



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>

Université Henri Poincaré – Nancy I

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Henri Poincaré Nancy I

DsCIPLINE Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

Présentée par :

Sanae BOUALI

Transfert des gènes p53 et pten par vectorisation non virale : effet
pro-apoptotique et potentialisation de la réponse cellulaire au cétuximab

Directeur de thèse : Pr. Jean Louis MERLIN

Soutenue le 28 octobre 2008

Membres du jury

Professeur	Jean Louis MERLIN	(directeur de thèse)
Docteur	Joseph ABECASSIS	(rapporteur)
Docteur	Amélie LANSIAUX-CAPPELAERE	(rapporteur)
Professeur	Phylippe BECUWE	
Docteur	Alexandre FIFRE	
Docteur	Gilles DOLIVET	

REMERCIEMENTS

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père

A ma mère, mes sœurs et mes frères, pour ces longues années de soutien, pour votre confiance, vous avez toujours témoigné de la plus grande patience et de la plus grande compréhension. Malgré toutes les difficultés qu'ont pu représenter ces longues années d'études, vous m'avez toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Aucun remerciement, ne serait suffisant !

Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans votre enthousiasme, vos compétences scientifiques, votre disponibilité et vos grande qualités humaines. La confiance que vous m'avez accordée m'a permis de mener à bien mes travaux de thèses dans les meilleures conditions. Veuillez trouver ma sincère reconnaissance et mon profond respect. **Merci pour tout !**

Madame le Docteur Amélie LANSIAUX et Monsieur le Docteur Joseph ABECASSIS

Je vous adresse mes sincères remerciements pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je vous prie de croire en ma haute considération.

Monsieur le Professeur Philippe BECUWE

Je suis honorée que vous ayez accepté de faire partie de ce jury de thèse, veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements.

Monsieur le Docteur Gilles DOLIVET

Je vous suis profondément reconnaissante pour l'enthousiasme avec lequel vous avez accepté de participer à ce jury de thèse.

Monsieur le Docteur Alexandre FIFRE

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, veuillez trouver ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

Les membres de l'Unité de Biologie des Tumeurs au Centre Alexis Vautrin

Carole, Marie R et Marie H, je vous remercie de m'avoir fait profiter de vos expériences et votre aide précieuse et indispensable tout au long de ce travail.

Madame Dominique LEPRINCE

Je te remercie en particulier pour ton aide discrète et ta gentillesse

A madame Sophie Marchal et mademoiselle Aurélie François

Je vous remercie de m'avoir apporté de l'aide et de votre gentillesse.

La ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains

Je vous suis reconnaissante pour le soutien financier que vous avez apporté à mon travail de recherche durant trois ans

Je tiens à remercier tous mes amis, Naoual, Nawal, Samad, Siham, Meriem, Saoussen, Nacera... Je vous remercie pour votre aide précieuse, votre complicité et surtout pour votre soutien...Et bon courage Saoussen pour la fin de ta thèse !

Table des matières:

TABLE DES MATIERES:	1
I. ONCOGENESE	6
II. LE CAS DU GENE P53:	11
II.1. Historique:	11
II.2. P53 un Gatekeeper:	11
II.3. Structure de la protéine P53	13
II.4. Régulation de P53	14
II.4.1. Phosphorylation de P53	15
II.4.2. Acétylation de P53:	16
II.4.3. Ubiquitination de P53	16
II.4.4. Les autres modifications de P53	16
II.4.5. Interaction de P53 –MDM2	16
II.5. Localisation cellulaire	18
II.6. Les fonctions de P53	18
II.6.1. Arrêt du cycle cellulaire	19
II.6.2. Apoptose	20
II.6.3. P53 et autophagie:	22
II.6.4. P53 et métabolisme:	22

II.7. Le choix de la réponse de P53: l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose ?-----	23
II.8. Le gène P53 et le cancer: mutation et conséquences -----	23
II.8.1. Quelles sont les conséquences cliniques de ces mutations ?-----	25
II.9.1. Thérapie génique -----	26
II.9.2. Inhibition de MDM2 -----	27
II.9.3. Réactivation du mutant de p53 -----	27
III. LE CAS DU GENE PTEN -----	29
III.1. Découverte -----	29
III.2. Structure -----	30
III.3. Les mutations de pten-----	31
III.3.1. Mutation somatique de pten dans diverses tumeurs humaines -----	32
III.3.2. Mutations germinales de pten dans divers syndromes et prédisposition aux cancers -----	32
III.3.3. Autres mécanismes d'inactivation -----	33
III.3.4. Souris déficientes en PTEN: -----	34
III.4. Régulation de PTEN :-----	34
III.4.1 Régulation transcriptionnelle -----	34
III.4.2. Régulation post-traductionnelle de PTEN -----	38
III.4.3. Interactions de PTEN avec d'autres protéines -----	41
III.5. Localisation au niveau de la cellule -----	41
III.6. Fonctions de PTEN-----	43
III.6.1. PTEN et voie des MAPK-----	43

III.6.2. PTEN et voie PI3K/AKT-----	44
III.6.3. Action sur le cycle cellulaire-----	46
III.6.4. Action sur l'apoptose: -----	47
III.6.5. Action sur la formation de métastases -----	47
 IV. LES RECEPTEURS TYROSINE KINASE DE LA FAMILLE <i>HUMAN</i>	
<i>EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (HER)</i> -----	48
 IV.1. Généralité: -----	48
 IV.2. Structure des récepteurs-----	50
 IV.3. Activation-----	51
 IV.4. HER et oncogenèse -----	52
 IV.5. L'exemple de l'EGFR-----	53
IV.5.1. L'EGFR et implication dans l'oncogenèse:-----	53
IV.5.1.3. Stimulation autocrine: -----	54
IV.5.2. Mise en évidence de l'EGFR et méthodes de détection-----	54
 IV.6. Les stratégies thérapeutiques:-----	55
IV.6.1. Les anticorps monoclonaux-----	56
 IV.7. Facteurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR -----	62
IV.7.1. Mutations de K-Ras-----	62
IV.7.2. L'inactivation de PTEN -----	63
IV.7.3. La voie des VEGF -----	64
IV.7.4. La voie de JAK/STAT-----	64
IV.7.5. Inactivation de p21-----	64

IV.7.6. Polymorphisme de Fc gamma R: -----	65
IV.7.7. Nombre de copies du gène EGFR-----	65
IV.7.8. Mutations du REGF-----	65
IV.7.9. Cross-talk EGFR-HER2-----	66
IV.7.10. Fonctionnalité des voies de signalisation en aval des HER -----	66
V. TRANSFERT DE GENES -----	68
V.1 L'ADN nu -----	68
V.2. Les vecteurs viraux -----	69
V.2.1. Les rétrovirus -----	70
V.2.2. Les lentivirus -----	70
V.2.3. Le virus Herpes-Simplex -----	70
V.2.3. Les virus associés aux adénovirus (VAA) -----	71
V.2.4. Les adénovirus-----	71
V.3. Les vecteurs non-viraux ou vecteurs synthétiques -----	72
V.3.1. Les lipides cationiques:-----	73
V.3.2. Les polymères cationiques: -----	73
V.4. Internalisation photochimique :-----	75
VI. OBJECTIFS DU TRAVAIL: -----	78
VII. TRAVAIL EXPERIMENTAL -----	80

VII.1. Prolongement de la durée d'expression du transgène et mort cellulaire après combinaison de PEI tétraglucosylé et de la PCI pour le transfert du gène P53 au sein de cellules humaines de cancer épidermoïde de la tête et du cou.	80
VII.2. Potentialisation de l'inhibition de la croissance cellulaire après transfert du gène pten par polyéthylèneimine et internalisation photochimique dans les cellules de cancer de l'endomètre	89
VII.3. L'expression de PTEN contrôle la réponse cellulaire au cetuximab par inhibition des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK dans des cellules exprimant K-Ras sauvage	98
VII.4. Influence de la fonctionnalité de PTEN et de P53 sur la réponse cellulaire au cetuximab	119
XIII. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	150
IX. PERSPECTIVES:	159
X. LISTE DES ABREVIATIONS:	161
XI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:	165
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	186

I. Oncogenèse

Des cancers étaient déjà décrits dans des écrits égyptiens vers –35000 avant JC. Hippocrate, médecin grec (460-377 av JC) a observé certaines lésions sur le corps humain qu’il a dénommé « karkinos » qui signifie crabe, en référence à ses observations d’une tumeur de sein avec une partie centrale arrondie prolongée en rayons simulant les pattes de l’animal. Au Ier siècle après JC Celsus, médecin romain, traduit en latin « karkinos » en cancer.

Le mot cancer est un terme général désignant des néoplasmes malins caractérisés par une prolifération anarchique de certaines cellules de l’organisme qui s’échappent aux mécanismes de différenciation, de régulation de leur multiplication et à l’absence de mort cellulaire et acquièrent une instabilité génétique leur permettant de se diviser indéfiniment (Figure 1). Les nouvelles cellules résultantes peuvent former des tumeurs malignes qui se distinguent des tumeurs bénignes.

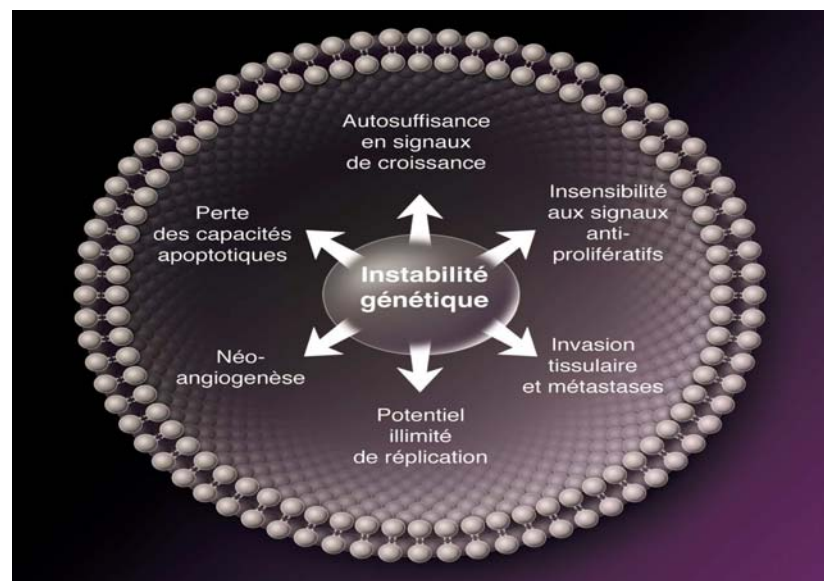


Figure 1: Capacités acquises du cancer.

Hanahan D et Weinberg RA. suggèrent que la plupart, si ce n'est pas tous, les cancers acquièrent les mêmes capacités fonctionnelles durant leur développement, bien que les stratégies mécanistiques sont variées.

La tumeur bénigne est une masse tumorale résultant d'un excès de cellules dont l'évolution ne donne jamais de métastase, c'est une tumeur bien limitée par rapport au tissu sain.

La tumeur maligne correspond à une masse tumorale résultant d'une prolifération cellulaire autonome pouvant donner lieu à des métastases, elles sont mal limitées, non encapsulées, détruisent ou envahissent l'organe d'origine et parfois les organes de voisinage. Les principales tumeurs malignes sont les carcinomes (se développant à partir des cellules épithéliales), les sarcomes (tumeurs solides qui affectent les cellules des tissus conjonctifs), les leucémies (tumeurs malignes qui se développent à partir des cellules du système sanguin) et les lymphomes (se développant à partir des cellules du système ganglionnaire). Le cancer est susceptible de se développer dans tous les organes, les plus touchés sont le sein, la prostate, les poumons, l'appareil digestif, les voies aérodigestives supérieures, la peau et le cerveau.

Le cancer est la deuxième cause de décès derrière les maladies cardiovasculaires dans les pays développés. La mortalité est variable selon la localisation de la tumeur.

L'apparition d'un cancer s'effectue selon un processus en plusieurs étapes au cours desquelles l'accumulation d'anomalies sur différents gènes confère un avantage sélectif au clone malin. Celle-ci devient de plus en plus agressive pour son environnement et échappe progressivement aux contraintes fixées par l'homéostasie.

La prolifération des cellules cancéreuses conduit à la destruction du tissu originel, ainsi que des tissus environnants. Les différentes mutations au niveau de l'ADN des cellules cancéreuses sont souvent initiées par des carcinogènes environnementaux, certaines substances chimiques mutagènes, agents infectieux (dont les principaux sont dues à certains virus: VHB, VHC, VPH et à la bactérie *Helicobacter Pylori*) via l'expression d'oncogènes capables de déréguler les mécanismes régissant la croissance et la prolifération cellulaire et

amenant à la transformation de la cellule, facteurs liés au modes de vie (Alimentation, activité physique, consommation d'alcool, hérédité).

D'une manière générale, l'oncogenèse associe des remaniements génétiques permettant la perte de la fonction d'un gène suppresseur de tumeur, l'activation d'un oncogène et l'apparition des clones malins et à leur prolifération anarchique. Ces gènes se distinguent par leur mécanisme d'action et sont capables de provoquer ou d'accélérer le processus cancéreux lorsqu'ils sont altérés:

*** Les gènes de réparation de l'ADN**

Le génome humain subit constamment des lésions qui sont réparées ou non. Les cellules possèdent tout un arsenal de gènes pour corriger des erreurs survenant lors de la réplication de l'ADN au cours de la division cellulaire ou d'éliminer les adduits à l'ADN induit par les cancérogènes chimiques par exemple. En effet, les systèmes de réparation sont parfois défectueux ou « débordés », la cellule conserve alors certaines altérations qui touchent parfois les systèmes de régulation de la prolifération.

*** Gain d'un oncogène**

Les proto-oncogènes sont a posteriori des gènes normaux codant pour des protéines impliquées à différents niveaux dans la prolifération cellulaire. Certaines formes mutées de ces gènes, les oncogènes, codent pour des protéines capables d'induire et/ou maintenir une prolifération cellulaire excessive. Le premier oncogène a été identifié à partir du rétrovirus du sarcome de Rous. De multiples études réalisées sur différents mutants de ce virus capables de se répliquer mais pas de transformer la cellule hôte ont permis d'identifier la protéine oncogénique Src, impliquée dans la transformation de la cellule hôte. Il a été démontré que les oncogènes rétroviraux étaient issus de formes modifiées de gènes existant dans des cellules initialement saines et appelés proto-oncogènes. Leur intégration dans le génome rétroviral s'est réalisée au cours de l'évolution. Ces proto-oncogènes codent des protéines impliquées

dans la régulation des voies contrôlant la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire ou l'apoptose. L'expression des oncogènes correspondants induit une dérégulation de ces voies, induisant une stimulation de la prolifération cellulaire ou la survie de cellules présentant des anomalies génétiques.

*** Perte de gènes suppresseurs de tumeur:**

A contrario, les gènes suppresseurs de tumeur codent pour des protéines inhibitrices de la prolifération cellulaire. Des mutations peuvent les rendre inactifs, privant ainsi les cellules des "freins" de prolifération. La perte de l'activité de protéine suppresseur de tumeur peut être considérée comme cause de cancer. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions, d'anomalies de méthylation des promoteurs inhibant la transcription. Ces gènes agissent de façon récessive, leur inactivation nécessitant l'altération des deux allèles (perte de fonction). Le premier gène suppresseur de tumeur a été identifié chez l'humain suite à l'étude du rétinoblastome. Les individus présentant un rétinoblastome étaient caractérisés par des délétions d'une même région chromosomique. L'analyse détaillée de ce locus a permis de mettre en évidence le gène *rb* codant la protéine dont l'absence est responsable du rétinoblastome, *Rb* (Goodrich and Lee 1990). *Rb* est inactivé dans différentes tumeurs humaines; il est alors qualifié de gène suppresseur de tumeur.

Selon les fonctions des gènes suppresseurs de tumeurs on peut distinguer deux types. La première est celle de gardien de l'intégrité du matériel génétique ou *caretakers*. La pénétrance de ces gènes est assez faible, car elle doit être suivie de trois autres événements pour aboutir à un cancer: mutation de l'autre allèle, complétant le déficit du système de réparation (ou encore absence de cet allèle), puis mutation du gène d'arrêt ou *gatekeeper*: *p53*, *pten*, *pRb*,

APC, NF1, qui empêchent la progression dans le cycle cellulaire s'ils n'ont pas l'information correcte des gènes *caretakers*.

II. Le cas du gène p53:

II.1. Historique:

La protéine P53 a été découverte pour la première fois en 1979 en tant qu'antigène spécifique de certains sarcomes induits chimiquement dans les souris (DeLeo, Jay et al. 1979). Elle a été également trouvée dans les cellules cancéreuses ou transformées par certains virus (Lane and Crawford 1979; Linzer, Maltzman et al. 1979) et surtout complexée à l'antigène Large-T du SV40 (Harlow, Pim et al. 1981; Oren, Maltzman et al. 1981). P53 a aussi été trouvée dans les cellules transformées par des agents chimiques et dans les cellules tumorales (Crawford, Pim et al. 1981). Son expression est également augmentée dans le cas de stimulation de la prolifération. Dans un premier temps elle a été considérée comme un proto-oncogène. C'est en 1989 que p53 a été identifiée comme suppresseur de tumeur suite à l'observation de la perte de son activité dans de nombreuses tumeurs humaines (Nigro, Baker et al. 1989; Hollstein, Sidransky et al. 1991; Hollstein, Marion et al. 1994) et murines.

La protéine P53 est présente dans toutes les cellules de l'organisme, elle est activée lorsqu'une cellule subit un stress oncogénique ou génotoxique, elle est susceptible d'induire des réponses antiprolifératives comme l'arrêt de sa croissance, son entrée en sénescence voire sa destruction, par activation de la transcription de ses gènes cibles. Elle est fortement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose.

II.2. P53 un Gatekeeper:

Dans de nombreuses tumeurs humaines et murines, p53 est muté ou délété, ce qui altère sa fonction. Les premières mutations de p53 chez les humains ont été mises en évidence en 1989 dans des cellules de cancers colorectaux et bronchiques (Baker, Fearon et al. 1989; Bodmer, Cottrell et al. 1989; Nigro, Baker et al. 1989). Les souris n'exprimant pas p53 bien qu'elles

étaient viables étaient prédisposées aux multiples cancers incluant sarcomes et lymphomes (Donehower, Harvey et al. 1992). Les mutations constitutionnelles de p53 sont à l'origine du syndrome familial rare de Li-Fraumeni (Srivastava, Zou et al. 1990), représentant une prédisposition génétique pour un large spectre de cancers principalement des sarcomes, cancer du sein, leucémie et lymphome parmi les membres d'une même famille (Malkin, Li et al. 1990).

La fonction de P53 est d'assurer et maintenir l'ordre dans les cellules, elle est exprimée dans toutes les cellules normales et maintenue inactive, son niveau d'expression reste faible par son association avec l'oncoprotéine MDM2 qui provoque son transport du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par la voie dépendante de l'ubiquitine (Momand, Zambetti et al. 1992).

La forme native de P53 est stabilisée et activée lorsque les cellules subissent un stress métabolique ou génétique telles que l'hypoxie, l'activation des oncogènes. L'activation de P53 dépend du type cellulaire et du type de stress et conduit à l'inhibition du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, inhibition de l'angiogenèse et des métastases, différenciation, sénescence, induction de l'apoptose et peut être d'autres réponses cellulaires encore inconnues à l'heure actuelle (May and May 1999; Vousden 2002). L'arrêt du cycle cellulaire et l'induction d'apoptose sont les deux mécanismes les plus étudiés. L'une des premières fonctions moléculaire de p53 est sa capacité à lier l'ADN par son domaine central, elle agit ainsi comme un facteur de transcription et régule directement ou indirectement l'expression de nombreux gènes *in vitro* et *in vivo*.

Une fois liée au polypeptide GAL4, P53 agit comme un activateur de transcription (Fields and Jang 1990). Cette découverte innovatrice est à la base de l'identification de la fonction majeure de P53 dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles. Un certains nombre de cibles de P53 participant à différents processus cellulaire ont été identifiées, leur

action détermine le destin des cellules, arrêt du cycle cellulaire ou apoptose. Des études récentes montrent que P53 induit l'apoptose directement au niveau de la mitochondrie.

II.3. Structure de la protéine P53

Le gène p53 est situé sur le bras court du chromosome 17 en position p13.1. Il est composé de 11 exons le premier étant non codant. Son produit est une phosphoprotéine oligomérique nucléaire de 393 acides aminés (Somasundaram 2000) et un poids moléculaire de 53 kDa. L'expression de P53 est constitutive et ubiquitaire et sa régulation fonctionnelle est essentiellement post-traductionnelle. Son organisation en domaines fonctionnels est caractéristique de celle d'un facteur de transcription (Figure 2).

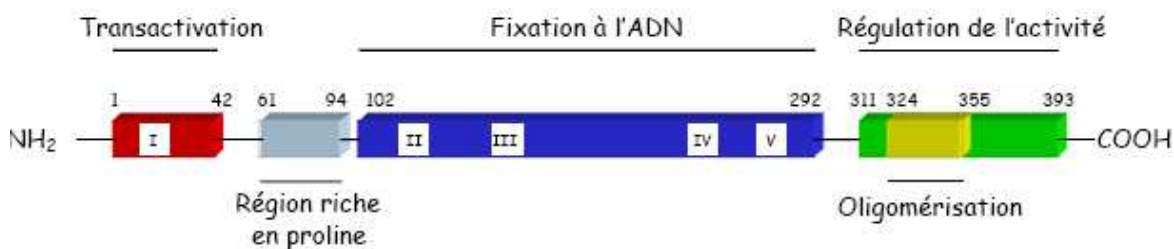


Figure 2: Représentation schématique des trois domaines structuraux de la protéine P53.

La protéine p53 comporte 393 acides aminés. La partie N-terminale constituée des 100 premiers acides aminés fortement acide. Cette zone renferme le domaine de transactivation ainsi que le site de fixation à MDM2. La partie centrale constituée des résidus 102 à 292 et formant un domaine structural capable de lier spécifiquement une séquence d'ADN. La partie C-terminale, chargée positivement et constituée par les acides amines 300 à 393. Ce domaine renferme le domaine de tétramérisation de la protéine (résidus 324 à 355), les signaux de localisation nucléaires de P53 et un domaine de régulation négative de l'activité de fixation spécifique à l'ADN (résidus 368 à 393). Les résidus 316 à 324, 370 à 376 et 380 à 386 correspondent à une séquence de localisation nucléaire (NLS). Les résidus 11 à 24 et 340 à 351 correspondent à des séquences d'exportation nucléaire (NES). La protéine p53 possède 5 régions très conservées (I, II, III, IV, V).

La région N-terminale comprenant le domaine de transactivation nécessaire pour la fonction d'activation transcriptionnelle de gènes cibles, responsable de l'interaction de P53 avec différents facteurs impliqués dans la transcription (TBP, TAF1 et TFIID) (Lu and Levine 1995) ainsi qu'une région riche en résidus proline qui est nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'induction de l'apoptose par P53 (Venot, Maratrat et al. 1998).

La région centrale requise pour la fixation spécifique de P53 à l'ADN. La fixation spécifique de P53 à l'ADN est nécessaire à sa fonction onco-suppressive. Elle inclut les 4 régions conservées (Soussi, Caron de Fromentel et al. 1990; May and May 1999).

La région C-terminal comprend le domaine de tétramérisation qui facilite la fixation spécifique de P53 ainsi qu'un domaine basique qui participe à la régulation négative de P53. Elle est donc impliquée dans l'apoptose, la régulation de la transcription ainsi que la reconnaissance des dommages causés à l'ADN (Wang and Prives 1995; Wang, Vermeulen et al. 1996). La présence de trois séquences de localisation nucléaire (NLS: Nuclear Localisation Signal) au niveau de la région C-terminal et des séquences d'exportation vers le cytoplasme (NES, Nuclear Export Signal), permettent la régulation de localisation subcellulaire de P53 (Dang and Lee 1989).

II.4. Régulation de P53

Dans les cellules stressées, P53 est surexprimée et peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'induction de l'apoptose, selon le type cellulaire, les signaux extracellulaires et ou le niveau d'expression de P53. P53 est hautement régulée au niveau post-traductionnel par des modifications covalentes. Les modifications post-traductionnelles de P53 incluent phosphorylation, acétylation, ubiquitination, glycosylation et sumoylation (Figure 3).

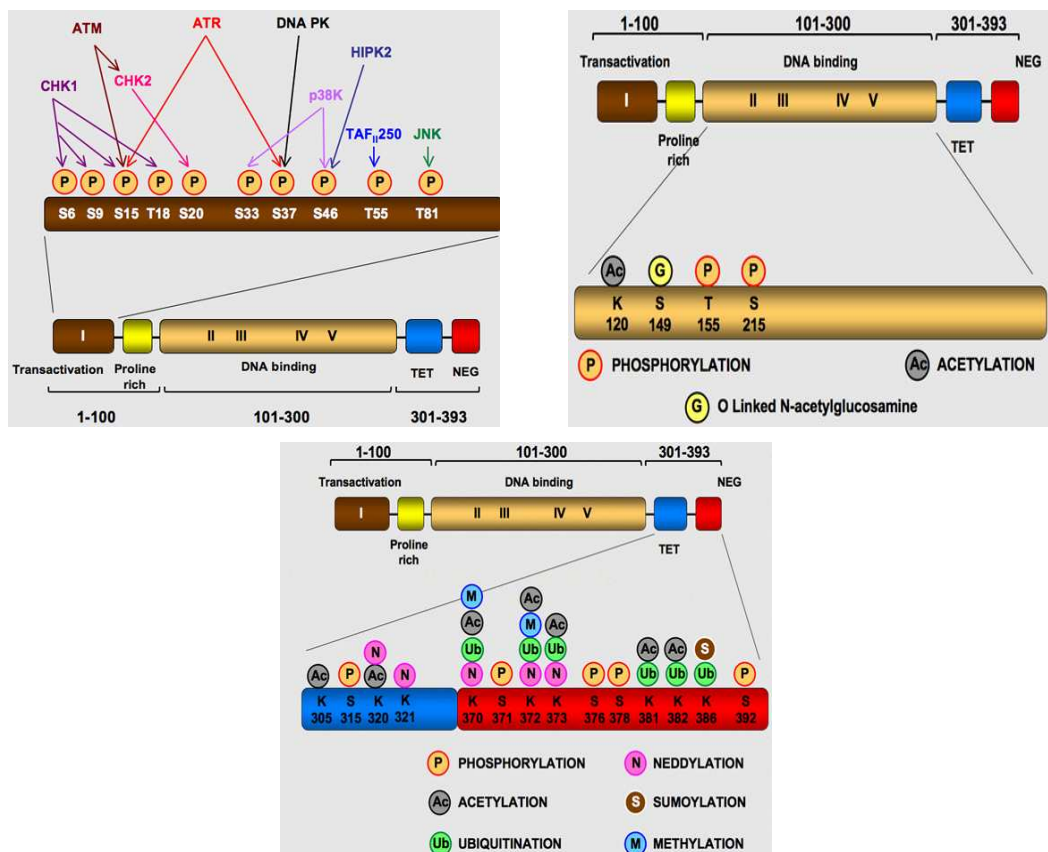


Figure 3: Modifications post-traductionnelles au niveau des différents domaines de P53.

Représentation schématique de la protéine p53 et les résidus spécifiques qui sont sujets aux modifications post-traductionnelles. P: phosphorylation, Ac: acétylation, S: sumoylation, M: méthylation, Ub: ubiquitination, N: neddylation. La localisation des sites de modifications post-traductionnelles est indiquée. Les chiffres se rapportent aux résidus acides aminés. S: sérine et K: lysine

II.4.1. Phosphorylation de P53

La phosphorylation de P53 peut être assurée par de nombreuses kinases (ATM, ATR, CDK1, CHK1+, CHK2+, DNA-PK, P38, etc.) (Bischoff, Friedman et al. 1990; Hall, Campbell et al. 1996; Woo, McLure et al. 1998) (Figure 3). Cette modification a pour effet d'accroître l'efficacité de P53 en tant que facteur de transcription en augmentant son affinité pour les gènes codant pour les protéines telles que Bax ou P21 qui contrôlent respectivement

l'apoptose et le cycle cellulaire, et stabilisent la protéine P53 en empêchant son ubiquitination par MDM2.

II.4.2. Acétylation de P53:

Les dommages de l'ADN induisent la phosphorylation de P53 sur N-terminal favorisant son association avec les protéines de type histone acétyltransférase p300/CBP (*Creb Binding Protein*), ce qui va augmenter son acétylation et son activité (Lambert, Kashanchi et al. 1998; Sakaguchi, Herrera et al. 1998; Barlev, Liu et al. 2001). L'acétylation permet d'augmenter l'affinité de P53 à l'ADN. D'autres modifications peuvent réguler l'activité de P53 incluant la méthylation par les méthyltransférases comme Set9 (Chuikov, Kurash et al. 2004). Set9 méthyle P53 au niveau du résidu Lysine 372, stabilise et active P53 et la confine au niveau du noyau ce qui entraîne une induction d'apoptose.

II.4.3. Ubiquitination de P53

P53 peut être ubiquitinée, ce qui entraîne sa translocation du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par la voie du protéasome.

II.4.4. Les autres modifications de P53

P53 peut également être sumoylée, ribosylée, neddylée et O-glycosylée.

II.4.5. Interaction de P53 –MDM2

MDM2, joue un rôle central dans la régulation de P53. Il a été montré que MDM2 se lie de façon spécifique à l'extrémité N-terminal (résidus 17 à 27) de P53, partie qui contient différents sites de phosphorylation, cette interaction bloque le domaine de transactivation de

la P53, inhibe son activité transcriptionnelle et induit sa dégradation (Chen, Marechal et al. 1993; Oliner, Pietenpol et al. 1993). MDM2 est une E3 ligase nécessaire à l'ubiquitination de ses substrats. MDM2 se lie à la protéine P53 dans le noyau et la déplace au niveau du cytoplasme où elle sera dégradée par le protéasome (Gottifredi and Prives 2001) (Figure 4). Le promoteur du gène MDM2 contient un domaine de liaison à la protéine P53 et elle est transcrite de manière P53 dépendante (Barak, Juven et al. 1993; Perry, Piette et al. 1993). Cependant, un niveau d'expression élevé de MDM2 due à une forte activité de P53 génère une boucle d'auto-régulation =turnover rapide afin de retrouver un niveau d'expression normal de P53 dans les cellules (Haupt, Maya et al. 1997; Kubbutat, Jones et al. 1997).

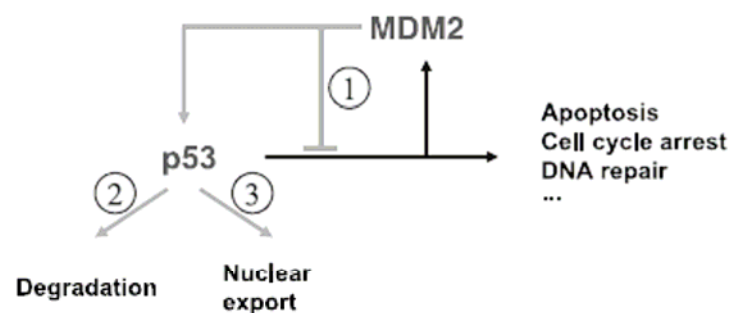


Figure 4: Régulation de P53 par MDM2. MDM2 régule P53 par trois voies différentes.

MDM2 se lie au domaine de transactivation de P53 et inhibe son activité transcriptionnelle (1), augmente la dégradation de P53 (2) et favorise l'export de P53 vers le noyau (3). En présence de MDM2, P53 est inactive et ne peut plus stimuler l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Dans les tumeurs qui surexprime MDM2, P53 est constitutivement inhibée et la croissance tumorale est favorisée. L'inactivation de MDM2 dans ces tumeurs active P53 et induit l'apoptose.

II.5. Localisation cellulaire

L'import-export de P53 est un processus actif. La localisation nucléaire de P53 est nécessaire à sa fonction régulatrice de transcription. P53 contient 3 séquences de localisation nucléaire (NLS), qui la transportent vers le noyau après activation. L'export nucléaire de P53 est dû à deux séquences d'export nucléaire (NES) (O'Brate and Giannakakou 2003). Le transport nucléaire de P53 nécessite la fonction ubiquitine ligase de MDM2 (Boyd, Tsai et al. 2000; Geyer, Yu et al. 2000). L'export nucléaire de P53 est nécessaire à sa dégradation (Freedman and Levine 1998). D'autres protéines régulent directement ou indirectement l'import-export nucléaire de P53 telles que PI3K, P14ARF, actine, mot2, vimentine et importine α (O'Brate and Giannakakou 2003).

II.6. Les fonctions de P53

La protéine P53 est localisée au niveau du cytoplasme dans les conditions normales, elle se déplace du cytoplasme vers le noyau lors de la transition G1/S et y reste jusqu'à la phase G2. Le cycle cellulaire est régulé par plusieurs protéines tels que des kinases cycline-dépendantes des cyclines (CDKs) et des inhibiteurs des CDK. La succession normale des différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par les *checkpoints* qui bloquent la progression du cycle cellulaire dans le cas où les cellules subissent des dommages au niveau de l'ADN. P53 active les points de contrôle au niveau des phases G1/S et G2/M suite à un stress physiologique.

II.6.1. Arrêt du cycle cellulaire

II.6.1.1. Arrêt du cycle cellulaire en phase G1

P21, est un gène qui induit l'inhibition du cycle cellulaire par P53 au niveau de G1 et G2, en inhibant respectivement les complexes cycline E/CDK2 et la cycline B/CDK1 (Kastan, Onyekwere et al. 1991; Agarwal, Agarwal et al. 1995; Bunz, Dutriaux et al. 1998). CDK1 (appelée aussi cdc2) est nécessaire à l'entrée des cellules en mitose (Azzam, de Toledo et al. 1997), elle est inhibée par P21. P21 est aussi impliquée dans la voie de signalisation du suppresseur de tumeur RB. La protéine RB est inactivée par hyperphosphorylation par cycline /CDKs durant la succession des différentes étapes du cycle cellulaire. L'induction de p21 entraîne l'inhibition de la cycline E/CDK2 causant l'hypophosphorylation de RB, ce dernier se lie à l'E2F et inhibe la transcription des gènes du cycle cellulaire contrôlé par E2F (Stewart, Soria et al. 2001).

II.6.1.2. Arrêt du cycle cellulaire en phase G2

P53 et ses gènes cibles ne sont pas impliqués uniquement dans l'arrêt du cycle en phase G1 mais semblent impliqués dans tous les points de contrôle du cycle cellulaire.

Plusieurs travaux récents montrent que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 après survenue des lésions génotoxiques est véritablement dépendant de P53. Le facteur clé pour cette transition G2/M est le complexe CDK1-cycline B1. Ce complexe cytoplasmique ne rentre dans le noyau qu'au moment de la mitose. Le gène 14-3-3 σ , transactivé par P53, est capable de séquestrer ce complexe CDK1-cycline B1 dans le cytoplasme pour provoquer un arrêt de la division cellulaire en phase G2. Des cellules dans lesquelles les deux copies du gène 14-3-3 σ ont été inactivées ne sont plus capables d'induire cet arrêt de la division cellulaire.

L'irradiation de ces cellules induit une mitose anormale qui conduit à leur mort par des mécanismes qui ne sont pas apoptotiques.

Un second gène transactivé par P53, GADD45A, est également important pour le contrôle de la transition G2/M. L'inactivation de ce gène chez des souris conduit à un phénotype très proche de celui des souris p53^{-/-}. Les cellules de ces souris GADD45A^{-/-} présentent une forte aneuploïdie et de nombreuses anomalies chromosomiques et ne sont plus capables de s'arrêter en phase G2 en réponse à des stress induit par irradiation.

II.6.2. Apoptose

Le rôle de la protéine P53 n'est pas aussi clair dans l'apoptose que dans l'arrêt du cycle cellulaire. Cela est dû à l'hétérogénéité de cette fonction apoptotique. Il y aurait deux voies, l'une passant par l'activité de transactivation de la protéine et l'autre utilisant un mécanisme indépendant de la transcription. Pour la voie dépendante de la transcription, plusieurs gènes ont été identifiés. Il s'agit de Bax, IGF-BP3 et PIG3. Les mécanismes de l'apoptose indépendante de la transcription, induite par P53, ne sont pas connus. Ceux-ci impliqueraient des interactions protéine-protéine. La protéine 53BP2, qui interagit de façon compétitive avec P53 et Bcl2, est une bonne candidate. Il est également intéressant de noter que de faibles quantités de P53 sont capables de protéger les cellules de l'apoptose.

II.6.2.1. Signalisation extracellulaire

Les initiateurs de cette voie sont les récepteurs transmembranaires et leurs ligands respectifs. La formation de DISC incluant récepteur ligand, molécules adaptatrices et caspase 8 activent les caspases effectrices. Les récepteurs cellulaires Fas ou CD95 sont des clés de l'induction de ses voies de signalisation qui sont activées par la liaison du ligand, FasL. Fas est une cible de P53, elle est activée transcriptionnellement suite à des dommages induits au niveau de l'ADN (Muller, Wilder et al. 1998). Le domaine de mort qui contient le récepteurs DR5/KILLER de

la famille TRAIL est aussi une cible de P53 dans les cellules ayant subi des dommages au niveau de l'ADN induisant l'apoptose dans différents tissus (Wu, Burns et al. 1997; Burns, Bernhard et al. 2001). La troisième protéine transmembranaire induite par P53 en réponse à des dommages de l'ADN est la PERP qui induit l'apoptose probablement en collaboration avec E2F1 (Attardi, Reczek et al. 2000).

II.6.2.2. Signalisation intracellulaire

Cette voie est régulée par des protéines pro- et anti-apoptotiques. Les protéines de la famille Bcl2 sont impliquées dans la dépolarisation mitochondriale, le relargage du cytochrome C vers le cytoplasme, la formation de l'apoptosome, et l'activation des caspases (Nicholson and Thornberry 2003). Les protéines de la famille Bcl-2 contiennent 3 sous classes: les protéines de survie avec une grande homologie au Bcl2, BclXL par exemple; les protéines pro-apoptotique Bax et Bak présentant des similarités structurales avec Bcl-2 et « BH3 » protéine pro-apoptotique, PUMA. Le domaine BH3 est un domaine nécessaire à l'activité pro-apoptotique, à l'hétérodimérisation et il est présent dans toutes les protéines (Kelekar and Thompson 1998; Cory and Adams 2002).

Les différentes protéines des trois groupes sont ciblées par P53. Bax est l'un des premiers gènes identifiés de la famille de Bcl-2, il est activé par P53 en réponse aux stress cellulaires (Miyashita and Reed 1995). Après induction de Bax, P53 change de conformation, forme un homodimère et elle est transloquée au niveau de la membrane mitochondriale où elle active le relargage du cytochrome C, ce qui entraîne l'activation de la caspase-9 (Adams and Cory 1998). Chez les souris déficientes en Bax, la croissance tumorale est accélérée et une diminution de l'induction de l'apoptose induite par P53 est constatée (Yin, Knudson et al. 1997). Bax peut aussi induire la suppression de tumeurs indépendamment de la voie P53 (Degenhardt, Chen et al. 2002).

Puma est une protéine médiatrice de la mort cellulaire, elle est régulée positivement par P53 en réponse à différents types de stress (Nakano and Vousden 2001; Jeffers, Parganas et al. 2003; Yu, Wang et al. 2003). PUMA est nécessaire à l'induction de l'apoptose par Bax, il a été montré qu'elle active la translocation et l'oligomérisation de Bax, ce qui va induire l'apoptose cependant les cellules déficiente en Bax sont résistante à l'apoptose induite par PUMA.

II.6.3. P53 et autophagie:

La protéine P53 ne contrôle pas uniquement la division cellulaire, et l'apoptose. Elle peut aussi agir directement ou indirectement sur l'autophagie. Elle active le gène *Dram+* (la protéine issue de ce gène est localisée au niveau de la membrane des lysosomes, elle est impliquée dans la fusion des lysosomes et les autophagosomes). Il a été montré que l'inhibition du gène *dram* par ARN interférence, inhibe l'autophagie. P53 inhibe la synthèse du récepteur de l'IGF1, ce qui tend à bloquer la voie de PI3/AKT et inhiber l'autophagie par inhibition de mTOR.

II.6.4. P53 et métabolisme:

La protéine P53 peut influencer le métabolisme énergétique des cellules. P53 ralentit la dégradation du glucose en stimulant l'activité du gène *tigar+* qui bloque la glycolyse en inhibant une enzyme clé de cette voie métabolique (Green and Chipuk 2006). P53 stimule la respiration en activant le gène *sco2+*. En inhibant la glycolyse, la protéine P53 favorise la dégradation du glucose ce qui accroît la concentration intracellulaire de glutathion réduit, utilisé par les cellules pour éliminer les radicaux oxydants par la glutathion peroxydase. La protéine P53 pourrait contribuer à protéger l'ADN contre les agressions de ces radicaux.

II.6.5. P53 et métabolisme:

La P53 pourrait avoir un effet sur la recombinaison, la reproduction (Hu, Feng et al. 2007), l'angiogenèse, la sénescence et la différenciation. Elle est capable de se lier aux protéines RAD51 et EAD 54 ce qui entraîne l'inhibition de la recombinaison homologue. Il a été observé que les femmes ayant un codon proline en position 72 à la place de l'arginine ont des problèmes d'implantation dans des embryons. P53 peut aussi être impliquée dans la réparation de l'ADN, en interagissant avec les protéines DNA-polymérase, RPA et XPD

II.7. Le choix de la réponse de P53: l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose ?

Plusieurs facteurs semblent intervenir dans ce choix: l'importance des lésions de l'ADN, le niveau d'expression de P53 induit, le type cellulaire ou l'altération d'autres oncogènes. Après exposition des cellules à un stress génotoxique le niveau d'expression de P53 augmente, et il est accompagné de son activation suite à des modifications post-traductionnelles. Cette induction peut conduire soit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 afin de donner le temps à l'ADN cellulaire d'être réparé avant de rentrer en phase S soit à l'apoptose dans le but d'éliminer les cellules contenant une altération génétique.

II.8. Le gène P53 et le cancer: mutation et conséquences

P53 est muté dans 50% des cancers sporadiques (Figure 5), dans la moitié des cas sa fonction est inhibée par des antagonistes oncogènes tels que MDM2 (Momand, Zambetti et al. 1992; Soussi and Beroud 2001). Les mutations de P53 sont identifiées sur tous les exons avec une prédominance dans le domaine de liaison à l'ADN. P53 est mutée dans un large spectre de cancers.

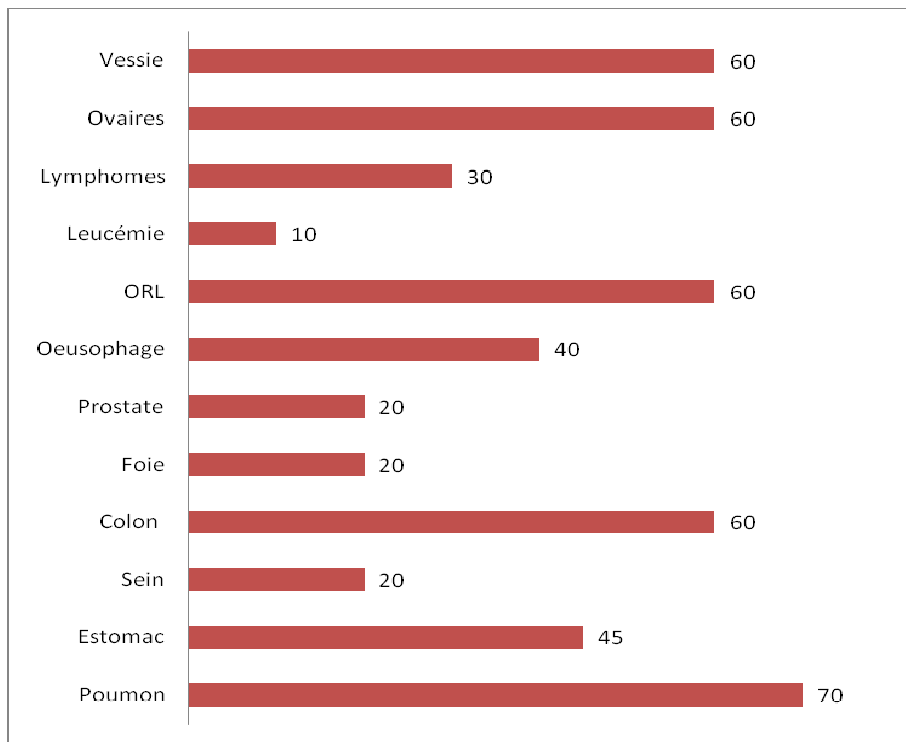


Figure 5: Le pourcentage des mutations de p53 par type d'organe.

Contrairement aux autres gènes suppresseurs de tumeurs qui sont inactivés par troncation ou délétion, plus de 80% des altérations de P53 sont dues à des mutations faux-sens qui stabilisent le niveau d'expression de p53 (Soussi and Lozano 2005).

90% des mutations sont regroupées dans le domaine central (résidus 110 à 290) de P53 ciblant la séquence spécifique de liaison à l'ADN entraînant l'inhibition de son activité transcriptionnelle (Bullock and Fersht 2001). Environ 30% de mutations concernent les 6 codons R175, R245, R248, R249, R273 et R282. Dans les hépatocarcinomes, plus de 80% des mutations sont regroupées au niveau du codon 249. On peut distinguer deux types de mutations de p53:

- Les mutations du groupe I: exemple du codon R248, la plupart des mutations affectent le domaine de liaison à l'ADN mais la conformation reste intacte (Ory, Legros et al. 1994).

- Les mutations du groupe II: exemple du codon R175, la mutation touche les résidus de la protéine interagissant avec l'ADN, la mutation est localisée en dehors du domaine de liaison à l'ADN, incluant les domaines de transactivation et d'oligomérisation (Soussi and Beroud 2001).

II.8.1. Quelles sont les conséquences cliniques de ces mutations ?

Selon plusieurs études, ces mutations sont associées à un mauvais pronostic et à une mauvaise réponse au traitement. A titre d'exemple, les patients qui ont un cancer de colon avec une mutation de p53 au niveau du codon 175 ont une survie plus courte que celle des patients avec d'autres types de mutations. Les patientes ayant un cancer du sein avec des mutations au niveau du site de liaison à l'ADN ont également un pauvre pronostic plus défavorable que celui des patientes avec des mutations structurales.

Le gène p53 ne contient qu'un seul polymorphisme qui se définit au niveau du codon 72. Dans la population normale, ce codon peut-être soit une arginine, soit une proline. Il existe alors 3 types de génotypes dans la population: les personnes qui sont homozygotes avec un codon arginine ou un codon proline sur chacun des deux allèles et les personnes qui sont hétérozygotes avec un codon arginine sur un allèle et un codon proline sur le second allèle. Il a été montré que la P53 avec un résidu arginine au niveau du codon 72 est plus efficace que la protéine p53 avec un résidu proline au niveau du codon 72 au niveau de l'induction de l'apoptose et qu'elle est plus sensible à la dégradation par la protéine E6 de l'HPV ce qui favorise la croissance des tumeurs contaminées à l'HPV, exemple du cancer cervical.

II.9. Stratégies thérapeutiques liées à P53.

L'inactivation de P53 est indispensable à la croissance des tumeurs, cela fait de P53 une cible thérapeutique attractive dans la thérapie du cancer. *In vivo*, des études ont montré que la restauration de la fonctionnalité de P53 entraîne à elle seule la régression tumorale dans divers modèles de xénogreffes confirmant l'intérêt du ciblage de P53 dans les cancers (Dolivet, Merlin et al. 2002; Martins, Brown-Swigart et al. 2006; Ndoeye, Dolivet et al. 2006; Ventura, Kirsch et al. 2007).

Plusieurs thérapies ont été développées incluant thérapie génique, réactivation des mutants p53 et inhibition de l'interaction P53-MDM2 (Figure 6).

II.9.1. Thérapie génique

La thérapie génique est une technique appliquée à diverses maladies génétique, en particulier dans le traitement du cancer. Le gène p53 est muté chez 50% des cancers. Différentes stratégies ont été développées afin de délivrer efficacement p53 au tissu cible telles que le Adp53 et ONYX-015. Adp53 est un adénovirus contenant une copie intacte de c-DNA du gène p53 (Wiman 2007). Le traitement des patients avec un cancer des voies aérodigestives supérieures par Adp53 montre un effet clinique chez 50% des patients. Il est en phase III aux USA (Clayman, el-Naggar et al. 1998). Plusieurs gènes activateurs des tumeurs tels que les VEGF, MMP et MDR diminuent l'efficacité du transfert du gène p53 par Adp53 (Haupt and Haupt 2006). ONYX-015 est un adénovirus capable de se répliquer et de lyser les cellules tumorales n'exprimant pas P53 (Bischoff, Kirn et al. 1996). *In vivo*, il a été montré que l'administration systémique d'ONYX-015 permet un effet anti-tumoral, cet effet est potentialisé par la combinaison de la chimiothérapie (Heise, Sampson-Johannes et al. 1997).

II.9.2. Inhibition de MDM2

Dans les tumeurs non porteuses de mutations, P53 est inhibée par d'autres mécanismes. L'un des mécanismes est la surexpression de MDM2 qui cible P53 de façon constitutive. L'une des approches utilisées pour stabiliser le niveau d'expression de P53 est de bloquer l'interaction MDM2-P53. Plusieurs petites molécules capables d'inhiber cette interaction ont été développées, comme la Nutlin-1. Cette molécule se lie au domaine N-terminal de P53 et inhibe l'interaction MDM2-P53. *In vitro*, une étude a montré son efficacité à restaurer l'activité de BAX et l'induction de l'apoptose au niveau des mitochondries des cellules AML (P53 inhibée par la surexpression de MDM2). Nutlin-1 agit de façon synergique avec l'antagoniste de Bcl2, ABT-737 induisant l'activation de l'apoptose P53 dépendante (Kojima, Konopleva et al. 2006). RITA[®] est aussi une molécule capable d'inhiber l'interaction MDM2-P53 et restaurer l'induction de l'apoptose P53 dépendante (Issaeva, Bozko et al. 2004). *In vivo*, le traitement par RITA permet de restaurer l'inhibition de la croissance des tumeurs et les protéines cibles de P53 telles que GADD45 et PUMA sont induites suite au traitement par RITA[®].

II.9.3. Réactivation du mutant de p53

Les mutations faux-sens affectent le site de fixation à l'ADN entraînant la perturbation (activation/inactivation) d'un certain nombre de gènes cibles de P53. Plusieurs petites molécules sont capables de restaurer la fonction des mutants p53. Ces molécules ont été identifiées par screening de nombreuses molécules chimiques de faible poids moléculaire, comme pour exemple, PRIMA-1. Le traitement des cellules tumorales présentant des mutations du gène p53 (exemple: R175H) par PRIMA-1 induit efficacement l'apoptose (Bykov, Issaeva et al. 2002). La conformation de P53 est modifiée par PRIMA-1 dans les cellules et permet de réactiver la transcription de certaines cibles telles que PUMA et P21.

L'administration systémique de PRIMA-1 entraîne une inhibition de la croissance tumorale de xénogreffes sans toxicité détectée. *In vitro*, d'autres molécules ont montré leur efficacité telle que CB- 313198. Cette molécule réactive p53 en restaurant la liaison du mutant p53 à l'ADN, empêche la dégradation de P53 par MDM2 et augmente l'expression des transcrits entraînant l'induction de l'apoptose (Rippin, Bykov et al. 2002).

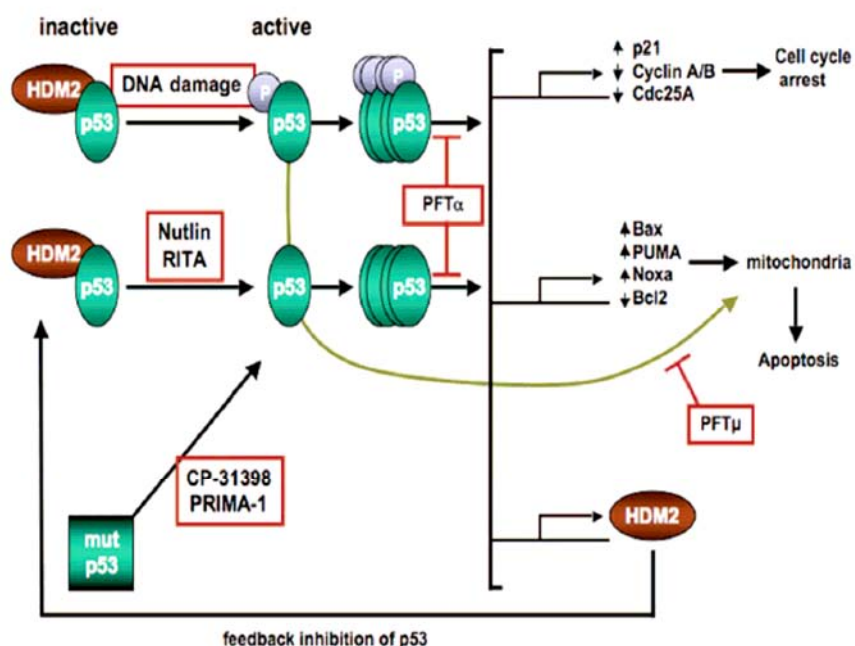


Figure 6: Représentation schématique des stratégies d'activation et ou d'inhibition des voies de signalisation contrôlées par P53.

P53 est normalement ciblée et liée par HDM2 (l'homologue de MDM2 chez l'humain) pour être ensuite dégradée. Les dommages de l'ADN induisent la phosphorylation de P53 entraînant sa dissociation de HDM2 et l'augmentation de sa stabilité. Nutlin et RITA peuvent dissocier P53-HDM2 induisant l'activation de P53 directement sans passer par sa phosphorylation. CP31398 et PRIMA-1 peuvent induire le mutant P53 qui adopte une conformation de P53 sauvage entraînant sa stabilisation. La forme tétramérique de P53 induit la sur-régulation des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la dégradation de P53. P53 inhibe aussi l'expression de nombreux gènes bien que ceci n'implique pas sa tétramérisation ni sa liaison directe à l'ADN. PFTα inhibe la transcription médiée par P53 tandis que PFTμ inhibe l'apoptose induite par la translocation de P53 dans la mitochondrie.

III. Le cas du gène pten

III.1. Découverte

Pten (pour *Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten*) un gène suppresseur de tumeur également appelé MMAC1 (Mutated in multiple advanced cancers) ou encore TEP1 (TGF β - regulated and epithelial cell-enriched phosphatase). Pten a été identifié en 1997 par trois groupes différents: Parson, Steck et Sun (Li and Sun 1997; Li, Yen et al. 1997; Steck, Pershouse et al. 1997). Les trois équipes ont utilisé des stratégies différentes. L'équipe de Sun l'ont identifié comme une nouvelle phosphatase à double spécificité, sa transcription étant modulée par TGF β . Les équipes de Parson et Steck, l'ont identifié comme un gène fréquemment muté ou délété dans divers cancers. Sa fonction de gène suppresseur de tumeur a été confirmée par la suite dans divers modèles, *in vivo* (Di Cristofano, Pesce et al. 1998; Stambolic, Suzuki et al. 1998; Podsypanina, Ellenson et al. 1999; Sun, Lesche et al. 1999). En effet, des mutations ou des délétions de pten sont communes dans divers cancers humains. Pten est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers après p53. En plus des mutations somatiques de pten, des mutations germinales responsable des divers syndromes ont été décrites. La protéine PTEN appartient au groupe des phosphatases à double spécificité capable de déphosphoryler des résidus phosphosérine et phosphothréonine ou phosphotyrosine, et possède une activité phosphoinositide 3-phosphatase (déphosphoryle le PIP3 en PIP2) (Maehama and Dixon 1998). Elle est donc impliquée dans la cascade de signalisation PI3K/AKT. La voie de PI3K/AKT est impliquée dans la survie, la prolifération et la croissance cellulaire, cette voie est perturbée dans presque tous les cancers humains ce qui explique pourquoi pten, le seul régulateur négatif défini de cette voie, est le suppresseur de tumeur dominant. Beaucoup de protéines tyrosine kinases sont des proto-oncogènes ce qui laisse entendre que les phosphatases agissent comme des suppresseurs de tumeur.

III.2. Structure

Pten est situé sur le chromosome 10 en position 10q23, il est constitué de 9 exons et s'étend sur environ 12.10^4 pb (Figure 7). Il code pour une protéine phosphatase de 403 acides aminés.

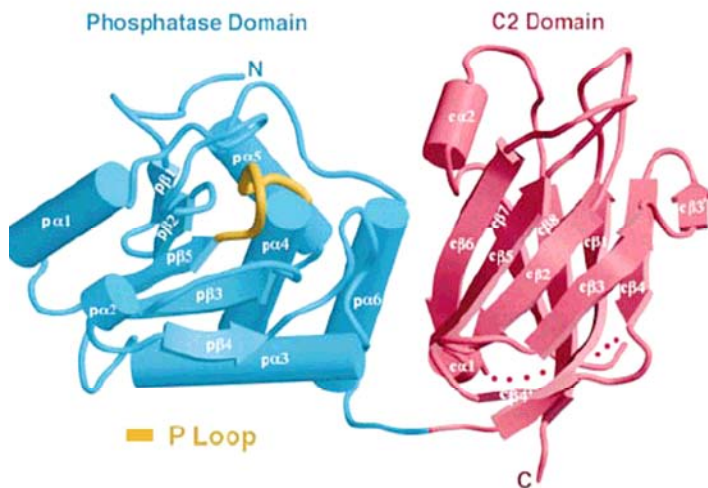


Figure 7: Structure tridimensionnelle des différents domaines de la protéine PTEN.

PTEN possède deux domaines, un domaine N terminal à activité phosphatase relié à un domaine C terminal par une boucle majeure, connectés par une boucle interne flexible.

Le domaine catalytique N-terminal de 179 résidus (résidus 7-185) composé de six hélices α et cinq feuillets β contenant un motif HCXXGXXRS/T présent dans les domaines actifs des protéines tyrosine kinases et des protéines phosphatases à double spécificité mais elle ne présente pas d'autres similarités en dehors de ce motif. PTEN a des homologues de séquences avec la tensine du poulet et l'auxilline des bovins (Li, Yen et al. 1997; Steck, Pershouse et al. 1997), deux protéines du cytosquelette. Elle possède une boucle (résidu 123-130) dont la cystéine 124 et l'arginine 130 sont essentielles pour l'activité catalytique, et l'histidine 123 et la glycine 127 sont importantes pour la conformation de la boucle (Barford, Flint et al. 1994;

Stuckey, Schubert et al. 1994; Hlobilkova, Knillova et al. 2003). Le site actif est un haut point de mutation avec environ 31% de mutations somatiques et constitutionnelles dans l'exon 5 codant le site catalytique (Waite and Eng 2002).

Le domaine C-terminal de 166 résidus (résidus 186-351) appelé C2 composé de deux feuillets β antiparallèles reliés par deux petites hélices α (Lee, Yang et al. 1999). Il existe dans la région terminale du domaine C2 un motif consensus, le *PDZ-binding domain* qui lie des protéines contenant le domaine PDZ. Ce motif est une région importante d'interactions entre protéines (Waite and Eng 2002). Elle contient aussi deux sites de liaison au domaine SH2 de la tyrosine kinase SHP-1, un site de liaison à SH2 de la protéine Crk et un site de liaison à ShC. Il a été montré que la phosphorylation de certains résidus comme les tyrosines 240, 315, 336, la sérine 380, et les thréonine 382 et 383 du *PDZ-binding domain* affecte la stabilité et la fonction de la protéine PTEN (Waite and Eng 2002; Hlobilkova, Knillova et al. 2003). La protéine est phosphorylée de façon constitutive *in vivo* par une protéine caséine kinase (CK2) sur les résidus sérine 370, 380 et 385 et sur le résidu thréonine 383 (Waite and Eng 2002; Hlobilkova, Knillova et al. 2003)

III.3. Les mutations de pten

Dans la majorité des cancers humains, ces altérations génétiques sont somatiques. Les altérations observées consistent essentiellement en mutations non-sens, en mutations faux-sens et en mutations responsables d'une altération du cadre de lecture; comme des délétions, des insertions ou des mutations du site d'épissage, (Marsh, Coulon et al. 1998). Il peut aussi exister des réarrangements chromosomiques, des amplifications géniques et des pertes de chromosomes entiers.

III.3.1. Mutation somatique de pten dans diverses tumeurs humaines

Les gènes impliqués dans les cancers héréditaires sont aussi fréquemment impliqués au niveau somatique. Pten est muté dans divers types de cancers incluant les cancers de prostate (Cairns, Okami et al. 1997; Feilotter, Nagai et al. 1998; Whang, Wu et al. 1998), les mélanomes (Guldberg, thor Straten et al. 1997; Robertson, Furnari et al. 1998) et les lymphomes (Gronbaek, Zeuthen et al. 1998; Nakahara, Nagai et al. 1998; Sakai, Thieblemont et al. 1998). Les mutations somatiques, dans le cas de cancer du sein, sont associées à la progression de la tumeur et non à son initiation (Perren, Weng et al. 1999). Des anomalies structurales de pten sont présentes dans 37% des tumeurs primaires de cancers colorectaux (Nassif, Lobo et al. 2004).

Une analyse détaillée de la nature et de la fréquence des mutations de pten dans divers cancers permet de fournir des informations tissus spécifiques sur les mécanismes génétiques de la cancérogenèse.

III.3.2. Mutations germinales de pten dans divers syndromes et prédisposition aux cancers

Il existe quelques pathologies qui découlent de mutations germinales de PTEN pour lesquelles plus d'une centaine de mutations ont été dénombrées (Figure 8), c'est le cas de la maladie de Cowden ou syndrome des hamartomes multiples ou encore dans le syndrome de Bannayan-Zonana ou le syndrome de Protée. Les individus avec un syndrome de Cowden présente un haut risque de tumeurs bénignes ou malignes de la thyroïde, du sein, de l'endomètre et du système nerveux central. Le risque de développer un cancer du sein est de 25 et 50 % avec un âge de diagnostic entre 38 et 46 ans, un cancer de la thyroïde d'environ 10 %, un cancer de l'endomètre est de 3 à 10 %. Le syndrome de Bannayan-Zonana est caractérisé par un retard

mental, une macrocéphalie, des néoplasmes bénins (polype intestinal,), et des malformations vasculaires (Marsh, Dahia et al. 1997; Longy, Coulon et al. 1998).

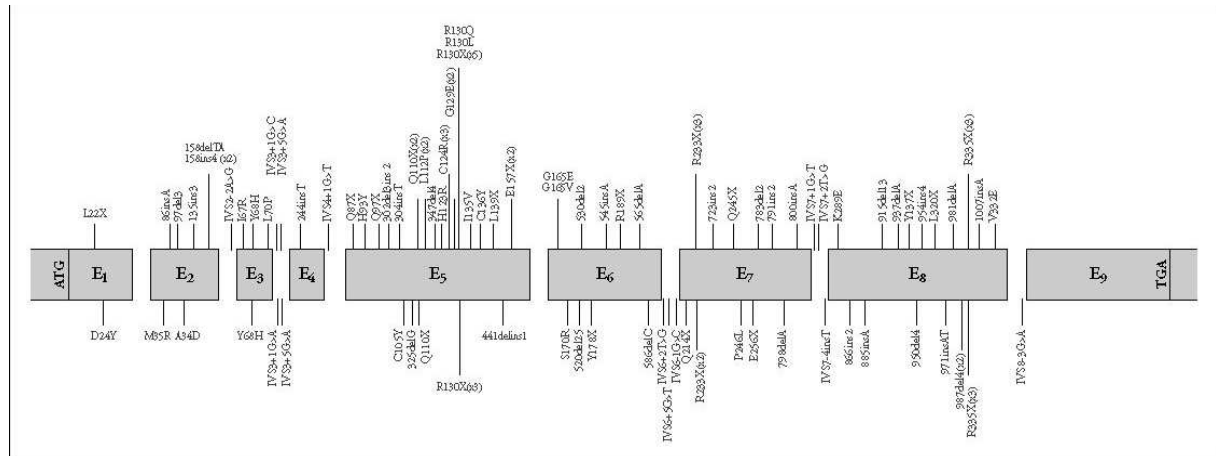


Figure 8: Localisation des mutations germinales de pten.

Au-dessus: les mutations observées dans le syndrome de Cowden, en dessous: les mutations observées dans le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba ou chez les patients avec le syndrome de Cowden ou le syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba dans la même famille.

III.3.3. Autres mécanismes d'inactivation

Pten peut être inactivé par divers mécanismes autre que les mutations somatiques et les mutations germinales. Des mécanismes épigénétiques peuvent être responsable d'une dérégulation de l'expression du gène pten, c'est le cas du cancer de la prostate, certaines leucémies et certains lymphomes. D'autres mécanismes comme le *silencing* ou une erreur de méthylation peuvent également intervenir dans le dysfonctionnement de l'expression du gène pten. La méthylation du promoteur est aussi un mécanisme conduisant à l'innactivation de pten, elle est liée à d'autres facteurs de mauvais pronostic. Dans ces tumeurs, les transcrits

ARNm de *pten* sont aussi plus faiblement exprimés. La diminution de la demi-vie du gène dans certaines lignées cellulaires mutées est également rapportée.

III.3.4. Souris déficientes en PTEN:

Plusieurs études sur des souris *knockout* confirment l'implication de *pten* dans la suppression des tumeurs. Les embryons des souris homozygotes mutés ne sont pas viables. Les souris hétérozygotes sont prédisposées aux tumeurs. Ceci suggère que le *pten* est un gène suppresseur de tumeurs. Les souris chimériques *pten*^{+/-} obtenues par élimination des exons 4-6 développent spontanément des tumeurs de prostate, peau et colon. Chez ces souris *pten*^{+/-} (Exons 4-6) (Di Cristofano, Pesce et al. 1998) il a été montré que *pten* est impliqué dans la résistance à la réponse à des médiateurs FAS par activation de la voie PI3K/AKT (Di Cristofano, Kotsi et al. 1999).

III.4. Régulation de PTEN :

III.4.1 Régulation transcriptionnelle

III.4.1.1. Régulation positive

Plusieurs facteurs de transcription se lient directement au promoteur de *pten* et régulent son expression (Figure 9). Il a été montré que *pten* est activé par EGR1 en réponse au traitement par irradiation (Virolle, Adamson et al. 2001). EGR1 régule positivement *pten* suite au traitement par l'inhibiteur de phosphatase calyculin A et potentialise son effet apoptotique (Okamura, Yoshida et al. 2005). Le niveau d'expression d'EGR1 est fortement corrélé au niveau d'expression de PTEN dans les cancers bronchopulmonaires non à petites cellules, la surexpression des deux protéines étant associée à un mauvais pronostic (Ferraro, Bepler et al.

2005). Pten est régulé par d'autres facteurs. En effet, il a été montré que PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) régule PTEN au niveau transcriptionnel, l'activation de PPAR γ par son ligand sélectif, la rosiglitazone (antidiabétique de la classe des thiazolidinediones) est nécessaire à sa liaison au niveau des deux sites (PPRE1 et PPRE2) du promoteur de pten ce qui entraîne la sur-activation de PTEN dans les cellules normales et les cellules cancéreuses (Patel, Pass et al. 2001). Ceci est accompagné d'une diminution d'expression de phospho-AKT et de la survie cellulaire. Il a été montré que la rosiglitazone augmente l'expression de PTEN et réduit la migration cellulaire dans les cellules de cancer hépatique (Zhang, Wu et al. 2006). Une autre équipe a montré l'inhibition de la croissance des cellules du cancer bronchopulmonaire non à petites cellules traitées par rosiglitazone (Han and Roman 2006).

L'inactivation de PTEN pourrait aussi être associée à celle de P53, il a été montré que P53 peut se lier directement au promoteur de pten et augmenter sa transcription et que la perte de P53 entraîne une diminution de l'expression de PTEN (Wang, 2005). Une étude récente a montré que l'activité proliférative de SPRY2 passe par la régulation de PTEN. La surexpression de SPRY2 augmente l'expression d'ARNm et de la protéine PTEN (mais diminue la phosphorylation de PTEN au niveau des résidus sérine 370 et sérine 385 ainsi que sa stabilité), la capacité de SPRY2 à inhiber la prolifération est par ailleurs abolie dans les cellules pten négatives (Edwin, Singh et al. 2006). Une autre étude a montré que la résistine (cytokine impliquée dans la résistance à l'insuline), augmente l'expression de PTEN par activation de la p38MAPK et ATF2 (activating transcription factor 2) dans les cellules (endothéliales) vasculaires ce qui entraîne une inhibition de l'activité d'AKT et ses cibles ainsi que eNOS (NOS, Nitrous Oxide Systems) (Shen, Zhang et al. 2006). Il a été montré que les phytoœstrogènes comme la génistéine (dans le soja), le résvératrol (dans le vin rouge) et la quercétine (dans les fruits et les végétaux) augmentent l'expression de PTEN, inhibe

l'activation de l'AKT et augmente le niveau d'expression de P27 (Waite, Sinden et al. 2005). Des données épidémiologiques suggèrent que la consommation des phytoestrogènes puissent protéger contre le cancer (Park and Surh 2004; Verheus, van Gils et al. 2007). Le niveau d'expression de PTEN ainsi que l'index apoptotique sont augmentés dans les glandes mammaires des rats nourris avec des protéines de soja ou des aliments riches en génistéine (Dave, Eason et al. 2005). Il a aussi été montré que l'indol-3-carbinol, dérivé phytochimique des crucifères comme les brocolis, augmente l'expression de PTEN dans l'épithélium cervical, dans un modèle de cancer cervical de souris (Qi, Anderson et al. 2005).

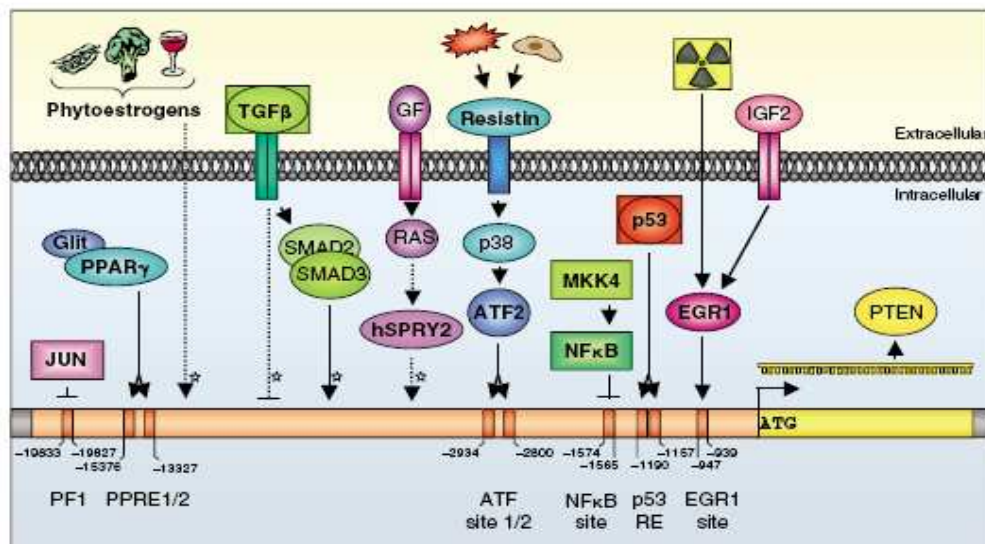


Figure 9: Régulation transcriptionnelle de PTEN.

Illustration des nouvelles voies impliquées dans la régulation de la transcription. Les éléments sous forme ovale représentent les activateurs et les éléments sous forme rectangulaire représentent les répresseurs. JUN inhibe la transcription de pten suite à sa liaison avec AP-1, en amont du site d'initiation de la transcription. L'activation de PPAR γ par son ligand glitazone (Glit), utilisé pour le traitement des diabétiques, augmente le niveau d'expression de pten suite à sa liaison aux deux éléments de réponse (PPREs) au niveau du promoteur de pten. L'augmentation du niveau d'expression de pten par le glitazone a été observée par différents groupes.

Phytoœstrogènes tels que la génistéine, l'indole-3-carbinol et ésveratrol augmentent le niveau d'expression des ARNm de pten et la protéine PTEN. Dans les cellules de cancer de pancréas, TGF β régule positivement la transcription de pten de manière SMAD-dépendante et le contrôle négativement indépendamment de la voie SMAD. La liaison du facteur de croissance (GF) à son récepteur membranaire active hSPRY2 via RAS et augmente le niveau de transcription de pten. Le Resistine, peptide sécrété par des adipocytes et d'autres types cellulaires durant l'inflammation, régule positivement la transcription de pten. Le resistine active la voie de p38 et ATF2 ainsi que la liaison d'ATF2 au promoteur de pten et ses deux sites de liaison à l'ATF. MKK4 inhibe la transcription de PTEN par activation de NF κ B, répresseur transcriptionnelle qui se lie au niveau du promoteur de pten en amont de l'ATG. P53 régule pten positivement au niveau transcriptionnelle et négativement au niveau de la stabilité de la protéine: l'élément de réponse à p53 a été trouvé dans le promoteur de pten, l'induction de P53 entraîne une augmentation des mRNA de pten ainsi que le niveau d'expression de la protéine. PTEN autorégule son propre expression et ceci passe par la stabilisation de P53 et indépendamment de son activité phosphatase. EGR1 se lie au promoteur pten et augmente son expression en réponse à des radiations et IGF2. Les voies marquées par des étoiles signifient qu'il n'y a pas de sites identifiés sur le promoteur de pten et impliqués dans les régulations observées. Les traits continus présentent des interactions directes des protéines avec l'ADN; Les traits discontinus présentent des interactions indirectes.

III.4.1.2. Régulation négative:

Il a été montré que MMK4 (mitogen-activated kinase) active NF κ B (nuclear factor-kappa B), ce qui entraîne sa liaison sur le promoteur de pten et son inhibition au niveau transcriptionnelle (Xia, Srinivas et al. 2007).

TGF β , inhibe la transcription de pten dans les cellules de cancer de pancréas (Chow, Quach et al. 2007) et dans les cellules mésangiales (Mahimainathan, Das et al. 2006). Une corrélation négative entre l'expression du proto-oncogène jun (facteur de transcription) et celle de pten a été trouvée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales (Hettinger, Vikhanskaya et al. 2007). Le proto-oncogène jun se lie au promoteur de pten et entraîne son inhibition.

III.4.2. Régulation post-traductionnelle de PTEN

L'activité de PTEN est hautement régulée par phosphorylation (Figure 10) (Vazquez, Ramaswamy et al. 2000; Okahara, Ikawa et al. 2004; Valiente, Andres-Pons et al. 2005; Maccario, Perera et al. 2007), oxydation (Leslie, Bennett et al. 2003; Kwon, Lee et al. 2004; Connor, Subbaram et al. 2005) (Figure 10), acétylation, et par le contrôle de sa localisation.

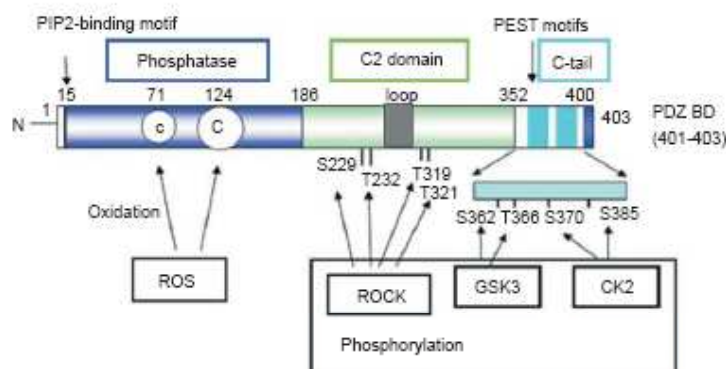


Figure 10: La structure des différents domaines fonctionnels de PTEN et les sites de modifications post-traductionnelles.

Les trois domaines de PTEN, le domaine phosphatase ("*Phosphatase*", résidus 15-186), le domaine C2 ("*C2 domain*", résidus 186 à 351), et le fragment C-terminal ("*C-tail*", résidus 352 à 403). Le domaine de liaison à PIP2 ("*PIP2 binding motif*", résidus 6 à 15), et le motif PEST ("*PEST motifs*", résidus 350 à 375). La boucle ("*Loop*", résidus (286-309) dans le domaine C2. Le domaine PDZ ("*PDZ BD*", résidus 401 à 403) domaine de liaison au PDZ-binding-domain. La figure montre les résidus cystéines au niveau du domaine phosphatase qui peuvent être oxydés par des espèces réactives d'oxygène (ROS), ainsi que les résidus sérine et thréonine qui peuvent être phosphorylés par des kinases correspondantes.

III.4.2.1. Oxydation

PTEN peut être inhibée par des espèces réactives d'oxygène (ROS) suite à l'oxydation de la cystéine 124 et la formation d'un pont disulfure avec la cystéine 71. Une étude *in vitro* sur des

lignées cellulaires de neuroblastome, a montré que la génération des ROS et l'inactivation de PTEN sont nécessaires à l'activation d'AKT par l'insuline (Seo, Ahn et al. 2005).

III.4.2.2. Acétylation

L'acétylation est un autre mécanisme régulateur de PTEN (Okamura, Iwata et al. 2006). PCAF acétyle PTEN au niveau des lysines 125 et 128 en réponse à plusieurs facteurs de croissance. Ces résidus sont localisés au niveau de la région catalytique de PTEN et sont essentiels à sa spécificité pour PI3K. PCAF est un régulateur négatif de PTEN.

III.4.2.3. Phosphorylation

PTEN est régulée par phosphorylation des résidus sérine et thréonine du domaine C-terminal. La phosphorylation de ces résidus n'est pas nécessaire à son activation mais à sa stabilisation. La substitution de ses résidus de phosphorylation par l'alanine augmente l'activité catalytique ainsi que la dégradation de PTEN.

CK2 est impliquée dans la phosphorylation de nombreux résidus sérine ou thréonine de la partie C terminale de PTEN, mais elle n'est pas seule. GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) participe aussi à cette phosphorylation (Al-Khoury, Ma et al. 2005). CK2 phosphoryle les résidus sérine 370 et sérine 385 tandis que GSK3 β cible la sérine 362 et la thréonine 366 (Torres and Pulido 2001). Aucune des deux protéines ne peut phosphoryler la sérine 380 de PTEN, c'est GLTSCR2 appelé aussi PICT1 (Protein Interacting with Carboxyl Terminus 1) qui est capable de phosphoryler la sérine 380 et entraîner une augmentation de PTEN (Okahara, Itoh et al. 2006; Yim, Kim et al. 2007). L'altération de PICT-1 entraînerait une instabilité de PTEN conduisant à un processus de cancérisation.

ROCK est capable de phosphoryler PTEN sur les résidus sérine 229, thréonine 232, 319 et 321 du domaine qui entraîne son activation (Li, Dong et al. 2005).

Il a été montré que la sous-unité catalytique de PI3K inactive PTEN à travers la voie impliquant RohA/ROCK et augmente la phosphorylation du résidu tyrosine de PTEN (Papakonstanti, Ridley et al. 2007).

III.4.2.4. Neddylation

Le niveau d'expression de NEDD4-1 est inversement corrélé au niveau d'expression de PTEN dans des xénogreffes de cancer de prostate, suggère le rôle oncogénique de NEDD4-1. Récemment, une étude a montré que PTEN est capable d'inhiber NEDD4-1 au niveau transcriptionnel (Ahn, Hwang et al. 2008) par feedback négatif. NEDD4-1 peut activer la polyubiquitination et la dégradation de PTEN (Wang, Trotman et al. 2007) mais peut aussi catalyser sa monoubiquitination nécessaire à l'import nucléaire (Trotman, Wang et al. 2007) ce qui entraîne l'inhibition de sa polyubiquitination et sa dégradation dans le cytoplasme (Figure 11).

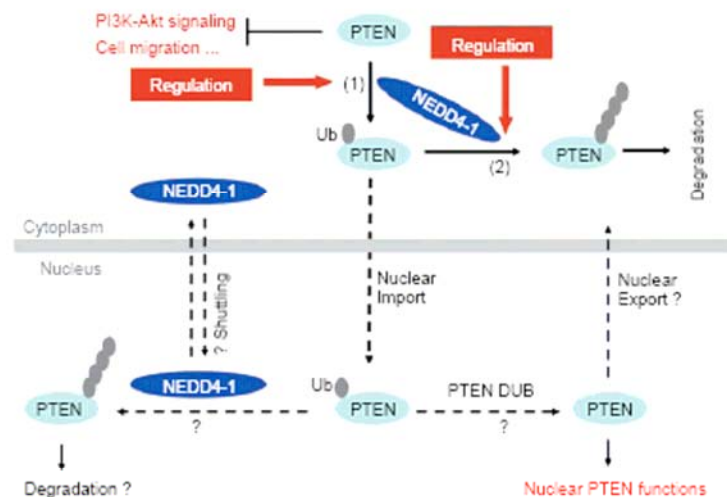


Figure 11: Régulation de la protéine PTEN par ubiquitination par NEDD4-1.

NEDD4-1 entraîne la monoubiquitination et la polyubiquitination de PTEN avec des conséquences fonctionnelles différentes. Les deux réactions sont séparées (nommées (1) et (2)) et sont sujets à des régulations distinctes. Ub: ubiquitin; DUB: enzyme de deubiquitination.

III.4.3. Interactions de PTEN avec d'autres protéines

L'expression de PTEN peut aussi être modulée par des changements de sa stabilité dues à son interaction avec d'autres protéines. Par l'intermédiaire de son domaine *PDZ-binding domain*, PTEN interagit avec plusieurs protéines qui contiennent un domaine PDZ. Wu et al. ont montré que PTEN interagit avec un certain nombre de protéines de la membrane, la famille des MAGI (*guanylate-kinase inverted*), telle que MAGI2, ce qui entraîne sa stabilisation (Wu, Dowbenko et al. 2000). Récemment, une étude a montré que cette interaction est régulée par la vinculine (protéine du cytosquelette exprimée de façon ubiquitaire). Les cellules Vinculine^{-/-} n'expriment pas la protéine PTEN mais expriment normalement les ARNm (Subauste, Nalbant et al. 2005). Subauste et son équipe ont montré que la vinculine est nécessaire pour maintenir les interactions entre β -caténine–MAGI2 et les jonctions ce qui limite l'ubiquitination et la dégradation de PTEN (Subauste, Nalbant et al. 2005). Valiente et al. ont montré récemment que la liaison de PTEN à MAST3 (*microtubule-associated serine/threonine kinase*) et SAST (*syntrophin-associated serine/threonine Kinase*) stabilise PTEN et facilite sa phosphorylation par ces kinases (Valiente, Andres-Pons et al. 2005).

III.5. Localisation au niveau de la cellule

- Recrutement au niveau de la membrane plasmique

La localisation cellulaire de PTEN joue un rôle important dans la régulation de son activité. La première fonction décrite de PTEN est la déphosphorylation de PIP3 au niveau de la membrane plasmique. Afin d'accéder à sa cible, PTEN a besoin d'être recrutée au niveau de la membrane. Le domaine C2 (Das, Dixon et al. 2003), le domaine phosphatase (Das,

Dixon et al. 2003) et le domaine de liaison à PIP3 ont un rôle crucial dans sa liaison aux lipides (Downes, Ross et al. 2007). PTEN est recrutée au niveau de la membrane par interaction avec des protéines MAGI1b, MAGI2, MAGI3, MAST3 et SAST au niveau du domaine *PDZ-binding domain*. PTEN interagit aussi avec NHERF1 (EBP50) et NHERF2 (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*), protéines adaptatrices, par son domaine *PD-binding domain*. Les protéines PTEN et NHERF forment un complexe ternaire avec le récepteur PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*). L'activation de PI3K après stimulation des récepteurs PDGFR est prolongée dans les fibrobalases MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) NHERF1^{-/-} et quand NHERF2 est inhibée par ARNi. Les protéines NHERF recrutent PTEN au niveau des récepteurs PDGFR afin de réduire l'activité de PI3K (Takahashi, Morales et al. 2006). Des études utilisant la microscopie TIRF (*total internal reflection fluorescence*) dans des cellules vivantes montrent que PTEN se lie à la membrane pendant quelques millisecondes, temps suffisant à la dégradation de plusieurs molécules PIP3. Ceci confirme que la phosphorylation de l'extrémité C-terminal de PTEN contraint sa conformation et limite son association avec la membrane (Vazquez and Devreotes 2006).

- Import export nucléaire

La localisation de PIP3 et PIP2 au niveau nucléaire montre le rôle de PTEN dans le noyau (Mazzotti, Zini et al. 1995; Caramelli, Matteucci et al. 1996; Tanaka, Fujita et al. 2005). Cette fonction est moins claire que celle au niveau de la membrane plasmique. Cependant, plusieurs chercheurs ont détecté PTEN exclusivement dans le cytoplasme (Gu, Tamura et al. 1998), d'autres chercheurs l'ont détecté dans le cytoplasme et dans le noyau, et la perte de PTEN dans le noyau a été associée aux néoplasmes et à la formation des tumeurs (Perren, Weng et al. 1999; Gimm, Perren et al. 2000), indiquant que la fonction de suppresseur de tumeur de PTEN est nucléaire. Liu et al. ont utilisé la technique de

Recouvrement de Fluorescence Après Photoblanchiment (FRAP) et ont conclu que PTEN diffuse passivement à travers les pores nucléaires (Liu, Sheng et al. 2005). Chung et al. ont décrit des séquences de localisation nucléaire nécessaires à l'import nucléaire de PTEN (Chung, Ginn-Pease et al. 2005). Ils ont aussi mis en évidence les différents effets de PTEN en fonction de sa localisation cytoplasmique ou nucléaire: PTEN cytoplasmique inhibe phospho-AKT, active p27kip1 et est nécessaire à l'induction de l'apoptose, alors que PTEN nucléaire inhibe la cyclin D1, phospho-MAPK et a un rôle crucial dans l'arrêt du cycle cellulaire (Chung and Eng 2005; Chung, Ostrowski et al. 2006).

III.6. Fonctions de PTEN

PTEN est une phosphatase qui déphosphoryle les résidus phosphotyrosine, la phosphosérine et/ou la phosphothréonine. Cette activité protéine phosphatase lui permet d'inhiber la voie de signalisation des MAPK ou RAS/MEK/ERK et la kinase d'adhésion focale, FAK. PTEN a de plus une activité lipide phosphatase qui induit l'inhibition de la voie PI3K/AKT en antagonisant l'action de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K).

III.6.1. PTEN et voie des MAPK

Cette voie est constituée par une série de protéines kinases qui permettent par phosphorylation l'activation de protéines MAP (*mitogen activated protein*) ou ERK (*extracellular signal regulated kinase*) (figure 4). PTEN en déphosphorylant Shc et/ou IRS-1, empêche la formation du complexe Grb/SOS nécessaire à l'activation de la voie des MAP kinases (Waite and Eng 2002) (Figure 12).

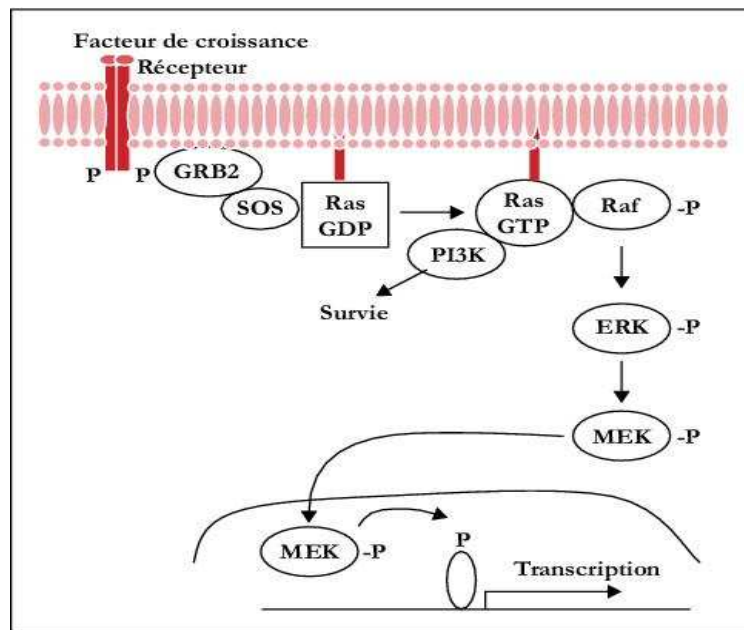


Figure 12: Activation de la voie de RAS/MAPK/ERK et réponse cellulaire aux signaux extracellulaire.

Après activation de Ras par les récepteurs à activité tyrosine kinase, de nombreux effecteurs sont activés tels que la PI3K et la kinase Raf entraînant la phosphorylation de MEK qui va ensuite phosphoryler en cascade la kinase ERK. ERK phosphoryle de nombreux substrats impliqués dans la transcription de gènes responsables de la réponse cellulaire.

III.6.2. PTEN et voie PI3K/AKT

Cette voie est représentée par les PI3 kinases, une famille d'enzyme phosphorylant les lipides inositols des membranes en position 3. Elles phosphorylent spécifiquement les PIP2 générant alors des PIP3. La PI3K dont il existe plusieurs membres, entraîne la phosphorylation et l'activation de AKT/PKB, par l'intermédiaire de PIP3. Cette action sera suivi par la phosphorylation de la sérine 473 et la thréonine 308 par des protéines kinases (Feng, Park et al. 2004; Mora, Komander et al. 2004; Sarbassov, Guertin et al. 2005). Cette double phosphorylation a pour effet d'activer AKT et conduire à l'inhibition de l'apoptose. PTEN

intervient dans cette voie en contrôlant le niveau de PIP2. La déphosphorylation du PIP3 en PIP2 s'effectue préférentiellement en position D3 (Su, Mayo et al. 2003)

De cette façon, PTEN contrôle négativement la kinase AKT. Il a été montré qu'une inactivation de PTEN entraîne une phosphorylation constitutive de AKT d'où une survie cellulaire facilitée par l'intermédiaire de la voie mTOR/p70S6 kinase. Il a été aussi montré une activation constitutive de p70S6 kinase dans des cellules tumorales déficientes en PTEN (Guasch 2002) (Figure 13).

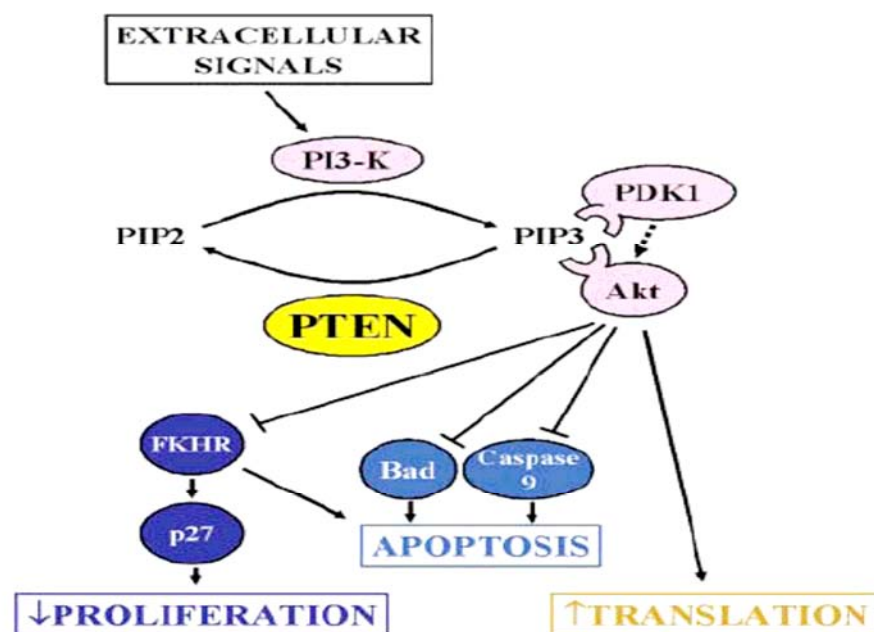


Figure 13: Représentation Schématique de la voie PI3K/PTEN/AKT.

La voie de PI3K est un important régulateur de la carcinogenèse, la croissance tumorale et l'angiogenèse. L'activation des récepteurs tyrosine kinases augmente l'activité de PI3K. PI3K produit des PIP2 et des PIP3, ce qui entraîne l'activation de PDK1 et l'AKT. AKT régule plusieurs fonctions cellulaires incluant la progression du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, croissance tumorale par ciblage de différentes protéines en aval.

GSK-3

La protéine GSK-3 (*Glycogen synthase kinase-3*) est une protéine sérine/thréonine kinase constitutivement active dans les cellules quiescentes. Son activité est inhibée par phosphorylation dans les cellules en prolifération. La protéine kinase AKT phosphoryle GSK sur la sérine 9 et la rend inactive.

mTOR et P70S6K

mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) appartient à la famille des protéines kinases PIKK (*PIKinase-related kinase*), elle intervient en relai de la voie PI3K/AKT. mTOR règle notamment l'initiation de la traduction en phosphorylant 4E-BP et p70S6kinase. La phosphorylation de 4E-BP induit la libération de eIF4E, facteur qui initie la traduction. De même, p70S6kinase phosphoryle la protéine ribosomique S6, qui va initier la traduction d'ARNm codant pour des protéines ribosomiques et des facteurs d'élongation. Ainsi, mTOR est à l'origine de la synthèse de protéines favorisant la mitose cellulaire.

mTOR intervient aussi dans le contrôle du cycle cellulaire. Son inhibition provoque une augmentation du turnover de la cycline D1 et une diminution de l'élimination de p27.

III.6.3. Action sur le cycle cellulaire

PTEN agit sur le cycle cellulaire en bloquant l'entrée des cellules en phase S, par augmentation de l'expression de l'inhibiteur de CDK p27kip1 entraînant une diminution d'expression de la cycline D1. La réintroduction de PTEN dans des cellules n'exprimant pas PTEN, déclenche l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 grâce à son activité lipide phosphatase mais pas par son activité protéine phosphatase. PTEN est donc un régulateur du cycle, empêchant les cellules transformées de proliférer anarchiquement.

III.6.4. Action sur l'apoptose:

Les cellules n'exprimant PTEN sont résistantes aux stimuli apoptotiques, ce qui classe PTEN parmi les régulateurs positifs de l'apoptose. Une autre étude a montré que l'expression du gène normal de PTEN dans des cellules issues de gliomes bloque le cycle cellulaire mais n'augmente pas leur capacité à induire l'apoptose

III.6.5. Action sur la formation de métastases

PTEN augmente le niveau de Drg-1, protéine issue d'un gène ayant des propriétés suppresseur de métastases. Cette propriété a été mise en évidence au niveau de modèles animaux porteurs de cancer de la prostate et du colon. Le niveau d'expression de cette protéine est significativement diminué au cours de l'évolution de cancer de prostate ou de sein. La recherche de Drg-1 associée à celle de PTEN traduit un meilleur pronostic.

IV. Les récepteurs tyrosine kinase de la famille *Human Epidermal Growth Factor Receptor* (HER)

IV.1. Généralité:

Les tyrosines kinases sont des protéines impliquées dans la prolifération des cellules normales et sont impliqués dans la transformation maligne. HER (pour *Human Epidermal Growth Factor Receptor*) ou erb-B (pour érythroblastose) est une famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Elle constitue une famille d'enzymes très importante chez l'homme en intervenant dans de nombreux processus de régulation de la croissance cellulaire favorisant la prolifération et diminuant les mécanismes de l'apoptose. La famille des HER est constituée de 4 récepteurs (EGFR/HER-1/ErbB-1, HER-2/ErbB-2, HER-3/ErbB-3, HER4/ErbB-4) (Yarden 2001) (Figure 14). Ils sont anormalement activés dans plusieurs types tumoraux, en particulier les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures, les carcinomes bronchiques non à petites cellules, les glioblastomes, les cancers mammaires, colorectaux, prostatiques, vésicaux et ovariens (Tableau 1). Ils ont en commun la propriété de phosphoryler un résidu tyrosine. Cette phosphorylation permet l'activation ou l'inactivation de certaines voies enzymatiques au sein de la cellule.

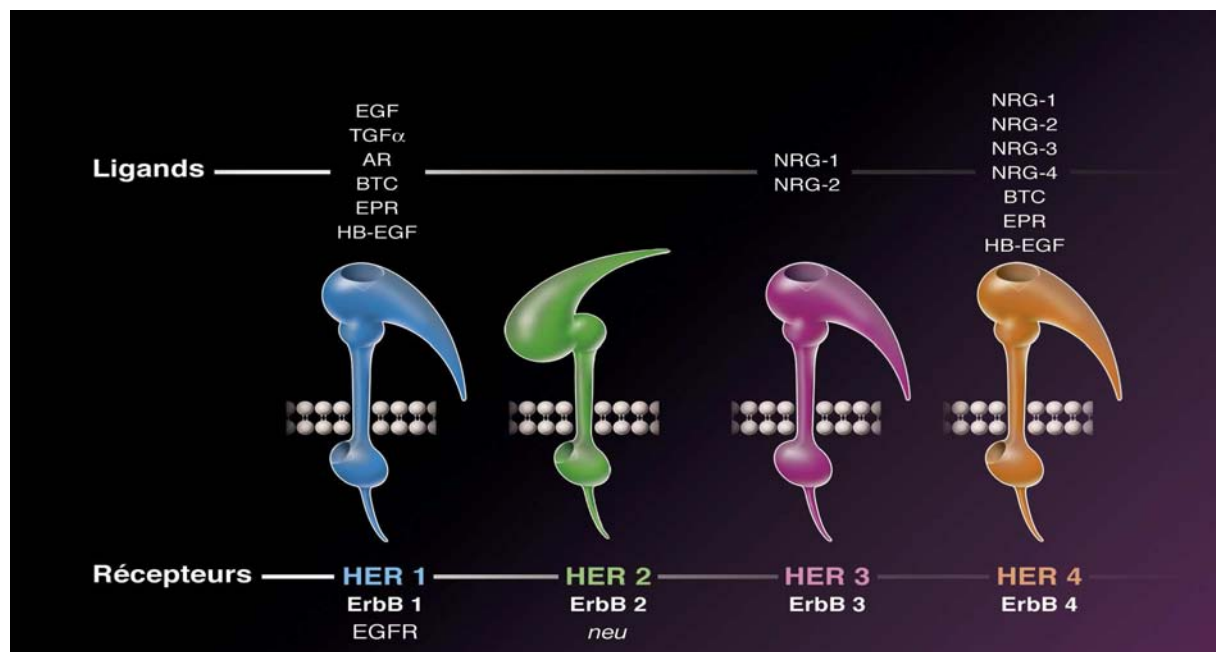


Figure 14: Représentation schématique des quatre récepteurs tyrosine kinase de la famille des protéines HER et leurs ligands (12 ligands).

Type tumoral	Pourcentage de tumeurs surexprimant			
	EGFR	HER2	HER3	HER4
Tumeurs tête et cou	80-100 %	33-76 %	faible	
Bronchique	45-90 %	20-30 %	25-71 %	49-60 %
Adénocarcinome pancréas	30-50 %	17-82 %	28-47 %	
Côlon-rectum	28-77 %	51 %		
Cœsophage	43-89 %	10 %		
Estomac	33-74 %	25 %	faible	
Col utérin (malpighien)	90 %			
Sein	14-91 %	25-30 %	20-70 %	7-13 %
Ovaire	35-70 %	4-30 %		
Prostate	65 %	35-56 %		
Vessie	31-48 %	17-71 %		
Carcinome rénal	50-90 %			
Gliomes	40-63 %			

Tableau 1: Pourcentage des tumeurs surexprimant les récepteurs HER en fonction du type tumoral.

IV.2. Structure des récepteurs

Tous les récepteurs de la famille des HER partagent une structure commune qui se traduit par une organisation structurale caractéristique. Ce sont des molécules transmembranaires comportant un domaine extracellulaire contenant le site de fixation des ligands, un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire (Figure 15):

* Le domaine extracellulaire d'environ 620 acides aminés est composé de 4 sous domaines (I à IV): L1 (sous domaine I) et L2 (sous domaine III) ont été identifiés comme les sièges de la fixation du ligand. Les domaines CR1 (sous domaine II) et CR2 (sous domaine IV) pour « Cystein-Rich » sont des domaines riches en cystéines.

* Le domaine transmembranaire est d'environ 24 acides aminés est un domaine hydrophobe.

* Le domaine intracellulaire d'environ 535 acides aminés avec la partie à activité tyrosine kinase très conservée, suivie de la partie C-terminal qui est moins conservée, cette partie est riche en sites de phosphorylation. Leur site kinase est normalement inactif. Pour être activé, résidu tyrosine doit d'abord être phosphorylé.

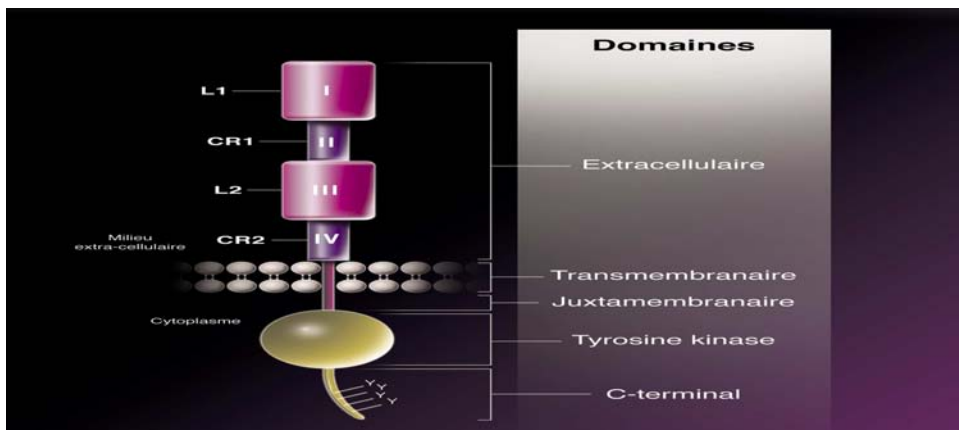


Figure 15: Représentation schématique des différents domaines protéiques des récepteurs de la famille HER.

La partie extracellulaire composée de 4 domaines, homologues 2 à 2, appelés L1 et L2 (domaines I et III) et CR1 et CR2 (domaines II et IV), le domaine transmembranaire, le domaine juxtamembranaire, le domaine tyrosine kinase et le domaine C-terminal portant les sites majeurs de phosphorylation sur tyrosine (Y)

IV.3. Activation

Le mécanisme d'activation de ces récepteurs est particulier, car le segment transmembranaire, ne peut pas transmettre d'information sur l'occupation du site de reconnaissance du ligand vers l'intérieur de la cellule. En l'absence du ligand les récepteurs sont sous forme monomérique. La fixation des ligands aux récepteurs permet d'induire leur dimérisation en homodimères ou hétérodimères avec d'autres récepteurs de la famille HER (EGFR-HER2 ; EGFR-HER3 ; EGFR-HER4). Il est suggéré que les hétérodimères ont un potentiel de signalisation plus puissant. Cette dimérisation entraîne une transphosphorylation des sites tyrosine kinase. L'activité tyrosine kinase va alors pouvoir s'exercer sur leurs différentes molécules cibles (Carpenter and Cohen 1990). Une fois phosphorylé, les deux grandes voies de signalisation sont activées: la voie des MAPK et la voie des PI3K/AKT. Ces cascades de signaux sont transmis jusqu'au noyau où il y a stimulation de la prolifération cellulaire, néoangiogenèse, différenciation, activation de la motilité cellulaire, la survie cellulaire et de la capacité d'invasion. Pour stopper l'action du récepteur phosphorylé, la cellule va l'internaliser. La protéine va ensuite être dégradée dans un lysosome ou dans certains cas, être renvoyée à la surface de la membrane après inactivation pour être réutilisée (Figure 16).

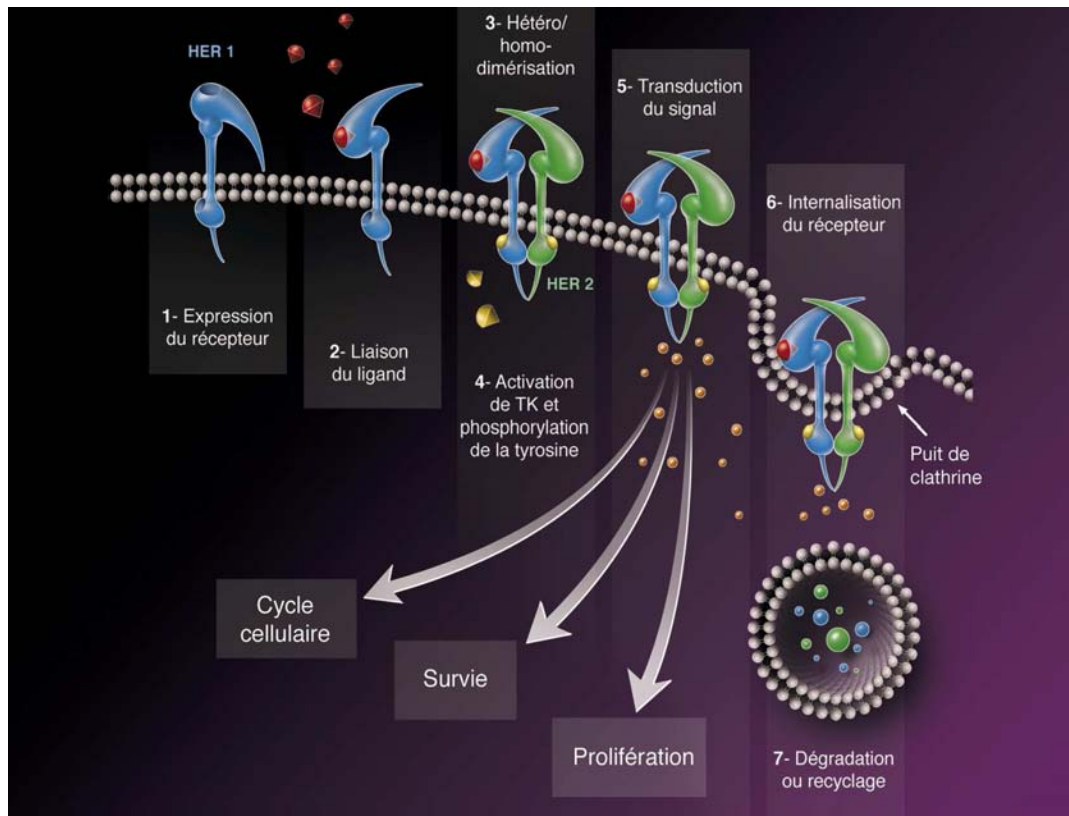


Figure 16: Les différentes étapes d'activation des récepteurs HER.

L'activation des récepteurs débute par l'expression des récepteurs (étape 1). Les ligands vont ensuite se fixer sur les récepteurs monomériques (étape 2) entraînant leur hétéro ou homo dimérisation (étape 3). La dimérisation entraîne l'activation de la tyrosine kinase et la phosphorylation de résidus tyrosine du domaine C-terminal (étape 4). Ces tyrosines phosphorylées vont recruter diverses protéines adaptatrices et/ou des substrats de la kinase, ce qui aboutit à l'activation des différentes voies de signalisation intracellulaires (étape 5). Les récepteurs activés sont ensuite internalisés par endocytose (étape 6), dégradés ou recyclés à la surface cellulaire (étape 7).

IV.4. HER et oncogénèse

Les récepteurs HER sont fortement impliqués dans les cancers. (Tableau 1). Il existe une corrélation entre la surexpression des récepteurs HER et l'agressivité tumorale dans plusieurs types de cancers. Quelques études ont fait un lien avec le risque de récurrence, la survie réduite, le stade tumoral avancé pour divers cancers comme les cancers du poumon non à

petites cellules, les carcinomes épidermoïde de la tête et du cou, les carcinomes du sein et de l'ovaire.

IV.5. L'exemple de l'EGFR

L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa (Cohen, Ushiro et al. 1982), présente sous forme monomérique inactive à la surface des cellules épithéliales. L'EGFR est l'un des tout premiers proto-oncogènes cellulaire humain identifiés et le premier proto-oncogène membranaire.

L'EGFR a été le plus étudié parce qu'il joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, la survie cellulaire durant des processus physiologique. Son hyper-activation lui confère un potentiel prolifératif et malin.

IV.5.1. L'EGFR et implication dans l'oncogenèse:

La surexpression élevée de l'EGFR est une altération commune à plusieurs tumeurs solides, particulièrement dans les carcinomes (Herbst and Hong 2002; Nicholson and Thornberry 2003). Différents modes d'activation peuvent conduire à la dérégulation de la voie EGFR dans les cancers humains, tels que l'hyperexpression du récepteur ou de son ligand, l'amplification génique, les mutations activatrices ou encore la perte de mécanismes de régulation négatifs.

IV.5.1.1. Surexpression de l'EGFR:

A l'état normal une cellule contient 40 000 à 100 000 récepteurs à la surface, leur nombre peut atteindre plusieurs millions dans un cancer. Un nombre élevé d'EGFR peut être la conséquence d'un mécanisme de régulation transcriptionnel, post-transcriptionnel et ou une

amplification du gène. La surexpression de l'EGFR est souvent accompagnée d'une production accrue de ligands.

IV.5.1.2. Activation constitutive du récepteur:

Des mutations activatrices au niveau de la partie tyrosine kinase permettent une activation constitutive de son activité indépendamment du ligand. Des mutations touchant la partie extracellulaire du récepteur entraînant la synthèse d'un récepteur muté tronqué constitutivement active telle que l'EGFRvIII ont été également rapportées. Il est absent dans les cellules normales mais particulièrement exprimé dans les glioblastomes ainsi qu'à des fréquences variables dans les carcinomes de la prostate, du sein, de l'ovaire, de l'estomac et dans le cancer du poumon non à petites cellules.

Une association entre la mutation somatique (délétion et mutations faux-sens) dans le domaine à tyrosine kinase de l'EGFR et réponse aux inhibiteurs tyrosine kinase a été montré dans les cancers pulmonaires non à petites cellules. Ces mutations sont retrouvées dans 20% des tumeurs

IV.5.1.3. Stimulation autocrine:

La surexpression des ligands a été décrite dans plusieurs tumeurs solides (œsophage, pancréas, sein, ovaire) permettant une activation d'EGFR par stimulation autocrine.

IV.5.2. Mise en évidence de l'EGFR et méthodes de détection

L'approche dominante de l'étude du niveau d'expression de l'EGFR est la technique d'immunohistochimie avec de nombreux kits de détection. Le nombre de copies du gène de l'EGFR dans les cellules tumorales peut être mesuré par hybridation fluorescente in situ FISH

(*fluorescent in situ hybridization*) sur coupe en paraffine, en hybridation in situ chromogénique CISH (*chromogenic in situ hybridization*) ou encore en PCR quantitative.

IV.6. Les stratégies thérapeutiques:

Le récepteur à l'EGF est ainsi à l'origine de recherche visant à bloquer son expression, au moyen d'anti récepteur tyrosine kinases. Différentes stratégies visent à bloquer tous les niveaux ont été développées (Figure 17):

- * Neutralisation par un anticorps couplé à une toxine afin d'entraîner la destruction des cellules exprimant le récepteur
- * Production d'oligonucléotides antisens des anti-HER bloquant la traduction des ARNm codant pour le récepteur.
- * Les inhibiteurs de tyrosine kinase: mise en place des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase par des petites molécules administrées par voie orale (Erlotinib et Lapatinib).
- * Les anticorps monoclonaux: liaison d'un anticorps monoclonal à la portion externe du récepteur de façon à neutraliser son activité et empêcher le lien avec son ligand. Actuellement, les données les plus avancées concernent les deux dernières stratégies avec l'exemple de l'anticorps monoclonal cetuximab ciblant l'EGFR commercialisé dans le cancer colorectal métastatique et dans les cancers de la tête et du cou et des inhibiteurs de tyrosine kinase tels que le gefitinib et l'erlotinib, commercialisés respectivement dans les cancers du poumon et du sein.

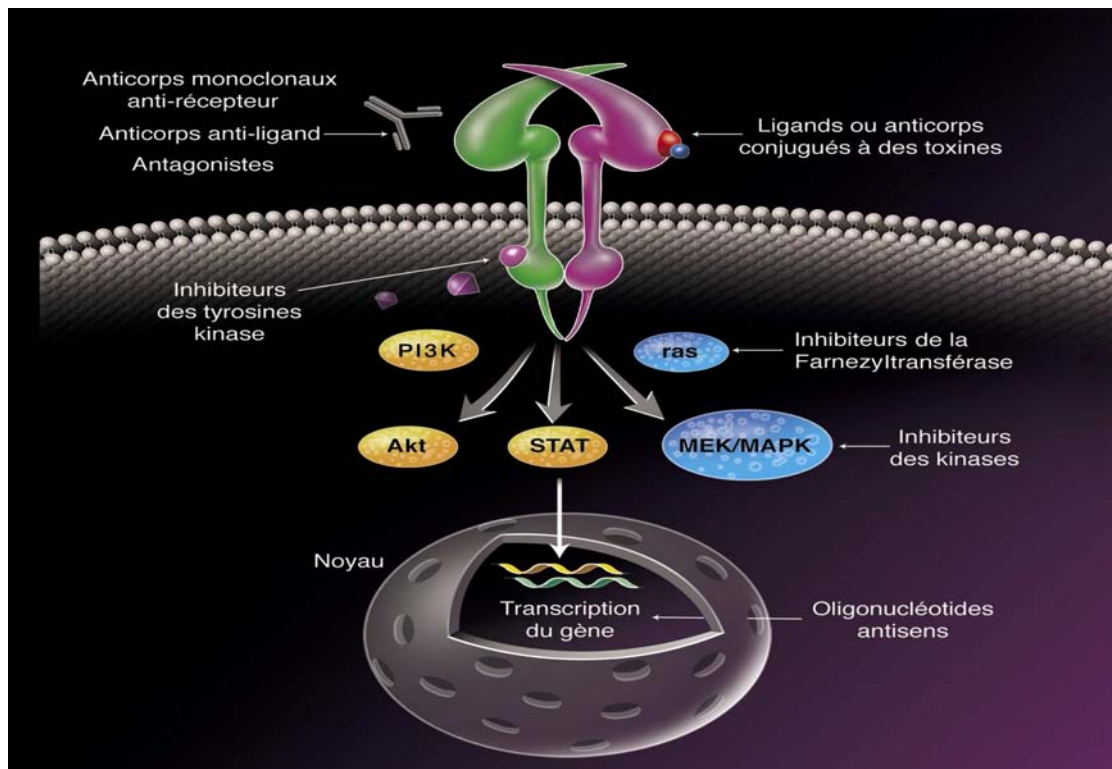


Figure 17: Différentes stratégies thérapeutiques développées pour bloquer les récepteurs HER.

les ligands ou les anticorps spécifiques des récepteurs couplés à des toxines détruisant les cellules exprimant les récepteurs HER, les oligonucléotides antisenses bloquant la traduction des ARNm des récepteurs ou des ligands, les inhibiteurs de la farnésyl-transférase (anti-ras) empêchant la farnésylation de P21-Ras et abolissant les propriétés transformantes de P21 mutée, les inhibiteurs des kinases, les anticorps monoclonaux bloquant le domaine extracellulaire des récepteurs et les petites molécules bloquant le domaine kinase intracellulaire des récepteurs inhibant leur phosphorylation et leur activation.

IV.6.1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps anti-HER agissent indépendamment du statut de phosphorylation du récepteur inhibant ainsi la fixation du ligand, et entraînant son internalisation et l'inhibition des voies de transduction en aval. Les anticorps monoclonaux sont traditionnellement produits à partir de lymphocytes B d'origine murine et afin de contourner les problèmes antigéniques, plusieurs

méthodes ont été élaborées afin de produire des anticorps qui apparaissent plus semblables (human-like) pour le système immunitaire. Une de ces méthodes consiste à greffer des régions d'anticorps humains sur des anticorps murins. Un anticorps que l'on dit chimérique contient environ 60 % de la séquence de protéines humaines tandis qu'un anticorps humanisé contient de 90 % à 96 % de la séquence humaine. Une technologie plus récente utilise des souris transgéniques chez qui on enlève des gènes murins d'immunoglobuline pour les remplacer par un répertoire de gènes d'anticorps humains.

Le suffixe « mab » signifie « anticorps monoclonal »; la source est identifiée par des lettres placées avant la syllabe « mab »; « ximab » pour chimérique; « momab » pour souris; « zumab » pour humanisé; « umab » pour humain (complètement humain) (Figure 18).

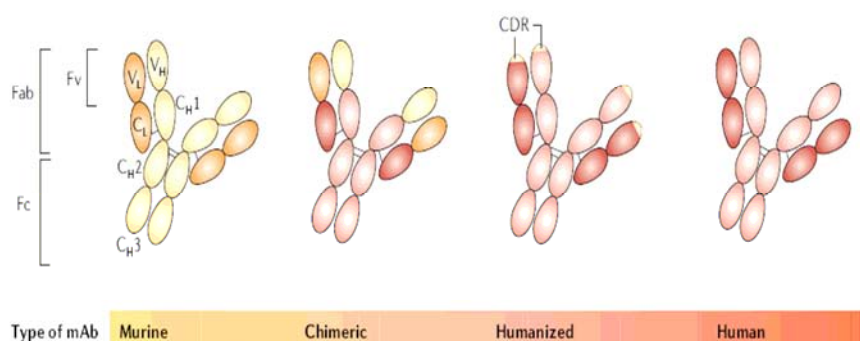


Figure 18: Classification des anticorps monoclonaux utilisés en thérapie: murin, chimérique, humanisé et humain.

La structure fondamentale reste intacte, une molécule IgG est constituée d'une paire de chaînes légères (orange/rouge) et une paire de chaînes lourdes (jaune/rose). Les chaînes légères sont composées de deux régions séparées (une région variable (VL) et une région constante (CL)), les chaînes lourdes sont composées de quatre régions (VH, CH1, CH2 et CH3). Les régions de complémentarité CDRs (complementarity-determining regions) sont situées au niveau du fragment variable (Fv), portion du fragment Fab (antigen-binding). Les anticorps chimériques comme le cétuximab et le rituximab sont constitués de régions variables (VL et VH) murines et de

régions constantes humaine. Les anticorps humanisés sont d'origine humaine excepté les régions CDRs, qui sont d'origine murine. Les anticorps humains et les anticorps murins sont respectivement d'origine entièrement humaine et murine. Le Panitumumab (ABX-EGF) est un anticorps anti-EGFR humain. Une différence significative entre les sous classes des IgG en terme de leur demi-vie dans le sang (IgG1, IgG2 et IgG4 21 jours approximativement; IgG3 jours approximativement), en terme de leur capacité à activer la voie complémentaire classique (classical complement pathway) et la liaison aux récepteurs Fcγ. Le choix de la sous classe des IgG est un facteur déterminant de l'efficacité des anticorps monoclonaux. La plus part des anticorps monoclonaux approuvés appartiennent à la sous classe IgG1, qui ont une longue demi-vie et possédant un potentiel d'effecteur immunitaire comme CDC (complement dependent cytotoxicity), CDCC (complement-dependent cell-mediated cytotoxicity) et ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity).

IV.6.1.1. Cétuximab

Le cétuximab est un anticorps monoclonal chimérique constitué d'une immunoglobuline G1 (IgG1) humaine et d'une région murine variable qui se lie spécifiquement au domaine extracellulaire de l'EGFR, produit sur une lignée cellulaire de mammifère (Sp2/0) par la technique de l'ADN recombinant.

IV.6.1.1.1. Indications thérapeutiques

Le cétuximab (Erbitux[®], Merck Serono) est actuellement indiqué dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR ainsi qu'en association avec la radiothérapie dans le traitement des patients présentant un carcinome épidermoïde localement avancé de la tête et du cou.

IV.6.1.1.2. Posologie et rythme d'administration

L'administration du cétuximab se fait à rythme hebdomadaire. La dose habituellement recommandée est de 400 mg/m² en 2 heures pour la première injection. La dose de

maintenance est de 250 mg/m² par semaine. Une prémédication par un antihistaminique est recommandée.

IV.6.1.1.3. Tolérance

Les effets secondaires notables du cétuximab sont rash acnéiforme et choc anaphylactique. Le rash acnéiforme est la conséquence du blocage de l'EGFR au niveau de l'épiderme. Allant de la simple réaction érythémateuse parfois prurigineuse aux lésions nodulaires profondes parfois surinfectées, les lésions s'étendent généralement sur le tronc et le visage. Cet effet peut décroître progressivement au cours du traitement ou encore être prévenu par administration concomitante de doxycycline. Il apparaît chez 15% des patients et n'empêche pas la poursuite du traitement. Sa physiopathologie n'est pas clairement établie mais est en partie liée à la présence de l'EGFR sur la membrane des kératinocytes, des cellules épithéliales des glandes sébacées et du follicule pileux qui constituent des régions particulièrement sujettes à cette toxicité. Un des premiers facteurs prédictifs de réponse au cétuximab identifié est l'apparition de cette éruption cutanée acnéiforme. Le choc anaphylactique ne survient que dans 1% des cas mais il est potentiellement grave.

Une dyspnée peut survenir pendant ou peu après la perfusion du cetuximab. Les patients âgés, avec un indice de performance diminué et des atteintes cardiaques ou pulmonaires sous-jacentes peuvent présenter un risque augmenté de dyspnée, potentiellement sévère et/ou persistante. D'autres toxicités chroniques ont été décrites: syndrome septique, insuffisance rénale, déshydratation, diarrhée. Ces symptômes sont cependant peu fréquents.

IV.6.1.1.4. Mode d'action

Ainsi, le mécanisme d'action du cétuximab pourrait être le résultat d'interaction à plusieurs niveaux:

- l'antagonisme de la transduction du signal de croissance cellulaire propre à l'EGFR
- la stimulation de l'internalisation et de la dégradation du récepteur EGFR
- le recrutement et la stimulation des cellules immunes responsables de la toxicité cellulaire dépendante des anticorps (*ADCC antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)
- la diminution de l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ainsi que d'autres facteurs angiogéniques.

- Antagonisme de la transduction du signal de croissance cellulaire

En se liant sélectivement à l'EGFR, cet anticorps monoclonal bloque la fixation du facteur de croissance sur son récepteur. Il entraîne ainsi la désactivation des signaux de prolifération cellulaire, en particulier les voies des MAP kinases et de la PI3 kinase/AKT. Le cétuximab induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1.

- La stimulation de l'internalisation et de la dégradation de l'EGFR

De nombreuses études *in vitro* ont montré que l'action du cétuximab sur les lignées cellulaires était due à sa capacité à faciliter l'internalisation du récepteur dans le cytoplasme et la diriger vers la dégradation. La destruction de l'EGFR doit être précédée d'une polyubiquitination du récepteur.

- Le recrutement et la stimulation des cellules immunes

Le cétuximab avec sa partie Fc est capable de recruter les cellules de l'immunité et en particulier, les cellules NK. *In vitro*, le cétuximab augmente le nombre de cellules NK et entraîne ainsi une diminution des cellules exprimant l'EGFR. Ainsi, une action de cytotoxicité cellulaire serait responsable de l'activité du cétuximab plutôt qu'une action sur l'expression du récepteur EGFR (Figure 19).

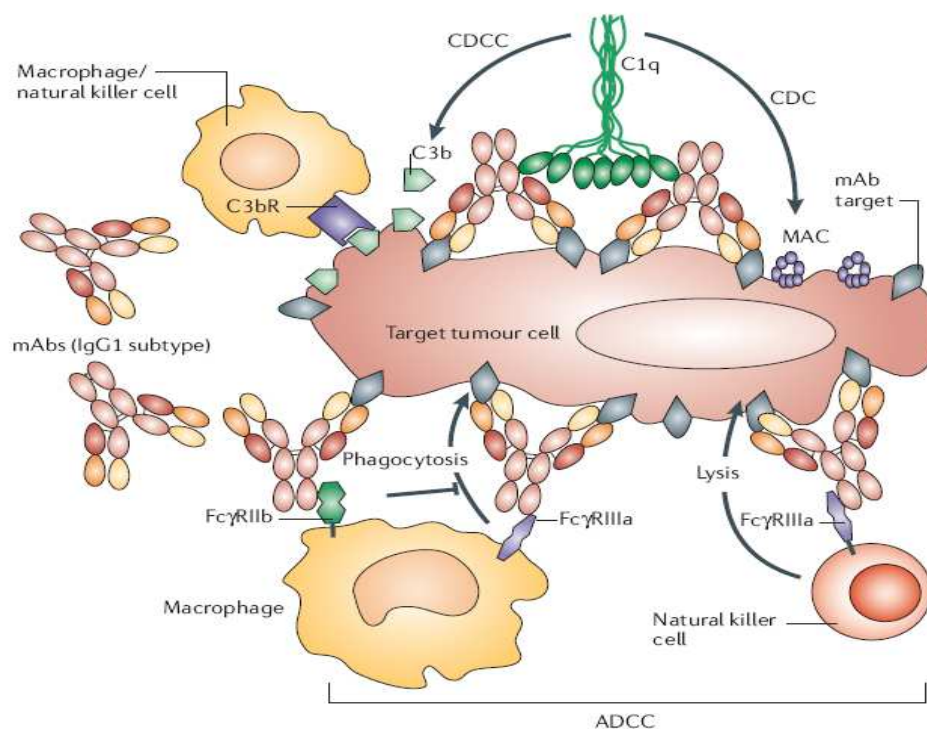


Figure 19: Action des anticorps monoclonaux par le système immunitaire.

Après liaison des anticorps monoclonaux à leur cibles au niveau des cellules tumorales, le C1q (facteur complémentaire) interagit avec la région constante CH2, nécessaire à l'activation de la cascade protéolytique de la voie (complement classical pathway) induisant la formation du complexe MAC (membrane-attack complex) afin de lyser les cellules tumorales, c'est le système CDC (complement-dependent cytotoxicity). C3b, est généré durant ces cascades, fonctionne comme l'opsonine et facilite la phagocytose et la cytolyse suite à l'interaction des récepteurs C3bR et les macrophages ou les cellules NK (natural killer), cette activité correspond au système CDCC (complement-dependent cell-mediated cytotoxicity). La liaison des anticorps monoclonaux aux cellules tumorales induit aussi le système ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity); Les cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules NK sont alors recrutées et interagissent avec la région CH3 des anticorps monoclonaux à travers la région FcγRIIIa exprimées par les cellules effectrices. Les cellules tumorales liées aux anticorps monoclonaux sont alors phagocytées par des macrophages et lysées par les cellules NK

La diminution de l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) ainsi que d'autres facteurs angiogéniques. La synthèse de VEGF permettant la prolifération des cellules endothéliales et la vascularisation de la tumeur, est liée à la surexpression de l'EGFR. Le cétuximab en antagonisant l'EGFR s'oppose à l'angiogenèse tumorale.

IV.7. Facteurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR

La détermination de facteurs prédictifs de la réponse aux thérapies anti-REGF a un rôle potentiel dans la détermination de façon plus précise des indications des traitements anti-EGFR et donc d'en diminuer, les effets secondaires, les coûts et la détermination de nouvelles cibles potentielles impliquées dans la résistance.

IV.7.1. Mutations de K-Ras

Une étude clinique récente dans une série de 89 patients traités par cétuximab pour un cancer colorectal métastatique (mCRC) montre que K-Ras est muté dans 27% des cas, cette mutation est significativement corrélée à la résistance au traitement par cétuximab. Aucune mutation de K-Ras n'est détectée chez les patients répondeurs (0/24) contre 40% (26/65) des patients non répondeurs. La survie médiane des patients K-Ras non mutés est plus longue que celle des patients K-Ras mutés (Lievre, Bachet et al. 2008). D'autres études récentes confirment la corrélation entre la mutation de K-Ras et la réponse au traitement par cétuximab. Une analyse rétrospective dans une série de 60 patients traités par cétuximab pour mCRC montre qu'aucune mutation de K-Ras n'est détectée dans les 11 patients répondeurs, tandis que la mutation de K-Ras est détectée dans 23 des 36 patients non répondeurs (0% versus 62%) (Personeni, De Schutter et al.). Dans une autre série de 27 patients avec un mCRC,

Romagnani et son équipe montrent que 10% des patients répondeurs sont mutés en K-Ras *versus* 53% des patients non répondeurs (Romagnani, Martin et al.).

IV.7.2. L'inactivation de PTEN

Plusieurs études précliniques sur des lignées cellulaires ont montré l'implication de l'inactivation de PTEN dans l'activation constitutive de la voie de l'AKT/PI3K et la résistance à différents antagonistes de la famille EGFR (Bianco, Shin et al. 2003; Camp, Summy et al. 2005). Une étude sur 77 patients traités par cétuximab pour un cancer colorectal métastatique montre que l'expression de PTEN dans les tumeurs est corrélée à la réponse au cétuximab. PTEN est exprimée dans 10 des 10 patients répondeurs contre 6 des 17 patients non répondeurs (100% versus 35%).

D'autres études plus récentes ont également montré l'implication du statut de pten analysé par la technique de FISH dans la réponse au traitement par cétuximab. Perrone et ses collègues ont montré sur 32 patients traités par cétuximab pour un mCRC une corrélation significative des mutations (10%) ou perte d'expression de pten (13%) (analysée par la méthode de FISH) et la résistance au cétuximab (Perrone, Lampis et al. 2008). L'étude de Razis et ses collègues sur 72 patients traités par cétuximab montre que 42% (18/43) des patients avec un statut pten normal sont répondeurs avec un temps jusqu'à progression (TTP) de 7,41 mois contre 13% (3/23) de répondeurs avec pten délété et une TTP à 5,28 mois ($p=0.042$) (Razis, Briasoulis et al. 2008).

IV.7.3. La voie des VEGF

Une étude sur des lignées cellulaires de cancer de colon avec une résistance acquise au cétuximab (5 à 10 fois supérieure à celle des cellules parentales) montre une augmentation de l'activation de MAPK, de l'expression de la cyclooxygenase et du VEGF par rapport aux cellules parentales sensibles (Razis, Briasoulis et al. 2008). Une étude clinique dans une série de 39 patients traités par cétuximab pour un cancer colorectal métastatique (mCRC) montre qu'une faible expression intratumorale du gène VEGF (analysée par PCR) est corrélée à la réponse au cétuximab. La médiane du niveau d'expression du gène VEGF est de $4,63 \cdot 10^3$ dans les patients répondeurs (n=2), $3,76 \cdot 10^3$ dans les patients avec une maladie stabilisée (n=16) et $6,56 \cdot 10^3$ dans les patients non répondeurs (n=11) (Vallbohmer, Zhang et al. 2005).

IV.7.4. La voie de JAK/STAT

STAT3 est activée dans divers cancers humain et joue un rôle important dans l'oncogenèse. Dans l'étude EVEREST, p-STAT3 a été analysée par immunohistochimie des biopsies des patients traités par cétuximab. Une augmentation majorée de p-STAT3 a été trouvée chez les patients répondeurs durant le traitement par cétuximab avant randomisation (Gebhardt, Zanker et al. 1999).

IV.7.5. Inactivation de p21

Une étude clinique récente dans une série de 31 patients traités par géfitinib associé à une chimiothérapie (irinotécan-leucovorin-5-fluorouracile) pour un cancer colorectal métastatique (mCRC) montre que l'expression de p21 combiné à la mutation de p53 est un facteur prédictif de la résistance à la chimiothérapie (Ogino, Meyerhardt et al. 2005).

L'inactivation de l'expression de P21 a été trouvée dans 43% des patients non répondeurs (67% avec P21 inactivée versus 25% avec P21 exprimée). 9% des patients non répondeurs exprimant P21 sont p53 mutés versus 69% des patients avec P21 inactivée ou P53 sauvage.

IV.7.6. Polymorphisme de Fc gamma R:

Les anticorps monoclonaux comportent une région Fc fonctionnelle et dotée d'une activité thérapeutique potentielle. Cette région peut se lier à des récepteurs (FcR) exprimée au niveau des macrophages et des lymphocytes NK et déclencher le système ADCC. Un récent travail a montré que deux polymorphismes (FCGR2A-131H et FCGR3A-158F) favorables d'au moins un allèle ont une meilleure survie sans progression et une meilleure réponse au cétuximab que les patients homozygotes pour les deux polymorphismes défavorables (Zhang, Gordon et al. 2006).

IV.7.7. Nombre de copies du gène EGFR

Des travaux récents montrent une association significative entre le nombre de copies de l'EGFR et la réponse aux thérapies anti-REGF pour les inhibiteurs de tyrosine kinase utilisés dans le traitement des cancers pulmonaires non à petites cellules ainsi que pour les anticorps monoclonaux dans les cancers colorectaux (Moroni, Veronese et al. 2005; Frattini, Saletti et al. 2007).

IV.7.8. Mutations du REGF

Les mutations somatiques du gène EGFR ont été identifiées dans le domaine à activité tyrosine et sont associées à la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase. La mutation du gène

EGFR est également un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie. Toutefois, les mutations de l'EGFR ne représentent pas un facteur prédictif suffisant pour sélectionner les patients pouvant bénéficier d'un traitement par des inhibiteurs tyrosine kinase. Des mutations liées à une résistance aux traitements anti-REGF ont également été mises en évidence.

IV.7.9. Cross-talk EGFR-HER2

In vitro, les lignées tumorales surexprimant HER2 sont sensibles aux agents anti-EGFR. Une étude récente a montré une association entre l'augmentation du nombre de copies de HER2, évaluée par FISH, et la réponse au gefitinib.

IV.7.10. Fonctionnalité des voies de signalisation en aval des HER

Récemment notre équipe a montré l'intérêt de l'étude des niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation en aval de l'EGFR dans la prédiction de réponse au cétuximab de cancers colorectaux non porteurs de mutation K-Ras. Dans ce cadre, les niveaux d'expression tumorale de phosphoprotéines de signalisation en aval de l'EGFR (p-MEK, p-ERK1/2, p-AKT, p-GSK3b, p-P70S6K) ont été analysés par Bioplex® phosphoprotein array chez 42 patients porteurs de CRC et confrontés au statut K-Ras. Parmi les 42 patients, 12 (28.5%) réponses objectives ont été observées (1 CR, 11 PR) avec une survie sans progression médiane (PFS) de 15.3 semaines. Les mutations K-Ras ont été observées chez 19 patients (45.2%) et associées à une absence de réponse au cetuximab (0/19 K-Ras mutés vs 12/23 (52%) chez les non-mutés; $p < 10^{-4}$). L'absence de mutation de K-Ras est associée à une PFS supérieure (32 vs 8.6 sem., $p < 10^{-5}$). L'expression de p-P70S6K est plus faible chez les patients répondeurs que chez les non-répondeurs ($p = .02$). La PFS est supérieure chez les patients avec un niveau d'expression bas de p-P70S6K et p-MEK (hazard ratio de 2.44,

$p=.007$ et 1.89 , $p=.025$). Parmi les 5 phosphoprotéines évaluées, seule p-MEK permet de prédire la PFS. L'expression de p-MEK est plus élevée dans les K-Ras mutés que dans les non-mutés ($p<.04$). K-Ras et pMEK apparaissent alors comme deux marqueurs prédictifs indépendants (HR 4.4, $p<10^{-3}$ et 2.15, $p=.03$) (Merlin, Perkins et al. 2008).

V. Transfert de gènes

Comme il a été mentionné plus haut, le cancer est principalement relié à des instabilités génétiques dues aux dérèglements des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, l'apoptose, le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Dans ce contexte, un traitement, permettant le transfert de gènes thérapeutiques dans les cellules cancéreuses pourrait présenter une alternative aux traitements conventionnels. C'est le concept de la thérapie génique. Depuis les premiers essais dans les années 80, cette technique a progressé du simple essai clinique à la commercialisation des premiers gènes thérapeutiques. Cependant, les stratégies de délivrance des gènes thérapeutiques présentent de nouveaux challenges pour les chercheurs, les cliniciens et les instances réglementaires. On peut distinguer deux types de thérapies géniques. La thérapie génique des cellules germinales comprend toute thérapie effectuée aux cellules germinales transmise à la prochaine génération. La thérapie génique des cellules somatiques comprend toute thérapie effectuée aux cellules somatiques, elle n'est pas transmise à la génération d'après. Le gène d'intérêt thérapeutique peut être transféré sous forme d'ADN nu ou vectorisé à l'aide de molécules chimiques, de liposomes ou de dérivés de virus à ADN ou à ARN.

V.1 L'ADN nu

Le gène d'intérêt thérapeutique est inséré dans un plasmide bactérien et il est directement injecté dans les tissus ou dans les organes (Wolff, Dowty et al. 1992). Il n'y a aucune limite quant à la taille du gène thérapeutique mais cette approche est très peu efficace. L'ADN nu pénètre très difficilement dans les cellules et est facilement dégradé par les nucléases cellulaires. Toutefois, l'expression de l'ADN qui réussit à pénétrer la cellule est stable.

Plusieurs techniques physiques ont été développées pour augmenter l'efficacité du transfert.

*** L'électroporation**

L'électroporation est une méthode physique de transfection, elle consiste à appliquer un champ électrique sur des cellules mises en présence des ADN pour déstabiliser la membrane plasmique et permettre l'internalisation du gène thérapeutique (Wong and Neumann 1982).

*** Le bombardement de gène ou « *gene gun* »**

Cette méthode utilise des particules d'or d'environ 2µm avec de l'ADN plasmidique adsorbé sur leur surface. Elles sont ensuite propulsées sur des cellules en culture et internalisées dans les cellules (Tuting, Wilson et al. 1998). L'expression de l'ADN est stable.

V.2. Les vecteurs viraux

L'ADN est une macromolécule chargée négativement, la membrane plasmique est aussi chargée négativement ce qui rend difficile son passage à l'intérieur de la cellule. Afin de résoudre ce problème, des vecteurs viraux ont été utilisés afin de tirer profit de leur pouvoir infectieux.

Un vecteur viral est un virus renfermant un génome viral modifié et où les portions du génome pour la réplication virale ont été remplacées par le gène thérapeutique.

Les vecteurs viraux contiennent plusieurs membres dont les rétrovirus, les lentivirus, le virus Herpes Simplex, les virus associés aux adénovirus (VAA) et les adénovirus. Les caractéristiques des vecteurs viraux sont résumées dans le tableau 2.

V.2.1. Les rétrovirus

Les premiers virus utilisés dans le transfert de gène thérapeutique sont les rétrovirus. Ce sont des virus à ARN simple brin de la famille des *retroviridae*. Ils rentrent dans la cellule cible au moment de la mitose, leur ARN est rétro-transcrit pour ensuite être intégré dans le génome de la cellule cible ce qui permet de conserver l'information génétique durant la division cellulaire. Le génome des rétrovirus contient deux régions appelées *Long Terminal Repeat* (LTR) séparées par les gènes *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour les protéines structurales, les polymérases et les intégrases ainsi que pour les glycoprotéines de surface (Kay, Glorioso et al. 2001).

V.2.2. Les lentivirus

Ce sont des virus à ARN monocaténaire dérivés des virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le génome des lentivirus, en plus de contenir les gènes de base des rétrovirus, contient deux gènes de régulation, *tat* et *rev* qui sont essentiels pour l'expression du génome ainsi que des gènes accessoires (Kay, Glorioso et al. 2001).

V.2.3. Le virus Herpes-Simplex

Le virus Herpes simplex de type 1 (HSV-1) est le virus herpes le plus utilisé en thérapie génique. Il est composé d'un ADN linéaire bicaténaire, il peut produire un effet cytotoxique pour les cellules tumorales tout en étant incapable de se répliquer dans les tissus humains normaux (Robbins, Tahara et al. 1998).

V.2.3. Les virus associés aux adénovirus (VAA)

Les VAA sont des parvovirus humains non enveloppés et avec une capsid, ils nécessitent un virus herpes et un adénovirus pour sa réplication. Les VAA contiennent deux gènes pouvant produire plusieurs polypeptides: rep pour la réplication virale et cap pour l'encapsidation. Ces deux gènes sont entourés de régions ITR (*inverted terminal repeat*) (Kay, Glorioso et al. 2001).

V.2.4. Les adénovirus

Les adénovirus sont des virus à ADN linéaire double brin et sans enveloppe. Les adénovirus se répliquent de façon très efficace. Le cycle d'infection de l'adénovirus se divise en deux phases: une phase plus précoce qui concerne l'entrée du virus dans la cellule hôte, le passage du génome viral au noyau cellulaire suivi par la transcription des gènes précoces et une phase plus tardive (Kay, Glorioso et al. 2001).

Les vecteurs viraux présentent un certain nombre de désavantages qui rendent leur utilisation chez l'homme discutable en terme de sécurité. Leur utilisation provoque des réactions immunitaires, en plus des possibilités d'insertion du génome viral pouvant entraîner des mutations insertionnelles. La taille réduite des séquences d'ADN pouvant être insérée dans ces vecteurs peut également s'avérer problématique.

Type de virus	rétrovirus	lentivirus	Virus Herpes-Simplex	Virus associés aux adénovirus	adénovirus
Longueur des séquences intégrées	8 Kb	30 Kb	30 Kb	5 Kb	8 Kb
Inflammation	non	Non détectée	Oui	Non	Oui
Stabilité	++	++	++	++	+
Avantages	Infection des cellules en division Expression prolongée du transgène	Intégration par transport actif	Administration répétée Persistance	Sécurité Absence de cytotoxicité Absence de réponse inflammatoire	Relativement sécuritaire Pas de risque de mutation insertionnelle Infecte cellules en division et quiescente Tropisme pour les cellules hépatiques
Inconvénients	Risque de recombinaison Intégration aléatoire dans le génome Absence de spécificité	Pathogène Intégration aléatoire dans le génome	Immunogène Pas de risque de mutation insertionnelle	Risque de mutation insertionnelle	Toxique Expression transitoire Réponse immunitaire

Tableau 2: Caractéristiques de quelques vecteurs viraux.

V.3. Les vecteurs non-viraux ou vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques sont en général des polymères cationiques chargés positivement ce qui leur permet d'interagir avec l'ADN chargé négativement conduisant à la condensation de l'ADN et à son endocytose. La stabilité des complexes ADN/PEI dépend de la nature du vecteur. les caractéristiques des principaux vecteurs non viraux sont résumées dans le tableau

	Lipide cationiques	Polyéthylénimine
Expression	transitoire	transitoire
Avantages	peu immunogène production simple possibilité de couplage pour ciblage	compacter les plasmides de grandes taille efficacité d'expression non immunogène <i>in vivo</i>
Inconvénients	courte durée d'expression toxique absence de spécificité	Interaction avec les protéines sériques

Tableau 3: Caractéristiques de quelques vecteurs non viraux

V.3.1. Les lipides cationiques:

Le (N-[1-(2,3,-diolelyoxy)propyl]-N,N,Ntrimethylammonium chloride (DOTMA) est le premier lipide cationique synthétisé (Felgner, Gadek et al. 1987). Les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles (Wasungu and Hoekstra 2006) chargées positivement permettant des interactions électrostatiques avec les charges négatives de l'ADN et aboutissant à des lipoplexes. Ces lipoplexes transmettent l'ADN aux cellules cibles par fusion avec la membrane cellulaire et par endocytose. Ces vecteurs peuvent contenir de grande quantité d'ADN.

V.3.2. Les polymères cationiques:

Les polymères cationiques condensent fortement l'ADN et sont capables de transfecter de façon stable ou transitoire différents types cellulaires. Les molécules les plus utilisées sont la polylysine (PLL) et le polyéthylénimine (PEI).

V.3.2.1. L'exemple du polyéthylénimine:

Le polyéthylénimine (PEI) est un polymère cationique fortement chargé, un atome sur 3 est un atome d'azote qui peut être protoné, il a été mis en évidence en 1995 pour son efficacité à la fois *in vitro* aussi bien dans les cellules adhérentes ou en suspension et *in vivo* (Boussif, Lezoualc'h et al. 1995; Ferrari, Moro et al. 1997). Il existe sous forme branchée ou sous forme linéaire en fonction de son mode de synthèse (Figure 20). Le PEI branché est synthétisé à partir de l'aziridine par catalyse par un acide. La polymérisation par ouverture du cycle de la 2-ethyl 2-oxazoline conduit à un polymère substitué qui par hydrolyse peut être transformé en PEI linéaire. Le PEI linéaire est commercialisé sous forme (Exgen500®, jetPEI®). Les poids moléculaire varie entre 5 et 25 kDa. Les poids moléculaires plus importants présentent une cytotoxicité importante. L'efficacité de ce polymère tient à ses capacités à condenser l'ADN et à piéger les protons grâce à ses groupements azotes protonables, la densité de charge est liée au pH (Godbey, Wu et al. 1999). En effet, à pH neutre, 20 % des amines sont protonées alors qu'à pH acide le niveau de protonation peut augmenter à 40%. Son innocuité a été montrée par son utilisation dans la purification d'eau. Les polyplexes PEI/ADN sont décrits en fonction du ratio N/P (l'azote apporté par le PEI et le phosphate par l'ADN. Le ratio PEI/ADN agit sur la taille du polyplexe. Plusieurs polyplexes avec différents ratios allant de 5 à 20 ont été testés, et il a été montré que la transfection par des polyplexes à très fort ratio sont toxiques et qu'un faible ratio augmente la taille et l'agrégation des polyplexes à cause des interactions hydrophobes et des interaction de Van der Waals.

Le polyplexe PEI/ADN formé rentre dans la cellule par endocytose. L'endosome fusionne ensuite avec un lysosome pour permettre la dégradation des éléments endocytés. Avant de fusionner le PEI engendre l'éclatement osmotique des endosomes du fait de sa propriété d'éponge à proton. L'entrée massive de protons dans l'endosome par effet tampon du PEI permet l'entrée de contre-ions. L'entrée massive des ions entraîne un choc osmotique et la

PEI linéaire

$$\text{---} \text{CH}_2\text{---} \underset{\text{H}_2}{\text{C}} \text{---} \text{N} \text{---} \underset{\text{H}_3}{\text{C}} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{N} \text{---} \underset{\text{H}_3}{\text{C}} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{N} \text{---} \text{---}$$

$\text{R} = \text{H} \text{ ou } \text{H}, \text{H}^+$

PEI branchée

$$\begin{array}{c} \left[\begin{array}{c} \text{---} \text{CH}_2\text{---} \text{N} \text{---} \text{---} \\ \text{---} \text{CH}_2\text{---} \text{N} \text{---} \text{---} \end{array} \right]_i \\ \left| \right. \\ \left[\begin{array}{c} \text{---} \text{CH}_2\text{---} \text{N} \text{---} \text{---} \\ \text{---} \text{CH}_2\text{---} \text{N} \text{---} \text{---} \end{array} \right]_j \end{array}$$

$\text{R} = \text{H} \text{ ou } \text{H}, \text{H}^+; \text{R}' = (\text{H}^+)$, avec $j=0 \text{ ou } j=1; i = 1, 2, \text{ ou } n$

V.4. Internalisation photochimique :

75

L'internalisation photochimique (PCI) est un procédé original qui permet d'accroître la pénétration intracellulaire des macromolécules ou des complexes supramoléculaires (protéines, plasmides, polymères) (Berg, Selbo et al. 1999). La PCI repose sur la destruction photochimique des vésicules d'endocytose obtenue par photoirradiation de cellules ou de tissus préalablement exposés par à un agent photosensibilisant se localisant au niveau membranaire (Berg, Prasmickaite et al. 2003; Hogset, Prasmickaite et al. 2004) (Figure 21).

L'efficacité de la PCI dépend très étroitement du photosensibilisant utilisé. Il s'agit en général de dérivés de porphyrines ou de phtalocyanines (TPPS2a, AlPcS2) qui vont dans un premier temps s'insérer dans la membrane plasmique (Prasmickaite, Hogset et al. 2001). Après endocytose, ses molécules se retrouvent dans les membranes des vésicules d'endocytose. L'exposition à la lumière induit alors la photodestruction de la vésicule et la libération de son contenu au niveau intracytoplasmique. Afin d'obtenir l'activité maximale des molécules ou complexes internalisés, il est nécessaire de maîtriser la cytotoxicité inhérente à ce procédé en optimisant les paramètres photodynamiques (concentration de photosensibilisant, dose de lumière, irradiance). Il a été montré que l'utilisation de la PCI permettait d'accroître l'internalisation de macromolécules exogènes (protéines, ADN) ne pouvant spontanément entrer dans la cellule.

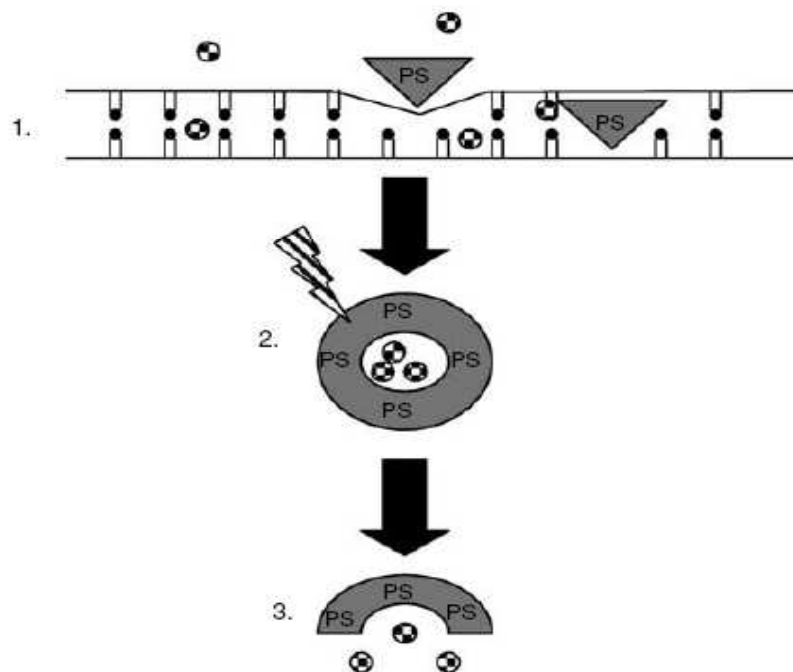


Figure 21: Principe de l'internalisation photochimique.

Le photosensibilisant (PS) et le polyéthylèneimine (PEI) s'incorporent dans la membrane plasmique des cellules cibles (1). Formation des endosomes photosensibilisés contenant le PEI (2) . Après irradiation avec une lumière à la longueur d'onde spécifique, le photosensibilisant excité produit des espèces réactives de l'oxygène, l'oxygène singulet en particulier ce qui entraîne la dégradation, la rupture de la membrane et le relargage du PEI dans le cytosol (3).

VI. Objectifs du travail:

Nous venons de rappeler que la cellule est régie par une multitude de gènes dont le rôle principal est de maintenir l'intégrité du génome et de contrôler la prolifération. La mutation de certains de ces gènes entraîne une instabilité génétique menant à la dysfonction de la cellule, l'accumulation des mutations génétiques au cours des divisions cellulaires entraîne progressivement la cellule vers un état tumoral. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs est une des premières étapes du cheminement d'une cellule saine vers un état tumoral.

Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux gènes suppresseurs de tumeur, p53 et pten.

Il a été démontré que la restauration du gène P53 dans ces cellules avait un effet anti-tumoral important dû à l'arrêt de la croissance cellulaire et à l'induction de l'apoptose. Il a aussi été montré que l'utilisation de la thérapie génique par p53 combinée avec la radiothérapie ou la chimiothérapie éliminait plus efficacement la tumeur que ces traitements appliqués seuls.

Le gène pten est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et la survie des cellules normales. Les mutations de ce gène contribuent directement à la transformation des cellules. Le rétablissement de l'expression de pten a pour conséquence une diminution de la croissance cellulaire. Il a aussi été montré que la perte de la fonctionnalité de la protéine PTEN était associée à la résistance au cétuximab via l'hyperactivation de AKT. Dans cette même étude, il a été montré que l'inhibition de l'activité de la sensibilité cellulaire au cétuximab est également restaurée. D'autres études mettent également clairement en évidence que l'expression de la protéine PTEN pourrait constituer un marqueur de la sensibilité cellulaire aux inhibiteurs de HER.

La thérapie génique a suscité et suscite encore des grands espoirs dans le traitement des cancers par restauration de la fonctionnalité des différents gènes suppresseurs de tumeurs. Les vecteurs viraux furent les premiers utilisés sur la base de leur pouvoir infectieux mais peuvent être immunogènes, peuvent modifier les génomes par des mutations insertionnelles et impliquent des difficultés techniques; C'est pourquoi des vecteurs non viraux ont été mis au point tel que les polymères cationiques parmi lesquels nous avons choisi le polyéthylénimine. Le but de ce travail a été d'étudier l'intérêt d'une nouvelle méthodologie de transfert de gène par vectorisation non virale appliquée à la restauration de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pten et d'évaluer la capacité de la technique d'internalisation photochimique à améliorer son efficacité de transfert.

Nous avons ensuite évalué l'impact du transfert des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pten sur la réponse cellulaire au cétuximab. Pour cela nous avons mis en place plusieurs études, utilisant différentes lignées cellulaires caractérisées par leurs anomalies géniques touchant les gènes p53 et pten.

VII. Travail expérimental

VII.1. Prolongement de la durée d'expression du transgène et mort cellulaire après combinaison de PEI tétraglucosylé et de la PCI pour le transfert du gène P53 au sein de cellules humaines de cancer épidermoïde de la tête et du cou.

Ndoye A, Bouali S, Dolivet G, Leroux A, Erbacher P, Behr JP, Berg K, Guillemin F, Merlin JL.

International Journal of Oncology 2004;25(6):1575-81

Résumé

P53 est fréquemment muté dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Le transfert du gène p53 sauvage a permis l'induction de l'apoptose *in vitro* et la régression tumorale *in vivo* et la essais cliniques de thérapie par p53 sont habituellement effectuées par des vecteurs viraux. Les vecteurs non viraux sont de plus en plus utilisés comme alternative aux vecteurs viraux. L'internalisation photochimique (PCI) est une technique décrite comme permettant d'augmenter l'efficacité des vecteurs non viraux.

Cette étude a été réalisée sur la lignée cellulaire de carcinome de pharynx exprimant une protéine P53 mutée. Le statut mutationnel de p53 a été validé par séquençage. Les FaDu ont été transfectées par le PEI tétraglucosylé (PEI-Glu4) couplé ou non à la PCI et la protéine fluorescente (GFP) a été utilisée comme gène rapporteur pour déterminer la cinétique du transfert de gène par PEI-Glu4 couplé ou non à la PCI. L'étude de l'induction de l'apoptose a été réalisée après transfert du gène p53 dans les conditions optimales. L'apoptose détectée par la mise en évidence de l'externalisation des phosphatidylsérines, analysée par cytométrie en flux, et la mort cellulaire à long terme par des essais clonogéniques à 10 jours.

Le séquençage a montré une mutation ponctuelle au niveau du codon 248 dans l'exon 7 du gène p53, une conversion de G vers T impliquant une substitution d'une arginine par une leucine qui a pour conséquence l'expression d'une protéine P53 tronquée et exprimée dans plus de 90% des cellules non transfectées analysées par immunocytochimie. Le transfert du gène p53 par PEI-Glu4 couplée à la PCI a augmenté significativement le niveau d'expression de la GFP et ce quelque soit la solution de formulation des complexes. L'analyse de la cinétique d'expression de GFP entre 24 et 144h a montré que la PCI a permis d'augmenter le niveau d'expression du transgène et reste maintenue jusqu'à 144h (10%). Le transfert de p53 par PEI-Glu4 couplé à la PCI a été réalisé dans ces conditions et a permis la restauration de l'induction spontanée de l'apoptose entraînant une augmentation significative de la mort cellulaire à long terme (50%).

Le transfert du gène p53 sauvage par PEI-Glu4 et PCI a permis de potentialiser l'efficacité de la transfection et la mort cellulaire dans la lignée cellulaire de carcinome de pharynx, FaDu.

Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells

ALIOUNE NDOYE¹, SANAE BOUALI¹, GILLES DOLIVET², AGNES LEROUX³,
PATRICK ERBACHER⁴, JEAN-PAUL BEHR⁵, KRISTIAN BERG⁶,
FRANÇOIS GUILLEMIN⁷ and JEAN-LOUIS MERLIN¹

¹Laboratoire de Recherche en Oncologie, EA 3452, ²Unité de Chirurgie Cervico-faciale, ³Unité d'Anatomie Pathologique, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-les-Nancy; ⁴PolyPlus Transfection, Strasbourg; ⁵Laboratoire de Chimie Génétique, CNRS UMR 7514, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France; ⁶Department of Radiation Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway; ⁷Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique, Centre Alexis Vautrin, UMR CRAN-CNRS 7039, Vandoeuvre-les-Nancy, France

Received June 15, 2004; Accepted August 23, 2004

Abstract. p53 is frequently mutated in head-and-neck squamous cell carcinoma. Wild-type p53 gene transfer induces apoptosis *in vitro* and tumor regression *in vivo* and clinical investigations of p53 gene therapy have been reported, mostly using viral vectors. Non-viral vectors are increasingly being used as an alternative to viral vectors and photochemical internalisation (PCI) of non-viral vectors has been reported to yield high gene transfer efficiency. The p53-mutated status of FaDu human pharynx carcinoma cell line was first assessed by DNA sequencing and the cells were transfected using tetraglucosylated polyethylenimine (PEI-Glu4) in conjunction with photochemical internalisation (PCI). The green fluorescent protein (GFP) was used as a reporter for determination of the transgene expression kinetics with or without PCI. p53 gene transfer was performed in these optimised conditions, and subsequent induction of apoptosis was investigated by flow cytometric determination of the phosphatidylserine externalisation. Long-term cell death was assessed using colony forming assays. DNA sequencing in FaDu cells showed a G/T point mutation at codon 248 in exon 7 of p53 gene, resulting in an arginine-to-leucine substitution. As a consequence, P53 was shown to be expressed in >90% of untreated cells using immunocytochemistry. Using PEI-Glu4 as vector, PCI was found to significantly

enhance GFP gene transfer whatever the formulation solution. Transfection efficiency was significantly increased with PCI. GFP expression kinetics (24-144 h) demonstrates that PCI induces sustained transgene expression with >10% of cells remaining transfected after 144 h. In such conditions, p53 gene transfer using PEI-Glu4 and PCI, resulted in spontaneous induction of apoptosis. As a consequence, long-term cell death was significantly enhanced after wt-p53 gene transfer when PCI was used, reaching up to 50% cell death. Wild-type p53 gene transfer using PEI-Glu4/DNA complexes and PCI, yields sustained transgene expression and induces cell death in p53-mutated FaDu cells.

Introduction

p53 tumor suppressor gene abnormalities are frequently detected in human cancers including head and neck cancers in which mutant p53 status is found in nearly 50% of the cases and is associated with poor prognosis (1,2). Therefore, restoring tumor-suppressor gene expression in cells presenting genetic abnormalities by means of external gene transfer has been extensively investigated. Indeed, spontaneous induction of apoptosis has been evidenced after wild-type p53 gene transfer in human tumor models *in vitro* and *in vivo* using either viral (3-7) or non-viral (8,9) vectors. Further, in clinical trials, induction of significant tumor regression after p53 adenovirus-gene therapy was reported in head and neck tumors (10).

When non-viral vectors such as liposomes and polycations (11) are used, the main drawback is their low transfection rate compared to that of viral vectors. The efficiency of gene transfer and complex stability are influenced by several parameters including charge ratio, the size of complexes and formulation medium (12-15). Several studies aiming at enhancing their transfection efficiency by improving their cellular uptake or their physico-chemical properties have been reported (16). Among non-viral vectors, PEI derivatives

Correspondence to: Dr Jean-Louis Merlin, Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France
E-mail: jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

Key words: p53, GFP, photochemical internalisation, polyethylenimine, apoptosis, gene therapy

appear as potent vectors (17) for both *in vitro* and *in vivo* gene transfer (18,19) and glycosylated PEI derivatives were reported to yield higher transfection rates than unsubstituted PEI (9,12).

In vivo, we recently reported that glucosylated PEI-mediated wt-p53 gene transfer was able to achieve long-term tumor-growth inhibition following interactive intratumoral injection of PEI/DNA complexes (8). The use of efficient and specific technologies such as PhotoChemical Internalisation (PCI) for delivery of molecules into the target cells would be very interesting to fully exploit the potential of macromolecular drugs (16).

PCI has been described as an innovative procedure for releasing macromolecules from endocytic vesicles to the cytosol of target cells (20-22). This technology is based on light-induced delivery of macromolecules such as DNA, proteins and other therapeutic molecules into the cytosol (16). Rupture of the endocytic vesicles (lysosomes and endosomes) is photochemically induced by incubation of the cells with a photosensitising compound preferentially localised in the membrane of these vesicles (23), followed by the illumination at a wavelength specific to the photosensitiser. PCI has been reported to enhance the gene delivery potential of adenovirus as well as non-viral vectors such as polylysine and liposomes (24-26). Our last *in vitro* results (27) showed that coupling PCI with tetraglucosylated PEI (PEI-Glu4)-mediated wt-p53 gene transfer reached high transfection rates and biological activity.

The present study was designed to optimise the PCI of PEI-Glu4-DNA complexes and wt-p53 gene transfer *in vitro*. We first evaluated the influence of the formulation medium of PEI-Glu4/DNA complexes on PCI-mediated gene transfer efficiency. The effect of PCI on the transgene expression kinetics was evaluated in a second stage. In these optimized experimental conditions, cell death induction following wt-p53 gene transfer was finally analysed.

Materials and methods

Cell culture. Cell culture plastic ware was purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). Culture media and additives were from Life Technologies (Eragny, France) except fetal calf serum, which was from Dutscher (Brumath, France).

Cell lines. Cells were cultured in phenol red-free RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotics penicillin-streptomycin mixture, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

p53 mutation analysis. To identify p53 genomic status of human head and neck carcinoma FaDu cells and of human breast carcinoma CAL51 cells, DNA automated fluorescent sequencing analyses were performed. Briefly, PCR was performed using four pairs of primers covering exons 2-9 and including flanking intronic splicing sites (one pair for exons 2-4, one for exons 5 and 6, one for exon 7 and one pair for exons 8 and 9), in a 20 µl volume containing 10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l KCl, 1.5 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l deoxynucleotide triphosphates, 0.5 mmol/l of each primer and 1 µg of genomic DNA. The reactions were carried out using a

Perkin-Elmer/Cetus thermal cycler model 9600. The PCR products were then purified using Sephadryl S400HR (Amersham-Pharmacia Biotech, Les Ulis, France). Purified fragments were used for sequencing with a Thermo Sequenase™ Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham-Pharmacia Biotech), using the same PCR primers. After purification with Biogel P10 (BioRad), the products were sequenced using ABI 373 automated DNA sequencing system (Applied Biosystem).

P53 expression analysis using immunocytochemistry. Trypsinized cells were fixed in Preservcyt® (Cytoc, Montrouge, France) and slides (Thin prep®) were prepared according to the manufacturer's recommendations. Then, immunocytochemistry was made after digestion in 10 mmol/l citrate buffer, pH 6.0. Briefly, the slides were treated by hydrogen peroxide and glutaraldehyde at 0.05%. The cells were then stained with DO7 monoclonal antibody (Dako, Trappes, France) at 1:50 dilution in phosphate-buffered saline (PBS) for 32 min at room temperature with a basic detection kit (Ventana, Illkirch, France) using biotinylated immunoglobulin secondary antibody according to the manufacturer's recommendations. The chromogen substrate was diaminobenzidine. A light hematoxylin counterstaining was applied for microscopic examination. Appropriate positive and negative controls were evaluated.

Plasmids. pEGFP-C3 (Clontech, Montigny le Bretonneux, France) and pNCNeo (Dr J.-M. Heard, Institut Pasteur, Paris, France) encoding respectively the green fluorescent protein (GFP) and the P53 protein under the control of the cytomegalovirus promoter were used in these experiments. Plasmids were purified from *Escherichia coli* using Gibco BRL Concert™ Maxiprep columns (Life Technologies).

Chemicals. Tetraglucosylated derivative of linear 22 kDa polyethylenimine (PEI-Glu4; Glcα4Glcα4Glcα6Glc) (28) was obtained from Polyplus-transfection and was diluted in a 5% glucose or in a 9‰ NaCl solution.

TPPS_{2a} (LumiTrans®), a meso-tetraphenylporphine with two sulfonate groups on adjacent phenyl rings was used as photosensitiser and was kindly provided by PCI Biotech (Oslo, Norway). LumiTrans was dissolved in dimethylsulfoxide as a 350 µg/ml stock solution. Unless otherwise indicated, all other reagents were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and were of molecular biology grade.

Light source. Lumisource® (PCI Biotech) was used as light source. Lumisource is a bank of 4 fluorescent tubes designed to provide homogeneous illumination of the treatment area, emitting mainly blue light with a peak at 420 nm. The light emission from the illumination area was measured and showed a high homogeneity with a fluence rate of 10±0.1 mW/cm² over the light field.

Cell transfection and PCI procedures. PCI experimental conditions were established according to our previous results and the PCI conditions inhibiting <30% of the cell growth were selected as optimal experimental conditions as already reported (28).

Briefly, FaDu cells were seeded in 24-well plates 48 h before transfection. When PCI was used, 24 h after seeding, the cells were incubated for 18 h in RPMI medium containing 0.1 µg/ml TPPS_{2a}, at 37°C and kept in the dark until the end of the protocol.

Before transfection, the cells were washed with PBS and supplemented with fresh serum-free medium. Plasmid (pEGFP-C3 or pNCNeo) (4 µg) and the corresponding amount of PEI-Glu4 were both separately prepared in a 5% glucose, or in a 9% NaCl solution. PEI-Glu4 was used at a charge ratio of five (five amino groups per phosphate group) (28). PEI-Glu4 solution was then mixed with plasmid and 100 µl of the resulting mixture was added to each well.

PCI was performed after 2 h of incubation by submitting the cells for 30 sec to blue light emitted by Lumisource®. Cells were then re-incubated for different period time before being tested for transgene expression.

GFP expression. GFP expression was evaluated using flow cytometry (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Meylan, France) in cell suspensions containing 10⁵-10⁶ cells/ml obtained after trypsinization of 24-well dishes as already reported (9,27).

The influence of the dispersing solution (5% glucose, or 9% NaCl) on the transfection rate, was evaluated 24 and 48 h after transfection. Then under the optimal conditions, GFP expression kinetics was analysed from 24 to 144 h after transfection on at least 10,000 cells.

p53 gene expression. p53-mRNA expression was analyzed using semi-quantitative RT-PCR with β₂-microglobulin (β₂M1) as reference gene as already reported (9).

Apoptosis measurements. Quantitative analysis of apoptosis induction was performed by flow cytometry (FACS Calibur) using annexin V-propidium iodide double labeling (ApopTEST™, Dako, Trappes, France). Briefly, the cells were cultured on 24-well dishes and allowed to grow for 24 h. Then, according to the transfection protocol (with or without PCI), the cells were incubated with TPPS_{2a} for 18 h followed by incubation with PEI-Glu4/p53 complexes. Forty-eight hours after transfection, the cells were washed with PBS and re-suspended in cold buffer solution before being incubated for 10 min in ice with 1 µl of annexin V/FITC and 2.5 µl of PI. After this incubation, 250 µl of cold buffer solution was added and the samples were analysed using flow cytometry with excitation at 488 nm. Results were expressed as annexin V-FITC labelled apoptotic cell fractions.

Colony forming assay. Colony forming assays were performed after the p53 gene transfer. Briefly, the cells were seeded in 24-well dishes and allowed to grow for 24 h before being photosensitized (in the case of PCI) by an 18 h incubation in RPMI medium containing 0.1 µg/ml TPPS_{2a}. Then, the cells were transfected with PEI-Glu4/p53 complexes alone or followed by PCI and allowed to grow for two days. After this incubation period, the cells were harvested, counted and seeded in 6-well dishes at 200 cells/well and allowed to grow for 10 days. The colonies formed were then stained using crystal-violet and counted. Cell death fraction was

determined by comparing transfected cells, with or without PCI, with controls consisting of cells transfected with irrelevant PEI/GFP complexes.

Statistical analysis. Unless indicated, all experiments were performed in triplicate and results are presented as mean values ± standard deviation.

Non-parametric Mann-Whitney test was employed to determine the statistical significance with a limit set to P<0.05 using Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., USA).

Results

p53 mutational status. Characterization of the p53 status of FaDu cells by DNA sequencing showed a G/T point mutation at codon 248 in exon 7, resulting in arginine to leucine substitution (Fig. 1B). The wild-type p53 status was found in the human breast carcinoma CAL51 cell line (Fig. 1A) which was used as a control.

As a consequence, using immunocytochemistry, P53 protein expression was observed in approximately 20% of the control wild-type CAL51 cells (Fig. 1C) and in >90% of untreated p53-mutated FaDu cells (Fig. 1D).

GFP gene transfer. The influence of the dispersing solution on the transfection rate was studied using a 5% glucose or a 9% NaCl solution for preparation of the PEI-Glu4/GFP complexes. Using the standard transfection procedure (4 µg DNA/well containing 10⁵ cells), PEI-Glu4 mediated GFP gene transfer was measured in FaDu cells 24 and 48 h after transfection, with or without PCI (Fig. 2A).

PCI was found to significantly (p<0.02) increase the GFP-expressing cell population 48 h after transfection, irrespective of the dispersing solution. The transfected cell population was higher when the PEI-Glu4/GFP complexes were formed in 5% glucose solution than when the complexes were formed in 9% NaCl solution. GFP transfection rate was significantly higher (P<0.02) 48 h after transfection when PEI-Glu4/GFP complexes were formulated in 5% glucose solution and transferred using PCI. In such optimised conditions, GFP-expressing cells reached 48% of the total cell population (Fig. 2B).

GFP expression kinetics. GFP expression analysis was performed using flow cytometry 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h after transfection of FaDu cells using PEI-Glu4 alone or associated with PCI (Fig. 3). PCI was found to enhance the GFP expressing FaDu population at 48, 72, 96, 120 and 144 but not 24 h after the transfection. When PCI was used, the highest transfection level was achieved 48 h after transfection, with nearly 50% of the total cell population expressing the transgene. This value decreased progressively and still remained >10% 144 h after the transfection. Using PEI-Glu4 alone, the maximum of GFP expression was achieved 24 h after transfection (25%) and did not significantly vary until 48 h. It then decreased faster than with PCI, reaching approximately 10% 96 h after transfection.

In summary, the use of PCI led to sustained transgene expression in FaDu cells. The highest level of transgene

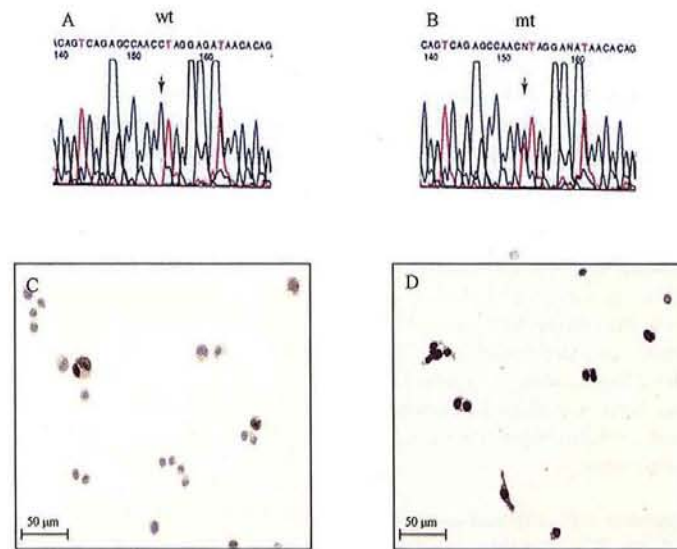


Figure 1. Direct DNA sequencing analysis of p53 genomic status of CAL51 control (A) and untreated FaDu (B) cell lines and P53 protein expression analysis in wild-type p53 CAL51 (C) and p53 mutated FaDu (D) cells. G·T mutation was observed in FaDu cells at codon 248 in exon 7 resulting in arginine to leucine substitution. CAL51 (C) and FaDu (D) P53 expression was analysed by immunocytochemistry using DO7 monoclonal antibody staining. The images are representative fields selected for qualitative observation of DO7 monoclonal antibody labeling.

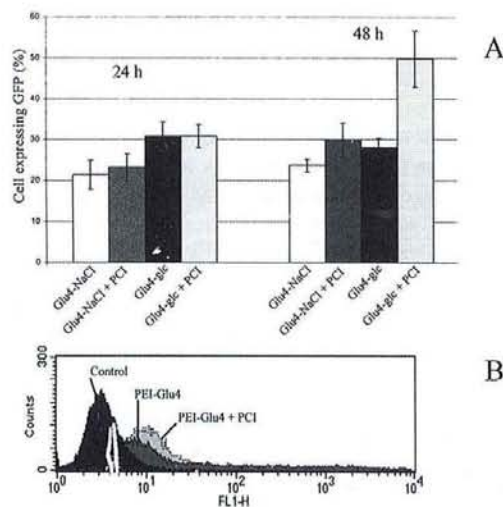


Figure 2. Influence of the dispersing solution of PEI/DNA complexes on GFP gene transfer efficiency. The cells were transfected with PEI-Glu4/GFP complexes formulated in 9‰ NaCl (Glu4-NaCl) or 5% glucose (Glu4-glc) solution without or with PCI. (A). The transgene expression was measured by flow cytometry 24 and 48 h after transfection. Results are expressed as mean values of GFP expressing cell populations of at least three independent experiments. Error bars are standard deviations. (B). Representative distribution histograms observed 48 h after transfection of PEI/DNA complexes in 5% glucose solution.

expression occurred 48 h after transfection and expression remained significant up to 144 h.

p53 gene transfer. p53 mRNA expression was measured 48 h after transfection using RT-PCR (Fig. 4). p53 mRNA relative

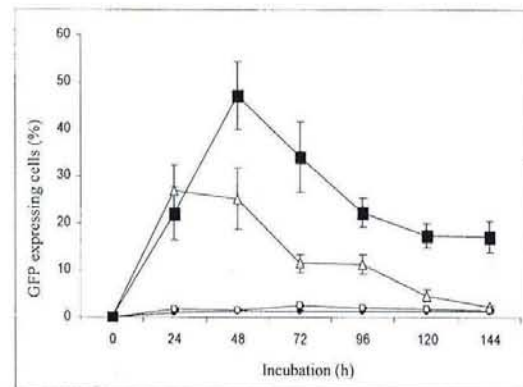


Figure 3. GFP expressing kinetics in FaDu cell line as measured by flow cytometry from 24 to 144 h after GFP gene transfer using PEI-Glu4 alone (Δ) or combined with PCI ($\blacksquare$). Control experiments consisted of untransfected cells ($\bullet$) and cells exposed to PCI without DNA ($\square$). Results are expressed as GFP expressing cell fraction and are presented as mean values of at least three independent experiments. Error bars are standard deviations.

expression ratio (RER) was calculated using β_2 -microglobulin mRNA as reference. In p53-mutated FaDu cells, basal expression of p53 mRNA (RER=0.3) was detected. In transfected cells, p53 mRNA expression was significantly ($P<0.01$) increased (4.5-fold). No difference in expression was found between cells transfected using PEI-Glu4 and those transfected using PEI-Glu4-PCI, with RER's of 1.4 and 1.3, respectively.

Biological activity of p53 gene transfer. Induction of apoptosis was studied by flow cytometry using annexin V/FITC labeling

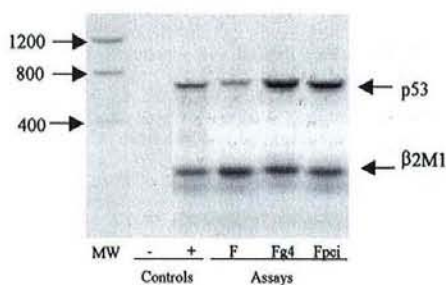


Figure 4. Semi-quantitative RT-PCR p53 mRNA expression analysis in FaDu cells 48 h after transfection. (-), negative control (water); (+), positive control (wild-type p53 CAL51 cells); (F), untransfected FaDu cells; (Fg4), FaDu cells transfected using PEI-Glu4; (Fpci), FaDu cells transfected using PEI-Glu4 and PCI. β_2 -microglobulin1 (β_2 M1) was used as housekeeping gene.

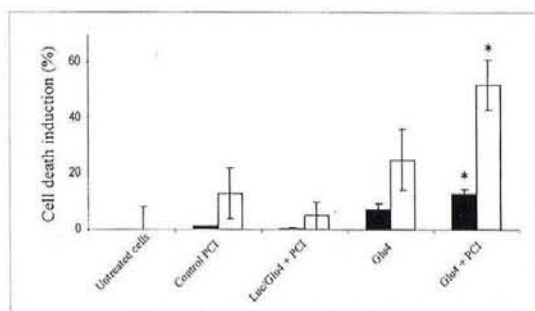


Figure 5. Cell death induction following wild-type p53 gene transfer as assessed using colony-forming assays (□) and measurements of apoptosis (■). The apoptotic cell population was determined using flow cytometry detection of annexin V/FITC-labeled cells 48 h after wild-type p53 gene transfer. Controls consisted of untreated cells, cells treated by PCI but not transfected (Control PCI) and cells transfected with irrelevant plasmid using PEI-Glu4 and PCI (Luc/Glu4 + PCI). Results are expressed as mean values of three independent experiments. Error bars are standard deviations. * $P < 0.05$ Mann-Whitney test PEI-Glu4/p53 versus PEI-Glu4/p53 + PCI.

for detection of phosphatidylserine externalisation. The fraction of apoptotic cells (i.e., annexinV/FITC-positive and propidium iodide-negative) was quantified (Fig. 5). In untreated FaDu control cells, no apoptosis was detected. The gene transfer procedure itself, as performed with PEI-Glu4 and PCI but with an irrelevant plasmid (pCMV-Luc), was found to induce apoptosis in <2% cells. In FaDu cells transfected using PEI-Glu4 alone, apoptosis was detected in 7.3% of the cell population while this fraction was significantly enhanced ($P < 0.05$) when PCI was used (13.0%).

Long-term cell death induction after p53 gene transfer was then investigated using colony forming assays in FaDu cells transfected using PEI-Glu4 alone or combined with PCI (Fig. 5). Control experiments consisted of untreated cells (untreated control), cells transfected with an irrelevant plasmid using PEI-Glu4 combined with PCI (GFP-PCI control). In the control groups, no significant cell death was observed, thus confirming the lack of toxicity of the experimental procedures. p53 gene transfer was found to induce a significant decrease in cell survival ($P < 0.02$). PEI-Glu4 alone induced

cell death to level up to $32 \pm 3\%$. PCI was found to further enhance cytotoxicity by 1.4-fold ($P < 0.05$) with cell death reaching $51 \pm 6\%$.

Discussion

The p53 tumor suppressor gene is often mutated in neoplastic cells and in nearly 50% of the head and neck cancers and is associated with poor prognosis (1,2). Restoration of the ability of tumor cells bearing p53 gene mutation to express a functional P53 protein could be an important means of destroying the early cancer clones and has been extensively investigated *in vitro* (6) and *in vivo* (8). p53 gene therapy clinical trials have been reported in many cancer types including head and neck (10) in which encouraging results were reported with significant tumor growth inhibition after adenovirus-mediated p53 gene transfer.

Viral vectors are mainly used for gene transfer, because of their powerful cellular infection potency. Non-viral vectors such as liposomes and polycations (11) and in particular PEI derivatives, are increasingly used as an alternative to viral vectors. Unfortunately non-viral vectors are not yet as efficient as viral vectors. Several studies that aim at improving the transfection ability by optimising the physical properties (9,12,15,31) or the transfection procedure (20) have been reported. In this context, photochemical internalisation, which is based upon light-induced disruption of photosensitised endocytic vesicles, has been shown to be efficient for gene transfer *in vitro* (23) and protein toxin treatment *in vivo* (21). This method was described to improve the transfection efficiency of several macromolecules (21,25,29,32) and can be coupled with either viral (25) or non-viral vectors (23).

We have reported that tetraglucosylated PEI-mediated p53 gene transfer induces apoptosis *in vitro* (9) and that the use of PCI enhances the transfection rate up to those achieved using viral vectors (28). This enhancement was correlated with induction of apoptosis. *In vivo*, we previously reported that long-lasting tumor growth inhibition could be achieved after iterative wild-type p53 gene transfer with glucosylated-PEI (8).

After having shown that PCI can be safely combined with the PEI-mediated gene transfer and using an optimised PCI procedure (28), we now evaluated the kinetics of GFP gene expression *in vitro* as well as the effects of PCI on the long-term transgene expression to prepare the *in vivo* administration scheme.

Comparing 5% glucose and 9% NaCl solutions as preparation solution for PEI/DNA complexes, we showed that with and without PCI, the transfection efficiency was higher when a 5% glucose solution was used. These results should be related to the fact that in 9% NaCl solution, PEI/DNA complexes form macro-aggregates (13) thus limiting their ability to enter cells. Additionally, recent results showed that the use of 9% NaCl solution for PEI/DNA formulation could be more cytotoxic than 5% glucose solution (P. Erbacher; Personal communication). More recently, it has been shown that the diffusive transport of macromolecules in tumors is an important determinant of the delivery of many anticancer therapeutics and is modulated by the size of the complexes

(33). Lastly, aiming at *in vivo* transfer of the present results and since PEI/DNA complexes prepared in 9% NaCl solution form macro-aggregates that would be very painful if injected, therefore, their use in animal studies should be avoided. For FaDu cells, the highest transfection rate (nearly 50%) was obtained when the PEI-Glu4/GFP complexes formed in a 5% glucose solution were transferred by PCI, reaching a 1.8-fold increase and a gene transfer efficiency comparable to that achieved using viral vectors (34). PCI was found to enhance the transfection efficiency from 48 to 144 h with a maximum of transfection level achieved at 48 h (48%). Sustained transgene expression is thus observed at significant level (>10% expressing cells) for more than 6 days after transfection.

The potential therapeutic interest of this experimental procedure, which combines glucosylated PEI and PCI, was highlighted by wild-type p53 gene transfer in FaDu p53-mutated cells. A significant increase in p53 mRNA expression was achieved in FaDu p53-mutated cells using PEI-Glu4 alone or combined with PCI as we previously reported (27). P53 protein functionality was demonstrated, and a significant spontaneous induction of apoptosis was evidenced as already observed in experiments using viral vectors (4). Furthermore, PCI was found to enhance apoptosis induction as already reported (27). As a consequence, long-term cell death induction was enhanced after wt-p53 gene transfer when PCI was used, yielding up to 50% spontaneous cell death. Again, these data are consistent with those achieved using 5-fluorouracil chemotherapy in wt-p53 CAL51 and p53-mutated FaDu cells, in which 50% induction of cell death was achieved at concentrations that generated approximately 15-20% apoptosis (35).

The results presented here are in agreement with data already reported in the literature with non-viral or adenovirus-mediated p53 gene transfer in head and neck cancer cell lines (3,4,28). In conclusion, the present results confirm the potency of combining PCI with glucosylated PEI-mediated gene transfer. The sustained transgene expression appears very promising in view of improving the *in vivo* administration schedule leading to a therapeutic effect.

Acknowledgements

The authors are grateful to Carole Ramacci, Sophie Marchal for their expert technical assistance, to Dr J.F. Mirjolet and Pr J.P. Peyrat for p53 mutation analysis and, to Dr J.L. Fischel for providing FaDu and CAL51 cell lines as part of the exchange program of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Preclinical Therapeutic Models Group. This study was supported by grants from the French 'Ligue Nationale contre le Cancer' and Alexis Vautrin Cancer Center private research funds.

References

- Brennan JA and Sidransky D: Molecular staging of head and neck squamous carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 15: 3-10, 1996.
- Dolivet G, Colosetti P, Merlin JL, *et al.*: Elements of epidemiology and initiation of carcinogenesis in carcinomas of the upper aerodigestive tract. Future therapeutic consequence. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 120: 5-12, 1999.
- Liu TL, Zhang WW, Taylor DL, *et al.*: Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene with a recombinant adenovirus. *Cancer Res* 54: 3662-3667, 1994.
- Liu TL, El-Naggar AK, Roth JA, *et al.*: Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and the neck. *Cancer Res* 55: 3117-3122, 1995.
- Clayman GL, El-Naggar AK, Roth JA, *et al.*: *In vivo* molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 55: 1-6, 1995.
- O'Malley BW, Chen SH, Schwartz MR, *et al.*: Adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer in a nude mice model. *Cancer Res* 55: 1080-1085, 1995.
- Ghaneh P, Greenhalf W, Humphreys M, *et al.*: Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16(INK4a) results in pancreatic cancer regression *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 8: 199-208, 2001.
- Dolivet G, Merlin JL, Barberi-Heyob M, *et al.*: *In vivo* growth inhibitory effect of iterative wild-type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine non-viral vector. *Cancer Gene Ther* 9: 708-714, 2002.
- Merlin JL, Dolivet G, Dubessy C, *et al.*: Improvement of a non-viral p53 gene transfer in human carcinoma cells using glucosylated polyethylenimine derivatives. *Cancer Gene Ther* 8: 203-210, 2001.
- Clayman GL, El-Naggar AK, Lippman SM, *et al.*: Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 16: 2221-2232, 1998.
- Thomas M and Klivanov AM: Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 28-34, 2003.
- Ogris M, Steinlein P, Kursu M, *et al.*: The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* 10: 1425-1433, 1998.
- Goula D, Remy JS, Erbacher P, *et al.*: Size diffusibility and transfection performance of linear PEI/ADN complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther* 5: 712-717, 1998.
- Rudolph C, Lausier J, Naundorf S, *et al.*: *In vivo* gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J Gene Med* 2: 269-278, 2001.
- Kichler A: Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med* 6 (Suppl 1): S3-S10, 2004.
- Hogset A, Prasmickaite L, Selbo PK, Hellum M, Engesaeter BO, Bonsted A and Berg K: Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 95-115, 2004.
- Merlin JL, N'Doye A, Bouriez T, *et al.*: Polyethylenimine derivatives as potent non-viral vectors for gene transfer. *Drug News Perspect* 15: 445-451, 2002.
- Boletta A, Benigni A, Lutz J, *et al.*: Non-viral gene delivery to the rat kidney with PEI. *Hum Gene Ther* 8: 1243-1251, 1997.
- Goula D, Benoist C, Mantero S, *et al.*: PEI-based intravenous delivery of transgene to mouse lung. *Gene Ther* 5: 1291-1295, 1998.
- Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, *et al.*: Photochemical internalisation: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res* 59: 1180-1183, 1999.
- Selbo PK, Sivam G, Sandvig K, *et al.*: *In vivo* documentation of photochemical internalization. A novel approach to site-specific cancer therapy. *Int J Cancer* 92: 761-766, 2001.
- Selbo PK, Hogset A, Prasmickaite L, *et al.*: Photochemical internalisation: a novel drug delivery system. *Tumour Biol* 23: 103-112, 2002.
- Prasmickaite L, Hogset A, Tjelle ET, *et al.*: Role of endosomes in gene transfection mediated by photochemical internalisation (PCI). *J Gene Med* 2: 477-488, 2000.
- Hogset A, Prasmickaite L, Tjelle E, *et al.*: Photochemical transfection: a new technology for light-induced, site-directed gene delivery. *Hum Gene Ther* 11: 869-880, 2000.
- Hogset A, Øvstebo Engesaeter B, Prasmickaite L, *et al.*: Light-induced adenovirus gene transfer, an efficient and specific gene delivery technology for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 9: 365-371, 2002.
- Hellum M, Hogset A, Engesaeter BO, *et al.*: Photochemically enhanced gene delivery with cationic lipid formulations. *Photochem Photobiol Sci* 2: 407-411, 2003.

27. Ndoye A, Merlin JL, Leroux A, Dolivet G, Erbacher P, Behr JP, Berg K and Guillemín F: Enhanced gene transfer and cell death following p53 gene transfer using photochemical internalisation of glucosylated PEI-DNA complexes. *J Gene Med* 6: 884-894, 2004.
28. Erbacher P, Bettinger T, Belguise P, *et al*: Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethyleneglycol) and antibody-derivatized polyethyleneimines (PEI). *J Gene Med* 1: 210-222, 1999.
29. Selbo PK, Sivam G, Fodstad O, *et al*: Photochemical internalisation increases the cytotoxic effect of the immunotoxin MOC31-Gelonin. *Int J Cancer* 87: 853-859, 2000.
30. Didelot C, Mirjolet JF, Barberi-Heyob M, *et al*: Oncoprotein expression of E6 and E7 does not prevent 5-fluorouracil (5FU) mediated G1/S arrest and apoptosis in 5FU resistant carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 23: 81-87, 2003.
31. Zanta MA, Boussif O, Adib A, *et al*: *In vitro* delivery to hepatocytes with galactosylated polyethyleneimine. *Bioconjugate Chem* 8: 839-844, 1997.
32. Bonsted A, Engesaeter BO, Hogset A, *et al*: Transgene expression is increased by photochemically mediated transduction of polycation-complexed adenoviruses. *Gene Ther* 11: 152-160, 2004.
33. Brown EB, Boucher Y, Nasser S and Jain RK: Measurement of macromolecular diffusion coefficients in human tumors. *Microvasc Res* 67: 231-236, 2004.
34. Buttgereit P, Schakowski F, Marten A, *et al*: Effects of adenoviral wild-type p53 gene transfer in p53-mutated lymphoma cells. *Cancer Gene Ther* 8: 430-439, 2001.
35. Mirjolet JF, Didelot C, Barberi-Heyob M, *et al*: G(1)/S but not G(0)/G(1) cell fraction is related to 5-fluorouracil cytotoxicity. *Cytometry* 48: 6-13, 2002.

VII.2. Potentialisation de l'inhibition de la croissance cellulaire après transfert du gène pten par polyéthylèneimine et internalisation photochimique dans les cellules de cancer de l'endomètre

Maurice-Duelli A, Ndoye A, Bouali S, Leroux A, Merlin JL.

Technology in Cancer Research and Treatment 2004;3(5):459-65.

Résumé

Pten est un gène suppresseur de tumeurs situé sur le chromosome 10q23.3 qui code une protéine phosphatase à double spécificité. Pten est impliqué dans la voie de PI3K/AKT et déphosphoryle le PIP3 en PIP2. Il est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose par inhibition de la voie de PI3K/AKT et la migration cellulaire par son interaction avec les protéines d'adhésion focale. Les mutations somatiques de pten ont été fréquemment décrites dans divers cancers incluant les gliomes, les cancers de la prostate et les cancers de l'endomètre. La fréquence des mutations de pten et sa fonction comme gène suppresseur de tumeurs font de ce dernier un très bon candidat à la thérapie génique. La restauration de la fonction de pten par transfert de gène sauvage dans les cellules n'exprimant pas pten est de plus en plus utilisée dans la recherche des nouveaux traitements anticancéreux. Plusieurs techniques telle que l'internalisation photochimique (PCI) ont été développées dans le but d'augmenter l'efficacité de transfection. La PCI est une technique innovante basée sur des réactions photochimiques initiées par des photosensibilisants localisés au niveau des endosomes induisant leur rupture et la libération des macromolécules (ADN, protéines et autres molécules thérapeutiques) dans le cytosol des cellules cibles après exposition à la lumière. Il a été montré que la PCI permet d'augmenter l'efficacité de transfection par des vecteurs viraux et non viraux. Cette étude a été réalisée sur une lignée cellulaire de cancer de

l'endomètre n'exprimant pas la protéine PTEN. L'influence de la PCI sur le transfert de gène pten par polyéthylèneimine (jet PEI[®]) et sur la viabilité cellulaire a été évaluée. L'expression de la protéine a été restaurée par le transfert de gène pten par jet PEI[®] couplé ou non à la PCI. La PCI a permis d'augmenter significativement le niveau d'expression des ARNm (d'un facteur 4,2) de la protéine et l'inhibition de la croissance cellulaire. Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus par les essais clonogéniques. En effet, la transfection par jet PEI[®]/pten sans PCI permet de restaurer l'inhibition de la croissance cellulaire (44%), la PCI couplée au transfert de pten par jet PEI[®] augmente l'inhibition de la croissance cellulaire à 89%.

Enhanced Cell Growth Inhibition Following PTEN Nonviral Gene Transfer Using Polyethylenimine and Photochemical Internalization in Endometrial Cancer Cells

www.tcrt.org

Aurore Maurice-Duelli, Ph.D.¹
Alioune Ndoeye, M.Sc.¹
Sanae Bouali, M.Sc.¹
Agnès Leroux, M.D.²
Jean-Louis Merlin,
Pharm.D., Ph.D.^{1*}

PTEN is a tumor suppressor gene mapped on chromosome 10q23.3 and encodes a dual specificity phosphatase. PTEN has major implication in PI3 kinase (PI3K) signal transduction pathway and negatively controls PI3 phosphorylation. It has been reported to be implicated in cell cycle progression and cell death control through inhibition of PI3K-Akt signal transduction pathway and in the control of cell migration and spreading through its interaction with focal adhesion kinase. Somatic mutations of PTEN are frequently detected in several cancer types including brain, prostate and endometrium with more than 30% of tumor tissue specimens bearing PTEN mutations and/or deletions. Because of its high frequency of mutations and its important function as tumor suppressor gene, PTEN is a good candidate for gene therapy. Inducible expression of PTEN has been also reported. In cancer cells bearing PTEN abnormalities, the reversion of PTEN function by external gene transfer becomes more and more investigated in cancer treatment research. Several technologies including the photochemical internalization (PCI) and aiming at improving the transfection efficiency have been reported. PCI is an innovative procedure based on light-induced delivery of macromolecules such as DNA, proteins and other therapeutic molecules from endocytic vesicles to the cytosol of target cells. PCI has been reported to enhance the gene delivery potential of viral and nonviral vectors. The present study was designed to evaluate the influence of photochemical internalization on polyethylenimine (PEI)-mediated PTEN gene transfer and its effects on the cellular viability in Ishikawa endometrial cancer cells bearing PTEN abnormalities. PCI was found to significantly ($P < 0.01$) enhance PTEN mRNA expression (4.2 fold increase). Subsequently, following PEI-mediated PTEN gene transfer, the restoration of the PTEN protein expression was observed. As a consequence, significant cell growth inhibition (44%) was observed in Ishikawa endometrial cells. Using PCI for PEI-mediated PTEN gene transfer was found to further enhance PTEN mRNA and protein expression as well as PTEN-related cell growth inhibition reaching 89%.

Key words: PTEN, Photochemical internalization, Polyethylenimine, Gene therapy.

Introduction

Mapped to chromosome 10q23.3, the tumor suppressor gene PTEN is mutated in glioblastoma, endometrium, prostate, head and neck, prostate and colon tumors (1-3). PTEN encodes a dual specificity phosphatase with activity on phosphotyrosyl and phosphoserine/threonine residues (3). PTEN has major implication in PI3 kinase (PI3K) signal transduction pathway and negatively controls PI3 phosphorylation (4, 5). PTEN has been reported to be implicated in cell cycle progression and cell death control through inhibition of PI3K-Akt signal transduc-

¹Unité de Biologie des Tumeurs

²Unité d'Anatomie Pathologique

EA 3452 Université Henri Poincaré

Centre Alexis Vautrin

Avenue de Bourgogne

54511 Vandoeuvre-les Nancy cedex, France

* Corresponding Author:
Jean-Louis Merlin, Pharm.D., Ph.D.
Email: jl.merlin@nancy.fncfcc.fr

tion pathway (6, 7) and in the control of cell migration and spreading through its interaction with focal adhesion kinase (8). PTEN induces growth suppression via cell cycle arrest and/or induction of apoptosis (9, 10).

Germ-line mutation of PTEN causes the autosomal dominant Cowden syndrome, which is characterized by multiple hamartomas and an increase risk of developing breast and thyroid cancers (11). Somatic mutations of PTEN are frequently detected in several cancer types including head and neck, prostate and endometrium tumor in which more than 30% of tumor tissue specimens bears mutations, in lung and hematological malignancies (20%), melanoma, breast and bladder (10%) and at a lower frequency in other tumor types (3). Using immunohistochemistry in sporadic primary breast carcinomas, 33% of the tumors were found to have decreased or no PTEN expression, which generally correlated with structural monoallelic deletion of the gene (12).

Because of this high frequency of abnormalities and its important function as tumor suppressor gene, PTEN is a good candidate for gene therapy and PTEN gene transfer has been largely studied using adenoviral (9, 13-20) and nonviral vectors (10, 21, 22). Inducible expression has been reported using a tet-inducible system (10, 22) and nonviral transfection using lipofectamine. In such conditions, transfection of PTEN has been reported to suppress cell growth by G1 cell cycle arrest followed by cell death in breast cancer cells bearing PTEN deletion (23). More recently, PTEN mutation has been associated with decreased cell sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in breast cancer cells (22). Resistance to gefitinib occurred through the EGFR-independent constitutive activation of Akt caused by loss of PTEN function in PTEN-null cells. Reconstitution of PTEN function by gene transfer was demonstrated to restore the cell sensitivity to gefitinib through reestablishment of EGFR-stimulated Akt signaling.

PCI has been described as an innovative procedure for releasing macromolecules from endocytic vesicles to the cytosol of target cells (25-27). This technology is based on light-induced delivery of macromolecules such as DNA, proteins and other therapeutic molecules into the cytosol. (28). Rupture of the endocytic vesicles (lysosomes and endosomes) is photochemically induced by incubation of the cells with a photosensitizing compound preferentially localized in the membrane of these vesicles (29), followed by the illumination at a wavelength specific to the photosensitizer. PCI has been reported to enhance the gene delivery potential of adenovirus as well as nonviral vectors such as polylysine and liposomes (30-32).

We recently reported the potency of photochemical internalization (PCI) associated with nonviral polyethylenimine

(PEI)-mediated gene transfer of wild type p53 gene in head and neck and pancreatic cancer cells bearing p53 mutations or deletion (24). The results achieved in head and neck cancer cells clearly demonstrated that this technique enables higher and sustained transgene expression leading to the enhancement of apoptosis and cell growth suppression following the gene transfer than when PEI-mediated gene transfer was used without PCI (33). Therefore, this study was designed to evaluate the influence of photochemical internalization on PEI-mediated PTEN gene transfer by investigating PTEN mRNA and protein expression and its effect on cell growth in endometrial cancer cells bearing PTEN abnormalities.

Materials and Methods

Cell Culture Materials

Cell culture plastic ware was purchased from Becton Dickinson (Dutscher, Brumath, France). Culture media and additives were from Life Technologies (Eragny, France) except fetal calf serum, which was from Dutscher (Brumath, France).

Cell Lines

Ishikawa and MCF-7 cell lines were cultured in phenol red-free RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotics penicillin-streptomycin mixture, at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

The PTEN status of the cell lines has been previously characterized (1). Ishikawa cells expressed a high amount of PTEN mRNA but did not express the PTEN protein because of protein truncations. Wild type PTEN MCF-7 cell line was used as a positive control.

Chemicals

Linear 22kDa polyethylenimine (JetPEI®) was obtained from Polyplus-transfection (Illkirch, France) and was used in a 5% glucose solution. TPPS_{2a} (LumiTrans®), a meso-tetraphenylporphine with two sulfonate groups on adjacent phenyl rings was used as photosensitizer and was kindly provided by PCI Biotech (Oslo, Norway). LumiTrans® was dissolved in dimethylsulfoxide as a 350 µg/ml stock solution. Unless indicated, all other reagents were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and were of molecular biology grade.

Light Source

Lumisource® (PCI Biotech, Oslo, Norway) was used as light source. Lumisource® is a bank of 4 fluorescent tubes designed to provide homogeneous illumination of the treatment area, emitting mainly blue light with a peak at 420 nm.

The light emission from the illumination area was measured and showed a high homogeneity with a fluence rate of 10 ± 0.1 mW/cm² over the light field.

Plasmids

pEGFP-C3 was purchased from Clontech (Montigny le Bretonneux, France) and pcDNA4-PTEN was kindly provided by Dr MM Moasser (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY) encoding respectively the green fluorescent protein (GFP) and the PTEN protein were used in these experiments. Plasmids were purified from *Escherichia coli* using GIBCO BRL CONCERTTM Maxiprep columns (Life Technologies, Eragry, France).

Cell Transfection and PCI

Cells were seeded at the density of 10^5 cells/well in 24-well plates 48h before transfection to reach 60-70% confluence at the time of transfection. Amounts and volumes given below refer to a single well. When PCI was used, 24h after seeding, the cells were incubated for 18h in the presence of 0.1 µg/ml TPPS_{2a} and kept in the dark until the end of the protocol.

Before transfection, the cells were washed twice with PBS and supplemented with 1ml fresh serum-free RPMI medium. Four micrograms of plasmid and the corresponding amount of JetPEI[®] (6 µl of 10mM JetPEI[®]) were separately prepared in 50 µl of 5% glucose solution, vortexed gently and spun down to collect the entire volume of solution. The JetPEI[®] was used at a charge ratio of five (five amino groups per phosphate group). The JetPEI[®] solution was mixed with the plasmid suspension, then vortexed and spun down. After approximately 15 min, 100 µl of the resulting mixture was added to the cells and the cell supernatant was homogenized by a gentle horizontal hand rotation. PCI was performed after 2 hours of incubation. Cells were submitted to blue light emitted by Lumisource[®] and re-incubated for 24 or 48h period before being tested for transgene expression.

PTEN-mRNA Expression Analysis using RT-PCR

The PTEN-mRNA expression was analyzed using semi-quantitative RT-PCR with β_2 -microglobulin (β_2 M1) as reference housekeeping gene. Cell extracts were prepared after collection of adhesive cells scrapped from the culture support and centrifuged (300g, 10 min).

Isolation of total RNA was performed using TRIzol[®] (Life Technologies), according to the manufacturer's specifications. cDNA synthesis was performed with 1 µg total RNA in a reaction volume of 20 µl containing 100 ng of random primers, 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8.3, 75 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 0.5 mmol/l deoxynucleotide triphosphate, 10

mmol/l dithiothreitol and 200 units SuperScript II[®] reverse transcriptase (Life Technologies) and incubated for 10 min at room temperature, 50 min at 42 °C, followed by 15 min at 70 °C. RNase-H (2.5 units) was added into each sample, then incubated for 20 min at 37 °C (Mastercycler gradient, Eppendorf). cDNA samples were stored at -20 °C until analyzed. cDNA samples (0.5 µl) were mixed in a volume of 20 µl containing 16 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 67 mmol/l Tris-HCl, pH 8.8, 0.01% Tween 20, 2 mmol/l MgCl₂, 0.2 mmol/l dNTP, 5 µmol/l of 5'- and 3'-primers, and 0.5 unit of Taq polymerase (Life Technologies). The primers sequences were 5'-GCGTGCAGATAATGACAACG-3' (sense) and 5'-GGATCAGAGTCAGTGGTGTG-3' (antisense) and, 5'-AACACGGCGACCCCTACAAGCT-3' (sense) and 5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3' (antisense) for β_2 M1. The PCR tubes were incubated for PTEN cDNA amplification as follows: the first cycle was 5 min at 95 °C, 1 min at 57 °C and 1 min at 72 °C. The 29 following cycles were 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C and 1 min at 72 °C. After completion of the PCR cycles, the mixture was finally incubated for 7 min at 72 °C. PTEN PCR products were electrophoretized on 1% agarose gel containing 0.1 µg/ml of ethidium bromide and analyzed by UV transillumination using a Gel Doc 1000 system (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) and analyzed using Molecular Analyst software (BioRad).

Western Blot Analysis

For western blot analysis, the cells were frozen 48h after the transfection procedure. The frozen cells were homogenized in a lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA and PMSF. The lysate was centrifuged and the protein concentration of the supernatant was determined using a BioRad Protein Assay Kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). 20 µg of protein were loaded on 10% SDS-PAGE gel for electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting. The membrane was blocked with 1% skim milk/1% bovine serum albumin (Sigma, St Quentin Fallavier France)/0.1% Tween-20 PBS. The membrane was incubated with an anti-PTEN primary antibody (Cell Signaling, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Following incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, protein signals were detected using enhanced chemiluminescence kit (Amersham).

Cell Growth Inhibition Following PTEN Gene Transfer

Colony forming assays were performed after completion of the transfection protocol in Ishikawa cells. Briefly, the cells were seeded in 24 well dishes and allowed to grow for 24 hours before being photosensitized (in the case of PCI) by a 18 hours incubation in RPMI medium containing 0.1 µg/ml TPPS_{2a}. Then, the cells were transfected with PTEN/JetPEI[®] complexes alone or followed by PCI and allowed to

grow for two days. After this incubation period, the cells were harvested, counted and seeded in 6 well dishes at 500 cells/well and allowed to grow for 10 days. The colonies formed were then stained using crystal violet and counted using robotized image analysis system (Techlab, St Julien les Metz, France). Cell growth inhibition was then determined in comparing transfected cells, with or without PCI, with controls consisting in untreated cells.

Statistical Analysis

Unless indicated, all experiments were performed in triplicate and results are presented as mean values $\pm$ standard deviation.

Non-parametric Mann-Whitney test was employed to determine the statistical significance with a limit set to $P < 0.05$ using Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., USA).

Results and Discussion

PTEN mRNA Expression Analysis

The PTEN mRNA expression was investigated 48h after transfection, by mean of RT-PCR (Figure 1). Using β_2 -microglobulin1 (β_2 M1) mRNA as reference gene, the PTEN mRNA relative expression ratio (RER) was calculated for untreated cells (T), TPPS_{2a} treated cells (TPS) and for Ishikawa cells transfected using PTEN/JetPEI® complexes alone (PEI) or coupled with PCI (PCI) (Table I). The MCF7 cells were used as positive control for PTEN mRNA.

In PTEN-mutated Ishikawa cells, a basal expression of PTEN mRNA (RER = 1.72) was detected. When transfected using PTEN/JetPEI® complexes alone (PEI), the PTEN mRNA expression was significantly ($P < 0.02$) enhanced (RER = 3.34). The PCI was found to significantly ($P < 0.01$) enhance the PTEN mRNA expression (RER = 7.22) with a subsequent 4.2 fold increase (PCI). These data can be significantly correlated with those previously described

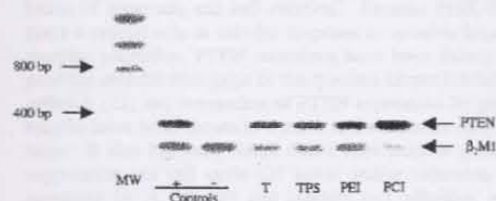


Figure 1: Semi-quantitative RT-PCR PTEN mRNA expression analysis in Ishikawa cells. (-) negative control (water), (+) positive control (wild-type PTEN MCF7 cells), (T) untransfected PTEN mutated Ishikawa cells, (TPS) TPPS_{2a} and light treated Ishikawa cells, (PEI) Ishikawa cells transfected using JetPEI® alone, (PCI) Ishikawa cells transfected using JetPEI® and PCI. Beta-2 microglobulin (β_2 M1) was used as housekeeping gene.

Table I

PTEN mRNA expression in Ishikawa cells. Results were obtained using semi-quantitative RT-PCR and are expressed as mean values of relative PTEN/ β_2 M1 mRNA expression ratio of three independent experiments (standard deviation).

	T	TPS	PEI	PCI
PTEN/ β_2 M1	1.72	1.87	3.34	7.22
(SD)	(0.19)	(0.14)	(0.17)	(0.71)

after PCI-directed gene delivery (1, 24, 34-36). The enhancement of the PTEN mRNA expression should lead to more PTEN protein activity.

Western Blot Analysis

The PTEN protein expression was investigated 48h after the transfection using Western blot analysis (Figure 2). MCF7 cells were used as positive control for PTEN protein expression. The PTEN protein status of untreated Ishikawa cells was compared to those of cells transfected using PTEN/JetPEI® complexes alone or with PCI.

Whereas the untreated Ishikawa cells did not show any PTEN protein expression, their ability of PTEN protein synthesis was restored after JetPEI®-mediated PTEN gene transfer. The use of PCI for PTEN/JetPEI® transfer was found to further enhance the expression of PTEN protein showing a correlation between mRNA and protein expression assays.

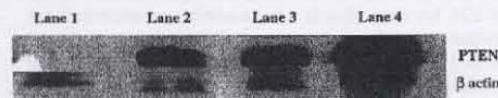


Figure 2: PTEN protein expression levels evaluated by Western blot analysis. Lane 1: Untreated Ishikawa cells; Lane 2: Positive PTEN-MCF7 cells; Lane 3: Ishikawa transfected by PTEN/JetPEI® complexes; Lane 4: Ishikawa cells transfected by PTEN/JetPEI® complexes using PCI. β -actin was used as reference protein.

Cell Growth Inhibition Following PTEN Gene Transfer

Cell growth inhibition following PTEN gene transfer was investigated using colony forming assays in Ishikawa cells transfected using JetPEI® alone or combined with PCI (Figure 3).

Without light, no significant variation in the cell growth ($P > 0.05$) was observed in control groups illustrating the absence of cellular toxicity of the experimental procedures. At the other hand, a slight difference in cell growth was observed in control cells treated with the photosensitizer and exposed to light. Whatever the transfection procedure, the PTEN gene transfer leads to a significant ($P < 0.01$) decrease of the cell viability compared to the irrelevant GFP gene transfer.

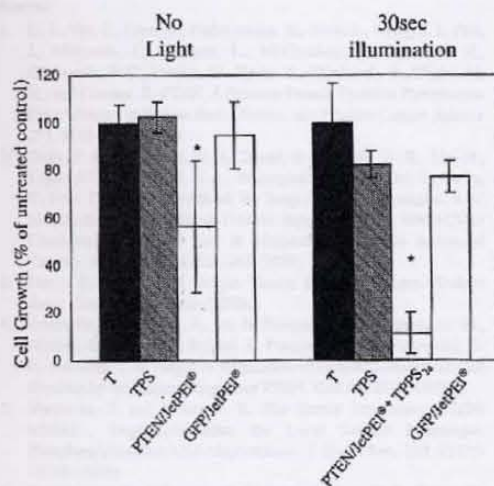


Figure 3: Cell growth inhibition in Ishikawa cells as assessed using colony-forming assays. Control experiments consisted of untreated control cells (T), PCI treated cells without PEI-DNA complexes (TPS), cells transfected with an irrelevant plasmid using JetPEI® combined with PCI (GFP/JetPEI®). Ishikawa cells were transfected using PTEN/JetPEI® complexes alone (PTEN/JetPEI®) or coupled with PCI (PTEN/JetPEI® + TPPS_{2a}). Results are expressed relative values to untreated control cells and are mean values of triplicate experiments. Error bars are standard deviations.

Whereas the JetPEI®-mediated PTEN gene transfer (PTEN/JetPEI®) induced a significant ($P < 0.05$) decrease in the cell growth (56%). PCI-mediated PTEN gene transfer (PTEN/JetPEI® + TPPS_{2a}) was found to further enhance this effect on cell growth with 89% cell growth inhibition.

PTEN is a tumor suppressor gene whose alterations (mutations, deletion) have been reported in various tumor types (3). PTEN mutations are associated with transcriptional and translational defects that abolish the protein functionality. Suppression of PTEN regulation results in constitutive activation of PI3 kinase/Akt signaling leading to inhibition of apoptosis and cell survival. Because PI3K/Akt plays a crucial role in cellular response to tyrosine kinase receptor activation, PTEN mutations have been shown to generate cellular resistance to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (22) and restoration of PTEN expression by gene transfer have been shown to reverse this resistance mechanism. It also has been found that PTEN induces growth suppression via cell cycle G1 arrest and/or induction of apoptosis (4, 6, 37, 38) and inhibits cell adhesion and migration. Regulation of androgen receptor signaling by PTEN has been recently reported in prostate cancer (39).

Previous reports showed that the PTEN tumor suppressor gene transfer induces cell apoptosis in a variety of cell

types including breast (10), prostate (39) and colorectal (40) cancers. Several data indicate that silencing of PTEN gene expression may be relevant in follicular thyroid cell transformation (41).

In all these studies, gene transfer was achieved in stable transfectants models using viral or nonviral vectors and subsequent selection. Stable transfectants are ideal models for cell signaling studies. However, no direct therapeutic application of this technique can be proposed since *in vivo*, no selection being applicable, most gene transfer techniques, viral and nonviral, yield transient transgene expression.

Studies that aim at improving the transfection ability by optimizing the physical properties (42-44) or the transfection procedure (25) have been reported. In this context, PCI, which is based upon light-induced disruption of photosensitized endocytic vesicles, has been shown to be efficient for gene transfer *in vitro* (29, 34, 36, 45) and protein toxin treatment *in vivo* (26). PCI was described to improve the transfection efficiency of several macromolecules (26, 31, 45, 46) and can be coupled with either viral (31) or nonviral vectors (29).

The purpose of the present study was to evaluate the potency of transient PTEN gene transfer in Ishikawa cells bearing PTEN abnormalities to initiate cell death.

The results achieved confirm the potency of PCI to lead to effective tumor suppressor gene transfer in cancer cells bearing mutations or deletions. As already reported PCI was found to potentiate the gene transfer efficiency achieved with a polyethylenimine derived nonviral vector (24, 36). Further, the high transfer rate was found to increase the transgene expression and to be associated with a higher spontaneous cell death induction.

The present results warrant further investigation of PCI-mediated PTEN gene transfer *in vitro* and *in vivo*.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. K. Berg (Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway), Dr. A. Hogset (PCI Biotech, Oslo, Norway), Prof. J. P. Behr (UMR CNRS 7514, Illkirch, France), Dr. P. Erbacher (Polyplus Transfection, Illkirch, France), Dr. C. Eng (Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Columbus, OH, USA), and Dr. P. Becuwe (EA 3446, Faculté des Sciences, Vandoeuvre les Nancy, France) for helpful collaboration and to Mrs. C. Ramacci for her expert technical assistance. This study was supported by grants from the French "Ligue Nationale contre le Cancer" and Alexis Vautrin Cancer Center private research funds.

References

- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovannella, B. C., Littmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R. PTEN, A Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science* 275, 1943-1947 (1997).
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., and Tavtigian, S. V. Identification of a Candidate Tumour Suppressor Gene, MMAC1, at Chromosome 10q23.3 that is Mutated in Multiple Advanced Cancers. *Nat. Genet.* 15, 356-362 (1997).
- Dahia, P. L. PTEN, A Unique Tumor Suppressor Gene. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 115-129 (2000).
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., and Mak, T. W. Negative Regulation of PKB/Akt-dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39 (1998).
- Maehama, T., and Dixon, J. E. The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 13375-13378 (1998).
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D. B., Perera, S., Roberts, T. M., and Sellers, W. R. Regulation of G1 Progression by the PTEN Tumor Suppressor Protein is Linked to Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2110-2115 (1999).
- Li, D. M., and Sun, H. PTEN/MMAC1/TEP1 Suppresses the Tumorigenicity and Induces G1 Cell Cycle Arrest in Human Glioblastoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15406-15411 (1998).
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., and Yamada, K. M. Inhibition of Cell Migration, Spreading, and Focal Adhesions by Tumor Suppressor PTEN. *Science* 280, 1614-1617.
- Li, J., Simpson, L., Takahashi, M., Miliareis, C., Myers, M. P., Tonks, N., and Parsons, R. The PTEN/MMAC1 Tumor Suppressor Induces Cell Death that is Rescued by the AKT/Protein Kinase B Oncogene. *Cancer Res.* 58, 5667-5672 (1998).
- Weng, L. P., Smith, W. M., Dahia, P. L., Ziebold, U., Gil, E., Lees, J. A., and Eng, C. PTEN Suppresses Breast Cancer Cell Growth by Phosphatase Activity-dependent G1 Arrest Followed by Cell Death. *Cancer Res.* 59, 5808-5814 (1999).
- Marsh, D. J., Dahia, P. L., Conlon, V., Zheng, Z., Dorion-Bonnet, F., Call, K. M., Little, R., Lin, A. Y., Eeles, R. A., Goldstein, A. M., Hodgson, S. V., Richardson, A. L., Robinson, B. G., Weber, H. C., Longy, M., and Eng, C. Allelic Imbalance, Including Deletion of PTEN/MMAC1, at the Cowden Disease Locus on 10q22-23, in Hamartomas from Patients with Cowden Syndrome and Germline PTEN Mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 21, 61-69 (1998).
- Perren, A., Komminoth, P., Saremaslani, P., Matter, C., Feurer, S., Lees, J. A., Heitz, P. U., and Eng, C. Mutation and Expression Analyses Reveal Differential Subcellular Compartmentalization of PTEN in Endocrine Pancreatic Tumors Compared to Normal Islet Cells. *Am. J. Pathol.* 157, 1097-1103 (2000).
- Cheney, I. W., Johnson, D. E., Vaillancourt, M. T., Avanzini, J., Morimoto, A., Demers, G. W., Wills, K. N., Shabram, P. W., Bolen, J. B., Tavtigian, S. V., and Bookstein, R. Suppression of Tumorigenicity of Glioblastoma Cells by Adenovirus-mediated MMAC1/PTEN Gene Transfer. *Cancer Res.* 58, 2331-2334 (1998).
- Cheney, I. W., Neuteboom, S. T., Vaillancourt, M. T., Ramachandra, M., and Bookstein, R. Adenovirus-mediated Gene Transfer of MMAC1/PTEN to Glioblastoma Cells Inhibits S Phase Entry by the Recruitment of p27Kip1 into Cyclin E/CDK2 Complexes. *Cancer Res.* 59, 2318-2323 (1999).
- Sakurada, A., Harnada, H., Fukushima, S., Yokoyama, T., Yoshinaga, K., Furukawa, T., Sato, S., Yajima, A., Sato, M., Fujimura, S., and Horii, A. Adenovirus-mediated Delivery of the PTEN Gene Inhibits Cell Growth by Induction of Apoptosis in Endometrial Cancer. *Int. J. Oncol.* 15, 1069-1074 (1999).
- Minaguchi, T., Mori, T., Kanamori, Y., Matsushima, M., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Nakamura, Y. Growth Suppression of Human Ovarian Cancer Cells by Adenovirus-mediated Transfer of the PTEN Gene. *Cancer Res.* 59, 6063-6067 (1999).
- Mohiuddin, I., Cao, X., Ozvaran, M. K., Zumstein, L., Chada, S., and Smythe, W. R. Phosphatase and Tensin Analog Gene Overexpression Engenders Cellular Death in Human Malignant Mesothelioma Cells via Inhibition of AKT Phosphorylation. *Ann. Surg. Oncol.* 9, 310-316 (2002).
- Stewart, A. L., Mhashilkar, A. M., Yang, X. H., Ekmekcioglu, S., Saito, Y., Siegel, K., Schrock, R., Onishi, E., Swanson, X., Mumm, J. B., Zumstein, L., Watson, G. J., Snary, D., Roth, J. A., Grimm, E. A., Ramesh, R., and Chada, S. PI3 Kinase Blockade by Ad-PTEN Inhibits Invasion and Induces Apoptosis in RGP and Metastatic Melanoma Cells. *Mol. Med.* 8, 451-461 (2002).
- Saito, Y., Swanson, X., Mhashilkar, A. M., Oida, Y., Schrock, R., Branch, C. D., Chada, S., Zumstein, L., and Ramesh, R. Adenovirus-mediated Transfer of the PTEN Gene Inhibits Human Colorectal Cancer Growth *In Vitro* and *In Vivo*. *Gene Ther.* 10, 1961-1969 (2003).
- Saito, Y., Gopalan, B., Mhashilkar, A. M., Roth, J. A., Chada, S., Zumstein, L., and Ramesh, R. Adenovirus-mediated PTEN Treatment Combined with Caffeine Produces a Synergistic Therapeutic Effect in Colorectal Cancer Cells. *Cancer Gene Ther.* 10, 803-813 (2003).
- Seki, M., Iwakawa, J., Cheng, H., and Cheng, P. W. p53 and PTEN/MMAC1/TEP1 Gene Therapy of Human Prostate PC-3 Carcinoma Xenograft, Using Transferrin-facilitated Lipofection Gene Delivery Strategy. *Hum. Gene Ther.* 13, 761-773 (2002).
- She, Q. B., Solit, D., Basso, A., and Moasser, M. M. Resistance to Gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing Tumor Cells can be Overcome Through Restoration of PTEN Function or Pharmacologic Modulation of Constitutive Phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt Pathway Signaling. *Clin. Cancer Res.* 9, 4340-4346 (2003).
- Weng, L. P., Smith, W. M., Dahia, P. L., Ziebold, U., Gil, E., Lees, J. A., and Eng, C. PTEN Suppresses Breast Cancer Cell Growth by Phosphatase Activity-dependent G1 Arrest Followed by Cell Death. *Cancer Res.* 59, 5808-5814 (1999).
- Ndoye, A., Merlin, J. L., Leroux, A., Dolivet, G., Erbacher, P., Behr, J. P., Berg, K., and Guillemin, F. Enhanced Gene Transfer and Cell Death Following P53 Gene Transfer Using Photochemical Internalization of Glucosylated PEI-DNA Complexes. *J. Gene Med.* 6, 884-894 (2004).
- Berg, K., Selbo, P. K., and Prasmickaite, L. Photochemical Internalization: A Novel Technology for Delivery of Macromolecules into Cytosol. *Cancer Res.* 59, 1180-1183 (1999).
- Selbo, P. K., Sivam, G., and Sandvig, K. *In Vivo* Documentation of Photochemical Internalization: A Novel Approach to Site-specific Cancer Therapy. *Int. J. Cancer* 92, 761-766 (2001).
- Selbo, P. K., Hogset, A., and Prasmickaite, L. Photochemical Internalization: A Novel Drug Delivery System. *Tumour Biol.* 23, 103-112 (2002).
- Hogset, A., Prasmickaite, L., Selbo, P. K., Hellum, M., Engesaeter, B. O., Bonsted, A., and Berg, K. Photochemical Internalization in Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56, 95-115 (2004).
- Prasmickaite, L., Hogset, A., and Tjelle, E. T. Role of Endosomes in Gene Transfection Mediated by Photochemical Internalization (PCI). *J. Gene Med.* 2, 477-488 (2000).
- Hogset, A., Prasmickaite, L., and Tjelle, E. Photochemical Transfection: A New Technology for Light-induced, Site-directed Gene Delivery. *Hum. Gene Ther.* 11, 869-880 (2000).

31. Hogset, A., Ovstebø Engesaeter, B., and Prasmickaite, L. Light-induced Adenovirus Gene Transfer, An Efficient and Specific Gene Delivery Technology for Cancer Gene Therapy. *Cancer Gene Ther.* 9, 365-371 (2002).
32. Hellum, M., Hogset, A., and Engesaeter, B. O. Photochemically Enhanced Gene Delivery with Cationic Lipid Formulations. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 407-411 (2003).
33. Merlin, J. L., Dollivet, G., Dubessy, C., Festor, E., Parache, R. M., Verneuil, L., Erbacher, P., Behr, J. P., and Guillemin, F. Improvement of Nonviral p53 Gene Transfer in Human Carcinoma Cells Using Glucosylated Polyethylenimine Derivatives. *Cancer Gene Ther.* 8, 203-210 (2001).
34. Prasmickaite, L., Hogset, A., Olsen, V. M., Kaalhus, O., Mikalsen, S. O., and Berg, K. Photochemically Enhanced Gene Transfection Increases the Cytotoxicity of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Combined with Ganciclovir. *Cancer Gene Ther.* 11, 514-523 (2004).
35. Stambolic, V., Mak, T. W., and Woodgett, J. R. Modulation of Cellular Apoptotic Potential: Contributions to Oncogenesis. *Oncogene* 18, 6094-6103 (1999).
36. Ndoye, A., Bouali, S., Dollivet, G., Leroux A., Erbacher, P., Behr, J. P., Berg, K., Guillemin, F., and Merlin, J. L. Sustained Gene Transfer and Enhanced Cell Death Following Glucosylated-PEI-mediated p53 Gene Transfer with Photochemical Internalization in p53-mutated Head and Neck Carcinoma Cells. *Int. J. Oncol.* 2004 (in press).
37. Furnari, F. B., Huang, H. J., and Cavenee, W. K. The Phosphoinositol Phosphatase Activity of PTEN Mediates a Serum-sensitive G1 Growth Arrest in Glioma Cells. *Cancer Res.* 58, 5002-5008 (1998).
38. Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P., and Tonks, N. K. The Lipid Phosphatase Activity of PTEN is Critical for its Tumor Suppressor Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 13513-13518 (1998).
39. Lin, H. K., Hu, Y. C., Lee, D. K., and Chang, C. Regulation of Androgen Receptor Signaling by PTEN Tumor Suppressor Through Distinct Mechanisms in Prostate Cancer Cells. *Mol. Endocrinol.* 2004 (in press).
40. Taniyama, K., Goodison, S., Ito, R., Bookstein, R., Miyoshi, N., Tahara, E., Tarin, D., and Urquidí, V. PTEN Expression is Maintained in Sporadic Colorectal Tumours. *J. Pathol.* 194, 341-348 (2001).
41. Tell, G., Pines, A., Arturi, F., Cesaratto, L., Adamson, E., Puppini, C., Presta, L., Russo, D., Filetti, S., and Damante, G. Control of PTEN Gene Expression in Normal and Neoplastic Thyroid Cells. *Endocrinology.* 2004 (in press).
42. Ogris, M., Steinlein, P., and Kursa, M. The Size of DNA/Transferrin-PEI Complexes is an Important Factor for Gene Expression in Cultured Cells. *Gene Ther.* 10, 1425-1433 (1998).
43. Kichler, A. Gene Transfer with Modified Polyethylenimines. *J. Gene Med.* 6, Suppl. 1: S3-10 (2004).
44. Zanta, M. A., Bousif, O., Adib, A. *In Vitro* Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine. *Bioconj. Chem.* 8, 839-844 (1997).
45. Bonsted, A., Engesaeter, B. O., Hogset, A., Maelandsmo, G. M., Prasmickaite, L., Kaalhus, O., and Berg, K. Transgene Expression is Increased by Photochemically Mediated Transduction of Polycation-complexed Adenoviruses. *Gene Ther.* 11, 152-160 (2004).
46. Selbo, P. K., Sivam, G., and Podstad, O. Photochemical Internalization Increases the Cytotoxic Effect of the Immunotoxin MOC31-Gelatin. *Int. J. Cancer.* 87, 853-859 (2000).

Date Received: July 15, 2004

VII.3. L'expression de PTEN contrôle la réponse cellulaire au cetuximab par inhibition des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK dans des cellules exprimant K-Ras sauvage

Bouali S, Chrétien AS, Ramacci C, Rouyer M, Becuwe P, Merlin JL

International Journal of Oncology

Résumé

La surexpression du récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) et la mutation du gène suppresseur de tumeur pten dans divers cancers sont impliquées dans l'activation constitutive des voies de signalisation en aval de l'EGFR, la voie de PI3K/AKT et la voie de RAS/RAF/MAPK ayant un rôle clé dans la résistance aux différentes thérapies ciblant l'EGFR. Le cetuximab, anticorps chimérique de la classe des IgG1 capable de se lier à l'EGFR avec une grande affinité, a été développé pour traiter diverses tumeurs solides incluant les cancers colorectaux et les cancers de la tête et du cou. L'activité du cetuximab dépend de la fonctionnalité des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK. Il a été montré qu'il est plus efficace dans les tumeurs exprimant K-Ras sauvage.

Afin d'étudier l'influence de l'expression de PTEN sur la réponse cellulaire au cetuximab nous avons utilisé des cellules de cancer de prostate présentant un génotype K-Ras sauvage, surexprimant l'EGFR mais n'exprimant pas la protéine PTEN.

La réintroduction de pten dans ces cellules a permis de réduire significativement l'expression constitutive de phospho-AKT (p-AKT) et les protéines kinases en aval, p-GSK3 β et p-P70S6K ainsi que phospho-ERK1/2 entraînant par conséquent la restauration significative de l'inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose. Dans notre étude, nous avons montré que PTEN contrôle la réponse cellulaire au cetuximab dans les cellules exprimant K-Ras

sauvage par la régulation de la phosphorylation de l'AKT et la restauration de la fonctionnalité des voies en aval de l'EGFR.

L'extrapolation de ces résultats en clinique suggère que la fonctionnalité des voies de signalisation en aval de l'EGFR peuvent être proposée comme un marqueur prédictif de la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR.

PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in K-RAS wild type, hormone refractory prostate cancer cells.

Sanae Bouali^{1*}, Anne-Sophie Chrétien^{1*}, Carole Ramacci^{1*}, Marie Rouyer^{1*}, Philippe Becuwe^{2*}, Jean-Louis Merlin^{1*}

¹ Centre Alexis Vautrin, Unité de Biologie des Tumeurs, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

² Laboratoire de Biologie cellulaire, Faculté des Sciences, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

* EA « Predicther » and Plateforme de Recherche Translationnelle en Oncologie, « Oncotrans », Nancy Université

Running title: Pten, signaling and cell response to cetuximab

Key words: EGFR, cetuximab, PTEN, gene transfer, K-Ras

Correspondence:

Jean-Louis Merlin, PharmD, PhD

Unité de Biologie des Tumeurs

Centre Alexis Vautrin

Avenue de Bourgogne

54511 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France

Tel : +33 383 59 83 07

Fax : +33 383 59 85 69

Email: jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

ABSTRACT

Overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and mutation of pten tumor suppressor gene in human cancer cells leads to activated EGFR downstream signaling (PI3K/AKT) and/or mitogen-activated protein kinases (RAS/RAF/MAPK) and have been linked to resistance to anti-EGFR targeted therapies. Cetuximab is a chimeric IgG1 monoclonal antibody that binds the EGFR with high specificity and have been developed as promising therapeutic anticancer treatments in several solid tumors, including colorectal and head and neck squamous cell carcinomas. Cetuximab activity is related to PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK signaling pathways functionality and its activity has been shown to be higher in wild type K-RAS tumors.

To study the influence of PTEN expression on cell response to cetuximab, we used wild-type K-RAS, PTEN-null, EGFR overexpressing PC3 prostate cancer cells. Reintroduction of PTEN significantly reduced the constitutive overexpression of phosphorylated-AKT (p-AKT) and downstream kinases (p-GSK3 α and p-P70S6 kinase) as well as phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK1/2) and consequently significantly restored cetuximab-induced cell growth inhibition and apoptosis induction. Taken together, the results achieved in the present study show that PTEN controls the cellular response to cetuximab in K-Ras wild type prostate carcinoma PC3 cells through the regulation of AKT phosphorylation and restoration of the functionality of EGFR downstream signaling. Extrapolation of these findings to clinical situation, suggests that assessment of EGFR downstream signaling functionality could be proposed as a diagnostic response predictive marker for anti-EGFR targeted therapies.

INTRODUCTION

EGFR is overexpressed in many tumor types and its inhibition represents an innovative therapeutic approach of targeted therapy. EGFR inhibition can be achieved through different manners including monoclonal antibodies prevention of ligand binding to the extracellular part of the receptor and tyrosine kinase inhibition at the intracellular level. Cetuximab is a chimeric monoclonal antibody binding EGFR with high affinity and abrogating the ligand-induced dimerization and phosphorylation of the receptor [1]. EGFR inhibition by cetuximab decreases cell proliferation, increases apoptosis, and decreases angiogenesis [2]. However, number of EGFR overexpressing tumors fail to respond to EGFR-targeted therapy. Recently, in colorectal cancer [3, 4], resistance to cetuximab has been associated with K-Ras mutations. However, in K-Ras wild-type tumors, some additional functional alterations of EGFR downstream signaling have been related to shorter progression-free survival [5]. K-Ras mutations have been reported in prostate cancer [6]. Additionally, alteration of pten gene has been shown to promote prostate cancer progression [7]. PTEN antagonizes the action of PI3-kinase (PI3K) and negatively controls downstream signaling by inhibiting the phosphorylation of AKT [8]. PI3K/AKT pathway has also been reported to cross talk with MAP kinase (MAPK) signaling pathway by autocrine signaling through RAS [9]. Consequently, the loss of PTEN expression could putatively affect the response to cetuximab by impairing PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK signaling downstream to EGFR.

A recent study investigating protein expression demonstrated that PTEN plays a fundamental role in predicting the response to cetuximab against EGFR in metastatic colorectal cancer [10]. In the present study we used the PC3 human prostate carcinoma cell line harboring PTEN deletion. Our investigation was designed to evaluate how restoring PTEN expression would affect cetuximab-mediated growth inhibition and apoptosis induction, regarding the implication of PI3K/AKT and MAPK signaling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

PC3 cell line was obtained from the American Type Culture Collection. The cells were maintained at 37°C/5% CO₂ in RPMI 1640 culture medium, supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (Dutscher, Brumath, France) and 1% glutamine. Culture media and additives were from Life Technologies (Eragny, France).

K-Ras genotyping

PC3 cells were checked for K-Ras mutations (codon 12 and 13) using two-step PCR-RFLP according to Schimanski et al [11]. Briefly, DNA was extracted from 10⁹ cells suspension. The amount of DNA isolated was determined spectrometrically and 100 ng DNA was used as template for the first PCR (Master Cycler Gradient, Eppendorf, Germany) with the oligonucleotide primers Ras A (sense; 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTCCATGGAGCT-3') and Ras B (antisense; 5'-TTATCTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCA-3'). PCR products were then submitted to enzymatic digestion with either BstXI or XcmI, restricting the amplicon if the first two bases of codon 12 (BstXI) and codon 13 (XcmI) were wild-type. two µl of the first digest were used as template for the second PCR in which primer Ras C (antisense; 5'-GGATGGTCCTCCACCAGTAATATGGATATTA-3') was used instead of Ras B. Seven µl of the second PCR were digested with either BstXI or XcmI. Ten µl of the digest were submitted to PAGE stained with ethidium bromide and analyzed under UV light (GelDoc EQ, Bio-Rad). DNA extracts from cell lines bearing codon 12 or/and 13 mutations were added as positive controls.

Gene transfer

Linear polyethylenimine (PEI) was kindly provided by Polyplus-Transfection (Illkirch, France). pCMV-Luc (Dr P Erbacher, Polyplus-Transfection), and pPTEN (Dr K Yamada, NIH, Bethesda, MD) plasmids, encoding luciferase and pten genes respectively, were purified from *Escherichia coli* using Marligen Maxiprep columns (Life Technologies, Eragny, France). Gene transfer was performed as already published [12] with slight modifications. Briefly, the cells were seeded at the density of $5 \cdot 10^4$ /ml in 6-well plates 48 h before transfection, to reach 60-70% confluence at the time of transfection. 5µg/ml of pCMV-Luc or pPTEN plasmids and corresponding amount of PEI were separately prepared and the resulting mixture was added to the cells. 24 h after transfection cells were submitted to 100µg/ml cetuximab (Merck Liphaz Sante, Lyon, France) and analyzed for cell growth inhibition and apoptosis induction.

Western blot analysis of EGFR and PTEN expression

EGFR and PTEN protein analysis was performed using western blot with monoclonal antibodies directed against EGFR and PTEN (dilution 1/500, Dako, Trappes, France). Tubulin was used as internal loading control (dilution 1/500, Santa Cruz).

Bio-Plex[®] phosphoprotein array

Phosphoproteins were analyzed using multiplex sandwich bead immunoassays (Bio-Plex[®] phosphoprotein array, Bio-Rad, Hercules CA) in cells exposed to EGF (100ng/ml, for 5 min). Phosphoprotein determination kits (Bio-Rad) were used according to the manufacturer's recommendations. Briefly, protein extracts were transferred into 96-well dishes then fluorescent capturing beads coupled to antibodies directed against the RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT signaling phosphoproteins (phospho-AKT, phospho-GSK3β, phospho-p70S6K, phospho-ERK1/2) were mixed, and added into each well and incubated overnight. Following

incubation, the plates were washed and incubated with biotinylated antibodies fixing each target protein. Streptavidin-phycoerythrin solution was then added. The analysis consisted in a double laser fluorescence detection allowing simultaneous identification of the target protein through the red fluorescence emission signal of the bead and quantification of the target protein through the fluorescence intensity of phycoerythrin. Results were recorded as mean fluorescence intensities and compared to negative controls. Positive control consisting in standard protein extract from cell lines were added to each series. This technique was previously cross-validated with western blot analysis [13].

Cell growth inhibition assay

Cell growth inhibition assays were performed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Briefly, the cells were seeded in 24-well dishes and allowed to grow for 24 h before being transfected then exposed to cetuximab for 24 hours. Following incubation 250µl of MTT was added into each well. The reaction was allowed to proceed for 3 h at 37°C, then the formazan crystals were dissolved by adding 250µl of sodium dodecylsulfate and the absorbance was measured at 540 nm (Multiskan Ascent LabSystem).

Apoptosis induction

Apoptosis induction was first determined by the analysis of DNA fragmentation (subG1 peak) by flow cytometry (FACS calibur, Becton Dickinson) using propidium iodide labeling. Briefly, cetuximab treated cells were trypsinized, washed with PBS, fixed in 70% ethanol for 30 min at 4°C, and suspended in PBS containing propidium iodide (1mg/ml) and RNase A (20 mg/ml). Fixed cells were subjected to flow cytometry and subG1 cell population, identified as hypoDNA-diploid cell population was calculated.

Active caspase-3 expression was measured as molecular marker for apoptosis induction using flow cytometry in cells fixed in Cytofix/Cytoperm™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), then were incubated with phycoerythrin-conjugated anti-active caspase-3 antibodies (PharMingen–Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) for 30 min. Cells were washed and 500 µl of 1 × Perm/Wash™ was added before analysis by flow cytometry. Active-caspase 3 expressing cell population identified as phycoerythrin-labeled cell population was quantified.

Statistical analysis

Differences between mean values were evaluated using either one-way ANOVA with Dunnett's test or Kruskal Wallis with Mann Whitney test according to data distribution.

$P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

K-RAS genotyping

As revealed by PCR-RFLP (fig 1), no mutation in either codon 12 or codon 13 was detected in PC3 cells DNA extracts.

EGFR, PTEN expression

In untransfected PC3 cells, EGFR overexpression was observed in PC3 cells (fig 2A). No PTEN expression was observed (fig 2B). Following gene transfer, pten gene was found to be restored (fig 2B).

RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT signaling

Constitutive overexpression of phosphorylated-AKT (p-AKT) and consequent overexpression of AKT downstream signaling phosphoproteins, phosphorylated-GSK3 β (p-GSK3 β and phosphorylated-P70S6K (p-P70S6K) was observed in untransfected control cells as awaited in relation with pten-null phenotype (fig 3). Constitutive overexpression of phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK1/2) was also observed. Exposure of control cells (untransfected control cells and cells transfected with pCMV-Luc irrelevant plasmid) to cetuximab did not induce any significant ($P>.05$) variation of p-AKT and p-GSK3 β expression. Cetuximab induced significant decrease in p-P70S6K and p-ERK1/2 expression, respectively down to 67% ($P<.05$) and to 46% ($P<.01$) of the initial values achieved in untreated controls.

Pten gene transfer was found to significantly restore inhibition of AKT signaling. p-AKT expression was significantly ($P<.01$) reduced down to 37% of the value achieved in untransfected controls. Decreased p-GSK3 β and p-P70S6K expression was also observed

down to 62% and 55% of the value measured in untransfected controls. Additionally, p-ERK1/2 expression was significantly ($P<.01$) reduced down to 73% of the value measured in untransfected controls. The expression of all phosphoproteins was found to be further significantly ($P<.05$) reduced, down to 5-20% of the values observed in untransfected controls, when the pten-transfected cells were exposed to cetuximab.

Growth inhibition and apoptosis induction by cetuximab

Pten-transfected PC3 cells were exposed to cetuximab (100 μ g/ml for 24 h) and assayed for cell growth inhibition and apoptosis induction. Negative controls consisted in untransfected cells. No significant difference was found between untransfected cells and cells transfected with irrelevant plasmid (pCMV-Luc) (data not shown).

No significant growth inhibition and apoptosis induction was observed in untransfected control cells exposed to cetuximab (fig 4).

Pten-transfected cells were found to be significantly ($P<.01$) sensitized to cetuximab with significant increase in cell growth inhibition, DNA fragmentation (sub G1) and caspase-3 expressing cell fraction.

DISCUSSION

The present study was performed in PC3 human prostate cancer cell line which is referenced as pten null also because of a deletion of the 3' end of pten gene and promoting the absence of the full length pten m-RNA [14]. No mutation of PI3K has been described in these cells illustrating that PI3K/AKT signaling pathway functionality should be extremely dependent on PTEN expression. Consistently, pten mutated status was found to be associated with constitutive activation of AKT in PC3 cells and the constitutive high level of expression of phosphorylated AKT was associated with a reduced sensitivity of PC3 cells to cetuximab. The data achieved in the present study are fully consistent with results showing that PC3 are resistant to apoptosis induction [15].

As awaited, reinstating PTEN in PC3 cells promoted a decrease in phosphorylation of AKT and its downstream signaling, and consequently induced the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis, confirming the key role of PTEN in the control of the cell survival pathway. These results are consistent with the now well-established model in which PTEN was shown to be essential for controlling cell growth in prostate human cancer cell lines [16] by regulating PI3K/AKT signaling pathways by decreasing the pool of phosphorylated proteins. Many studies demonstrated that p-AKT overexpression is associated with resistance to EGFR inhibitors. Further, it has been showed [17] that resistance to cetuximab was associated with p-AKT overexpression and repression of AKT expression by siRNA restored the cell sensitivity to cetuximab. Accordingly, we showed here that PTEN reintroduction restored the cell response to cetuximab by restoring inhibition of p-AKT and to a lesser extend by promoting p-ERK1/2 inhibition. Therefore, these data further confirmed that AKT signaling pathways functionality are controlled by PTEN and contribute to cetuximab activity. These results strongly suggest that, in K-RAS wild type cells, pten-mutated status, could be predictive of cellular resistance to cetuximab and warrant clinical evaluation to evaluate

whether patients with pten mutated prostate tumors, are unlikely to respond to this treatment as already shown with ras-mutation in colorectal cancer treated by cetuximab [3] or in breast cancer treated by trastuzumab [18]. In such situation, common diagnostic criteria could be the determination of signaling phosphoprotein expression in tumors [19]. Preliminary results achieved in breast [20], head and neck [21] and colon carcinoma [5] using Bio-Plex[®] phosphoprotein array demonstrated that large variation in phosphoprotein expression can be found in clinical specimens at diagnosis. Such variations were further demonstrated contribute to variation in progression-free survival of patients with metastatic colorectal cancer treated by cetuximab [5]. In the case of signaling alteration, addition of targeted therapy directed against PI3K downstream signaling kinases could be proposed to obtain greater antitumor signaling inhibition. Also, gene therapy could be envisaged in tumors with genes alteration, as already proposed in preclinical *in vivo* models [22-23].

Acknowledgements:

This study was supported by grants from the French «Ligue Nationale Contre le Cancer » and Alexis Vautrin Cancer Center private research funds

REFERENCES

- [1] Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*; 19: 6550-6565, 2000.
- [2] Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37(Suppl 4):S3–8, 2001.
- [3] Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*; 66: 3992-3995, 2006
- [4] Lièvre A, Bachet JB, Boige V et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26:374-379, 2008
- [5] Merlin JL, Perkins G, Lièvre A et al. Additonal value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to K-Ras mutation for response prediction to cetuximab in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 209s, 2008
- [6] Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 119, 1858-1862, 2006
- [7] McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Clin Cancer Res*; 59:4291-4296, 1999
- [8] Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*; 273:13375-13378, 1998
- [9] Sakata K, Kato S, Fox JC, Shigemori M, Morimatsu M. Autocrine signaling through Ras regulates cell survival activity in human glioma cells: potential cross-talk between Ras and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *J Neuropathol Exp Neurol*.;61: 975-983, 2002

- [10] Frattini M, Saletti P, Romagnani E, et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 97:1139-45, 2007
- [11] Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. Sensitive detection of K-Ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer Res*, 59: 5169-5175, 1999.
- [12] Maurice-Duelli A, Ndoeye A, Bouali S, Leroux A, Merlin JL. Enhanced cell growth inhibition following PTEN nonviral gene transfer using polyethylenimine and photochemical internalization in endometrial cancer cells. *Technol Cancer Res Treat* 3:459-465, 2004.
- [13] Chrétien AS, Chergui F, Bastogne T, et al. Validation of phosphoprotein array assay for the determination of human epidermal growth factor receptors downstream signaling phosphoproteins in breast cancer. *Eur J Cancer*, 9, 96, 2008
- [14] Sharrard RM, Maitland NJ. Phenotypic effects of overexpression of the MMAC1 gene in prostate epithelial cells. *Br J Cancer*; 83:1102-1109, 2000.
- [15] Wu ZX, Song TB, Li DM, Zhang XT, Wu XL. Overexpression of PTEN suppresses growth and induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in bladder cancer cells. *Tumour Biol*; 28:9-15, 2006
- [16] Astanehe A, Arenillas D, Wasserman WW, et al. Mechanisms underlying p53 regulation of PIK3CA transcription in ovarian surface epithelium and in ovarian cancer. *J Cell Sci*. 121:664-674, 2008
- [17] Li X, Luwor R, Lu Y, Liang K, Fan Z. Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. *Oncogene*; 25:525-535, 2006.
- [18] Nagata Y, Lan K-H, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*. 6:117-127, 2004

- [19] Merlin JL, Genin P, Harle A, et al. Phosphoprotein Array in tumor biopsies for molecular diagnosis of PI3 Kinase and MAP Kinase signaling functionality. *Mol. Cancer Ther* 6: 3540s, 2007
- [20] Merlin JL, Longavenne E, Chergui F, et al. Exploring human epidermal growth factor receptors downstream signaling by multiplex phosphoprotein determination in breast cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 47: Abstr 3607, 2006
- [21] Merlin JL, Mriouah J, Dolivet G, et al. Signaling phosphoproteins in head and neck squamous cell carcinoma: relation with cellular sensitivity to cetuximab and interest of multiplex determination using Bio-Plex protein array. *Proc Amer Assoc Cancer Res*. 48: Abstr 185, 2007
- [22] Davies MA, Kim SJ, Parikh NU, Dong Z, Bucana CD, Gallick GE. Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 8:1904-14, 2002
- [23] McRae EJ, Giannoudis A, Ryan R, et al. Gene therapy for prostate cancer: current strategies and new cell-based approaches. *Prostate*, 66: 470-494, 2006

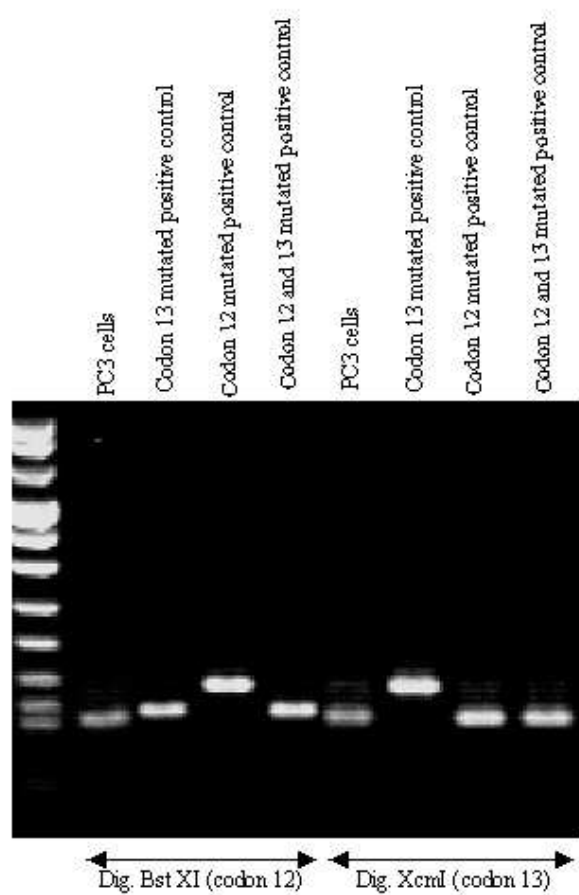
FIGURE LEGENDS

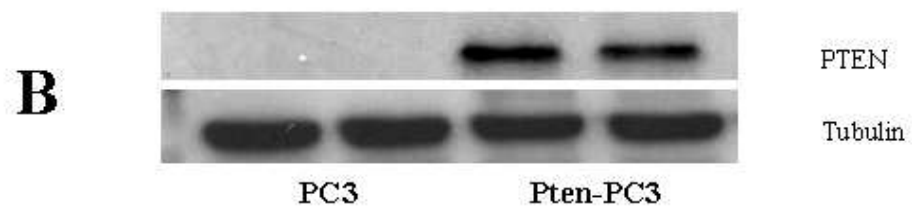
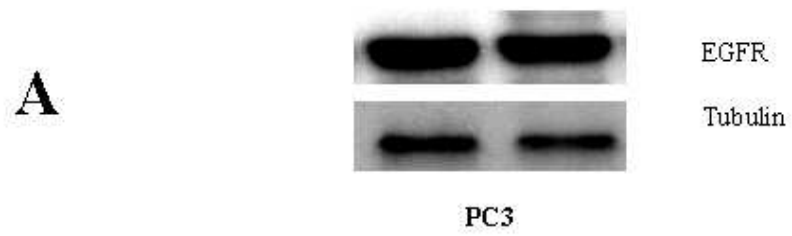
Figure 1: K-Ras mutation analysis using PCR-RFLP. DNA extract from PC3 cells were submitted to double PCR amplification after BstXI and XcmI enzymatic digestion allowing discrimination of codon 12 and codon 13 mutations. Codon 12 and codon 13-mutated cell lines were used as positive controls.

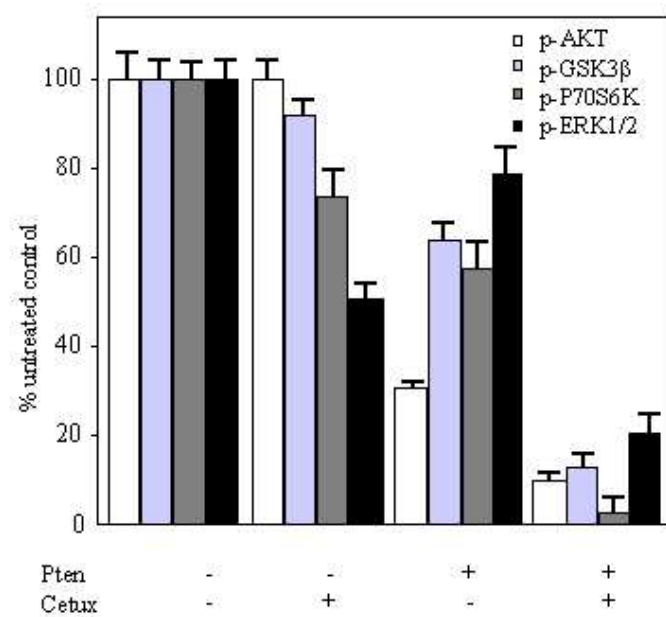
Figure 2: EGFR (A) and PTEN (B) protein expression analysis using western blotting. β -tubulin was used as loading control.

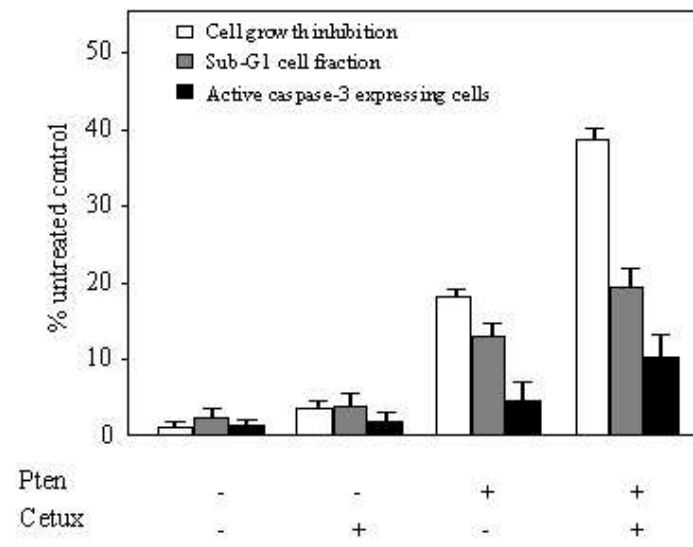
Figure 3: Analysis AKT and MAPK signaling pathways functionality using Bio-Plex[®] phosphoprotein array. Effect of pten restoration and exposure to cetuximab on AKT and MAPK signaling pathways. In each gene transfer condition, p-AKT, p-GSK3 β , p-P70S6K, p-ERK1/2 expression was analyzed using Bio-Plex[®] phosphoprotein array in total protein extracts from cell lysates. Results are expressed as mean values of three independent experiments, relative to untransfected controls

Figure 4: Analysis of cell growth inhibition and apoptosis induction in pten-transfected PC3 cells exposed to cetuximab for 24 hours. Cell growth inhibition was assessed using MTT assay. Apoptosis was analyzed by quantifying sub G1 cell population determination after propidium iodide staining of cells and by detection of active caspase 3 expression using flow cytometry. Results are expressed as mean values of three independent experiments, relative to untransfected controls.









VII.4. Influence de la fonctionnalité de PTEN et de P53 sur la réponse cellulaire au cetuximab

Bouali S, Chrétien AS, Ramacci C, Rouyer M, Marchal S, Galenne T, Juin P, Becuwe P, Merlin JL

Soumis à Cancer Gene Therapy

Résumé

Le cétuximab (Erbix[®]) est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie spécifiquement au domaine extracellulaire du récepteur à l'EGFR et bloque les voies de signalisation cellulaire (PI3K/AKT et MAPK) normalement activées en aval du récepteur. Des études récentes ont montré que p53 et pten régulent ces voies de signalisation. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'influence de la fonctionnalité des protéines PTEN et P53 sur la réponse cellulaire au cetuximab (survie cellulaire, induction d'apoptose). Cette étude a été réalisée *in vitro* sur la lignée cellulaire PC3 issue d'un cancer de prostate humain, surexprimant l'EGFR, portant des mutations de p53 et de pten. Le transfert des gènes pten et/ou p53 a permis de rétablir la fonctionnalité des voies de signalisation PI3K/AKT/MAPK et de restaurer la réponse cellulaire au cetuximab. Cet effet passe par une inhibition significative ($P < 0,05$) de l'expression basale de p-Akt (40% à 63%), de p-GSK3 β (38% à 72%), de p-P70S6K (33% à 45%) et de p-ERK1/2 (27% à 53%), une diminution significative de la croissance cellulaire (20-40%) et une augmentation significative de la population apoptotique (11-25%). Ces résultats confirment que l'effet du cétuximab est en grande partie dépendant de la fonctionnalité de PTEN mais également de celle de P53. Ceci est en accord avec des données récentes, montrant que l'activation de P53 inhibe la voie de signalisation PI3K/AKT dans les cellules PTEN $-/-$, et ce par l'inactivation de PIK3CA (gène codant pour la sous unité

catalytique de la PI3K). En conclusion les mutations de p53 et pten peuvent être des marqueurs prédictifs de la réponse cellulaire au cetuximab. Les résultats de ce travail montrent l'intérêt de l'analyse de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval de l'EGFR. A terme cette analyse pourrait être proposée afin de préciser les critères de prescription des thérapies ciblées.

P53 GENE TRANSFER POTENTIATES PTEN MEDIATED INHIBITION OF EGFR DOWNSTREAM SIGNALING PATHWAY BY CETUXIMAB

Sanae Bouali^{1*}, Anne-Sophie Chrétien^{1*}, Carole Ramacci^{1*}, Marie Rouyer^{1*}, Sophie Marchal^{1#}, Tristan Galenne², Philippe Juin², Philippe Becuwe³, Jean-Louis Merlin¹

1 Centre Alexis Vautrin, *Unité de Biologie des Tumeurs EA3452 Nancy Université
#CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy
cedex, France.

2 INSERM U601, CHU de Nantes, Institut de Biologie, 9 Quai Moncousu, 44093 Nantes,
France.

3 Laboratoire de biologie cellulaire EA 3446 Nancy Université, Faculté des Sciences, 54506
Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Running title: P53 enhanced cetuximab sensitivity

Key words: EGF receptor inhibitors, cetuximab, P53, PTEN, gene transfer

Correspondence:

Jean-Louis Merlin, PharmD, PhD

Unité de Biologie des Tumeurs

Centre Alexis Vautrin

Avenue de Bourgogne

54511 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France

Tel : +33 383 59 83 07

Fax : +33 383 59 85 68

Email: jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

ABSTRACT

Cetuximab (Erbix®) is an anti-EGFR monoclonal antibody whose activity is related to the inhibition of EGFR downstream signaling pathways. P53 and PTEN have been reported to control the functionality of PI3K/AKT signaling. In this study we evaluated whether re-introducing P53 using non viral gene transfer enhances PTEN mediated inhibition of PI3K/AKT signaling by cetuximab in PC3 prostate adenocarcinoma cell line bearing p53 and pten mutations. Signaling phosphoproteins expression was analyzed using Bio-Plex® phosphoprotein array and western blot. Apoptosis induction was evaluated from BAX expression, caspase-3 activation and DNA fragmentation analyses. The results presented show that p53 gene transfer potentiates pten mediated cell growth inhibition and apoptosis induction by restoral of signaling functionality which enabled the control of PI3K/AKT and MAPK signaling pathways by cetuximab in PC3 cells. These results highlight the interest of the analysis of signaling phosphoproteins expression as molecular predictive markers for response to cetuximab and show that p53 and pten mutations could be key determinants of cell response to cetuximab through the functional impact of these mutations on cell signaling.

INTRODUCTION

The high frequency of overexpression of EGFR in various cancers ¹ and its major key role in tumorigenesis have suggested that inhibition of EGFR stimulation and inhibition of downstream signaling pathways could represent new therapeutic approaches in cancer treatment and have opened the way of targeted therapies. Different concepts have been proposed for inhibition of EGFR activation including monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. Cetuximab is a chimeric monoclonal antibody developed for therapeutic purposes, that binds to EGFR with high affinity and abrogates ligand-induced EGFR phosphorylation ². In preclinical models, EGFR inhibition by monoclonal antibody or by the use of tyrosine kinase inhibitors has been associated with decreased cell proliferation, increased apoptosis, and decreased angiogenesis ³⁻⁵. However, a large number of patients whose tumors overexpress EGFR do not respond to targeted therapy ^{6, 7}. In prostate cancer, frequent gene mutations concern the p53 and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (pten) tumor suppressor genes. P53 is a transcription factor that regulates the cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis. In fact, p53 is probably the most frequently mutated gene in human cancer. Loss of p53 contributes to tumor progression, therapeutic resistance, and is often associated with a poor prognosis. The rate of mutations in prostate cancer in the p53 tumor suppressor gene varied among tumors of different aggressiveness, ranging from 5% for patients with clinically localized disease to 62% in metastatic disease ⁸. P53 may also affect the signaling pathways that are involved in cell growth and transformation. P53 re-introduction has been shown to significantly produce greater apoptosis and tumor growth suppression any other drug alone ⁸. Recent data showed that sensitivity to gefitinib is affected by P53 mutation and that P53 inhibition induces a significant decrease in apoptosis induction by gefitinib ⁹. Previous study already demonstrated that cetuximab inhibited the growth of wild type p53 but not of mutated p53 cancer cells and hypothesized

that resistance to cetuximab could related to p53 mutation 10. Additionally, recent study showed that induction of P53 resulted in decreased in phosphorylated AKT activity in cell line, that did not express PTEN protein, thus highlighting that p53 was involved in regulation of survival PI3K/AKT pathway in epithelial tumors, and independently of PTEN expression 11. It was reported that activation of p53-dependent downstream targets BAX with concomitant increased of MAPKinase (MAPK) pathways leading to apoptosis.¹² Altogether, these data indicated that the relationship between P53, PI3K/AKT and MAPK signaling pathways offers novel valuable insights into the resistance to targeted therapy.

Pten was identified in 1997 as tumor suppressor 13 and alteration of pten gene has been shown to promote prostate cancer progression 14. PTEN antagonizes the action of PI3K and negatively controls the downstream pathway by inhibiting the phosphorylation of AKT 15. Consequently, the loss of PTEN expression leads to an elevated activation of AKT 16, 17. A recent study investigating protein expression demonstrated that PTEN play a fundamental role in predicting the response to cetuximab against EGFR in metastatic colorectal cancer.¹⁸ A previous study 19 showed that loss of PTEN expression was associated with resistance to gefitinib, and that re-introduction of PTEN restored cell sensitivity of gefitinib, thus suggesting that signaling pathway may play a central role in the development of resistance to EGFR inhibitors. In the present study we used PC3 human prostate carcinoma cell line harboring P53 and PTEN mutations. Our investigation was designed to evaluate whether p53 transfer could enhance PTEN mediated growth inhibition and apoptosis induction to investigate the implication of PI3K/AKT and MAPK signaling proteins in response to cetuximab.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

PC3 cell line was obtained from the American Type Culture Collection. The cells were cultured at 37°C/5% CO₂ in RPMI 1640, supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Dutscher, Brumath, France) and 1% glutamine. Culture media and additives were from Life Technologies (Eragny, France).

Gene transfer

Linear polyethylenimine (PEI) was kindly provided by Polyplus-Transfection (Illkirch, France). pCMV-Luc (Dr P Erbacher, Polyplus-Transfection), pNCNeo (Dr JM Heard, Institut Pasteur, Paris, France) and pPTEN (Dr K Yamada, NIH, Bethesda, MD) plasmids, encoding luciferase, p53 and pten genes respectively, were purified from *Escherichia coli* using Marligen Maxiprep columns (Life Technologies, Eragny, France).

Gene transfer was performed as already published 20 with slight modifications. Briefly, the cells were seeded at the density of 5.10⁴/ml in 6-well plates 48 h before transfection, to reach 60-70% confluence at the time of transfection. 5µg/ml of pCMV-Luc or pNCNeo or pPTEN plasmids and corresponding amount of PEI were separately prepared and the resulting mixture was added to the cells. 24 h after transfection cells were submitted to 100µg/ml cetuximab (Merck Lipha Sante, Lyon, France) and analyzed for cytotoxicity and apoptotic induction. Pten and p53 co-transfer was achieved using 2.5µg/ml of each plasmid.

mRNA expression analysis

Pten-mRNA and p53-mRNA expression was analyzed using semi-quantitative RT-PCR with b2-microglobulin (b2M1) as reference housekeeping gene as already reported.^{20, 21}

Western Blot

Cells were exposed to EGF (100ng/ml) for 5 min (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Western blots were carried out with total protein extracted from cells as already described using monoclonal antibody directed against PTEN, pPTEN, P53, AKT, pAKT, GSK, pGSK, P70S6K, pP70S6K, ERK1/2, pERK1/2, BAX and tubulin 22 [Supplemental files, Table I]. Antibodies were used between 1/500 to 1/3000 dilution range and were provided by Cell Signaling, except PTEN, tubulin (Santa Cruz) and BAX (Dako). Quantification of relative band densities was performed using standard densitometry scanning techniques (Rasband, W.S, Image J, US National Institute of Health, Bethesda, Maryland).

Immunocytochemistry

PC3 cells were immunocytochemically analyzed for total EGFR, PTEN and P53. After a 5-min cytospin at 1000 rpm (Shandon Cytospin®4 Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France), the slides (Thin prep®) were fixed 10 min in 96% ethanol. Immunocytochemistry was then performed after digestion in pH 6 10 mmol/l citrate buffer, before exposure to the primary antibody. Briefly, the slides were treated by hydrogen peroxide, then incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies against either PTEN (1:100 dilution), P53 (1:100 dilution) or EGFR (1:100 dilution) (Dako, Trappes, France). Cells were then stained with biotinylated immunoglobulin secondary antibody according to the manufacturer's recommendations, revealed using LSAB kit (DAKO, Trappes, France). The slides were counterstained with hematoxylin. Negative control slides, without primary antibody, were examined for each staining.

Bio-Plex® phosphoprotein array

Phosphoproteins were analyzed using Bio-Plex® phosphoprotein array (Bio-Rad, Hercules CA) based on multiplex sandwich bead immunoassays. Cells were exposed to EGF (100ng/ml) for 5 min. Phosphoprotein determination kits (Bio-Rad) were used according to the manufacturer's recommendations. Briefly, protein extracts were transferred into 96-well dishes and diluted with 25µl buffered solution. Fluorescent capturing beads coupled to antibodies directed against the phosphoproteins (phospho-AKT, phospho-GSK3β, phospho-p70S6K, phospho-ERK1/2) were mixed, and added into each well and incubated overnight. Following incubation, the plates were washed and incubated with biotinylated antibodies fixing each target protein. Streptavidin-phycoerythrin solution was then added. The analysis consisted in a double laser fluorescence detection allowing simultaneous identification of the target protein through the red fluorescence emission signal of the bead and quantification of the target protein through the fluorescence intensity of phycoerythrin. Results were recorded as mean fluorescence intensities and compared to negative controls. Positive control consisting in standard protein extract from cell lines were added to each series.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assays were performed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Briefly, the cells were seeded in 24-well dishes and allowed to grow for 24 h before being transfected with pten/PEI or p53/PEI complexes. Cells were then treated with cetuximab for 24 hours. All incubations were terminated by adding 250µl of MTT in each well. The reaction was allowed to proceed for 3 h at 37°C. The formazan crystals were dissolved by adding 250µl of sodium dodecylsulfate, and the absorbance was measured at 540 nm (Multiskan Ascent LabSystem).

Apoptosis induction

DNA fragmentation apoptosis induction was analyzed by flow cytometry (FACS calibur, Becton Dickinson) using propidium iodide labeling. Evidence of apoptotic cells was determined by the induction of DNA fragmentation (subG1 peak). Briefly, cetuximab treated cells were trypsinized, washed with PBS, fixed in 70% ethanol for 30 min at 4°C, and suspended in PBS containing propidium iodide (1mg/ml) and RNase A (20 mg/ml). Fixed cells were subjected to flow cytometry.

Active-Caspase-3 expression

Cells were washed with cold PBS and fixed in Cytofix/Cytoperm™ (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Then, cells were incubated with phycoerythrin-conjugated anti-active caspase-3 antibodies (PharMingen–Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) for 30 min. Cells were washed and 500 µl of 1 × Perm/Wash™ was added before analysis by flow cytometry.

Statistical analysis

Differences between mean values were evaluated using either one-way ANOVA with Dunnett's test or Kruskal Wallis with Mann Whitney test according to data distribution.

$P \leq 0.05$ was regarded as statistically significant.

RESULTS

EGFR, PTEN and P53 expression

The immunocytochemistry analysis of PC3 cells (fig 1) showed that PC3 cells overexpress EGFR with intense staining of more than 90% of the cell population and did not express P53 and PTEN proteins.

Gene transfer efficiency

Neither expression of p53- and pten -mRNA (fig 2A), nor P53 and PTEN proteins (fig 2B-D) was detected in PC3 cells. In transfected cells, the expression of pten- and p53-mRNA was restored (fig 2A) and associated with PTEN and P53 protein expression as evidenced by western blots (fig 2B) and immunocytochemistry (fig 2C-D). Co-transfer of p53 and pten using 50/50 plasmid mixture induced intermediate expression of both p53- and pten -mRNA (fig 2A) and P53 and PTEN proteins (fig 2B, 2C and 2D).

Signaling

Untransfected control PC3 cells were found to constitutively overexpress phosphorylated-AKT (pAKT) in relation with pten-null phenotype (fig 3A). Consequently, overexpression of downstream signaling phosphoproteins (pGSK3 β and pP70S6K) was evidenced (fig 3A). Overexpression of phosphorylated-ERK1/2 (pERK1/2) was also observed (fig 3A). In negative control experiment, consisting in transfecting PC3 cells with irrelevant plasmid (pCMV-Luc), no difference in expression of phosphoproteins was found between PC3 transfected cells exposed or not to cetuximab and untransfected control cells exposed or not to cetuximab (data not shown).

As a whole, as well as protein by protein, all data obtained from Bio-Plex® phosphoprotein array analysis were found to correlate with data calculated from numerized western blot ($r=0.942$, $P<.001$). Therefore, all following considerations were calculated from Bio-Plex® phosphoprotein array analyses.

Exposure of the cells to cetuximab did not induce any significant ($P>.05$) decrease of pAKT and pGSK3 β expression while pP70S6K expression was significantly ($P<.05$) reduced by 33%. pERK1/2 expression was also significantly ($P<.01$) reduced by 54% (fig 3A).

In p53-transfected cells, inhibition of AKT signaling was observed with significant ($P<.05$) reduction of pAKT expression by 40%, pGSK3 β by 72% and pP70S6K by 35% (fig 3B). In addition, significant ($P<.01$) decrease in pERK1/2 by 53% was observed (fig 3B). Exposure of p53-transfected cells to cetuximab further decreased the expression of all phosphoproteins. In pten-transfected cells, inhibition of AKT signaling was found to be restored with significant ($P<.01$) reduction of pAKT expression by 63%, pGSK3 β by 38% and pP70S6K by 45% (fig 3). In addition, significant ($P<.01$) decrease in pERK1/2 by 27% was observed (fig 3C). Exposure of pten-transfected cells to cetuximab further significantly ($P<.05$) decreased the expression of all phosphoproteins.

In pten/p53-cotransfected cells (fig 3C), similar results i.e. AKT and ERK1/2 signaling inhibition, were achieved consistently with the data obtained in pten or p53 transfected cells (ré-écrire). Considering all experimental data achieved in PC3 cells using Bio-Plex® phosphoprotein array, statistically significant correlations were found between pAKT expression and pGSK3 β and pP70S6K expression ($r=0.816$, $P<.05$ and $r=0.859$, $P<.01$, respectively) (fig 4). No correlation was found between pAKT and pERK1/2 expression ($P>.05$) (data not shown).

Growth inhibition and apoptosis induction

Negative controls, consisting in untransfected cells and cell transfected with irrelevant plasmid (pCMV-Luc), then p53-, pten-, and p53/ pten- transfected PC3 cells were exposed to cetuximab (100µg/ml for 24 h) and assayed for cytotoxicity using MTT assays. Apoptosis induction was determined using flow cytometry determination of subG1 cells, active caspase-3 expression and BAX expression using western blot.

In negative controls (fig 5), no significant cytotoxicity of cetuximab was observed. This lack of cytotoxicity was associated with no significant apoptosis induction.

In p53-transfected cells (fig 5) was found to be associated with significant ($P<.01$) moderate cell cytotoxicity (20% (fig 5A)) with spontaneous apoptosis induction (16% sub G1) consistent with increased caspase-3 expressing cell fraction (12% (fig 5C)) and BAX expression (fig 5D). P53 gene transfer was found to significantly ($P<.01$) sensitize PC3 cells to cetuximab with 37% increase in cell cytotoxicity, increase in sub G1 cell fraction (up to 21%). No subsequent increase in caspase-3 expressing cell fraction (10%) and BAX expression was evidenced. Pten gene transfer (fig 5), PTEN protein expression led to a significant ($P<.01$) decrease (35%) in cell growth (fig 5A) and in consequence a significant ($P<.05$) increase in cell apoptosis (11% sub G1 (fig 5B), 6% caspase-3 expressing cell fraction (fig 5C) consistent with increased BAX expression (fig 5D). Pten gene transfer was found to significantly ($P<.01$) sensitize PC3 cells to cetuximab as a 30% increase in cytotoxicity, with increased apoptosis induction (22.5 % sub G1) which was not found to be associated with subsequent significant increase in caspase-3 expressing cell fraction (8%) and increase in BAX expression.

P53/pten co-transfer (fig 5) yielded significant ($P<.05$) further increase in cytotoxicity (35% (fig 5A) as compared to results achieved with either pten or p53 gene transfer alone. Apoptosis induction was significantly ($P<.01$) increased as compared to pten gene transfer

alone (18% sub G1 (fig 5B), 15% caspase-3 expressing cell fraction (fig 5C) and increased BAX expression (fig 5D). No significant variation in apoptosis induction was evidenced between p53- and pten/p53 transfected cells. P53/ pten gene transfer was found to potentiate cetuximab activity with significant ($P<.01$) increase in cytotoxicity (40%) as compared to results achieved in either pten or p53 transfected cells. Whatever the technique, apoptosis induction results were found to be fully consistent (25% sub G1, 20% caspase-3 expressing cell fraction and increased BAX expression).

These data confirm that loss of P53 or/and PTEN in PC3 cell accounts for their resistance to cetuximab and that restoration of P53 or/and PTEN function can re-established sensitivity to cetuximab.

Signaling phosphoproteins expression and cellular sensitivity to cetuximab

As illustrated by cytotoxicity assays (fig 6 A), as well as SubG1 apoptosis induction assays (fig 6 B) cell response to cetuximab was found to significantly correlate with pAKT, pGSK3 β , pP70S6K and pERK1/2 expression.

Comparison between western blot and Bio-Plex® phosphoprotein array methods

We observed an agreement between results in the Bio-Plex® phosphoprotein array and the western blot using Bland and Altman plot analysis as shown in (Fig. 7). The Passing–Bablok regression analysis showed a statistically significant correlation between the two methods (Fig. 7).

DISCUSSION

The present study was performed in PC3 human prostate cancer cell line which is referenced as p53 null because of a single base deletion in codon 138 that prevents its expression 23 and leads to resistance to apoptosis and many chemotherapeutic agents.

Additionally, PC3 cells are pten null because of a deletion of the 3'end of pten gene and promoting the absence of the full length pten m-RNA 24. Consistently, pten mutated status is associated with constitutive activation of AKT in PC3 cells and the constitutive high level of expression of phosphorylated AKT causes a reduced sensitivity of PC3 cells to cetuximab. No mutation of PI3K has been reported in PC3 cells. The data achieved in the present study are fully consistent with these findings since PC3 cells were found to be resistant to apoptosis induced by cetuximab 25.

Our hypothesis was that re-introducing P53 in PC3 cells would enhance PTEN-mediated cetuximab-induced cell growth inhibition, by restoring EGFR downstream signaling pathways functionality and apoptosis induction. Introduction of p53 expression resulted in a significant increase in growth inhibition and apoptosis induction, thus confirming the well-established essential role of P53 as mediator of cell growth and apoptosis control already reported in the literature with p53 gene transfer in head and neck, and pancreatic cancer cell lines 26, 27. These results are in agreement with a previous study 11 which demonstrated that, in PTEN deficient cells, p53 regulates cell survival by transcriptional down-regulation of PIK3CA (encoding p110 catalytic subunit of PI3K) independently of PTEN. Conversely, in pten intact cells, induction of p53 downregulates PIK3CA and increases PTEN protein expression 11 through a p53 response element located into PIK3CA promoter. These data were recently further confirmed since p53 was showed 28 to bind directly PIK3CA promoter and inhibit its activity with consequent alteration of many cellular functions.

When p53 gene transfer was combined with cetuximab, significant additive effects on growth inhibition, increased apoptosis induction, and restoration of inhibition of pAKT and pERK1/2 expression were observed. These results are consistent with previous data,¹⁰ hypothesizing that p53-mutated status may be implicated in cell resistance to cetuximab.

As awaited, reinstating PTEN in PC3 cells inhibited AKT activity and its downstream signaling pathways, and in consequence, an inhibition of cell growth and induction of apoptosis, confirming the key role of PTEN in the control of the cell survival pathway. These results are consistent with the now well-established model in which PTEN was shown to be essential for controlling cell growth in prostate human cancer cell lines ²⁹ by regulating PI3K/AKT signaling pathways by decreasing the pool of phosphorylated proteins.

Many studies demonstrated that pAKT overexpression is associated with resistance to EGFR inhibitors ¹⁹. Further, Li et al ²⁵ showed that resistance to cetuximab was associated with pAKT overexpression and inhibition of pAKT by siRNA AKT restored cetuximab sensitivity. Accordingly, we showed here that PTEN reintroduction restores the cytotoxicity of cetuximab by restoring inhibition of pAKT and pERK1/2. Therefore, these data further confirmed that PI3K/AKT and MAPK signaling pathways functionality contribute to cetuximab activity.

The present experiments demonstrated that, additionally to PTEN, the activity of cetuximab also greatly depends on P53 functionality. This is consistent with data already reporting that P53 expression is decreased in PTEN ^{-/-} cells ³⁰ through the increase of MDM2 activation caused by overexpression of pAKT. Additionally to its influence on PI3K activity and consequent inhibition of AKT signaling, P53 could further influence the cell response to cetuximab through its potential consequence onto PDK1. Furthermore, PDK1-mediated activation of NF- κ B signaling pathways was showed to occur through direct IKK phosphorylation independently to AKT signaling pathways ³¹. In such context, the relationship between p53 and PI3K and between PTEN and PI3K demonstrated here that

inhibition of PI3K could avoid the “cross-talk” between PI3K downstream signaling pathways such as AKT and IKK/ NF- κ B signaling pathways. These data further suggest that PI3K could be a promising and attractive target for cancer therapy in patients harboring PTEN and/or P53 mutations with up-regulation AKT signaling pathways.

In summary, these results strongly suggest that p53 and pten mutated status could be predictive of resistance to cetuximab and warrant clinical evaluation to evaluate whether patients with p53 mutated tumors are unlikely to respond to this treatment as already shown with pten18 and ras-mutation 32 in colorectal cancer treated by cetuximab. Functional diagnostic criteria could be the determination of signaling phosphoprotein expression in tumor 33 Preliminary results achieved in breast 34 and head and neck 35 using Bio-Plex® phosphoprotein array demonstrated that large variation in phosphoprotein expression can be found in clinical specimens at diagnosis and may contribute to variation in response to targeted therapy. In the case of signaling alteration, combination of therapeutics targeting different signaling proteins can be proposed to circumvent this potential mechanism of resistance and obtain greater antitumor activity. Also, gene therapy could be envisaged in tumors with genes alteration, as already proposed for p53 using viral vector 36.

Acknowledgements:

This study was supported by grants from the French «Ligue Nationale Contre le Cancer » and Alexis Vautrin Cancer Center private research funds

REFERENCES

- [1] Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000; 19:6550-65.
- [2] Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI et al. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1996; 19:419-27.
- [3] Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI, Kris MG. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2000; 6:4885-92.
- [4] Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl 4):S3–8.
- [5] Lei W, Mayotte JE, Levitt ML. Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res* 1999; 19:221-8.
- [6] Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non–small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:2237-46.
- [7] Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59:21-6.
- [8] Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, Fisher PB. Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:169-78.
- [9] Rho JK, Choi YJ, Ryoo BY, Na II, Yang SH, Kim CH et al. p53 enhances gefitinib-induced growth inhibition and apoptosis by regulation of Fas in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2007; 67:1163-9.

- [10] Huether A, Höpfner M, Baradari V, Schuppan D, Scherübl H. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem Pharmacol* 2005; 70:1568-78.
- [11] Singh B, Reddy PG, Goberdhan A, Walsh C, Dao S, Ngai I et al. p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas. *Genes Dev* 2002; 16:984-93.
- [12] Kalra N, Seth K, Prasad S, Singh M, Pant AB, Shukla Y et al. Theaflavins induced apoptosis of LNCaP cells is mediated through induction of p53, down-regulation of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinases pathways. *Life Sci* 2007; 80:2137-46.
- [13] Li J, Yen C, Liaw D, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275:1943-7.
- [14] McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Clin Cancer Res* 1999; 59:4291-6.
- [15] Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273:13375-8.
- [16] Li J, Simpson L, Takahashi M, Miliareis C, Myers MP, Tonks N et al. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Res* 1998; 58:5667-72.
- [17] Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J et al. Negative regulation of PKB/AKT-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998; 95:29-39.

- [18] Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2007; 97:1139-45.
- [19] She QB, Solit D, Basso A, Moasser MM. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway signalling. *Cancer Res* 2003; 9:4340-6.
- [20] Ndoye A, Bouali S, Dolivet G, Leroux A, Erbacher P, Behr JP et al. Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells. *Int J Oncol* 2004; 25:1575-81.
- [21] Maurice-Duelli A, Ndoye A, Bouali S, Leroux A, Merlin JL. Enhanced cell growth inhibition following PTEN nonviral gene transfer using polyethylenimine and photochemical internalization in endometrial cancer cells. *Technol Cancer Res Treat* 2004; 3:459-65.
- [22] Ndoye A, Dolivet G, Hogset A, Leroux A, Fife A, Erbacher P et al. Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma xenografts using nonviral p53 gene therapy and photochemical internalization. *Mol Ther* 2006; 13:1156-62.
- [23] Logan IR, McNeill HV, Cook S, Lu X, Lunec J, Robson CN. Analysis of the MDM2 antagonist nutlin-3 in human prostate cancer cells. *Prostate* 2007; 67:900-6.
- [24] Sharrard RM, Maitland NJ. Phenotypic effects of overexpression of the MMAC1 gene in prostate epithelial cells. *Br J Cancer* 2000; 83:1102-9.
- [25] Li X, Luwor R, Lu Y, Liang K, Fan Z. Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. *Oncogene* 2006; 25:525-35.

- [25] Wu ZX, Song TB, Li DM, Zhang XT, Wu XL. Overexpression of PTEN suppresses growth and induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in bladder cancer cells. *Tumour Biol* 2006; 28:9-15.
- [26] Merlin JL, Dolivet G, Dubessy C, Festor E, Parache RM, Verneuil L et al. Improvement of nonviral p53 gene transfer in human carcinoma cells using glucosylated polyethylenimine derivatives. *Cancer Gene Ther* 2001; 8:203-10.
- [27] Ndoeye A, Merlin JL, Leroux A, Dolivet G, Erbacher P, Behr JP et al. Enhanced gene transfer and cell death following p53 gene transfer using photochemical internalisation of glucosylated PEI-DNA complexes. *J Gene Med* 2004; 6:884-94.
- [28] Astanehe A, Arenillas D, Wasserman WW, Leung PC, Dunn SE, Davies BR et al. Mechanisms underlying p53 regulation of PIK3CA transcription in ovarian surface epithelium and in ovarian cancer. *J Cell Sci.* 2008; 121:664-74.
- [29] Davies MA, Kim SJ, Parikh NU, Dong Z, Bucana CD, Gallick GE. Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1904-14.
- [30] McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:1263-84.
- [31] Tanaka H, Fujita N, Tsuruo T. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated I κ B kinase beta (I κ B) phosphorylation activates NF-kappaB signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280:40965-73.
- [32] Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66:3992-5.

- [33] Merlin JL, Genin P, Harle A, Giagometti G, Chergui F, Bouali S et al. Phosphoprotein Array in tumor biopsies for molecular diagnosis of PI3 Kinase and MAP Kinase signaling functionality. *Mol. Cancer Ther.* 2007; 6: 3540s.
- [34] Merlin JL, Longavanne E, Chergui F, Ramacci C, Rouyer M, Bouali S et al. Exploring human epidermal growth factor receptors downstream signaling by multiplex phosphoprotein determination in breast cancer. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2006; 47: Abstract 3607.
- [35] Merlin JL, Mriouah J, Dolivet G, et al. Signaling phosphoproteins in head and neck squamous cell carcinoma: relation with cellular sensitivity to cetuximab and interest of multiplex determination using Bio-Plex protein array. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 2007; 48: Abstract 185.
- [36] Vattermi E, Claudio PP. Adenoviral gene therapy in head and neck cancer. *Drug News Perspect* 2006; 19:329-37.

Figure legends:

Figure 1: EGFR, PTEN and P53 expression analysis using immunocytochemistry in PC3 prostate cancer cells.

Figure 2: Analysis of gene transfer efficiency by RT-PCR, western blotting and immunocytochemistry. A, semi-quantitative RT-PCR p53 or/and pten mRNA expression analysis. Beta-2 microglobulin (b2M1) was used as housekeeping gene. B, western blotting P53, PTEN, pPTEN, protein expression analysis, b-tubulin was used as loading control. C, P53 protein expression analysis using immunocytochemistry. D, PTEN protein expression analysis using immunocytochemistry.

Figure 3: Analysis AKT and MAPK signaling pathways functionality using Bio-Plex® phosphoprotein array and western blotting analysis. Effect of p53 (A), pten (B), pten/p53 (C) restoration and exposure to cetuximab on AKT and MAPK signaling pathways. In each gene transfer condition, p-AKT, p-GSK3b, p-P70S6K, p-ERK1/2 expression was analyzed using Bio-Plex® phosphoprotein array (upper panels) and by western blotting (lower panels) on total cell lysates. Western blotting membrane was probed with specific antibodies raised against each protein and the corresponding phosphoprotein. Tubulin was probed with the specific antibodies as loading control.

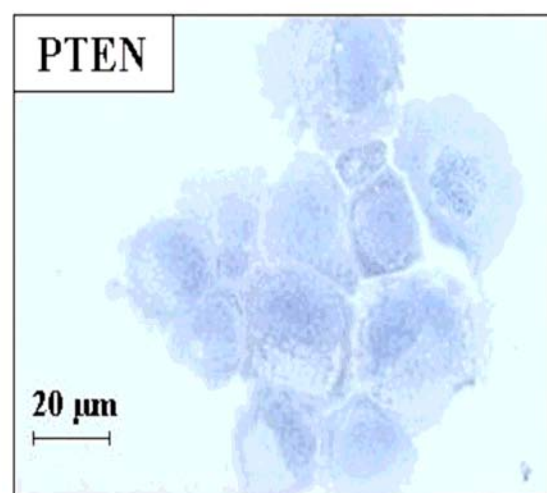
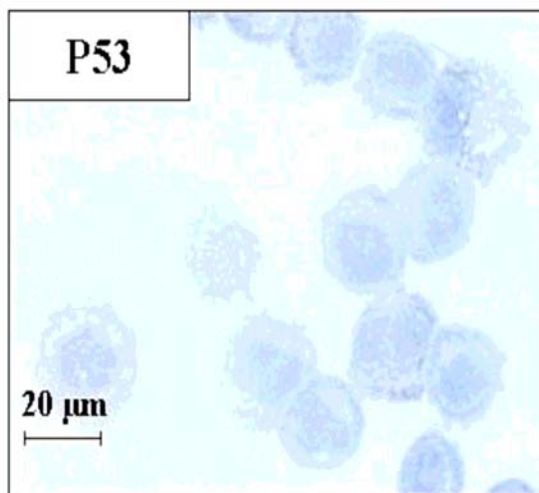
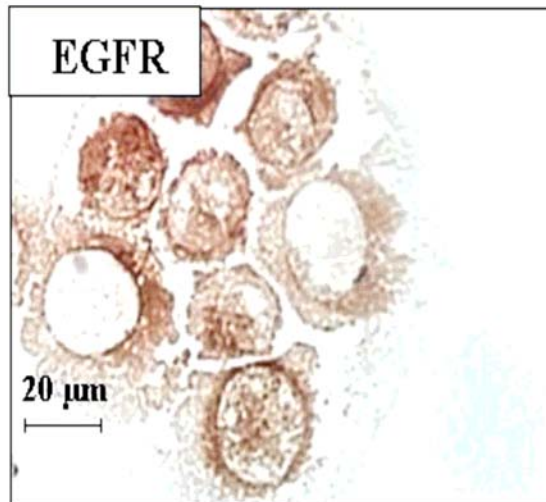
Figure 4: Correlation analyses of the relative expression levels of AKT signaling pathways phosphoproteins. A, correlation between pAKT and pGSK3b. B, correlation between pAKT and pP70S6K.

Figure 5: Analysis of cytotoxicity and apoptosis induction in p53 and/or PTEN transfected PC3 cells. Pten transfected, p53 transfected or pten/p53 cotransfected PC3 cells were exposed to cetuximab for 24 hours. Cell proliferation was measured using MTT assay (A). Apoptosis was analyzed by flow cytometry after propidium iodide staining of cells (B) or by detection of

active caspase 3 expression (C), and by western blotting by determination of BAX expression (D). Results are expressed as mean values of three independent experiments.

Figure 6: Correlation between phosphoproteins expression and cytotoxicity (A), apoptosis (B) induction in PC3 cells. Phosphoproteins expression was quantified using Bio-Plex® phosphoprotein array.

Figure 7: Quantitative correlation analysis between western blot and Bio-Plex® phosphoprotein array. Comparison were performed using Bland-Altman graphic method (left pannel) and Passing-Bablok regression method (right pannel) for the analysis of pAKT (A) , pGSK3b (B), pP70S6K (C) and pERK1/2 (D). For Bland and Altman analysis the Y-axis in each panel represents the difference between western blot and Bio-Plex® phosphoprotein array values, and the X-axis represents the average of the western blot and Bio-Plex® phosphoprotein array values. Solid lines are $1.96 \times \text{Standard deviation}$ value. Dotted lines are mean values.



A



p53
β2M1
pten
β2M1

P53	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
pten	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

B



P53
PTEN
pPTEN
Tubulin

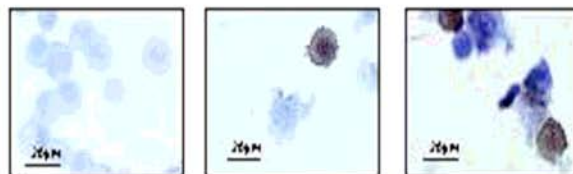
p53	-	-	-	-	+	+	+	+	C+
pten	-	-	+	+	-	-	+	+	C+
Cetuximab	-	+	-	+	-	+	-	+	C+

C



p53	-	+	+
pten	-	-	+

D



p53	-	-	+
pten	-	+	+

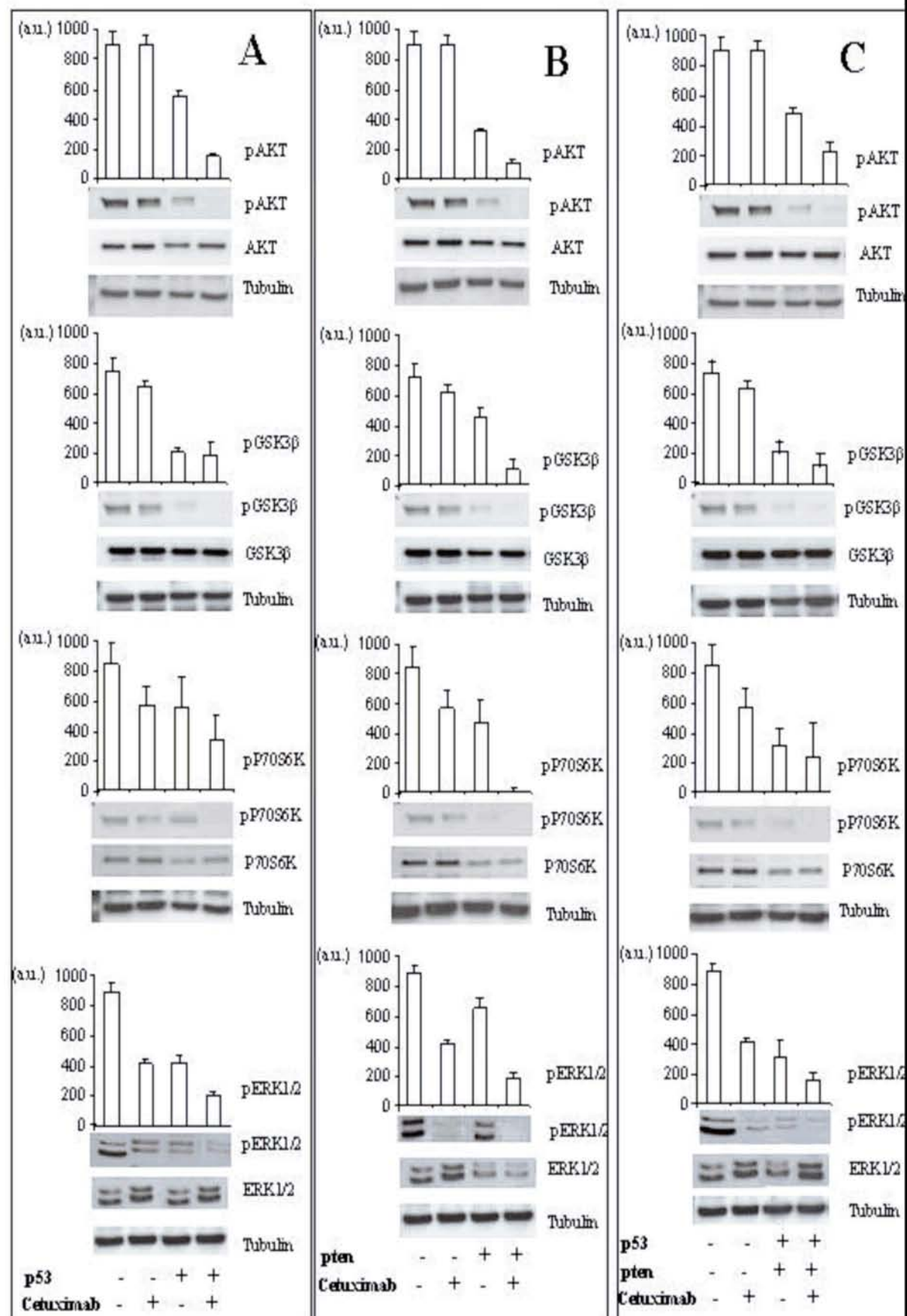
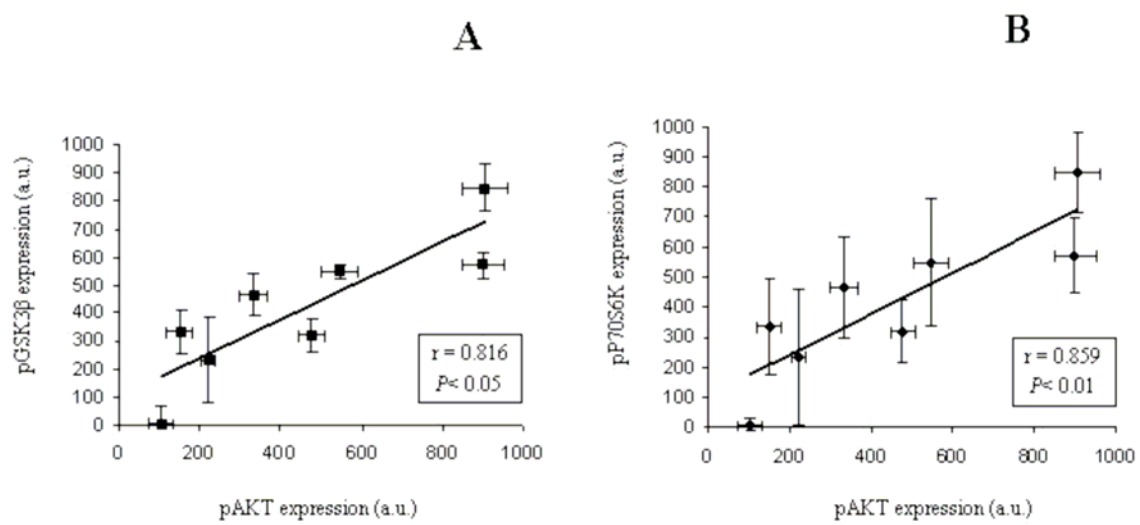
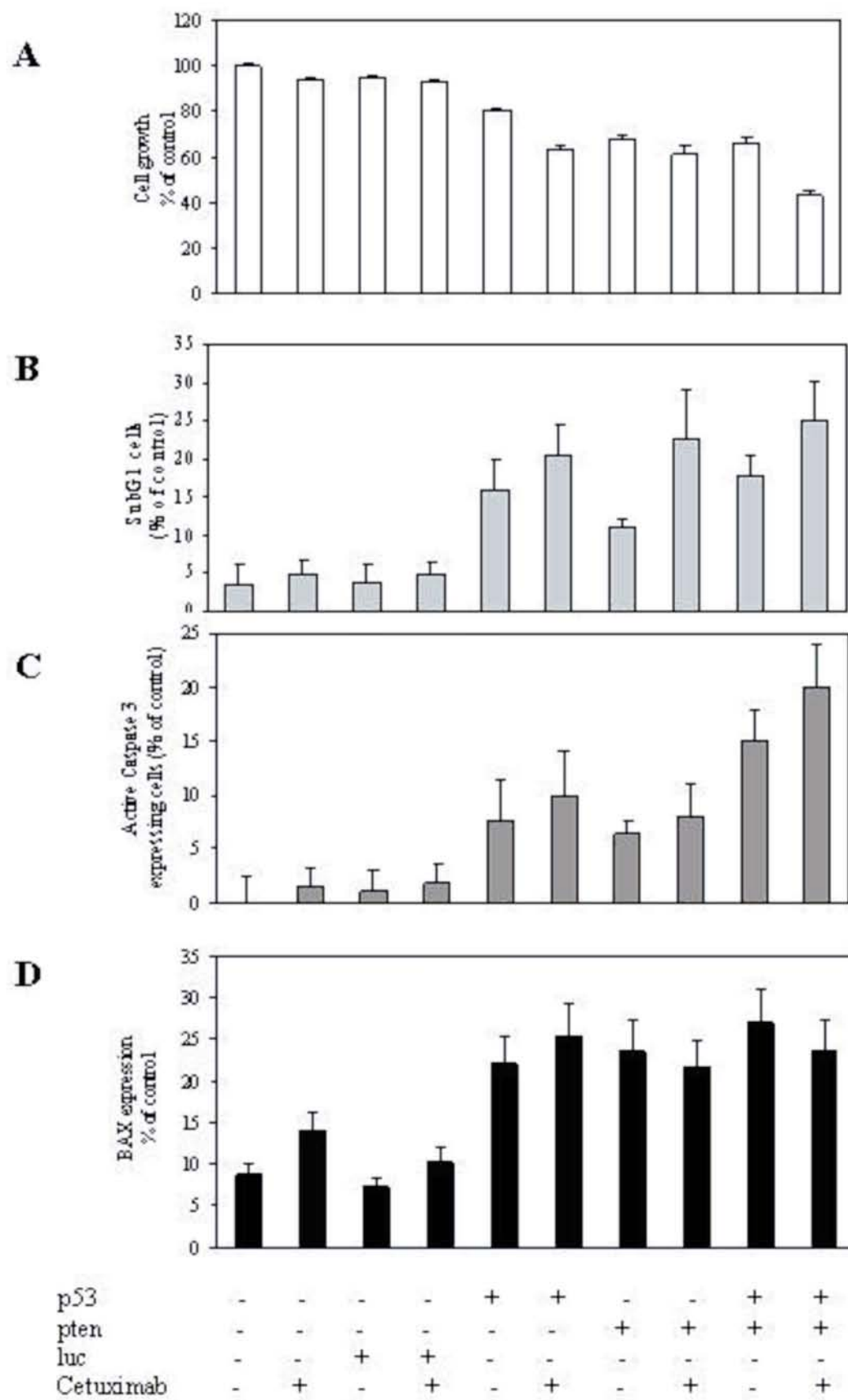
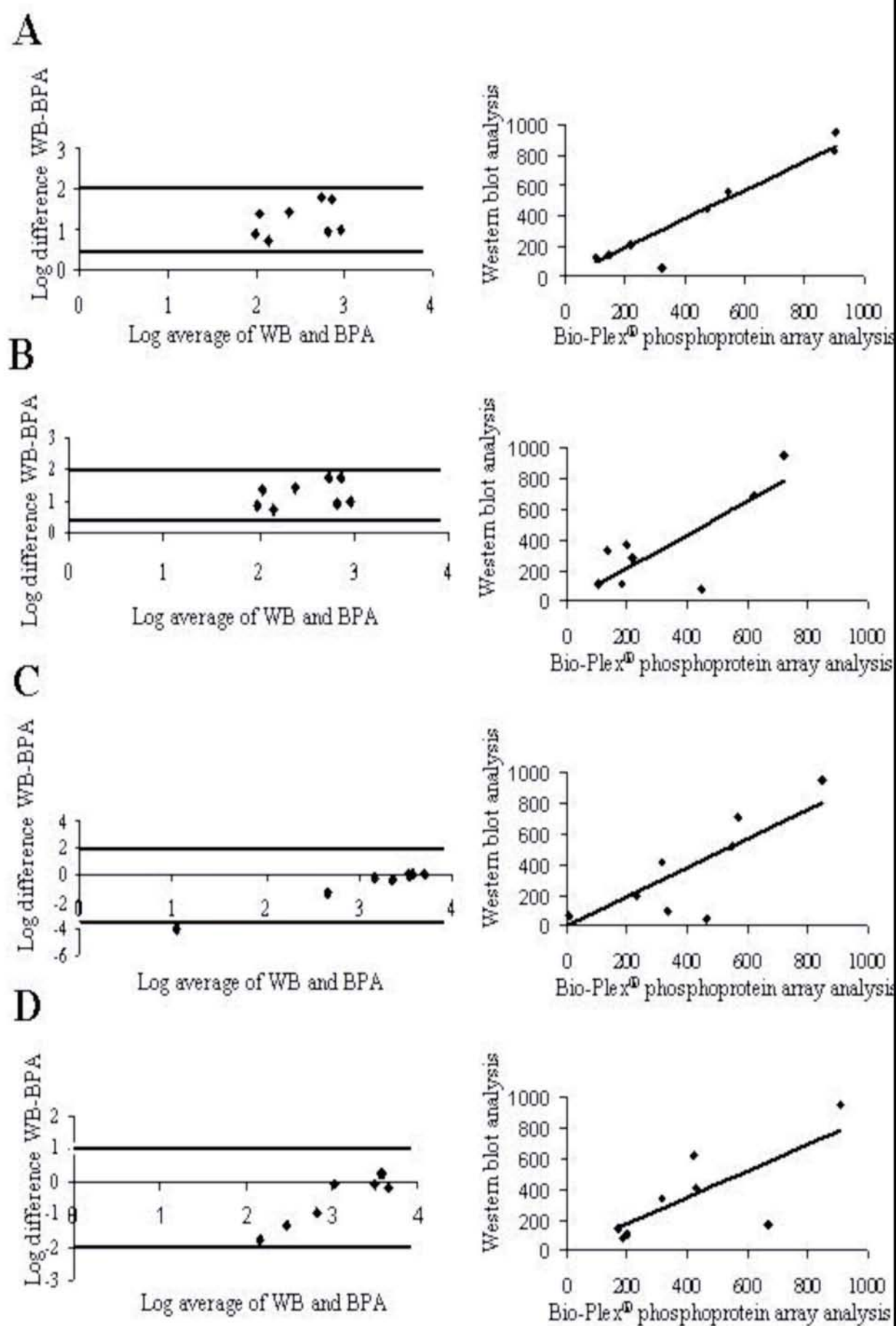


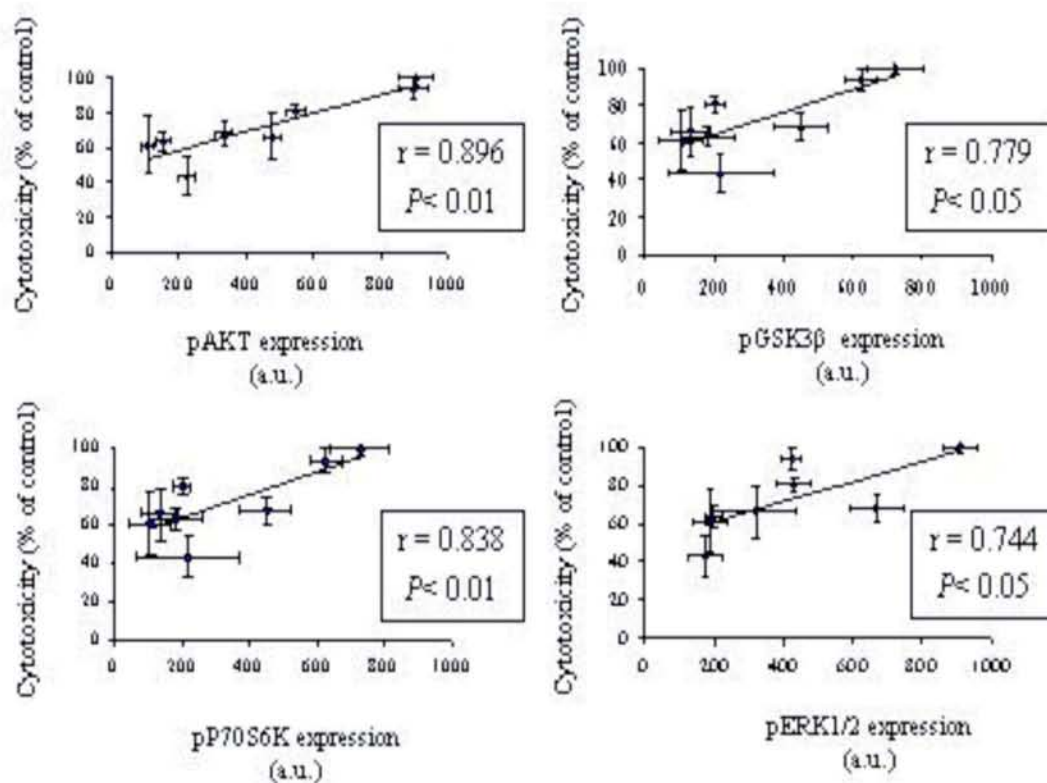
Figure 4



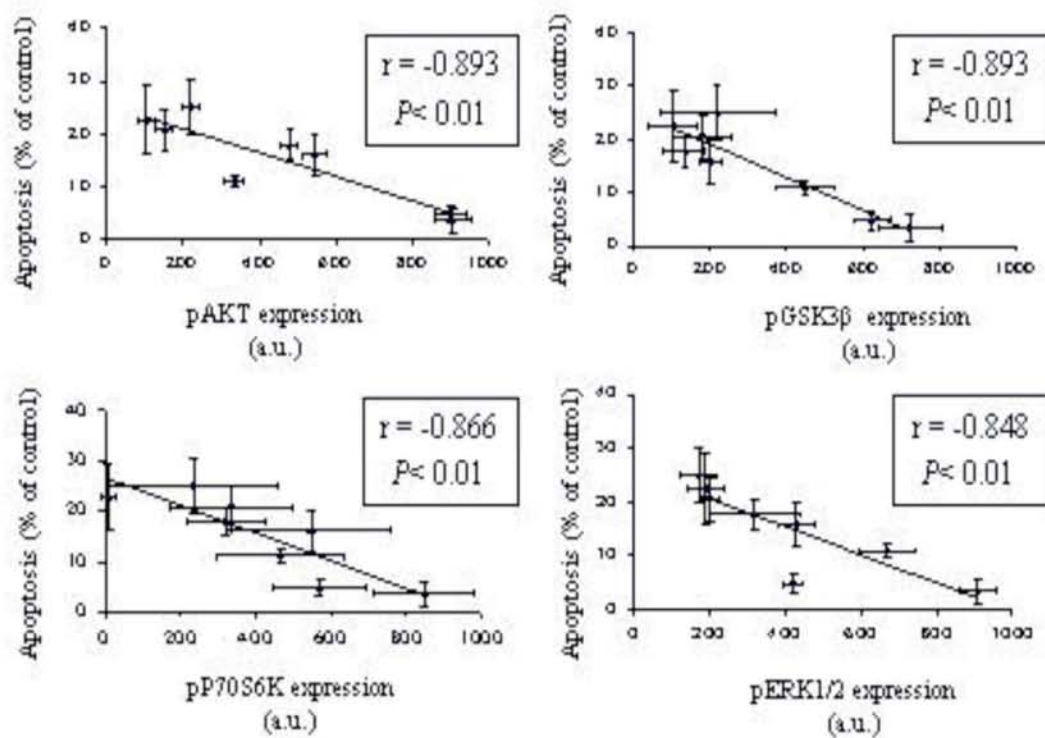




A



B



XIII. Discussion et conclusions

Les cancers sont des maladies génétiques acquises due à des causes différentes et connaissant des évolutions différentes. Cependant, les cellules cancéreuses ont un point commun: elles échappent toutes à l'apoptose et au contrôle de la croissance et de la division cellulaire à causes des mutations inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeurs (exemple de p53 et pten) et des mutations activatrices des oncogènes (exemple de ras). Selon le type des tumeurs, les traitements anticancéreux classiques reposent sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces dernières décennies, plusieurs concepts ont été développés dans le but de mettre au point des traitements plus spécifiques limités uniquement, dans toute la mesure du possible, aux tissus cancéreux et reposant sur des critères de diagnostic moléculaire permettant d'éviter les traitements inutiles et les effets secondaire des thérapies anticancéreuses classiques. Parmi ces concepts on peut citer le transfert de gènes suppresseurs de tumeurs par thérapie génique. Le transfert de gènes suppresseurs de tumeurs reste une stratégie thérapeutique intéressante et attractive dans le traitement des cancers. Depuis les premiers essais cliniques sur les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules en 1996, plusieurs autres essais de thérapie génique ont été mis en place dans le but de restaurer la fonctionnalité de la protéine P53 associée ou non au traitement par chimiothérapie. Pten ou encore le gène suppresseur de tumeur Rb ont fait l'objet de protocoles expérimentaux.

Transfert de gène p53

P53 est un gène suppresseur de tumeurs fréquemment altéré dans les cancers incluant les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Brennan and Sidransky 1996; Dolivet, Colosetti et al. 1999). Il permet aux cellules ayant subi un stress biologique d'induire des réponses

antiprolifératives telles que l'arrêt de la croissance cellulaire ou l'apoptose et ce par activation de la transcription de gènes cibles (Wu, Burns et al. 1997; Burns, Bernhard et al. 2001). P53 est alors considérée comme "Gardien du génome". L'inactivation du gène p53 dans des souris par knock-out, entraîne l'apparition d'un nombre anormalement élevé de tumeurs (Bodmer, Cottrell et al. 1989). La présence de mutations de p53 dans les cancers est un facteur de mauvais pronostic et de résistance à des thérapies anticancéreuses d'où l'intérêt d'envisager la restauration de son activité. Il a été montré que la restauration de l'expression de la protéine P53 sauvage permet la restauration de l'induction de l'apoptose *in vitro* (Merlin, Dolivet et al. 2001) et l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (Ndoeye, Dolivet et al. 2006). La thérapie génique ciblant p53 a donné des résultats satisfaisants en clinique par utilisation de l'adénovirus ONYX-015 dans les cancers ORL, de l'ovaire, du colon et du foie (Galanis, Okuno et al. 2005; Vatteini and Claudio 2006; Nemunaitis, Senzer et al. 2007). La restauration de l'expression de P53 sauvage dans les cellules P53 déficientes par l'intermédiaire d'un adénovirus contenant le gène p53 normal a montré également des résultats prometteurs (Vecil and Lang 2003).

Les vecteurs les plus utilisés dans la thérapie génique sont les vecteurs viraux, en particulier ceux dérivés des adénovirus grâce à leur tropisme naturel pour les voies aériennes supérieures, leur pouvoir infectieux et leur capacité à infecter de nombreux types de cellules quiescentes ou en division. La thérapie génique nécessite le choix d'un vecteur efficace mais ne présentant pas de risque de mutagenèse insertionnelle ni de pouvoir immunogène. Depuis quelques années, des vecteurs non viraux comme les liposomes et les polymères cationiques, notamment le polyéthylèneimine (PEI) et ses dérivés, sont de plus en plus utilisés mais les vecteurs non viraux ne sont pas aussi efficaces que les vecteurs viraux. L'internalisation cellulaire des vecteurs de transfection se fait généralement par endocytose. Les vecteurs sont alors localisés dans les endosomes où ils peuvent être dégradés dans les lysosomes avant

d'atteindre le noyau. L'efficacité de transfert de gène dépend alors de leur libération des endosomes/lysosomes pour atteindre le cytosol et le noyau. Le PEI et ses dérivés ont été utilisés pour le transfert de gène grâce à leur propriété d'éponge de protons permettant l'éclatement des endosomes, la libération des complexes de transfection et l'échappement à leur dégradation par des lysozymes. L'échappement du PEI et ses dérivés des endosomes n'est pas toujours très efficace. Dans ce contexte l'internalisation photochimique, une nouvelle technologie a été développée dans le but d'augmenter l'efficacité de transfert des gènes par déstabilisation de la membrane des endosomes (Selbo, Hogset et al. 2002; Berg, Prasmickaite et al. 2003).

L'optimisation des propriétés physiques et les procédures de transfection du protocole de transfection par des complexes PEI/ADN joue un rôle clé dans l'efficacité de la transfection. Des données bibliographiques montrent que les complexes PEI glycosylé/ DNA formés dans une solution de NaCl à 9% forment des agrégats ce qui limite leur capacité à rentrer dans les cellules, ces agrégats sont probablement plus toxiques. Nous avons montré dans cette étude que les conditions expérimentales pouvaient améliorer les résultats en dispersant les complexes PEI/ADN dans le soluté glucosé 5%. De plus, nous avons montré que le couplage de la PCI au PEI permettrait d'augmenter l'efficacité de la transfection et obtenir un niveau comparable à celui obtenu par des vecteurs viraux sans augmenter le ratio N/P des complexes PEI/ADN et diminuer la toxicité due à l'excès des charges positives. Ainsi, dans notre étude, en considérant les différents critères, nous montrons une amélioration de l'efficacité du transfert à environ 50% qui est comparable au niveau d'expression obtenu par transfection avec des vecteurs viraux. Le prolongement de l'efficacité de transfection par PCI en terme de quantité de protéine exogène exprimée et la durée de vie d'expression s'est avérée très intéressante puis qu'*in vivo* ce procédé a permis de diminuer le nombre des injections répétées pour un meilleur effet thérapeutique et un schéma d'administration beaucoup moins

contraignant (une injection au lieu de 4 injections par semaine) (Dolivet, Merlin et al. 2002; Ndoye, Dolivet et al. 2006).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est strictement régulée par la balance des protéines pro-apoptotiques et des protéines anti-apoptotiques. Cette balance est fréquemment dérégulée au cours de la cancérogenèse et provoque la résistance aux traitements anticancéreux. L'échappement des cellules à l'apoptose est critique à la croissance des tumeurs et présente l'un des marqueurs des cellules cancéreuses. De nombreux agents thérapeutiques anticancéreux exercent leur activité par activation de l'apoptose. La résistance à l'activation de l'apoptose peut être due à la mutation de P53. Il a été montré que la réintroduction de p53 par transfert de gène permet de restaurer l'inhibition de la croissance, l'apoptose et la sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Nous avons montré que la réintroduction de la protéine P53 dans une lignée cellulaire de cancer de pharynx exprimant une protéine P53 mutée a permis la restauration de l'induction de la voie de l'apoptose entraînant l'inhibition de la croissance à long terme et nous confirmons donc ce rôle déterminant de P53 dans la régulation de la voie de l'apoptose et l'inhibition de la croissance cellulaire.

Transfert de gène pten

De nombreux travaux ont souligné l'influence de la protéine PTEN sur la croissance cellulaire. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, l'altération et l'inactivation du gène pten sont majoritairement dues à des mutations entraînant l'expression d'une protéine mutée ou plus fréquemment à une répression de son expression. Il existe une corrélation entre les tumeurs malignes, la fréquence des mutations de pten et la fréquence de la perte de

l'hétérozygotie sur le bras court du chromosome 10. Pten est donc le premier gène suppresseur de tumeur à activité phosphatase, la protéine PTEN est associée à l'inhibition de la croissance cellulaire, l'apoptose et la cancérogenèse par son activité de protéine et de lipide phosphatase antagonisant la voie PI3K/AKT par déphosphorylation des de PIP3 en PIP2 entraînant une inhibition de phospho-AKT, cible majeure et directe de la PI3K (Maehama and Dixon 1998). La perte de la fonction de PTEN dans les cancers est associée à une activation de l'AKT et des protéines impliquées dans la voie de PI3K/AKT. PTEN joue par conséquent le rôle d'un interrupteur "*on-off switch*" de la voie PI3K/AKT. La voie de PI3K a un rôle important dans le contrôle de diverses fonctions cellulaires incluant survie, cycle cellulaire et différenciation en réponse à des stimuli. AKT, est la protéine en aval directement activée par PI3K (Stambolic, Suzuki et al. 1998). AKT est un point de contrôle de la régulation de la transduction du signal et à un rôle dans la stimulation de la prolifération, la survie, l'angiogenèse et l'inhibition de l'apoptose par phosphorylation de divers substrat incluant BAD, HIF-1 α et NF κ B. La stimulation de la croissance et la résistance à l'apoptose liées à l'activation constitutive de cette voie de signalisation contribue à la cancérogenèse et à la résistance de divers types de cancers aux thérapies anticancéreuses standards. L'augmentation de l'expression de PTEN par transfert de gène est capable de reverser le phénotype malin dans les cellules de cancer d'ovaire. Nous avons montré, qu'effectivement, le transfert de pten permet la restauration de l'expression et la fonctionnalité de la protéine PTEN et l'inhibition de la croissance cellulaire à long terme, cet effet étant potentialisé par la PCI suggérant que le transfert de gène pten pourrait être une nouvelle approche thérapeutique innovante dans le traitement de plusieurs types de cancers.

Influence du transfert sur la réponse cellulaire au cétuximab

Les récepteurs EGFR constituent un domaine d'intérêt démontré en cancérologie, ils sont surexprimés ou amplifiés dans 20 à 80% de cancers humains (Monnier, Milano et al. 2004). La surexpression tumorale de l'EGFR est un facteur d'agressivité tumorale et de mauvais pronostic. Ces dernières années les modalités de traitement de certains types de cancers se sont élargies avec les nouvelles stratégies thérapeutiques visant à bloquer spécifiquement des voies de signalisation médiées par les récepteurs tyrosine kinase. Le cétuximab se fixe sur la partie extracellulaire de l'EGFR au niveau du site de fixation du ligand endogène (Prewett, Rockwell et al. 1996). Cette fixation provoque une inhibition de la cascade de phosphorylation activant les voies de signalisation cytoplasmiques, notamment celles impliquant PI3K/PTEN/AKT et RAS/RAF/MAPK. Bien que l'utilisation thérapeutique de ces agents soit liée au niveau d'expression de la cible au sein du tissu tumoral, la réponse clinique ou histologique obtenue avec ces nouvelles molécules, utilisées seules ou en association, n'est pas toujours aussi élevée qu'on pourrait l'espérer (Fukuoka, Yano et al. 2003; Herbst 2004). La connaissance des mécanismes de résistance primaire ou secondaire au ciblage thérapeutique de l'EGFR permet d'identifier des paramètres prédictifs d'efficacité ou d'échec thérapeutique. L'ensemble des facteurs ainsi identifiés pour le ciblage de l'EGFR, se regroupent en grandes catégories concernant des modifications de la cible elle-même (formes mutées du récepteur dans sa partie extracellulaire ou dans sa partie intracellulaire), des changements d'activité des éléments constitutifs ou de contrôle de la voie de signalisation des récepteurs (mutations PTEN, mutations K-RAS, mutations P53)

La perte d'expression de PTEN a par conséquence une activation constitutive d'AKT (Stambolic, Suzuki et al. 1998; She, Solit et al. 2003; Li, Luwor et al. 2006). Ce niveau d'expression élevé de phospho-AKT est la cause d'une sensibilité réduite aux anti-HER tels

que le géfitinib et le cétuximab. Les travaux menés avec le géfitinib sur un modèle de cellules de cancer du sein surexprimant EGFR et porteuses d'une délétion de pten ont montré que la perte de la fonctionnalité de la protéine PTEN était associée à la résistance au géfitinib via l'hyperactivation d'AKT (She, Solit et al. 2003). Dans cette même étude, il a été montré que le transfert du gène pten sauvage permettait de restaurer l'expression de la protéine PTEN et d'assurer à nouveau le contrôle négatif de la phosphorylation de PI3K/AKT. Lorsque les cellules transfectées sont à nouveau exposées au géfitinib, les résultats montrent que la sensibilité cellulaire est également restaurée. Cette étude met, par conséquent, clairement en évidence, que l'expression de la protéine PTEN pourrait constituer un marqueur de la sensibilité cellulaire aux anti-HER. Li et son équipe ont montré que la résistance au cétuximab était associée à une surexpression de phospho-AKT, et que l'inhibition de phospho-AKT rétablissait la sensibilité au cétuximab (Li, Luwor et al. 2006). Nous avons montré que la réintroduction de l'expression de la protéine PTEN permet la restauration de la fonctionnalité des voies de signalisation PI3/AKT et MAPK ainsi que la capacité d'induction d'apoptose, confirmant ainsi le rôle essentiel de la fonctionnalité de PTEN dans la médiation de l'inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose dans des cellules surexprimant l'EGFR connues pour être résistantes au cétuximab . L'inhibition de croissance que nous avons obtenue après transfert du gène pten n'est pas P53 dépendante dans ces cellules. Le rétablissement de l'expression de PTEN a également potentialisé la sensibilité au cétuximab par restauration de l'inhibition de l'expression des voies de signalisations PI3K/AKT et MAPK. La fonctionnalité de la voie de signalisation PI3K/AKT contribue effectivement à l'action du cétuximab. Frattini et ses collègues et d'autres études plus récentes ont montré en clinique l'implication de la perte de PTEN dans la résistance au cétuximab dans les cancers colorectaux (Frattini, Saletti et al. 2007; Perrone, Lampis et al. 2008). D'autres études récentes ont montré que les mutations somatiques de KRAS et l'activation de pMEK

conditionnent la réponse au cétuximab dans les cancers colorectaux (Lievre, Bachet et al. 2008; Merlin, Perkins et al. 2008). Dans les cancers de sein, les mutations activatrices du gène PIK3CA (code pour la sous unité catalytique de la PI3K) ou la perte de l'expression de PTEN sont corrélées à une mauvaise réponse au trastuzumab (anticorps monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire d'HER2 autorisé dans le traitement des cancers de sein métastatique). Ces études donnent des preuves cliniques de l'intérêt de l'étude de l'intégrité des voies de signalisation PI3/AKT et RAS/RAF/MAPK et leur état de phosphorylation avant de proposer un traitement par cétuximab.

P53 est aussi impliquée dans la résistance à divers traitements. Une étude récente dans une lignée de carcinome hépatocellulaire suggéraient l'implication du statut p53-muté dans la résistance au cétuximab (Huether, Hopfner et al. 2005). Une autre étude a montré l'implication de P53 dans l'inhibition de la PI3K par sa fixation sur le promoteur du gène qui code pour la sous unité catalytique de PI3K. Le rétablissement de l'expression de P53 dans nos cellules a pour conséquence une diminution de la croissance cellulaire et l'induction de l'apoptose, ce qui confirme le rôle essentiel, déjà établi, de p53 gène suppresseur de tumeur et inducteur d'apoptose. L'association du transfert de p53 et du cétuximab a pour conséquence un effet additif sur l'inhibition de croissance et l'induction d'apoptose et la restauration de l'inhibition de la phosphorylation des deux voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK.

Nos résultats montrent que l'effet du cétuximab dans l'inactivation d'EGFR est en grande partie dépendant de la fonctionnalité de PTEN tout comme celle de P53 dans les PC3 par inhibition des voies deux voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK. Dans les cellules PC3 les deux suppresseurs de tumeurs peuvent agir de manière indépendante sur le contrôle de la croissance cellulaire et sur l'activité du cétuximab, puisque le transfert de l'un ou l'autre est efficace. L'efficacité du cétuximab est apparentée à la fonctionnalité des deux voies PI3K/AKT et MAPK et ou de la voie de l'apoptose.

La première partie de cette étude montre que l'amélioration des protocoles de transfection par polyéthylèneimine permet d'augmenter son efficacité, l'utilisation de la PCI permet de potentialiser le niveau et la durée la transfection et atteindre un niveau comparable au transfert de gène par des vecteurs viraux. La restauration de la fonctionnalité de la protéine P53 par transfert de gène p53 sauvage dans les cellules exprimant une protéine P53 mutée permet de restaurer l'inhibition de la croissance et l'induction de l'apoptose. La réintroduction du gène pten dans les cellules n'exprimant pas la protéine PTEN permet de restaurer l'inhibition de la croissance cellulaire. Les deux gènes suppresseurs de tumeurs pten comme p53 sont essentiels à l'inhibition de la croissance. La deuxième partie de cette étude montre l'implication des deux protéines PTEN et P53 dans la régulation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK et leur impact sur la résistance cellulaire au cétuximab et l'intérêt de l'analyse des niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation en aval d'EGFR. La restauration de l'expression des deux gènes suppresseurs de tumeurs p53 et ou pten permet de rétablir l'inhibition de la croissance, l'induction de l'apoptose et la sensibilité cellulaire au cétuximab. L'ensemble de ce travail montre l'intérêt potentiel de l'association de la thérapie génique et d'une thérapie ciblée anti-EGFR combinées à un diagnostic moléculaire visant à explorer la fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs de la famille HER

IX. Perspectives:

La biologie moléculaire a permis de mieux comprendre les mécanismes de l'oncogenèse et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Sur la base de ces connaissances, les thérapies anticancéreuses débouchent depuis quelques années sur des nouveaux axes thérapeutiques, les thérapies ciblées, qui par opposition aux chimiothérapies sont dirigées contre des cibles moléculaires (incluant les récepteurs HER) contrôlant des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la transformation des cellules malignes. Cependant ces thérapies ciblées ne semblent pas donner les résultats tant espérés avec des taux de réponse de 25 à 50%, comme dans le cas du trastuzumab dans le cancer du sein métastatique ou du cétuximab dans le cancer du colon métastatique. Dans le but d'éclaircir quelques points d'ombre dans ce domaine, plusieurs travaux sur des modèles *in vitro*, *in vivo* et l'analyse moléculaire des tumeurs des patients ont permis de mieux comprendre cette résistance. Une meilleure connaissance des niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation en aval de l'EGFR permettrait donc de mieux identifier les patients susceptible de bénéficier de ces traitements en déterminant des marqueurs prédictifs de la réponse aux thérapies ciblées. A ce niveau, l'utilisation de techniques innovantes permettant l'analyse simultanée des niveaux d'expression de nombreuses phosphoprotéines de signalisation impliquées, à partir d'échantillons tumoraux de petite taille, comme le Bioplex[®] phosphoprotein array, apparaît intéressante. L'exemple récent de l'analyse de pMEK comme marqueur prédictif de résistance au cétuximab chez les patients présentant un cancer colorectal vient étayer cette hypothèse.

Par ailleurs, au cours de ces dernières années, l'amélioration des propriétés chimiques et physiques des nouveaux vecteurs non viraux a permis d'augmenter l'efficacité de la transfection à un niveau comparable au niveau de transfert obtenu par des vecteurs viraux tout en diminuant le risque de mutagénèse insertionnelle. A plus long terme, et après validation des

résultats *in vivo*, le transfert clinique sous la forme d'un essai de thérapie génique pourrait être proposé avec une procédure de transfert local des gènes de pten et/ou p53 par polyéthylèneimine chez les patients présentant des mutations de pten et ou p53 et pourquoi pas la combinaison de la thérapie génique et les thérapies ciblées. Cette perspective aboutirait à proposer des combinaisons de traitements liés à l'analyse moléculaire individuelle (carte génétique) de la tumeur de chaque patient.

X. Liste des abréviations:

53BP2: p53-binding protein 2

4EBP: 4E bindingproteins

ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

AKT/PKB: protéine kinase B

AlPCS2a: aluminium phtalocyanine disulfonate

AP1: activator protein 1

APC : adenomatos polyposis coli

ARN: acide ribonucléique

ATF2: activating transcription factor 2

ATR : ataxia-telangiectasia related protein

ATM : ataxia-telangiectasia mutated

BAK: bcl2 antagoniste/ killer

BAX: bcl2 associated x protein

BcL2: b cell lymphoma 2

BRR: bannayan-riley-ruvalcaba

p300/CBP: Creb Binding Protein

CDC: complement dependent cytotoxicity

Cdc2: cycle dependant cyclin

CDCC: complement-dependent cell-mediated cytotoxicity

CDK : cyclin dependent kinase

CHK1: checkpoint kinase 1

CHK2: checkpoint kinase 2

CISH: chromogenic in situ hybridization

CK2: casein kinase

CS: Cowden syndrome

DISC: death inducing signaling complex

DNA-PK: DNA-dependant kinase

DR5/Killer: death receptor 5

Drg1: developmentally regulated GTP binding protein 1

E2F1: elongation 2 factor

EGFR: epidermal growth factor receptor

ERK: extracellular signal regulated kinase

FAK: cal adhesion kinase

Fas: apo-1, CD95

FISH: fluorescent in situ hybridization

GSK 3: glycogene synthase kinase-3

HER: human epidermal receptor

IgG1: isotype immunoglobulin

ITR: inverted terminal repeat

MAGI: guanylate-kinase inverted

MAPK: mitogen activated protein

MAST3: microtubule-associated serine/threonine kinase

MDM2 : mouse double minute 2

MDR: multidrug resistance

MEF: mouse embryonic fibroblasts

MKK4: mitogen-activated kinase

MMAC1: mutated in multiple advanced cancers

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

NEDD4-1: neural precursor expressed developmentally downregulated 4-1

NES: nuclear export signal

NF1: nuclear factor1

NFkB: nuclear factor-kappa B

NHERF: Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor

NK: natural killer

NLS: Nuclear localisation

P21 : waf-1, CIP

PCI: photochemical internalisation

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDGFR : platelet-derived growth factor receptor

pEGFR: phospho-EGFR

pERK: phospho-ERK

PEI: polyEthylèneImine

pGSK3β: phospho-GSK3β

pP70S6K: phospho-P70S6K

PI3K: phosphatidylinositol 3-OH kinase

PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate

PIP2: phosphatidylinositol 3,4 biphosphate

PTEN: phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

RPMI: roswell park memorial institute

RT-PCR: reverse transcriptase - polymerase chain reaction

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

Rb: rétinoblastome

RITA: reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis

SAST: syntrophin-associated serine/threonine Kinase

Src: protéine du sarcome de roux

SV40: Simian virus 40

TAF1: TBP associated factors

TEP1: TGF β - regulated and epithelial cell-enriched phosphatase

TFIID: transcription factor IID

TGF β : transforming growth factor β

TPPS2a: tétraphénylporphine disulfonate

Thr: thréonine

TRAIL: TNF-related-apoptosis-inducing-ligand

TBS : tris buffer salin

TBST : tris buffer saline tween

TIRF : total internal reflection fluorescence

TNF : tumor necrosis factor

VEGF: vascular endothelial growth factor

VHB: virus de l'hépatite B

VHC: virus de l'hépatite C

VPH: virus du papillome humain

XI. Références bibliographiques:

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science 281(5381): 1322-6.
- Agarwal, M. L., A. Agarwal, et al. (1995). "p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A 92(18): 8493-7.
- Ahn, Y., C. Y. Hwang, et al. (2008). "The tumour suppressor PTEN mediates a negative regulation of the E3 ubiquitin-protein ligase Nedd4." Biochem J 412(2): 331-8.
- Akinc, A., M. Thomas, et al. (2005). "Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis." J Gene Med 7(5): 657-63.
- Al-Khouri, A. M., Y. Ma, et al. (2005). "Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta." J Biol Chem 280(42): 35195-202.
- Attardi, L. D., E. E. Reczek, et al. (2000). "PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family." Genes Dev 14(6): 704-18.
- Azzam, E. I., S. M. de Toledo, et al. (1997). "CDC2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner." Cell Growth Differ 8(11): 1161-9.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, et al. (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." Science 244(4901): 217-21.
- Barak, Y., T. Juven, et al. (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." Embo J 12(2): 461-8.
- Barford, D., A. J. Flint, et al. (1994). "Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B." Science 263(5152): 1397-404.
- Barlev, N. A., L. Liu, et al. (2001). "Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases." Mol Cell 8(6): 1243-54.

- Berg, K., L. Prasmickaite, et al. (2003). "Photochemical internalization (PCI)--a novel technology for release of macromolecules from endocytic vesicles." Oftalmologia 56(1): 67-71.
- Berg, K., P. K. Selbo, et al. (1999). "Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol." Cancer Res 59(6): 1180-3.
- Bianco, R., I. Shin, et al. (2003). "Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors." Oncogene 22(18): 2812-22.
- Bieber, T., W. Meissner, et al. (2002). "Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes." J Control Release 82(2-3): 441-54.
- Bischoff, J. R., P. N. Friedman, et al. (1990). "Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2." Proc Natl Acad Sci U S A 87(12): 4766-70.
- Bischoff, J. R., D. H. Kirn, et al. (1996). "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." Science 274(5286): 373-6.
- Bodmer, W. F., S. Cottrell, et al. (1989). "Genetic analysis of colorectal cancer." Princess Takamatsu Symp 20: 49-59.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A 92(16): 7297-301.
- Boyd, S. D., K. Y. Tsai, et al. (2000). "An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53." Nat Cell Biol 2(9): 563-8.
- Brennan, J. A. and D. Sidransky (1996). "Molecular staging of head and neck squamous carcinoma." Cancer Metastasis Rev 15(1): 3-10.
- Bullock, A. N. and A. R. Fersht (2001). "Rescuing the function of mutant p53." Nat Rev Cancer 1(1): 68-76.

- Bunz, F., A. Dutriaux, et al. (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." Science 282(5393): 1497-501.
- Burns, T. F., E. J. Bernhard, et al. (2001). "Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo." Oncogene 20(34): 4601-12.
- Bykov, V. J., N. Issaeva, et al. (2002). "Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound." Nat Med 8(3): 282-8.
- Cairns, P., K. Okami, et al. (1997). "Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer." Cancer Res 57(22): 4997-5000.
- Camp, E. R., J. Summy, et al. (2005). "Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor." Clin Cancer Res 11(1): 397-405.
- Caramelli, E., A. Matteucci, et al. (1996). "Nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and protein kinase C during rat spermatogenesis." Eur J Cell Biol 71(2): 154-64.
- Carpenter, G. and S. Cohen (1990). "Epidermal growth factor." J Biol Chem 265(14): 7709-12.
- Chen, J., V. Marechal, et al. (1993). "Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains." Mol Cell Biol 13(7): 4107-14.
- Chow, J. Y., K. T. Quach, et al. (2007). "RAS/ERK modulates TGFbeta-regulated PTEN expression in human pancreatic adenocarcinoma cells." Carcinogenesis 28(11): 2321-7.
- Chuikov, S., J. K. Kurash, et al. (2004). "Regulation of p53 activity through lysine methylation." Nature 432(7015): 353-60.

- Chung, J. H. and C. Eng (2005). "Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis." Cancer Res 65(18): 8096-100.
- Chung, J. H., M. E. Ginn-Pease, et al. (2005). "Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein." Cancer Res 65(10): 4108-16.
- Chung, J. H., M. C. Ostrowski, et al. (2006). "The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation." Hum Mol Genet 15(17): 2553-9.
- Clayman, G. L., A. K. el-Naggar, et al. (1998). "Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma." J Clin Oncol 16(6): 2221-32.
- Cohen, S., H. Ushiro, et al. (1982). "A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles." J Biol Chem 257(3): 1523-31.
- Connor, K. M., S. Subbaram, et al. (2005). "Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation." J Biol Chem 280(17): 16916-24.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer 2(9): 647-56.
- Crawford, L. V., D. C. Pim, et al. (1981). "Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein." Proc Natl Acad Sci U S A 78(1): 41-5.
- Dang, C. V. and W. M. Lee (1989). "Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins." J Biol Chem 264(30): 18019-23.
- Das, S., J. E. Dixon, et al. (2003). "Membrane-binding and activation mechanism of PTEN." Proc Natl Acad Sci U S A 100(13): 7491-6.

- Dave, B., R. R. Eason, et al. (2005). "The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN." Carcinogenesis 26(10): 1793-803.
- Degenhardt, K., G. Chen, et al. (2002). "BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis." Cancer Cell 2(3): 193-203.
- DeLeo, A. B., G. Jay, et al. (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A 76(5): 2420-4.
- Di Cristofano, A., P. Kotsi, et al. (1999). "Impaired Fas response and autoimmunity in Pten^{+/-} mice." Science 285(5436): 2122-5.
- Di Cristofano, A., B. Pesce, et al. (1998). "Pten is essential for embryonic development and tumour suppression." Nat Genet 19(4): 348-55.
- Dolivet, G., P. Colosetti, et al. (1999). "[Elements of epidemiology and initiation of carcinogenesis in carcinomas of the upper aerodigestive tract. Future therapeutic consequence?]." Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) 120(1): 5-12.
- Dolivet, G., J. L. Merlin, et al. (2002). "In vivo growth inhibitory effect of iterative wild-type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine nonviral vector." Cancer Gene Ther 9(8): 708-14.
- Donehower, L. A., M. Harvey, et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." Nature 356(6366): 215-21.
- Downes, C. P., S. Ross, et al. (2007). "Stimulation of PI 3-kinase signaling via inhibition of the tumor suppressor phosphatase, PTEN." Adv Enzyme Regul 47: 184-94.
- Edwin, F., R. Singh, et al. (2006). "The tumor suppressor PTEN is necessary for human Sprouty 2-mediated inhibition of cell proliferation." J Biol Chem 281(8): 4816-22.

- Feilotter, H. E., M. A. Nagai, et al. (1998). "Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas." Oncogene 16(13): 1743-8.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A 84(21): 7413-7.
- Feng, J., J. Park, et al. (2004). "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem 279(39): 41189-96.
- Ferrari, S., E. Moro, et al. (1997). "ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo." Gene Ther 4(10): 1100-6.
- Ferraro, B., G. Bepler, et al. (2005). "EGR1 predicts PTEN and survival in patients with non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol 23(9): 1921-6.
- Fields, S. and S. K. Jang (1990). "Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein." Science 249(4972): 1046-9.
- Frattini, M., P. Saletti, et al. (2007). "PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients." Br J Cancer 97(8): 1139-45.
- Freedman, D. A. and A. J. Levine (1998). "Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6." Mol Cell Biol 18(12): 7288-93.
- Fukuoka, M., S. Yano, et al. (2003). "Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]." J Clin Oncol 21(12): 2237-46.
- Galanis, E., S. H. Okuno, et al. (2005). "Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas." Gene Ther 12(5): 437-45.
- Gebhardt, F., K. S. Zanker, et al. (1999). "Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1." J Biol Chem 274(19): 13176-80.

- Geyer, R. K., Z. K. Yu, et al. (2000). "The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export." Nat Cell Biol 2(9): 569-73.
- Gimm, O., A. Perren, et al. (2000). "Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors." Am J Pathol 156(5): 1693-700.
- Godbey, W. T., K. K. Wu, et al. (1999). "Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency." Gene Ther 6(8): 1380-8.
- Goodrich, D. W. and W. H. Lee (1990). "The molecular genetics of retinoblastoma." Cancer Surv 9(3): 529-54.
- Gottifredi, V. and C. Prives (2001). "Molecular biology. Getting p53 out of the nucleus." Science 292(5523): 1851-2.
- Green, D. R. and J. E. Chipuk (2006). "p53 and metabolism: Inside the TIGAR." Cell 126(1): 30-2.
- Gronbaek, K., J. Zeuthen, et al. (1998). "Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies." Blood 91(11): 4388-90.
- Gu, J., M. Tamura, et al. (1998). "Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways." J Cell Biol 143(5): 1375-83.
- Guasch, G. (2002). "Dérégulation moléculaire et cancer: prolifération, survie et inhibition de l'apoptose." the international ImMunoGeneTics information system*, <http://imgt.cines.fr>, Montpellier, France, .
- Guldberg, P., P. thor Straten, et al. (1997). "Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma." Cancer Res 57(17): 3660-3.

- Hall, S. R., L. E. Campbell, et al. (1996). "Phosphorylation of p53 at the casein kinase II site selectively regulates p53-dependent transcriptional repression but not transactivation." Nucleic Acids Res 24(6): 1119-26.
- Han, S. and J. Roman (2006). "Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways." Mol Cancer Ther 5(2): 430-7.
- Harlow, E., D. C. Pim, et al. (1981). "Complex of simian virus 40 large-T antigen and host 53,000-molecular-weight protein in monkey cells." J Virol 37(2): 564-73.
- Haupt, S. and Y. Haupt (2006). "Importance of p53 for cancer onset and therapy." Anticancer Drugs 17(7): 725-32.
- Haupt, Y., R. Maya, et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature 387(6630): 296-9.
- Heise, C., A. Sampson-Johannes, et al. (1997). "ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents." Nat Med 3(6): 639-45.
- Herbst, R. S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology." Int J Radiat Oncol Biol Phys 59(2 Suppl): 21-6.
- Herbst, R. S. and W. K. Hong (2002). "IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer." Semin Oncol 29(5 Suppl 14): 18-30.
- Hettinger, K., F. Vikhanskaya, et al. (2007). "c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN." Cell Death Differ 14(2): 218-29.
- Hlobilkova, A., J. Knillova, et al. (2003). "The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 147(1): 19-25.

- Hogset, A., L. Prasmickaite, et al. (2004). "Photochemical internalisation in drug and gene delivery." Adv Drug Deliv Rev 56(1): 95-115.
- Hollstein, M., M. J. Marion, et al. (1994). "p53 mutations at A:T base pairs in angiosarcomas of vinyl chloride-exposed factory workers." Carcinogenesis 15(1): 1-3.
- Hollstein, M., D. Sidransky, et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." Science 253(5015): 49-53.
- Hu, W., Z. Feng, et al. (2007). "p53 regulates maternal reproduction through LIF." Nature 450(7170): 721-4.
- Huether, A., M. Hopfner, et al. (2005). "EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer." Biochem Pharmacol 70(11): 1568-78.
- Issaeva, N., P. Bozko, et al. (2004). "Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors." Nat Med 10(12): 1321-8.
- Jeffers, J. R., E. Parganas, et al. (2003). "Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways." Cancer Cell 4(4): 321-8.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, et al. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res 51(23 Pt 1): 6304-11.
- Kay, M. A., J. C. Glorioso, et al. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med 7(1): 33-40.
- Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." Trends Cell Biol 8(8): 324-30.
- Kichler, A., C. Leborgne, et al. (2001). "Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study." J Gene Med 3(2): 135-44.

- Kojima, K., M. Konopleva, et al. (2006). "Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML." Cell Cycle 5(23): 2778-86.
- Kubbutat, M. H., S. N. Jones, et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature 387(6630): 299-303.
- Kwon, J., S. R. Lee, et al. (2004). "Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A 101(47): 16419-24.
- Lambert, P. F., F. Kashanchi, et al. (1998). "Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP." J Biol Chem 273(49): 33048-53.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature 278(5701): 261-3.
- Lee, J. O., H. Yang, et al. (1999). "Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association." Cell 99(3): 323-34.
- Leslie, N. R., D. Bennett, et al. (2003). "Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN." Embo J 22(20): 5501-10.
- Li, D. M. and H. Sun (1997). "TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta." Cancer Res 57(11): 2124-9.
- Li, J., C. Yen, et al. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." Science 275(5308): 1943-7.
- Li, X., R. Luwor, et al. (2006). "Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells." Oncogene 25(4): 525-35.

- Li, Z., X. Dong, et al. (2005). "Regulation of PTEN by Rho small GTPases." Nat Cell Biol 7(4): 399-404.
- Lievre, A., J. B. Bachet, et al. (2008). "KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab." J Clin Oncol 26(3): 374-9.
- Linzer, D. I., W. Maltzman, et al. (1979). "The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen." Virology 98(2): 308-18.
- Liu, J. L., X. Sheng, et al. (2005). "Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation." Mol Cell Biol 25(14): 6211-24.
- Longy, M., V. Coulon, et al. (1998). "Mutations of PTEN in patients with Bannayan-Riley-Ruvalcaba phenotype." J Med Genet 35(11): 886-9.
- Lu, H. and A. J. Levine (1995). "Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein." Proc Natl Acad Sci U S A 92(11): 5154-8.
- Maccario, H., N. M. Perera, et al. (2007). "PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366." Biochem J 405(3): 439-44.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." J Biol Chem 273(22): 13375-8.
- Mahimainathan, L., F. Das, et al. (2006). "Mesangial cell hypertrophy by high glucose is mediated by downregulation of the tumor suppressor PTEN." Diabetes 55(7): 2115-25.
- Malkin, D., F. P. Li, et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." Science 250(4985): 1233-8.

- Marsh, D. J., V. Coulon, et al. (1998). "Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation." Hum Mol Genet 7(3): 507-15.
- Marsh, D. J., P. L. Dahia, et al. (1997). "Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome." Nat Genet 16(4): 333-4.
- Martins, C. P., L. Brown-Swigart, et al. (2006). "Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors." Cell 127(7): 1323-34.
- May, P. and E. May (1999). "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein." Oncogene 18(53): 7621-36.
- Mazzotti, G., N. Zini, et al. (1995). "Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate localization sites within the nucleus." J Histochem Cytochem 43(2): 181-91.
- Merlin, J., G. Perkins, et al. (2008). "Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS mutation for response prediction to cetuximab in colorectal cancer." J Clin Oncol 26: 209s.
- Merlin, J. L., G. Dolivet, et al. (2001). "Improvement of nonviral p53 gene transfer in human carcinoma cells using glucosylated polyethylenimine derivatives." Cancer Gene Ther 8(3): 203-10.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell 80(2): 293-9.
- Momand, J., G. P. Zambetti, et al. (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." Cell 69(7): 1237-45.
- Monnier, L., G. Milano, et al. (2004). "[Targeting of membrane receptor tyrosine kinases: is there resistance in the HER?]." Bull Cancer 91(9): 685-94.

- Mora, A., D. Komander, et al. (2004). "PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction." Semin Cell Dev Biol 15(2): 161-70.
- Moroni, M., S. Veronese, et al. (2005). "Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study." Lancet Oncol 6(5): 279-86.
- Muller, M., S. Wilder, et al. (1998). "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs." J Exp Med 188(11): 2033-45.
- Nakahara, Y., H. Nagai, et al. (1998). "Mutational analysis of the PTEN/MMAC1 gene in non-Hodgkin's lymphoma." Leukemia 12(8): 1277-80.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell 7(3): 683-94.
- Nassif, N. T., G. P. Lobo, et al. (2004). "PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer." Oncogene 23(2): 617-28.
- Ndoye, A., G. Dolivet, et al. (2006). "Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma xenografts using nonviral p53 gene therapy and photochemical internalization." Mol Ther 13(6): 1156-62.
- Nemunaitis, J., N. Senzer, et al. (2007). "A phase I trial of intravenous infusion of ONYX-015 and enbrel in solid tumor patients." Cancer Gene Ther 14(11): 885-93.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (2003). "Apoptosis. Life and death decisions." Science 299(5604): 214-5.
- Nigro, J. M., S. J. Baker, et al. (1989). "Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types." Nature 342(6250): 705-8.
- O'Brate, A. and P. Giannakakou (2003). "The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?" Drug Resist Updat 6(6): 313-22.

- Ogino, S., J. A. Meyerhardt, et al. (2005). "Molecular alterations in tumors and response to combination chemotherapy with gefitinib for advanced colorectal cancer." Clin Cancer Res 11(18): 6650-6.
- Okahara, F., H. Ikawa, et al. (2004). "Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein." J Biol Chem 279(44): 45300-3.
- Okahara, F., K. Itoh, et al. (2006). "Critical role of PICT-1, a tumor suppressor candidate, in phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate signals and tumorigenic transformation." Mol Biol Cell 17(11): 4888-95.
- Okamura, A., N. Iwata, et al. (2006). "Casein kinase Iepsilon down-regulates phospho-Akt via PTEN, following genotoxic stress-induced apoptosis in hematopoietic cells." Life Sci 78(14): 1624-9.
- Okamura, H., K. Yoshida, et al. (2005). "PTEN expression elicited by EGR-1 transcription factor in calyculin A-induced apoptotic cells." J Cell Biochem 94(1): 117-25.
- Oliner, J. D., J. A. Pietenpol, et al. (1993). "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53." Nature 362(6423): 857-60.
- Oren, M., W. Maltzman, et al. (1981). "Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells." Mol Cell Biol 1(2): 101-10.
- Ory, K., Y. Legros, et al. (1994). "Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation." Embo J 13(15): 3496-504.
- Papakonstanti, E. A., A. J. Ridley, et al. (2007). "The p110delta isoform of PI 3-kinase negatively controls RhoA and PTEN." Embo J 26(13): 3050-61.
- Park, O. J. and Y. J. Surh (2004). "Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies." Toxicol Lett 150(1): 43-56.

- Patel, L., I. Pass, et al. (2001). "Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN." Curr Biol 11(10): 764-8.
- Perren, A., L. P. Weng, et al. (1999). "Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast." Am J Pathol 155(4): 1253-60.
- Perrone, F., A. Lampis, et al. (2008). "PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients." Ann Oncol.
- Perry, M. E., J. Piette, et al. (1993). "The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner." Proc Natl Acad Sci U S A 90(24): 11623-7.
- Personeni, N., J. De Schutter, et al. "Response prediction to cetuximab-based therapy: The role of EGFR copy number by fluorescence in situ hybridization and downstream effectors gene mutations." Gastrointestinal Cancers Symposium abstract 400.
- Podsypanina, K., L. H. Ellenson, et al. (1999). "Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems." Proc Natl Acad Sci U S A 96(4): 1563-8.
- Prasmickaite, L., A. Hogset, et al. (2001). "Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection." Photochem Photobiol 73(4): 388-95.
- Prewett, M., P. Rockwell, et al. (1996). "The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma." J Immunother Emphasis Tumor Immunol 19(6): 419-27.
- Qi, M., A. E. Anderson, et al. (2005). "Indole-3-carbinol prevents PTEN loss in cervical cancer in vivo." Mol Med 11(1-12): 59-63.
- Razis, E., E. Briasoulis, et al. (2008). "Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer. An exploratory study." BMC Cancer 8(1): 234.

- Rippin, T. M., V. J. Bykov, et al. (2002). "Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells." Oncogene 21(14): 2119-29.
- Robbins, P. D., H. Tahara, et al. (1998). "Viral vectors for gene therapy." Trends Biotechnol 16(1): 35-40.
- Robertson, G. P., F. B. Furnari, et al. (1998). "In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A 95(16): 9418-23.
- Romagnani, E., V. Martin, et al. "EGFR gene status, K-Ras mutation and PTEN expression predict cetuximab response in metastatic colorectal cancer." Gastrointestinal Cancers Symposium: Abstract 427.
- Sakaguchi, K., J. E. Herrera, et al. (1998). "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." Genes Dev 12(18): 2831-41.
- Sakai, A., C. Thieblemont, et al. (1998). "PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms." Blood 92(9): 3410-5.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science 307(5712): 1098-101.
- Selbo, P. K., A. Hogset, et al. (2002). "Photochemical internalisation: a novel drug delivery system." Tumour Biol 23(2): 103-12.
- Seo, J. H., Y. Ahn, et al. (2005). "The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway." Mol Biol Cell 16(1): 348-57.
- She, Q. B., D. Solit, et al. (2003). "Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling." Clin Cancer Res 9(12): 4340-6.

- Shen, Y. H., L. Zhang, et al. (2006). "Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A cross-talk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells." J Biol Chem 281(12): 7727-36.
- Somasundaram, K. (2000). "Tumor suppressor p53: regulation and function." Front Biosci 5: D424-37.
- Soussi, T. and C. Beroud (2001). "Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome." Nat Rev Cancer 1(3): 233-40.
- Soussi, T., C. Caron de Fromentel, et al. (1990). "Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution." Oncogene 5(7): 945-52.
- Soussi, T. and G. Lozano (2005). "p53 mutation heterogeneity in cancer." Biochem Biophys Res Commun 331(3): 834-42.
- Srivastava, S., Z. Q. Zou, et al. (1990). "Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome." Nature 348(6303): 747-9.
- Stambolic, V., A. Suzuki, et al. (1998). "Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN." Cell 95(1): 29-39.
- Steck, P. A., M. A. Pershouse, et al. (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." Nat Genet 15(4): 356-62.
- Stewart, C. L., A. M. Soria, et al. (2001). "Integration of the pRB and p53 cell cycle control pathways." J Neurooncol 51(3): 183-204.
- Stuckey, J. A., H. L. Schubert, et al. (1994). "Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate." Nature 370(6490): 571-5.

- Su, J. D., L. D. Mayo, et al. (2003). "PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment." Cancer Res 63(13): 3585-92.
- Subauste, M. C., P. Nalbant, et al. (2005). "Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein beta-catenin with the scaffolding protein MAGI-2." J Biol Chem 280(7): 5676-81.
- Sun, H., R. Lesche, et al. (1999). "PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 96(11): 6199-204.
- Takahashi, Y., F. C. Morales, et al. (2006). "PTEN tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling." Embo J 25(4): 910-20.
- Tanaka, H., N. Fujita, et al. (2005). "3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated IkkappaB kinase beta (IkkB) phosphorylation activates NF-kappaB signaling." J Biol Chem 280(49): 40965-73.
- Torres, J. and R. Pulido (2001). "The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation." J Biol Chem 276(2): 993-8.
- Trotman, L. C., X. Wang, et al. (2007). "Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression." Cell 128(1): 141-56.
- Tuting, T., C. C. Wilson, et al. (1998). "Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro: enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN-alpha." J Immunol 160(3): 1139-47.

- Valiente, M., A. Andres-Pons, et al. (2005). "Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases." J Biol Chem 280(32): 28936-43.
- Vallbohmer, D., W. Zhang, et al. (2005). "Molecular determinants of cetuximab efficacy." J Clin Oncol 23(15): 3536-44.
- Vattemi, E. and P. P. Claudio (2006). "Adenoviral gene therapy in head and neck cancer." Drug News Perspect 19(6): 329-37.
- Vazquez, F. and P. Devreotes (2006). "Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction." Cell Cycle 5(14): 1523-7.
- Vazquez, F., S. Ramaswamy, et al. (2000). "Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function." Mol Cell Biol 20(14): 5010-8.
- Vecil, G. G. and F. F. Lang (2003). "Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses." J Neurooncol 65(3): 237-46.
- Venot, C., M. Maratrat, et al. (1998). "The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression." Embo J 17(16): 4668-79.
- Ventura, A., D. G. Kirsch, et al. (2007). "Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo." Nature 445(7128): 661-5.
- Verheus, M., C. H. van Gils, et al. (2007). "Plasma phytoestrogens and subsequent breast cancer risk." J Clin Oncol 25(6): 648-55.
- Virolle, T., E. D. Adamson, et al. (2001). "The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling." Nat Cell Biol 3(12): 1124-8.
- Vousden, K. H. (2002). "Switching from life to death: the Miz-ing link between Myc and p53." Cancer Cell 2(5): 351-2.

- Waite, K. A. and C. Eng (2002). "Protean PTEN: form and function." Am J Hum Genet 70(4): 829-44.
- Waite, K. A., M. R. Sinden, et al. (2005). "Phytoestrogen exposure elevates PTEN levels." Hum Mol Genet 14(11): 1457-63.
- Wang, X., L. C. Trotman, et al. (2007). "NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN." Cell 128(1): 129-39.
- Wang, X. W., W. Vermeulen, et al. (1996). "The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway." Genes Dev 10(10): 1219-32.
- Wang, Y. and C. Prives (1995). "Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases." Nature 376(6535): 88-91.
- Wasungu, L. and D. Hoekstra (2006). "Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes." J Control Release 116(2): 255-64.
- Whang, Y. E., X. Wu, et al. (1998). "Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression." Proc Natl Acad Sci U S A 95(9): 5246-50.
- Wiman, K. G. (2007). "Restoration of Wild-Type p53 Function in Human Tumors: Strategies for Efficient Cancer Therapy." Adv Cancer Res 97: 321-38.
- Wolff, J. A., M. E. Dowty, et al. (1992). "Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle." J Cell Sci 103 (Pt 4): 1249-59.
- Wong, T. K. and E. Neumann (1982). "Electric field mediated gene transfer." Biochem Biophys Res Commun 107(2): 584-7.
- Woo, R. A., K. G. McLure, et al. (1998). "DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage." Nature 394(6694): 700-4.

- Wu, G. S., T. F. Burns, et al. (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." Nat Genet 17(2): 141-3.
- Wu, Y., D. Dowbenko, et al. (2000). "Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase." J Biol Chem 275(28): 21477-85.
- Xia, D., H. Srinivas, et al. (2007). "Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway." J Biol Chem 282(6): 3507-19.
- Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." Eur J Cancer 37 Suppl 4: S3-8.
- Yim, J. H., Y. J. Kim, et al. (2007). "The putative tumor suppressor gene GLTSCR2 induces PTEN-modulated cell death." Cell Death Differ 14(11): 1872-9.
- Yin, C., C. M. Knudson, et al. (1997). "Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo." Nature 385(6617): 637-40.
- Yu, J., Z. Wang, et al. (2003). "PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A 100(4): 1931-6.
- Zhang, W., M. Gordon, et al. (2006). "Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms associated with clinical outcome of EGFR-expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single agent cetuximab." J Clin Oncol abstract 3028.
- Zhang, W., N. Wu, et al. (2006). "PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via upregulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404." Cancer Biol Ther 5(8): 1008-14.

Table des figures et tableaux

Figure 1: Capacités acquises du cancer.....	6
Figure 2: Représentation schématique des trois domaines structuraux de la protéine P53.....	13
Figure 3: Modifications post-traductionnelles au niveau des différents domaines de P53.....	15
Figure 4: Régulation de P53 par MDM2. MDM2 régule P53 par trois voies différentes.....	17
Figure 5: Le pourcentage des mutations de p53 par type d'organe.	24
Figure 6: Représentation schématique des stratégies d'activation et ou d'inhibition des voies de signalisation contrôlées par P53.	28
Figure 7: Structure tridimensionnelle des différents domaines de la protéine PTEN.	30
Figure 8: Localisation des mutations germinales de pten.	33
Figure 9: Régulation transcriptionnelle de PTEN.	36
Figure 10: La structure des différents domaines fonctionnels de PTEN et les sites de modifications post-traductionnelles.	38
Figure 11: Régulation de la protéine PTEN par ubiquitination par NEDD4-1.....	40
Figure 12: Activation de la voie de RAS/MAPK/ERK et réponse cellulaire aux signaux extracellulaire.	44
Figure 13: Représentation Schématique de la voie PI3K/PTEN/AKT.	45
Figure 14: Représentation schématique des quatre récepteurs tyrosine kinase de la famille des protéines HER et leurs ligands (12 ligands).....	49
Figure 15: Représentation schématique des différents domaines protéiques des récepteurs de la famille HER.....	50
Figure 16: Les différentes étapes d'activation des récepteurs HER.	52
Figure 17: Différentes stratégies thérapeutiques développées pour bloquer les récepteurs HER.....	56

Figure 18: Classification des anticorps monoclonaux utilisés en thérapie: murin, chimérique, humanisé et humain.....	57
Figure 19: Action des anticorps monoclonaux par le système immunitaire.	61
Figure 20: Structure du PEI linéaire et du PEI branché.	75
Figure 21: Principe de l'internalisation photochimique.....	77

Liste des Tableaux

Tableau 1: Pourcentage des tumeurs surexprimant les récepteurs HER en fonction du type tumoral.	49
Tableau 2: Caractéristiques de quelques vecteurs viraux.	72
Tableau 3: Caractéristiques de quelques vecteurs non viraux	73