA, JOYCE-BRADY M, RISHI AK, BRODY JS. Retinoic acid induces changes in the pattern of airway branching and alters epithelial cell differentiation in the developing lung in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 12:464-76.
178. MILLER WH. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 1998, 83:1471-82.
179. SENIOR K. Vitamin A and its impact on human medicine. *Lancet*. 2001, 358:1072.
180. BOYLE JO, LANGENFELD J, LONARDO F, SEKULA D, RECZEK P, RUSCH V, DAWSON MI, DMITROVSKY E. Cyclin D1 proteolysis: a retinoid chemoprevention signal in normal, immortalized, and transformed human bronchial epithelial cells. *J Natl Cancer Inst*. 1999, 91:373-9.
181. LANGENFELD J, LONARDO F, KIYOKAWA H, PASSALARIS T, AHN MJ, RUSCH V, DMITROVSKY E. Inhibited transformation of immortalized human bronchial epithelial cells by retinoic acid is linked to cyclin E down-regulation. *Oncogene* 1996, 13:1983-90.
182. NADERI S, BLOMHOFF HK. Mad1 expression in the absence of differentiation: effect of cAMP on the B-lymphoid cell line Reh. *J Cell Physiol* 1999, 178:76-84.
183. ADACHI H, PRESTON G, HARVAT B, DAWSON MI, JETTEN AM. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by the retinoid AHPN in human lung carcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 18:323-33.
184. LIU M, IAVARONE A, FREEDMAN LP. Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem* 1996, 271:31723-8.
185. WAN H, ORIDATE N, LOTAN D, HONG WK, LOTAN R. Overexpression of retinoic acid receptor beta in head and neck squamous cell carcinoma cells increases their sensitivity to retinoid-induced suppression of squamous differentiation by retinoids. *Cancer Res* 1999 59:3518-26.
186. SCHULE R, RANGARAJAN P, YANG N, KLIEWER S, RANSONE LJ, BOLADO J, VERMA IM, EVANS RM. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88:6092-6.
187. SAATCIOGLU F, CLARET FX, KARIN M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* 1994, 5:347-59.
188. SHIN DM, XU XC, LIPPMAN SM, LEE JJ, LEE JS, BATSAKIS JG, RO JY, MARTIN JW, HITTELMAN WN, LOTAN R, HONG WK. Accumulation of p53 protein and retinoic acid receptor beta in retinoid chemoprevention. *Clin Cancer Res* 1997, 3:875-80.
189. MANGIAROTTI R, DANOVA M, ALBERICI R, PELLICCIARI C. All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br J Cancer* 1998, 77:186-91.
190. XU XC, LIU X, TAHARA E, LIPPMAN SM, LOTAN R. Expression and up-regulation of retinoic acid receptor-beta is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res* 1999, 59:2477-83.

191. SPANJAARD RA, IKEDA M, LEE PJ, CHARPENTIER B, CHIN WW, EBERLEIN TJ. Specific activation of retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors reveals a unique role for RAR γ in induction of differentiation and apoptosis of S91 melanoma cells. *J Biol Chem* 1997, 272:18990-9.
192. ZHANG LX, MILLS KJ, DAWSON MI, COLLINS SJ, JETTEN AM. Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J Biol Chem* 1995, 270:6022-9.
193. MOON RC, METHA RG, RAO KJ. Retinoids and cancer in experimental animals. In: the retinoids. SPORN MB, ROBERTS AB, GOODMAN DS. Raven Press, New York, 1994,573-95.
194. PICARD E, SEGUIN C, MONHOVEN N, ROCHETTE-EGLY C, SIAT J, BORRELLY J, MARTINET Y, MARTINET N, VIGNAUD JM. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:1059-66.
195. SUN SY, LI W, YUE P, LIPPMAN SM, HONG WK, LOTAN R. Mediation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in human cancer cells by different mechanisms. *Cancer Res* 1999, 59:2493-8.
196. MARTINET N, ALLA F, FARRE G, LABIB T, DROUOT H, VIDILI R, PICARD E, GAUBE MP, LE FAOU D, SIAT J, BORELLY J, VERMYLEN P, BAZARBACHI T, VIGNAUD JM, MARTINET Y. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor alterations in lung cancer precursor lesions. *Cancer Res* 2000, 60:2869-75.
197. LOTAN R, XU XC, LIPPMAN SM, RO JY, LEE JS, LEE JJ, HONG WK. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med* 1995, 332:1405-10.
198. XU XC, LEE JS, LEE JJ, MORICE RC, LIU X, LIPPMAN SM, HONG WK, LOTAN R. Nuclear retinoid acid receptor beta in bronchial epithelium of smokers before and during chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:1317-21.
199. HONG WK, ENDICOTT J, ITRI LM, DOOS W, BATSAKIS JG, BELL R, FOFONOFF S, BYERS R, ATKINSON EN, VAUGHAN C. 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia. *N Engl J Med* 1986, 315:1501-5.
200. ARNOLD AM, BROWMAN GP, LEVINE MN, D'SOUZA T, JOHNSTONE B, SKINGLEY P, TURNER-SMITH L, CAYCO R, BOOKER L, NEWHOUSE M. The effect of the synthetic retinoid etretinate on sputum cytology: results from a randomised trial. *Br J Cancer* 1992, 65:737-43.
201. LEE JS, LIPPMAN SM, BENNER SE, LEE JJ, RO JY, LUKEMAN JM, MORICE RC, PETERS EJ, PANG AC, FRITSCHER HA JR. Randomized placebo-controlled trial of isotretinoin in chemoprevention of bronchial squamous metaplasia. *J Clin Oncol* 1994, 12:937-45.
202. PASTORINO U, ANDREOLA S, TAGLIABUE E, PEZZELLA F, INCARBONE M, SOZZI G, BUYSE M, MENARD S, PIEROTTI M, RILKE F. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997, 15:2858-65.
203. BOLLA M, LEFUR R, TON VAN J, DOMENGE C, BADET JM, KOSKAS Y, LAPLANCHE A. Prevention of second primary tumours with etretinate in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Results of a multicentric double-blind randomised study. *Eur J Cancer* 1994, 30A:767-72.

204. VAN ZANDWIJK N, DALESIO O, PASTORINO U, DE VRIES N, VAN TINTEREN H. EUROSCAN, a randomized trial of vitamin A and N-acetylcysteine in patients with head and neck cancer or lung cancer. For the European Organization for Research and Treatment of Cancer Head and Neck and Lung Cancer Cooperative Groups. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:977-86.
205. THE ALPHA-TOCOPHEROL, BETA CAROTENE CANCER PREVENTION STUDY GROUP. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994, 330:1029-35.
206. OMENN GS, GOODMAN GE, THORNQUIST MD, BALMES J, CULLEN MR, GLASS A, KEOGH JP, MEYSKENS FL, VALANIS B, WILLIAMS JH, BARNHART S, HAMMAR S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996, 334:1150-5.
207. HENNEKENS CH, BURING JE, MANSON JE, STAMPFER M, ROSNER B, COOK NR, BELANGER C, LAMOTTE F, GAZIANO JM, RIDKER PM, WILLETT W, PETO R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996, 334:1145-9.
208. WOLF G. The effect of low and high doses of beta-carotene and exposure to cigarette smoke on the lungs of ferrets. *Nutr Rev* 2002, 60:88-90.
209. WANG XD, LIU C, BRONSON RT, SMITH DE, KRINSKY NI, RUSSELL M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91:60-6.
210. OMENN GS. Chemoprevention of lung cancer is proving difficult and frustrating, requiring new approaches. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:959-60.
211. XU XC, LIU X, TAHARA E, LIPPMAN SM, LOTAN R. Expression and up-regulation of retinoic acid receptor-beta is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res* 1999, 59:2477-83.
212. HOULE B, ROCHETTE-EGLY C, BRADLEY WE. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:985-9.
213. HERMAN JG, GRAFF JR, MYOHANEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:9821-6.
214. FRY WA, PHILLIPS JL, MENCK HR. Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer* 1999, 86:1867-76.
215. FLEHINGER BJ, KIMMEL M, MELAMED MR. The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer. Implications for screening. *Chest* 1992, 101:1013-8.
216. ADEBONOJO SA, BOWSER AN, MORITZ DM, CORCORAN PC. Impact of revised stage classification of lung cancer on survival: a military experience. *Chest* 1999, 115:1507-13.
217. LOPEZ-ENCUENTRA A, BULZEBRUCK H, FEINSTEIN AR, MOTTA G, MOUNTAIN CF, NARUKE T, SANCHEZ JM, TSUCHIYA R, WITTEKIND C. Tumor staging and classification in lung cancer. Summary of the international symposium. Madrid, Spain, 3-4 December 1999. *Lung Cancer* 2000, 29:79-83.

218. KAWANO R, HATA E, IKEDA S, SAKAGUCHI H. Micrometastasis to lymph nodes in stage I left lung cancer patients. *Ann Thorac Surg* 2002, 73:1558-62.
219. DEPIERRE A, MILLERON B, MORO-SIBILOT D, CHEVRET S, QUOIX E, LEBEAU B, BRAUN D, BRETON JL, LEMARIE E, GOUVA S, PAILLOT N, BRECHOT JM, JANICOT H, LEBAS FX, TERRIOUX P, CLAVIER J, FOUCHER P, MONCHATRE M, COETMEUR D, LEVEL MC, LECLERC P, BLANCHON F, RODIER JM, THIBERVILLE L, VILLENEUVE A, WESTEEL V, CHASTANG C. Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002, 20:247-53.
220. HARPOLE DH JR, HERNDON JE, WOLFE WG, IGLEHART JD, MARKS JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res* 1995, 55:51-6.
221. MARTINI N, RUSCH VW, BAINS MS, KRIS MG, DOWNEY RJ, FLEHINGER BJ, GINSBERG RJ. Factors influencing ten-year survival in resected stages I to IIIa non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999, 117:32-6.
222. FONTANINI G, BOLDRINI L, VIGNATI S, CHINE S, BASOLO F, SILVESTRI V, LUCCHI M, MUSSI A, ANGELETTI CA, BEVILACQUA G. Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 1998, 34:718-23.
223. KOUKOURAKIS MI, GIATROMANOLAKI A, O'BYRNE KJ, WHITEHOUSE RM, TALBOT DC, GATTER KC, HARRIS AL. Potential role of bcl-2 as a suppressor of tumour angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 1997,74:565-70.
224. ROSELL R, LI S, SKACEL Z, MATE JL, MAESTRE J, CANELA M, TOLOSA E, ARMENGOL P, BARNADAS A, ARIZA A. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 1993, 8:2407-12.
225. ZOCHBAUER-MULLER S, FONG KM, VIRMANI AK, GERADTS J, GAZDAR AF, MINNA JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001, 61:249-55.
226. VIRMANI AK, RATHI A, ZOCHBAUER-MULLER S, SACCHI N, FUKUYAMA Y, BRYANT D, MAITRA A, HEDA S, FONG KM, THUNNISSEN F, MINNA JD, GAZDAR AF. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:1303-7.
227. COTE S, MOMPARTLER RL. Activation of the retinoic acid receptor beta gene by 5-aza-2'-deoxycytidine in human DLD-1 colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1997, 8:56-61.
228. SPORN MB. Retinoids and demethylating agents- looking for partners. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:780-1.
229. Observatoire National de la Mucoviscidose 2000. Institut National des Etudes Démographiques.
230. ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM B, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M, ROZMAHEL R, COLE JL, KENNEDY D, HIDAKA N. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989, 245:1059-65.

231. RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z, ZIELENSKI J, LOK S, PLAUSIC N, CHOU JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989, 245:1066-73.
232. KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A, BUCHWALD M, TSUI LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989, 245:1073-80.
233. BRADBURY NA, CLARK JA, WATKINS SC, WIDNELL CC, SMITH HS 4TH, BRIDGES RJ. Characterization of the internalization pathways for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol* 1999, 276:L659-68.
234. VANKEERBERGHEN A, CUPPENS H, CASSIMAN JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cystic Fibrosis* 2002, 1:13-29.
235. QUINTON PM. Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. *FASEB J* 1990, 4:2709-17
236. GABRIEL SE, CLARKE LL, BOUCHER RC, STUTTS MJ. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 1993, 363:263-8.
237. SCHWIEBERT EM, EGAN ME, HWANG TH, FULMER SB, ALLEN SS, CUTTING GR, GUGGINO WB. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 1995, 81:1063-73.
238. BARASCH J, KISS B, PRINCE A, SAIMAN L, GRUENERT D, AL-AWQATI Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 1991, 352:70-3.
239. De BENTZMANN S, ROGER P, DUPUIT F, BAJOLET-LAUDINAT O, FUCHEY C, PLOTKOWSKI MC, PUCHELLE E. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 1996, 64:1582-8.
240. <http://www.genet.sickkids.on.ca>
241. WELSH MJ, SMITH AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993, 73:1251-4.
242. GIRODON E, CAZENEUVE C, LEBARGY F, CHINET T, COSTES B, GHANEM N, MARTIN J, LEMAY S, SCHEID P, HOUSSET B, BIGNON J, GOOSSENS M. CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur J Hum Genet* 1997, 5:149-55.
243. SUGITA M, YUE Y, FOSKETT JK. CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J* 1998, 17:898-908
244. SCHWIEBERT EM, MORALES MM, DEVIDAS S, EGAN ME, GUGGINO WB. Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:2674-9.
245. ROSENTHAL M, BUSH A. The growing lung: normal development and the long-term effects of pre-and post natal insults. *Eur Respir Mon* 2002, 19:1-24.
246. WINE JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 1999, 103:309-12.
247. ZHANG Y, ENGELHARDT JF. Airway surface fluid volume and Cl content in cystic fibrosis and normal bronchial xenografts. *Am J Physiol* 1999, 276:C469-76.

248. KNOWLES MR, ROBINSON JM, WOOD RE, PUE CA, MENTZ WM, WAGER GC, GATZY JT, BOUCHER RC. Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest* 1997, 100:2588-95.
249. MATSUI H, GRUBB BR, TARRAN R, RANDELL SH, GATZY JT, DAVIS CW, BOUCHER RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998, 95:1005-15.
250. TARRAN R, GRUBB BR, PARSONS D, PICHER M, HIRSH AJ, DAVIS CW, BOUCHER RC. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell* 2001, 8:149-58.
251. GUGGINO WB. Cystic fibrosis salt/fluid controversy: in the thick of it. *Nat Med* 2001, 7:888-9.
252. ZABNER J, SMITH JJ, KARP PH, WIDDICOMBE JH, WELSH MJ. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell* 1998, 2:397-403.
253. QUINTON PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983, 301:421-2.
254. SMITH JJ, TRAVIS SM, GREENBERG EP, WELSH MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996, 85:229-36.
255. GOLDMAN MJ, ANDERSON GM, STOLZENBERG ED, KARI UP, ZASLOFF M, WILSON JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997, 88:553-60.
256. TABARY O, ZAHM JM, HINNRASKY J, COUETIL JP, CORNILLET P, GUENOUNOU M, GAILLARD D, PUCHELLE E, JACQUOT J. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 1998, 153:921-30.
257. TAGER AM, WU J, VERMEULEN MW. The effect of chloride concentration on human neutrophil functions: potential relevance to cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19:643-52.
258. GANZ T, LEHRER RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994, 6:584-9.
259. BALS R, WEINER DJ, MEEGALLA RL, ACCURSO F, WILSON JM. Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Jul;25(1):21-5.
260. KIRCHNER KK, WAGENER JS, KHAN TZ, COPENHAVER SC, ACCURSO FJ. Increased DNA levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 154:1426-9.
261. LETHEM MI, JAMES SL, MARRIOTT C, BURKE JF. The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J* 1990, 3:19-23.
262. Observatoire National de la Mucoviscidose 1999. Institut National des Etudes Démographiques.
263. STEWART PS, COSTERTON JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001, 358:135-8.
264. DAVIS PB, DRUMM M, KONSTAN MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 154:1229-56.

265. De ROSE V. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Resp J* 2002,19:333-40.
266. REDDY MS. Human tracheobronchial mucin: purification and binding to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1992, 60:1530-5.
267. SAJJAN U, REISMAN J, DOIG P, IRVIN RT, FORSTNER G, FORSTNER J. Binding of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1992, 89:657-65.
268. WILSON R, DOWLING RB. Lung infections. 3. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* 1998, 53:213-9.
269. ADLER KB, LI Y. Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 25:397-400.
270. LI JD, DOHRMAN AF, GALLUP M, MIYATA S, GUM JR, KIM YS, NADEL JA, PRINCE A, BASBAUM CB. Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:967-72.
271. LEVINE SJ, LARIVÉE P, LOGUN C, ANGUS CW, OGNIBENE FP, SHELHAMER JH. Tumor necrosis factor- α induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 12:196-204.
272. PRINCE A. Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. *Microb Pathog* 1992, 13:251-60.
273. SAIMAN L, PRINCE A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest* 1993, 92:1875-80.
274. IMUNDO L, BARASCH J, PRINCE A, AL-AWQATI Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92:3019-23.
275. DAVIES J, DEWAR A, BUSH A, PITT T, GRUENERT D, GEDDES DM, ALTON EW. Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to native cystic fibrosis epithelium with anti-asialoGM1 antibody and neuraminidase inhibition. *Eur Respir J* 1999, 13:565-70.
276. De BENTZMANN S, ROGER P, PUCHELLE E. *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur Respir J* 1996, 9:2145-50.
277. CACALANO G, KAYS M, SAIMAN L, PRINCE A. Production of the *Pseudomonas aeruginosa* neuraminidase is increased under hyperosmolar conditions and is regulated by genes involved in alginate expression. *J Clin Invest* 1992, 89:1866-74.
278. DAVIES JC, STERN M, DEWAR A, CAPLEN NJ, MUNKONGE FM, PITT T, SORGI F, HUANG L, BUSH A, GEDDES DM, ALTON EW. CFTR gene transfer reduces the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to cystic fibrosis respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, 16:657-63.
279. ULRICH M, HERBERT S, BERGER J, BELLON G, LOUIS D, MUNKER G, DORING G. Localization of *Staphylococcus aureus* in infected airways of patients with cystic fibrosis and in a cell culture model of *S. aureus* adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19:83-91.

280. ZAR H, SAIMAN L, QUITTELL L, PRINCE A. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J Pediatr* 1995, 126:230-3.
281. BRYAN R, KUBE D, PEREZ A, DAVIS P, PRINCE A. Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19:269-77.
282. PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS, OLSEN JC, JOHNSON LG, YANKASKAS JR, GOLDBERG JB. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science*. 1996, 271:64-7.
283. PIER GB, GROUT M, ZAIDI TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:12088-93.
284. CARROLL TP, MORALES MM, FULMER SB, ALLEN SS, FLOTTE TR, CUTTING GR, GUGGINO WB. Alternate translation initiation codons can create functional forms of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 1995, 270:11941-6.
285. PLOTKOWSKI MC, DE BENTZMANN S, PEREIRA SH, ZAHM JM, BAJOLET-LAUDINAT O, ROGER P, PUCHELLE E. *Pseudomonas aeruginosa* internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, 20:880-90.
286. FLEISZIG SM, EVANS DJ, DO N, VALLAS V, SHIN S, MOSTOV KE. Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infect Immun* 1997, 65:2861-7.
287. HERARD AL, ZAHM JM, PIERROT D, HINNRASKY J, FUCHEY C, PUCHELLE E. Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, 15:624-32.
288. HERARD AL, PIERROT D, HINNRASKY J, KAPLAN H, SHEPPARD D, PUCHELLE E, ZAHM JM. Fibronectin and its alpha 5 beta 1-integrin receptor are involved in the wound-repair process of airway epithelium. *Am J Physiol* 1996, 271:L726-33.
289. CANTIN A. Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:939-41.
290. KHAN TZ, WAGENER JS, BOST T, MARTINEZ J, ACCURSO FJ, RICHES DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:1075-82.
291. KONSTAN MW, HILLIARD KA, NORVELL TM, BERGER M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150:448-54.
292. NOAH TL, BLACK HR, CHENG PW, WOOD RE, LEIGH MW. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1997, 175:638-47.
293. BIRRER P, MCELVANEY NG, RUDEBERG A, SOMMER CW, LIECHTI-GALLATI S, KRAEMER R, HUBBARD R, CRYSTAL RG. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150:207-13.

294. SAGEL SD, KAPSNER R, OSBERG I, SONTAG MK, ACCURSO FJ. Airway inflammation in children with cystic fibrosis and healthy children assessed by sputum induction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:1425-31.
295. MCCAIN RW, HOLDEN EP, BLACKWELL TR, CHRISTMAN JW. Leukotriene B4 stimulates human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and release interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994, 10:651-7.
296. KONSTAN MW, BERGER M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 1997, 24:137-42.
297. BONFIELD TL, PANUSKA JR, KONSTAN MW, HILLIARD KA, HILLIARD JB, GHNAIM H, BERGER M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152:2111-8.
298. KRONBORG G, HANSEN MB, SVENSON M, FOMSGAARD A, HOIBY N, BENDTZEN K. Cytokines in sputum and serum from patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection as markers of destructive inflammation in the lungs. *Pediatr Pulmonol* 1993, 15:292-7.
299. DIMANGO E, ZAR HJ, BRYAN R, PRINCE A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 1995, 96:2204-10.
300. MASSION PP, INOUE H, RICHMAN-EISENSTAT J, GRUNBERGER D, JORENS PG, HOUSSET B, PITTET JF, WIENER-KRONISH JP, NADEL JA. Novel *Pseudomonas* product stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1994, 93:26-32
301. BECKER S, KOREN HS, HENKE DC. Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993, 8:20-7.
302. BLACK HR, YANKASKAS JR, JOHNSON LG, NOAH TL. Interleukin-8 production by cystic fibrosis nasal epithelial cells after tumor necrosis factor-alpha and respiratory syncytial virus stimulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19:210-5.
303. TAGGART C, COAKLEY RJ, GREALLY P, CANNY G, O'NEILL SJ, MCELVANEY NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 278:L33-41.
304. BRUCE MC, PONCZ L, KLINGER JD, STERN RC, TOMASHEFSKI JF JR, DEARBORN DG. Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1985, 132:529-35.
305. SOMMERHOFF CP, NADEL JA, BASBAUM CB, CAUGHEY GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990, 85:682-9.
306. NADEL JA, STOCKLEY RA. Proteolytic enzymes and airway diseases. *Eur Respir J* 1998, 12:1250-1.
307. FICK RB JR, NAEGEL GP, SQUIER SU, WOOD RE, GEE JB, REYNOLDS HY. Proteins of the cystic fibrosis respiratory tract. Fragmented immunoglobulin G opsonic antibody causing defective opsonophagocytosis. *J Clin Invest* 1984, 74:236-48.

308. TOSI MF, ZAKEM H, BERGER M. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest* 1990, 86:300-8.
309. WITKO-SARSAT V, ALLEN RC, PAULAIS M, NGUYEN AT, BESSOU G, LENOIR G, DESCAMPS-LATSCHA B. Disturbed myeloperoxidase-dependent activity of neutrophils in cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, and its correction by amiloride. *J Immunol* 1996, 157:2728-35.
310. WITKO-SARSAT V, DELACOURT C, RABIER D, BARDET J, NGUYEN AT, DESCAMPS-LATSCHA B. Neutrophil-derived long-lived oxidants in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152:1910-6.
311. ROUM JH, BUHL R, MCELVANEY NG, BOROK Z, CRYSTAL RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1993, 75:2419-24.
312. HENRION-CAUDE A, FLAMAND C, ROUSSET M, FLAHAULT A, CHADELAT K, MIESCH MC, STRANGE RC, CLEMENT A. Severity of cystic fibrosis is associated with polymorphism of anti-oxidizing glutathione. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165:A651.
313. WANG P, WU P, SIEGEL MI, EGAN RW, BILLAH MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995, 270:9558-63.
314. STORDEUR P, GOLDMAN M. Interleukin-10 as a regulatory cytokine induced by cellular stress: molecular aspects. *Int Rev Immunol* 1998, 16:501-22.
315. BONFIELD TL, KONSTAN MW, BURFEIND P, PANUSKA JR, HILLIARD JB, BERGER M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 13:257-61.
316. OSIKA E, CAVAILLON JM, CHADELAT K, BOULE M, FITTING C, TOURNIER G, CLEMENT A. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J* 1999, 14:339-46.
317. CHMIEL JF, KONSTAN MW, KNESEBECK JE, HILLIARD JB, BONFIELD TL, DAWSON DV, BERGER M. IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic Pseudomonas infection in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:2040-7.
318. HOIBY N. Inflammation and infection in cystic fibrosis--hen or egg? *Eur Respir J* 2001, 17:4-5.
319. BALOUGH K, MCCUBBIN M, WEINBERGER M, SMITS W, AHRENS R, FICK R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1995, 20:63-70.
320. ARMSTRONG DS, GRIMWOOD K, CARLIN JB, CARZINO R, GUTIERREZ JP, HULL J, OLINSKY A, PHELAN EM, ROBERTSON CF, PHELAN PD. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156:1197-204.
321. DAKIN CJ, NUMA AH, WANG H, MORTON JR, VERTZYS CC, HENRY RL. Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165:904-10.
322. MEYER KC, SHARMA A. Regional variability of lung inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156:1536-40.

323. KAMMOUNI W, FIGARELLA C, MARCHAND S, MERTEN M. Altered cytokine production by cystic fibrosis tracheal gland serous cells. *Infect Immun* 1997, 65:5176-83.
324. DIMANGO E, RATNER AJ, BRYAN R, TABIBI S, PRINCE A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998, 101:2598-605.
325. TIROUVANZIAM R, DE BENTZMANN S, HUBEAU C, HINNRASKY J, JACQUOT J, PEAULT B, PUCHELLE E. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, 23:121-7.
326. MUHLEBACH MS, STEWART PW, LEIGH MW, NOAH TL. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, 160:186-91.
327. ROGER P, PUCHELLE E, BAJOLET-LAUDINAT O, TOURNIER JM, DEBORDEAUX C, PLOTKOWSKI MC, COHEN JH, SHEPPARD D, DE BENTZMANN S. Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 1999, 13:1301-9.
328. BAEUERLE PA, BALTIMORE D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996, 87:13-20.
329. THANOS D, MANIATIS T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995, 80:529-32.
330. BARNES PJ, KARIN M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997, 336:1066-71.
331. CHRISTMAN JW, SADIKOT RT, BLACKWELL TS. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. *Chest* 2000, 117:1482-7.
332. VENKATAKRISHNAN A, STECENKO AA, KING G, BLACKWELL TR, BRIGHAM KL, CHRISTMAN JW, BLACKWELL TS. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000, 23:396-403.
333. PAHL HL, SESTER M, BURGERT HG, BAEUERLE PA. Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J Cell Biol* 1996, 132:511-22.
334. KNORRE A, WAGNER M, SCHAEFER HE, COLLEDGE WH, PAHL HL. DeltaF508-CFTR causes constitutive NF-kappaB activation through an ER-overload response in cystic fibrosis lungs. *Biol Chem* 2002, 383:271-82.
335. TABARY O, ESCOTTE S, COUETIL JP, HUBERT D, DUSSER D, PUCHELLE E, JACQUOT J. High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. *J Immunol* 2000, 164:3377-84.
336. EIGEN H, ROSENSTEIN BJ, FITZSIMMONS S, SCHIDLOW DV. A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group. *J Pediatr* 1995, 126:515-23.
337. BALFOUR-LYNN IM, KLEIN NJ, DINWIDDIE R. Randomised controlled trial of inhaled corticosteroids (fluticasone propionate) in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1997, 77:124-30.

338. BISGAARD H, PEDERSEN SS, NIELSEN KG, SKOV M, LAURSEN EM, KRONBORG G, REIMERT CM, HOIBY N, KOCH C. Controlled trial of inhaled budesonide in patients with cystic fibrosis and chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156:1190-6.
339. KONSTAN MW, BYARD PJ, HOPPEL CL, DAVIS PB. Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1995, 332:848-54.
340. KOYAMA H, GEDDES DM. Erythromycin and diffuse panbronchiolitis. *Thorax* 1997, 52:915-8.
341. TAKIZAWA H, DESAKI M, OHTOSHI T, KAWASAKI S, KOHYAMA T, SATO M, TANAKA M, KASAMA T, KOBAYASHI K, NAKAJIMA J, ITO K. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156:266-71.
342. JAFFE A, BUSH A. Anti-inflammatory effects of macrolides in lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2001, 31:464-73.
343. JAFFE A, FRANCIS J, ROSENTHAL M, BUSH A. Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* 1998, 351:420.
344. WOLTER J, SEENEY S, BELL S, BOWLER S, MASEL P, MCCORMACK J. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax* 2002, 57:212-6.
345. FREEDMAN SD, WEINSTEIN D, BLANCO PG, MARTINEZ-CLARK P, URMAN S, ZAMAN M, MORROW JD, ALVAREZ JG. Characterization of LPS-induced lung inflammation in *cfr-/-* mice and the effect of docosahexaenoic acid. *J Appl Physiol* 2002, 92:2169-76.
346. FREEDMAN SD, SHEA JC, BLANCO PG, ALVAREZ JG. Fatty acids in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2000, 6:530-2.
347. COLLEDGE WH, ABELLA BS, SOUTHERN KW, RATCLIFF R, JIANG C, CHENG SH, MACVINISH LJ, ANDERSON JR, CUTHBERT AW, EVANS MJ. Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nat Genet* 1995, 10:445-52.
348. PAHL HL, BAEUERLE PA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J* 1995, 14:2580-8.
349. LEE JI, BURCKART GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998, 38:981-93.
350. SCHWIEBERT LM, ESTELL K, PROPST SM. Chemokine expression in CF epithelia: implications for the role of CFTR in RANTES expression. *Am J Physiol* 1999, 276:C700-10.
351. ZHU Z, TANG W, GWALTNEY JM JR, WU Y, ELIAS JA. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro: role of NF-kappaB. *Am J Physiol* 1997, 273:L814-24.
352. ANRATHER D, MILLAN MT, PALMETSHOFER A, ROBSON SC, GECZY C, RITCHIE AJ, BACH FH, EWENSTEIN BM. Thrombin activates nuclear factor-kappaB and potentiates endothelial cell activation by TNF. *J Immunol* 1997, 159:5620-8.

353. BOHUSLAV J, KRAVCHENKO VV, PARRY GC, ERLICH JH, GERONDAKIS S, MACKMAN N, ULEVITCH RJ. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* 1998, 102:1645-52.
354. ISHIKAWA H, CLAUDIO E, DAMBACH D, RAVENTOS-SUAREZ C, RYAN C, BRAVO R. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *J Exp Med* 1998, 187:985-96.
355. LAWRENCE T, GILROY DW, COLVILLE-NASH PR, WILLOUGHBY DA. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* 2001, 7:1291-7.
356. TABARY O, ESCOTTE S, COUETIL JP, HUBERT D, DUSSER D, PUCHELLE E, JACQUOT J. Genistein inhibits constitutive and inducible NFkappaB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol* 1999, 155:473-81.
357. KANG JL, LEE HW, LEE HS, PACK IS, CHONG Y, CASTRANOVA V, KOH Y. Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:2206-12.
358. PARK GY, LE S, PARK KH, LE CT, KIM YW, HAN SK, SHIM YS, YOO CG. Anti-inflammatory effect of adenovirus-mediated IkappaBalpha overexpression in respiratory epithelial cells. *Eur Respir J* 2001, 18:801-9.
359. TOMITA N, MORISHITA R, TOMITA S, YAMAMOTO K, AOKI M, MATSUSHITA H, HAYASHI S, HIGAKI J, OGIHARA T. Transcription factor decoy for nuclear factor-kappaB inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *J Hypertens* 1998, 16:993-1000.
360. MORISHITA R, SUGIMOTO T, AOKI M, KIDA I, TOMITA N, MORIGUCHI A, MAEDA K, SAWA Y, KANEDA Y, HIGAKI J, OGIHARA T. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997, 3:894-9.
361. KITSON C, ANGEL B, JUDD D, ROTHERY S, SEVERS NJ, DEWAR A, HUANG L, WADSWORTH SC, CHENG SH, GEDDES DM, ALTON EW. The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Ther* 1999, 6:534-46.
362. CHIN DJ, GREEN GA, ZON G, SZOKA FC JR, STRAUBINGER RM. Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. *New Biol* 1990, 2:1091-100.

Nom : Mr SCHEID
Prénom : Philippe

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT

Spécialité : BIOINGÉNIERIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

n° 747

Nancy, le 9 décembre 2002

Le Président de l'Université

C. BURLET
PRESIDENT
HENRI POINCARÉ
UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ
NANCY 1

RESUME : Les progrès de la connaissance des anomalies génétiques des maladies respiratoires permettent d'envisager des applications pratiques dans le domaine de la carcinogenèse bronchique et de la mucoviscidose. Nous rapportons nos travaux, d'une part pour l'étude de l'intérêt de l'étude de nouveaux marqueurs de pronostic (anomalies de *ras*, *bcl2*, *p53*, *c-erb-b2*) dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules, et d'autre part pour la compréhension des échecs de la chimioprévention par les rétinoïdes qui sont notamment liés à l'absence d'expression de récepteurs de l'acide rétinoïque ($RAR\beta$) du fait de délétions alléliques ou d'hyperméthylation des promoteurs des gènes correspondants. Dans le domaine de l'inflammation bronchique de la mucoviscidose nous identifions un rôle majeur de l'adhérence bactérienne. L'activation du facteur de transcription nucléaire $NF\kappa B$ et la sécrétion d'interleukin-8 ont pu être réduits *in vitro* par transfert génique.

TITLE : Genetic abnormality knowledge in respiratory epithelium applied to lung cancer prognosis, chemoprevention using retinoids and cystic fibrosis inflammation understanding.

SUMMARY : Recent advances about gene abnormality knowledge in respiratory disease allow new approaches especially in non small cell lung cancer and cystic fibrosis. Thus, we investigated new markers for lung cancer prognosis (*ras*, *bcl2*, *p53*, *c-erb-b2* genes), and the causes of chemoprevention failure using retinoids such as loss of heterozygosity or retinoic acid receptor β gene promoter hypermethylation. Concerning cystic fibrosis inflammation processes, bacterial adherence was shown to be of major importance although a direct (endogenous) contribution of the CFTR gene defect cannot be ruled out. Nuclear transcription factor $NF\kappa B$ activation and interleukin-8 secretion were lowered *in vitro* after gene transfer.

DISCIPLINE : Biologie Santé Environnement

SPECIALITE : Bioingénierie

MOTS-CLES: Cancer bronchique, chimioprévention, pronostic, méthylation, $RAR\beta$, mucoviscidose, inflammation, interleukine-8, $NF\kappa B$, $I\kappa B$.

EA 3443- Oncogenèse bronchique : chimioprévention et immuno-modulation épithéliale

Faculté de Médecine, UHP, BP 184, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy