Nancy-Université
Université Henri Poincaré

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 SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.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

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Anne-Sophie CHRETIEN**

FONCTIONNALITE DE LA SIGNALISATION EN AVAL DES RECEPTEURS HER :

IMPLICATION DANS LA REPONSE CELLULAIRE ET TUMORALE AUX THERAPIES CIBLEES

Le 20 juin 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :	Dr. Frédéric BIBEAU	Praticien Spécialiste, CLCC Val d'Aurelle, Montpellier
	Dr. Amélie LANSIAUX	MCU-PH, CLCC Oscar Lambret, Lille
Examinateurs :	Pr. Philippe Bécuwe	PU, Nancy Université, Nancy
	Pr. Pierre LAURENT-PUIG	PU-PH, HEGP, Paris
	Pr. Jean-Louis MERLIN	PU, CLCC Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy

---

EA 4421 : Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie (SiGReTO)
Faculté de Médecine – 9 avenue de la forêt de Haye – 54505 Vandœuvre-lès-Nancy

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations …… p. 5

Introduction générale …… p. 7

Chapitre I : Introduction Bibliographique ……..... p. 8

I.1. Signalisation et cancer …… p. 9

I.2. Récepteurs HER ……... p. 9
I.2.1. HER1 ou EGFR ……. p.15
I.2.2. HER2 ……. p.18
I.2.3. HER3 ……..... p.19
I.2.4. HER4 ……..….. p.20

I.3. Signalisation en aval des récepteurs HER ……..…… p.20
I.3.1. Voie des RAS/RAF/MAPK ……..….. p.20
I.3.1.1. RAS ……..... p.22
I.3.1.2. RAF ……..... p.22
I.3.1.3. MEK ……...……. p.23
I.3.1.4. ERK ……...…….. p.23
I.3.2. Voie des PI3K/AKT ……..…… p.23
I.3.2.1. PI3K ……..……... p.23
I.3.2.2. AKT ……..…… p.24
I.3.2.3. GSK3β ……..…….. p.24
I.3.2.4. P70S6K ……..……. p.25
I.3.2.5. PTEN ……..…… p.25

I.4. Anticorps monoclonaux Anti-EGFR …… p.27
I.4.1. Cétuximab …….. p.28
I.4.2 Panitumumab ……..... p.30
I.5. Mécanismes de résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR

et marqueurs validés et potentiels ……..……..... p.31
I.5.1. Généralités sur les biomarqueurs ...……..... p.31
I.5.2. Marqueurs prédictifs de résistance aux anticorps anti-EGFR …….. p.33
I.5.2.1 EGFR ……. p.33
I.5.2.2. Modulation de l'expression d'effecteurs intracellulaires en aval d'EGFR …… p.36
I.5.2.2.1. Voie des RAS/RAF/MAPK ……... p.37
I.5.2.2.2. Voie des PI3K/ATK …….. p.42
I.5.2.3. Activation de récepteurs et voies de signalisation alternatifs .. p.46
I.5.2.4. Autres marqueurs ……... p.46

Objectif du travail …… p.51

Chapitre II

Influence de la fonctionnalité de PTEN et de P53 sur la réponse cellulaire au cétuximab. …...…..... p.53

Chapitre III

Validation d'une méthode de caractérisation de la signalisation en aval des récepteurs à tyrosine kinase par phosphoprotein array dans le cancer du sein. …….…..... p.66

Chapitre IV

Optimisation de la procédure de génotypage *KRAS* pour la prescription rationnelle et individualisée des thérapies ciblées en première ligne dans le cancer colorectal métastatique (CCRm). ……..……... p.79

Chapitre V

Evaluation intégrative de la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR. Applications à la prédiction de réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique. ……... p.111

Discussion Générale ……. p.129

Conclusion …… p.138

Annexes …… p.140

Bibliographie …… p.150

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP :	Analyse en Composante Principale
AKT :	Protéine kinase B
ARN:	Acide RiboNucléique
ASMR:	Amélioration du Service Médical Rendu
BRAF :	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSC :	Best Supportive Care
CCRm:	Cancer ColoRectal métastatique
CISH :	Chromogenic In Situ Hybridization
COX2 :	CycloOXygénase 2
CR :	Complete Response
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EMEA:	European Medicines Agency
ERK 1/2 :	Extracellular signal Regulated Kinase 1/2
FDA :	Food and Drugs Administration
FGFR :	Fibroblast Growth Factor Receptor
FISH :	Fluorescent In Situ Hybridization
FOLFIRI :	5-Fluorouracile/irinotécan
FOLFOX :	5-Fluorouracile/oxaliplatine
GIST :	GastroIntestinal Stromal Tumor
GLUT4:	Glucose transporter type 4
Grb2:	Growth factor Receptor Binding protein 2
GSK3β :	Glycogene Synthase Kinase 3β
HER :	Human Epidermal growth factor Receptor
HRM :	High Resolution Melting
IGF1R:	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
iNOS:	Inductible NO Synthase
KRAS :	Kirsten Rat Sarcoma virus
LDA :	Linear Discriminant Analysis
MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK1 :	Mitogen-activated Extracellular signal regulated Kinase–activating kinase 1

mTOR :	mammalian Target Of Rapamycin
NIH :	National Institute of Health
OS:	Overall Survival
P70S6K :	P70 ribosomal protein S6 Kinase
P90RSK:	P90 Ribosomal S6 Kinase
pAKT :	phospho-AKT
pEGFR:	phospho-EGFR
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PD:	Progressive Disease
PDGFR :	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
pERK1/2:	phospho-ERK 1/2
PFS:	Progression Free Survival
pGSK3β:	phospho-GSK3β
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-OH kinase
PIP2 :	Phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIP3 :	Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
pMEK1:	phospho-MEK1
pP70S6K:	phospho-P70S6K
pP90RSK:	phospho- P90 Ribosomal S6 Kinase
PR:	Partial Response
PTEN:	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
RAS:	Rat Sarcoma
RAF:	Rat Fibrosarcoma virus
RECIST :	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR:	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
VEGFR:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
SD:	Stable Disease
STAT3:	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVM:	Séparateurs à Vastes Marges
TGFα:	Transforming Growth Factor α
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1

INTRODUCTION GENERALE:

En cancérologie, la dernière décennie a été marquée par des progrès majeurs : diminution de la mortalité par cancer, augmentation des durées de survies et des pourcentages de rémission complète, émergence de nouvelles options thérapeutiques (1).

D'après le bilan annuel des avancées thérapeutiques, et sur la base des avis rendus par la Commission de transparence de la Haute Autorité de Santé, l'oncologie apparaît comme l'un des domaines les plus porteurs en termes d'innovations. A eux seuls, les cancers représentent près du tiers des situations thérapeutiques améliorées et se voient attribuer la totalité des ASMR (amélioration du service médical rendu) de niveau I et II (respectivement progrès thérapeutique majeur et amélioration importante en termes d'efficacité et/ou de réduction des effets indésirables) en 2008. En 2009, près de 25% des molécules considérées comme améliorant le service médical rendu sont des anticancéreux.

La tendance actuelle, en ce qui concerne les objectifs à court et moyen terme, porte essentiellement sur la compréhension des mécanismes de la cancérogénèse, la prévention, le dépistage, le développement de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, l'amélioration de la qualité de vie des patients, ainsi que le développement de marqueurs diagnostiques, pronostiques, ou encore prédictifs de réponse aux traitements.

Parmi les progrès techniques les plus marquants se situent les avancées en génomique et protéomique, permettant la caractérisation moléculaire des tumeurs (2). Les conséquences cliniques de ces découvertes donnent accès à une meilleure connaissance de la biologie des cancers, et ont permis la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques aboutissant au développement des thérapies ciblées.

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. SIGNALISATION ET CANCER

Depuis la découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, le cancer apparait comme une maladie de la signalisation. En effet, selon le concept proposé par Hanahan et Weinberg (3), les six propriétés caractéristiques des cellules tumorales aboutissant à une indépendance de croissance, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, une résistance à la mort cellulaire, une prolifération illimitée, une capacité accrue à induire l'angiogenèse et une propension à l'invasion et la dissémination, sont imputables à des anomalies de la signalisation. A ces six propriétés s'ajoutent deux caractéristiques: la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire (4). Depuis, l'élucidation de mécanismes moléculaires clés a permis d'identifier les principales voies de signalisation impliquées dans l'oncogenèse. On estime qu'environ 20% des 32 000 gènes humains codent des protéines impliquées dans la transduction du signal, incluant des récepteurs transmembranaires, plus de 520 protéines kinases et 130 protéines phosphatases (5).

Deux voies majeures, la voie des RAS/RAF/MAPK (Rat Sarcoma/ Rat Fibrosarcoma virus/ Mitogen Activated Protein Kinase) et la voie des PI3K/AKT (Phosphatidylinositol 3-OH kinase/ Protéine kinase B) sont impliquées dans la signalisation cellulaire en aval des récepteurs à tyrosine kinase, et font l'objet d'un développement intensif depuis près de 20 ans. L'inhibition de ces voies de signalisation conditionne directement l'activité des thérapies ciblées dirigées contre des récepteurs à tyrosine kinase comme les récepteurs HER (Human Epidermal growth factor Receptor). Le contrôle de ces voies de signalisation demeure actuellement un challenge important.

I.2. Récepteurs HER

Les récepteurs du facteur de croissance épidermique humain ou Human Epidermal growth factor Receptors (HER) sont parmi les premiers oncogènes identifiés. Ils font partie de la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase, répartis en 20 familles différentes (Figure 1). Plusieurs récepteurs à tyrosine kinase sont des proto-oncogènes et sont de ce fait des cibles potentielles pour des thérapies anticancéreuses (5, 6).

La famille des récepteurs HER comprend quatre récepteurs homologues : HER1 (Erb-B1, EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (Erb-B2), HER3 (Erb-B3), et HER4 (Erb-B4) (Figure 2 A) qui partagent une grande homologie de structure primaire (40-45%). Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires présentant un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase (Figure 2B).

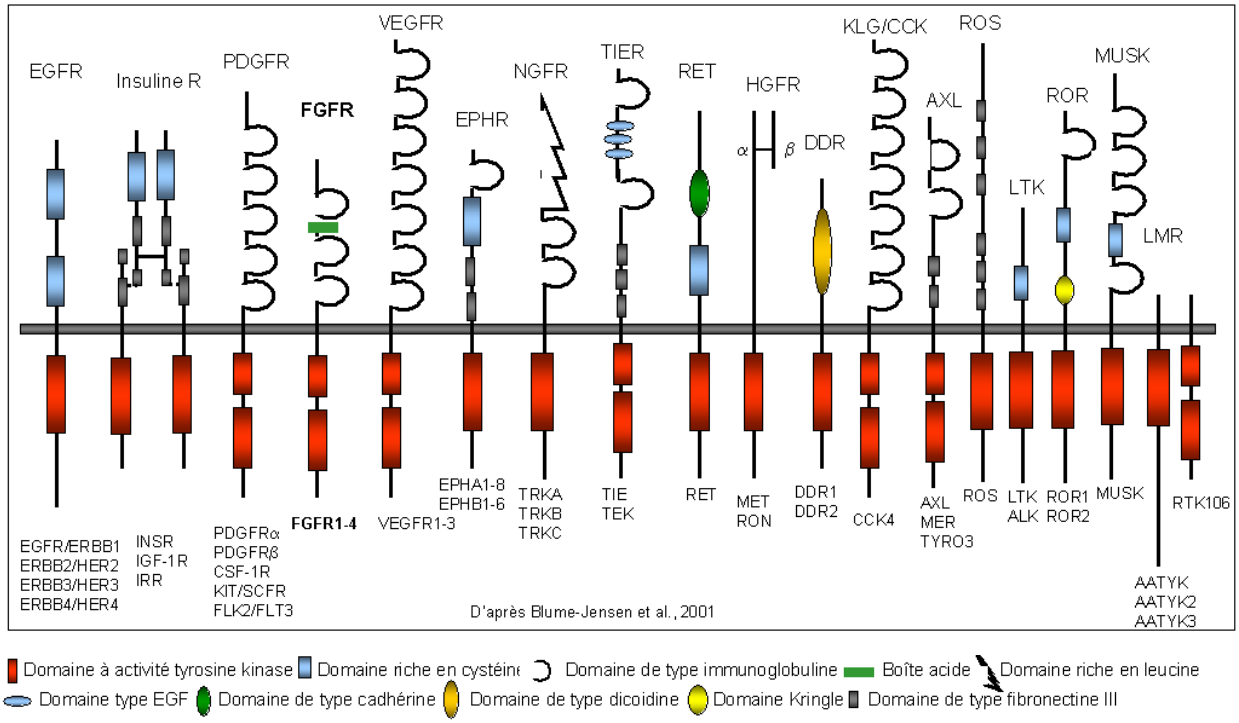


Figure 1 : Classification des récepteurs à activité tyrosine kinase, répartis en 20 familles différentes.

Ces récepteurs sont exprimés à l'état physiologique dans de nombreux types de tissus d'origine épithéliale, mésenchymateuse ou encore neurale, dans lesquels ils jouent un rôle majeur dans le développement, la prolifération, la différentiation et le métabolisme cellulaire (6-8). Les récepteurs HER sont surexprimés ou présentent des mutations activatrices dans de nombreux types tumoraux (tableau 1).

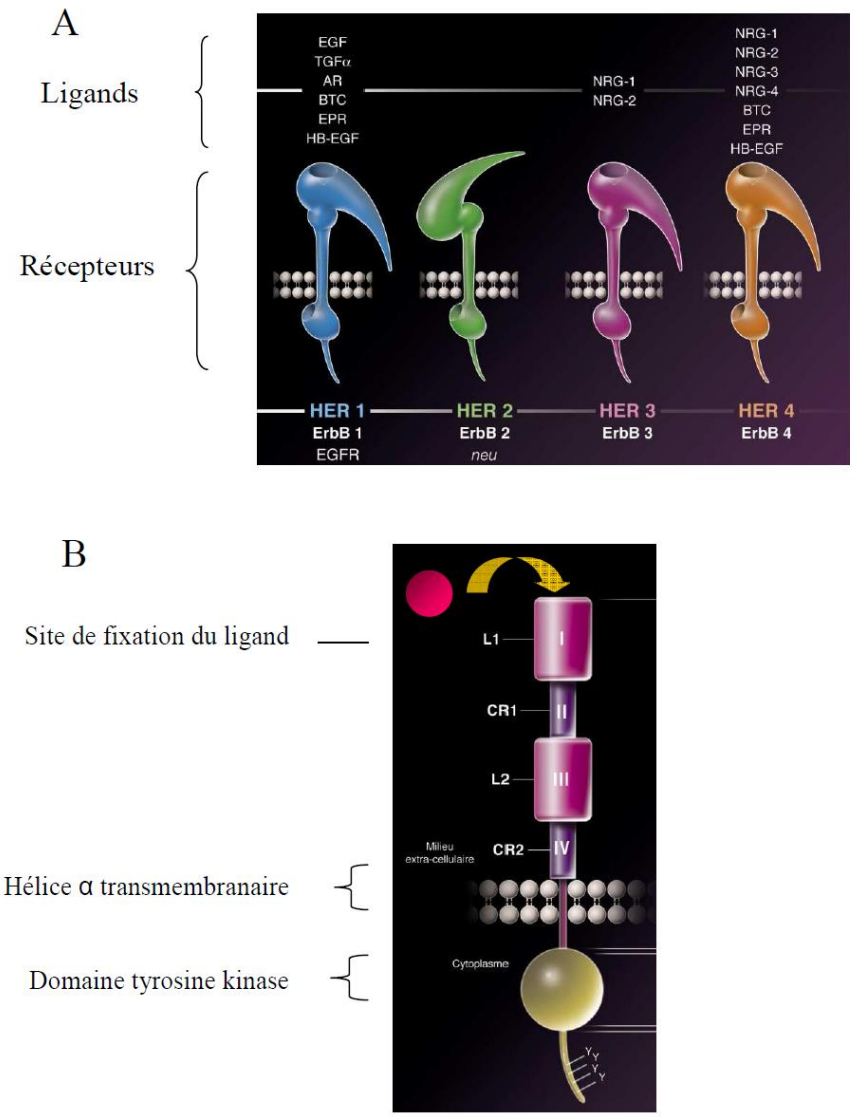


Figure 2: A: Famille des récepteur HER comprenant HER1 ou EGFR, HER2, HER3 et HER4. **B:** Structure des récepteurs HER: ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires présentant une partie extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase.

Au cours de ces dernières années, l'étude de ces récepteurs a conduit à une meilleure approche biologique des mécanismes inhérents à la carcinogenèse ainsi qu'au développement de thérapeutiques ciblées qui répondent à des besoins majeurs de spécificité (9).

Tableau 1 : Fréquence des mutations et de l'amplification des récepteurs HER en fonction du type tumoral. D'après (10).

Gène	Pathologie	Altération	Fréquence
EGFR	Sein, autres	Amplification	5% dans les cancers du sein
	Glioblastomes	Délétion, amplification	40-50%
	Cancer du poumon non à petites cellules	Mutation domaine kinase	10% caucasiens 30-50% asiatiques
HER2	Sein	Amplification	25-30%
	Cancer du poumon non à petites cellules	Mutation domaine kinase	4%
HER3		Pas d'altération significative décrite	
HER4	Divers	Mutation du domaine kinase	1-2% Asie

Fonctionnement des récepteurs HER

Les récepteurs HER à l'état monomérique sont normalement exprimés à la surface de la cellule. L'activation du récepteur nécessite sa dimérisation (homodimérisation ou hétérodimérisation), consécutive à la fixation du ligand. La fixation des ligands au récepteur a pour conséquence la stabilisation du domaine extracellulaire dans une conformation favorable à sa dimérisation avec un second monomère (Figure 3) (10). Cette activation est définitive ; sans mécanisme de déphosphorylation actuellement connu, l'activité tyrosine-kinase du récepteur peut se poursuivre indéfiniment. Le récepteur peut être internalisé et être dégradé par la voie lysosomiale ou recyclé et ré-exprimé à la surface membranaire.

Cette dimérisation permet la transphosphorylation du domaine kinase intracellulaire au niveau de résidus tyrosine, permettant ainsi le recrutement de molécules de signalisation et l'activation des voies de signalisation. Il peut s'agir d'une homo- ou d'une hétéro-dimérisation.

Ce système d'homo et hétérodimérisation confère aux récepteurs HER un haut degré de complexité. D'autre part, différentes combinaisons de récepteurs peuvent aboutir à des réponses biologiques variables (11). Les homodimères d'EGFR ou d'HER2 entraînent un

signal d'intensité modérée, les homodimères d'HER3 ne permettent pas de transduction du signal. Les hétérodimères entraînent un signal d'intensité plus forte que les homodimères (12). Les hétérodimères contenant HER2, et plus particulièrement les dimères HER2-HER3 sont les plus actifs (10).

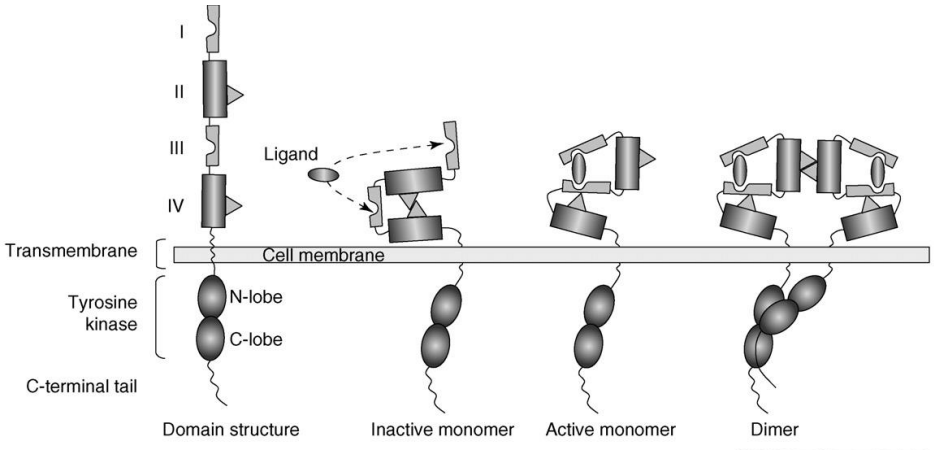


Figure 3 : Mode d'activation des récepteurs HER. Le domaine extracellulaire est composé de quatre domaines, I, II, III et IV. Les domaines I et III sont des sites de fixation du ligand. Les domaines II et IV sont des domaines riches en cystéine permettant l'interaction entre les monomères. Le domaine tyrosine kinase intracellulaire présente une homologie avec les autres membres de la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Le domaine C-terminal est riche en résidus tyrosine qui correspondent aux sites de phosphorylation. En l'absence de ligand, le récepteur est inactif et le domaine extracellulaire est replié dans une conformation permettant l'interaction des domaines II et IV. La fixation d'un ligand sur le monomère permet le rapprochement des domaines I et III, exposant ainsi le domaine II, interface de dimérisation. Les domaines de dimérisation de deux récepteurs peuvent alors interagir, ce qui a pour conséquence un rapprochement des domaines kinase, et l'induction de leur transphosphorylation. D'après (10).

Cette diversité de possibilités de dimérisation, ainsi que la diversité des ligands et de couplage à des protéines de signalisation en aval de ces récepteurs permet une large gamme de possibilités quant aux conséquences de l'activation de ces récepteurs. La multiplicité des récepteurs HER chez les mammifères pourrait avoir un rôle de modulation du signal. Ceci peut s'illustrer par l'existence de HER2 et HER3, dont la fonctionnalité est incomplète.

Chaque récepteur présente un rôle précis au cours du développement, contrairement aux autres membres des familles de récepteurs à activité tyrosine kinase, qui sont caractérisés par des redondances parmi les différents membres de ces familles (10). La sélectivité dans l'engagement dans une voie de signalisation est différente selon les séquences intracellulaires de chaque membre de la famille HER. EGFR et HER4 présentent la plus grande diversité

d'effecteurs intracellulaires. HER2 présente peu de diversité quant à ses possibilités d'interaction avec des protéines intracellulaires ; HER3 présente également peu d'effecteurs mais est caractérisé par un grand nombre de sites de fixation pour la sous-unité régulatrice p85 de PI3K. En revanche, chaque membre de la famille présente des sites de fixation pour la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) et peut potentiellement activer la voie des RAS/RAF/MAPK (10).
Les récepteurs HER peuvent également être transloqués au niveau nucléaire et induire l'expression de nombreux gènes impliqués dans la progression tumorale tels que la cycline D1 ou encore la voie de iNOS/NO (inductible NO synthase/ Nitric Oxide) et de la COX2 (cyclooxygénase 2) (13).

L'activation des récepteurs HER par les ligands peut se faire de manière juxtacrine, autocrine, paracrine ou endocrine (7). La diversité des ligands capables d'activer les récepteurs HER a augmenté au cours de l'évolution (7). Il existe de nombreux ligands spécifiques des récepteurs HER, qui présentent tous un domaine EGF (Epidermal Growth Factor) -like qui leur confère leur spécificité de liaison (14). Ces ligands se divisent en trois groupes en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs: le premier groupe se compose de l'EGF, l'amphiréguline et du TGFα, qui se lient spécifiquement à EGFR ; l'affinité d'EGFR pour l'EGF peut être modulée par la présence de HER2 et HER3 (7). La β-celluline, l'heparin-binding EGF et l'épiréguline font partie du second groupe et se lient à EGFR et HER4. Le troisième groupe se compose des neurégulines 1 à 4, qui présentent une affinité pour les récepteurs HER3 et HER4. Il n'existe aucun ligand identifié pour HER2 (Figure 4) (6, 14, 15).

Ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs ancrés dans la membrane. Leur activation est consécutive à leur clivage par des métalloprotéases, générant ainsi des ligands solubles d'environ 55 acides aminés (7). Le clivage de la partie extracellulaire est effectué par une famille de protéines, les A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM). Une fois clivée, la partie C-terminale du précurseur est transloquée dans le noyau et induit la prolifération cellulaire par activation du gène de la cycline A et c-myc (16).

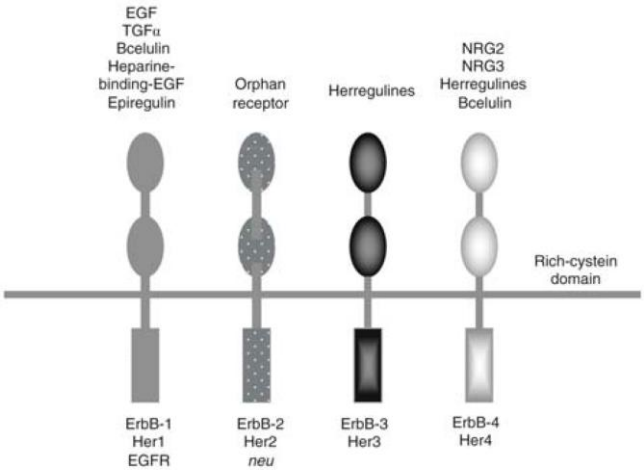


Figure 4 : Principaux ligands responsables de l'activation des récepteurs HER. Ces ligands présentent tous un domaine EGF-like qui leur confère leur spécificité de liaison. Ces ligands se divisent en trois groupes en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs: Il n'existe aucun ligand identifié pour HER2. D'après (17).

Plusieurs études mettent en évidence l'importance de ces phénomènes d'activation des précurseurs de ces ligands dans la prolifération et la migration cellulaires (18), et font de ces protéases des cibles thérapeutiques potentielles (16). Dans certaines circonstances, les précurseurs membranaires sont capables d'activer les récepteurs HER sans protéolyse préalable (7).

I.2.1. HER1 ou EGFR

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) fut le premier récepteur à tyrosine kinase caractérisé (6, 7), ainsi que l'un des premiers proto-oncogènes identifiés (19). EGFR présente un rôle physiologique préférentiel dans le développement des tissus d'origine épithéliale, contrairement aux récepteurs HER2, HER3 et HER4 qui présentent un rôle dans le développement des tissus nerveux et musculaires squelettiques (7). L'activation d'EGFR a pour conséquences une augmentation de la prolifération cellulaire, de la motilité cellulaire, et une diminution de l'apoptose. EGFR joue également un rôle dans le phénomène de transition épithélio-mésenshymateuse, dans la régulation des métalloprotéases matricielles, du VEGF-A et probablement un rôle dans le maintien des cellules souches (20), ainsi que dans les phénomènes d'angiogenèse tumorale (21). En clinique, la surexpression d'EGFR est associée à un pronostic péjoratif ainsi qu'à un risque accru de diffusion métastatique (22, 23).

Indépendamment de son activité kinase, EGFR aurait également un rôle dans la stabilisation des transporteurs du glucose SGLT1, favorisant la survie cellulaire par inhibition des phénomènes d'autophagie (24).

La forme membranaire d'EGFR peut, comme tous les récepteurs de la famille HER, s'homo ou s'hétérodimériser, préférentiellement avec HER2 et HER3, très exceptionnellement avec HER4 (25). On peut distinguer deux sous-types de récepteur en fonction de leur affinité, haute (10% du pool d'EGFR) ou basse (90% du pool d'EGFR), pour l'EGF (26-30). L'activation des voies de signalisation en aval d'EGFR est variable en fonction du sous-type de récepteur stimulé (29). La fixation des ligands sur les récepteurs à haute affinité active les voies des RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT, tandis que la fixation des ligands sur les récepteurs à basse affinité a pour conséquence l'activation des voies STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et PLCγ/PKC (Phospholipase Cγ/ Proteine kinase C). L'existence de récepteurs avec différentes propriétés de signalisation a pour conséquence une variation qualitative dans la réponse d'EGFR à sa stimulation par un même ligand en fonction de ses concentrations (29).
Il existe également une fonction nucléaire d'EGFR. Découverte récemment, la fraction intranucléaire d'EGFR permet l'activation directe de la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (cycline D1) et dans l'inflammation (COX-2) (31, 32). La localisation nucléaire d'EGFR est de mauvais pronostique dans les cancers du sein, des voies aérodigestives supérieures ainsi que dans les cancers de l'ovaire, et pourrait également avoir un impact sur la réponse aux traitements par chimiothérapie et par thérapies ciblées (31, 33, 34).

Des modèles *in vivo* ont confirmé que certaines mutations d'EGFR sont tumorigènes, mais nécessitent la mutation d'autres gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Ainsi EGFR joue un rôle majeur dans l'acquisition du phénotype malin et dans la progression tumorale (35), notamment en ce qui concerne l'oncogenèse colorectale. Considérant son importance majeure dans l'oncogenèse, ainsi que sa fréquence de surexpression dans de nombreux types tumoraux (tableau 2) ce récepteur constitue une cible thérapeutique de choix, en particulier dans les cancers colorectaux et les cancers des voies aérodigestives supérieures (35, 36). Plusieurs molécules ciblant EGFR appartenant à la classe des anticorps monoclonaux (cétuximab (Erbitux®), panitumumab (Vectibix®)) et des inhibiteurs de tyrosine kinase (géfitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (Tyverb®)) disposent actuellement d'une AMM

(Autorisation de Mise sur le Marché) (Figure 5). Une vingtaine d'autres molécules ciblant EGFR est actuellement en cours de développement (20).

EGFR présente des mutations ponctuelles ou des délétions au niveau de son domaine kinase dans 10 à 15% des cancers du poumon non à petites cellules chez les caucasiens, et 30 à 50%

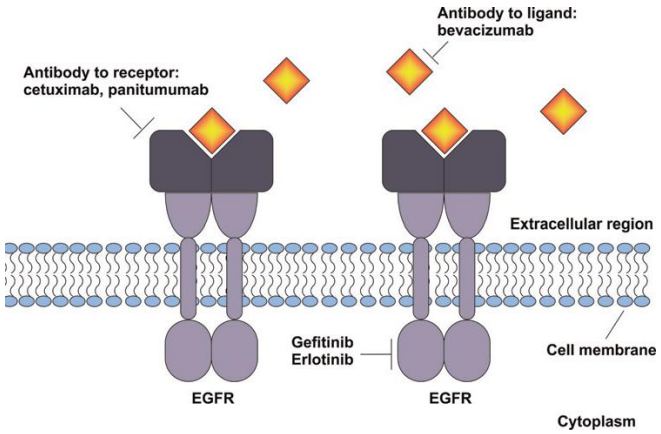


Figure 5 : Les inhibiteurs d'EGFR présentent une action extracellulaire (anticorps monoclonaux : cétuximab et panitumumab) ou intracellulaire (inhibiteurs de tyrosine kinase : géfitinib et erlotinib). D'après (37).

chez les asiatiques. Ces mutations ont pour conséquence une augmentation de l'activité kinase du récepteur, pouvant aller jusqu'à l'activation constitutive du récepteur, indépendamment de la fixation de son ligand. Les mutants d'EGFR transforment les fibroblastes *in vitro* et *in vivo* (10). Dans le cancer colorectal, ces mutations sont rares.

Plusieurs modes d'activation oncogénique d'EGFR ont été décrits (38, 39):

- augmentation de l'expression d'EGFR par divers mécanismes : augmentation de la transcription, stabilisation au niveau membranaire par inhibition de son internalisation ou de sa dégradation, ou encore amplification du gène
- mutations d'EGFR ayant pour conséquence l'expression d'une forme du récepteur constitutionnellement active ; on distingue des mutations dans des domaines codant la partie extracellulaire du récepteur (EGFRvIII) ou sa partie intracellulaire (mutation T790M)
- augmentation de l'expression des ligands (TGFα),
- autoactivation par une boucle autocrine (13)

L'impact de ces mutations sur la réponse thérapeutique aux thérapies ciblées anti-EGFR (39) sera détaillé ultérieurement. EGFR est également impliqué dans les phénomènes de résistance à la radiothérapie ainsi qu'à l'hormonothérapie (35).

Tableau 2 : Surexpression d'EGFR en fonction des tissus. D'après (40).

Tissus	Surexpression d'EGFR (%)	Référence
Cancer des voies aérodigestives supérieures	80-100	(41-43)
Cancer colorectal	70-90	(44)
Cancer du poumon non à petites cellules	40-80	(45)
Cancer de l'estomac	20-80	(46, 47)
Cancer du pancréas	30-90	(48)
Cancer du sein	15-90	(49)
Cancer de l'ovaire	35-70	(50)
Cancer du rein	50-90	(51)
Gliomes	40-50	(52, 53)
Cancer de la prostate	40-80	(54)
Cancer du col de l'utérus	80-100	(55)

I.2.2. HER2

HER2 n'a pas de ligand connu. Son extrémité N-terminale se présente de manière constitutive dans une conformation proche de celle observée lors de la fixation des ligands aux autres récepteurs. HER2 est donc en permanence capable de se dimériser ; il existerait cependant un mode de régulation qui serait dépendant de la partie transmembranaire du récepteur (10). Ce récepteur est surexprimé dans 15 à 20% des cancers du sein, et sa surexpression est liée au caractère très agressif de ces tumeurs (10). La surexpression d'HER2 se rencontre également dans les cancers de l'œsophage, de l'estomac, de l'ovaire et de l'endomètre (5). Les mutations d'HER2 sont rares dans ces cancers et sa surexpression semble être le mécanisme principal par lequel HER2 promeut l'oncogenèse (10). Le mode d'activation d'HER2 passe dans 95 à 98% par un phénomène d'amplification génique suivi d'une surexpression importante.

La surexpression d'HER2 dans les cancers du sein ainsi que sa valeur pronostique fut mise en évidence dès la fin des années 80 ; ces travaux conduisent au développement du premier anticorps monoclonal humanisé ciblant un oncogène, le trastuzumab (Herceptin®), mis sur le marché en 1998 (6), et plus récemment du lapatinib (Tyverb®), inhibiteur de tyrosine kinase ciblant les récepteurs HER1 et HER2.

I.2.3. HER3

HER3 présente un domaine intracellulaire tronqué, et ne présente donc pas d'activité kinase intrinsèque. Son activation est donc dépendante de la formation d'hétérodimères, habituellement avec HER2. HER3 comporte 14 tyrosines qui une fois phosphorylées peuvent potentiellement ancrer des domaines SH2 ou des PTB binding proteins impliquées dans un grand nombre de voies de signalisation intracellulaires. Les fonctions physiologiques de ces activités de signalisation restent à définir (12). HER3 peut activer directement AKT *via* 6 de ses phospho-tyrosines, ce qui en fait un point critique de la signalisation dans la famille de récepteurs HER.

Puisque HER3 n'est pas apparu dans les résultats de screening d'oncogènes, son rôle a été probablement sous-estimé dans un premier temps. De plus, aucune altération importante d'HER3 n'a été mise en évidence dans les tumeurs humaines. Ceci explique pourquoi les anti-EGFR et anti-HER2 ont été préférentiellement développés. De même, les pan-inhibiteurs d'HER épargnent HER3. Il a cependant été démontré que dans des modèles d'induction de tumeurs par mutagenèse d'HER2, le knock-out d'HER3 permet d'obtenir une réversion du phénotype tumoral *in vivo* (12). HER3 joue un rôle prépondérant dans la transformation maligne contrôlée par HER2, et est indispensable à la croissance tumorale et la prolifération cellulaire dans les tumeurs dépendantes de la surexpression d'HER2 *in vitro* et *in vivo*. Une perte d'expression de HER3 dans des lignées cellulaires surexprimant HER2 a pour conséquence une inhibition de la croissance cellulaire égale à une perte de fonction de HER2. Dans des modèles animaux de tumeurs colorectales spontanées, la suppression de HER3 prévient l'apparition de tumeurs (12).

D'autre part, bien que son implication en tant que moteur de l'oncogenèse n'ait jamais été démontrée, son rôle dans la transduction du signal et son implication dans la résistance aux

thérapies anti-EGFR ou anti-HER2, qu'il s'agisse d'inhibiteurs de tyrosine kinase ou d'anticorps monoclonaux, font d'HER3 un récepteur crucial en pathologie cancéreuse.

I.2.4. HER4

HER4 présente une importante homologie de séquence avec EGFR, mais son implication en pathologie humaine n'est pas encore clairement démontrée. HER4 pourrait participer à la séquestration d'HER3, ce qui pourrait expliquer que son expression est de bon pronostique dans les cancers du sein de stade précoce (12). Les mutations activatrices d'HER4 sont fréquentes dans les mélanomes (56).
Sa surexpression ne serait pas impliquée dans la tumorigenèse ; la signalisation en aval d'HER4 serait associée préférentiellement à la différenciation, la mort cellulaire et la diminution de tumorigénicité.

L'activation des récepteurs HER a pour conséquence l'activation de diverses voies de signalisation intracytoplasmiques ; les plus étudiées sont la voie des MAPK et la voie des PI3K/AKT.

I.3. SIGNALISATION EN AVAL DES RECEPTEURS HER

Plusieurs voies de signalisation sont couplées aux récepteurs HER : les plus décrites sont la voie des PI3K/AKT, la voie des RAS/Raf/MAPK, la voie de JAK/STAT3 ainsi que Src/PLCγ (Figure 6).

I.3.1 Voie des RAS/RAF/MAPK

La voie des RAS/RAF/MAPK présente un rôle central dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire d'un large spectre de tumeurs humaines. Cette voie, après activation des récepteurs, implique l'activation de RAS, à l'origine de la cascade des activités de phosphorylation : RAF (MAP kinase kinase kinase), MEK (mitogen-activated extracellular

signal regulated kinase–activating kinase) (MAP kinase kinase) et ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) (MAP kinase) (15). ERK est ensuite transloquée dans le noyau où elle active différents facteurs de transcription de gènes impliqués dans la réplication et dans le cycle cellulaire. De nombreuses molécules ont été conçues pour inhiber différentes étapes de cette voie et sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais de phase III.

Cette voie de signalisation est largement impliquée dans les phénomènes de résistance aux thérapies ciblées anti-EGFR. Le premier exemple d'application validée en situation clinique est celui de la mutation de l'oncogène *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma virus). Les mutations constitutives du gène *KRAS* sont fréquemment observées dans différentes tumeurs humaines et sont impliquées à la fois dans l'oncogenèse et la progression tumorale.

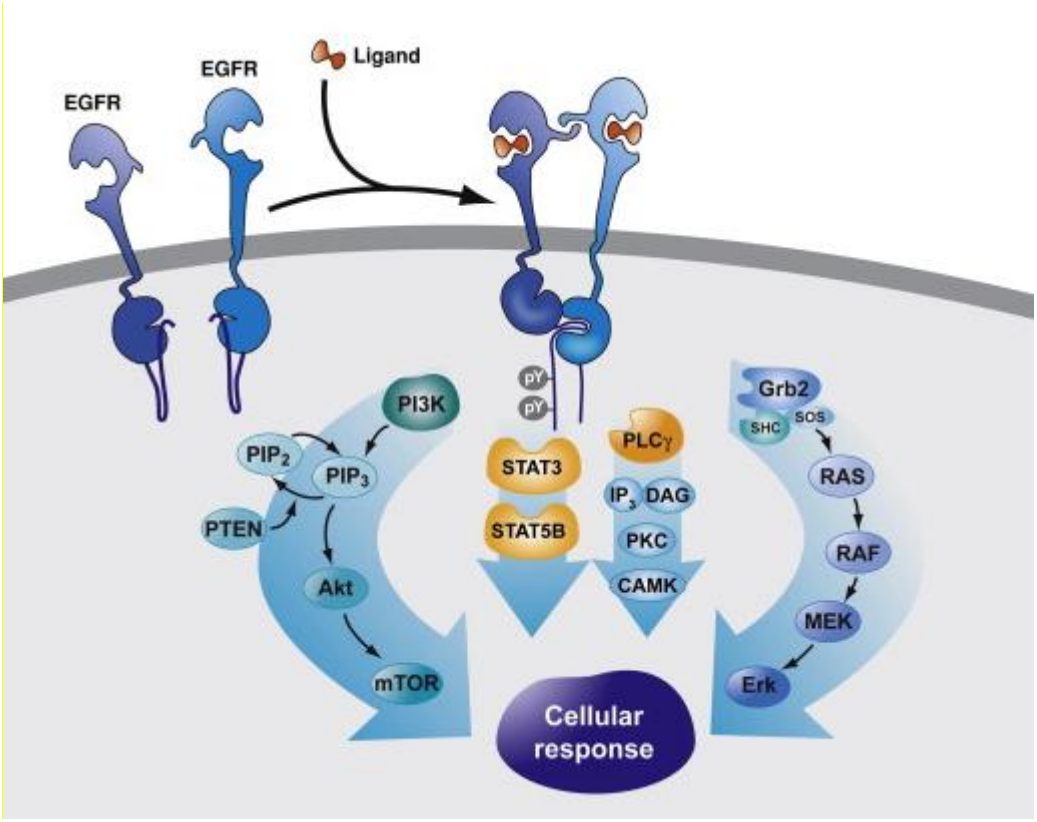


Figure 6 : Principales voies de signalisation en aval des récepteurs HER : voie des PI3K/AKT, la voie des RAS/RAF/MAPK, la voie de JAK/STAT3 et Src/PLCγ. Les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs HER servent de sites d'ancrage pour des adaptateurs intracellulaires tels que Grb2, des enzymes intracellulaires telles que PLCγ, ou encore des facteurs de transcription tels que STAT3. Le couplage des récepteurs HER à ces voies de signalisation permet une grande diversité de réponses cellulaires (prolifération, survie, migration…) D'après (39).

I.3.1.1. RAS

La superfamille des protéines RAS est une famille de petites protéines à activité GTPasique. Elle est constituée de plus de 150 membres divisés en cinq familles principales : RAS, RHO, RAB, ARF et RAN (57). RAS est activée par le complexe Sos/Grb2 suite à l'activation des récepteurs HER (Figure 6). RAS existe sous deux formes, une forme active liée au GTP, et une inactive liée au GDP (Figure 7). RAS oscille donc entre ces deux états par hydrolyse du GTP en GDP. La transition entre les états Ras-GDP et Ras-GTP est catalysée par une protéine GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), et la transition inverse est catalysée par une protéine GAP (GTPase-Activating Protein). La forme Ras-GTP active la protéine RAS mais également PI3K (58).

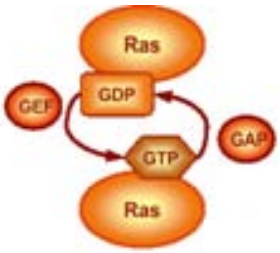


Figure 7 : La protéine RAS peut se trouver sous deux formes : une forme active, liée au GTP, et une forme inactive, liée au GDP. D'après (59).

I.3.1.2. RAF

L'activation de la protéine RAS a pour conséquence la phosphorylation de la protéine RAF, proto-oncogène appartenant à la famille des sérine/thréonine kinase (60). Les mutations des gènes codant cette protéine, et en particulier la mutation *BRAF V600E*, sont des facteurs de mauvais pronostique. L'effecteur direct de RAF est MEK, mais RAF peut également avoir une activité propre dans la progression du cycle cellulaire par interaction avec la protéine Rb (61).

I.3.1.3. MEK

MEK est également une sérine-thréonine kinase. Elle est activée par RAS mais également par diverses autres protéines telles que MEK kinase (62). Son activation conduit à une double phosphorylation de la protéine ERK au niveau d'un résidu tyrosine et d'un résidu thréonine.

I.3.1.4. ERK

La protéine ERK peut être activée par divers mécanismes indépendants de la voie des RAS/RAF/MAPK, entre autres par la voie des intégrines. A son tour, ERK peut phosphoryler plus d'une centaine de substrats différents ; son activation peut donc affecter différentes fonctions cellulaires telles que la différenciation, la survie, la motilité cellulaires. ERK peut également être transloquée au niveau nucléaire et activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (63).

I.3.2. Voie des PI3K/AKT

Plusieurs fonctions cellulaires sont régulées par la voie de signalisation des PI3K/AKT, telles que le métabolisme cellulaire glucidique *via* GLUT4 (Glucose transporter type 4) et GSK3 (Glycogene Synthase Kinase 3), lipidique, et également insulinique au niveau hépatique (64). L'activation de cette voie en pathologie cancéreuse favorise le développement tumoral et l'angiogenèse, stimule la prolifération cellulaire et réprime l'apoptose (65). Cette voie est également impliquée dans les phénomènes de diffusion métastatique (64, 66).

I.3.2.1. PI3K

Les protéines PI3K forment une famille que l'on peut diviser en trois classes selon leur structure, leurs substrats, leur distribution, leurs mécanismes d'action et leur fonction. PI3K est une protéine hétérodimérique présentant une sous-unité régulatrice, p85, et une sous-unité catalytique, p110. L'activation de divers récepteurs à tyrosine kinase tels qu'EGFR mais également PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor), FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) et IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), permet d'activer la protéine PI3K par liaison à sa sous-unité régulatrice p85. Cette liaison entraîne une

modification conformationelle de cette dernière, qui va alors catalyser la formation de PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) à partir de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5 diphosphate). PIP3 phosphoryle à son tour AKT, ce qui permet son activation. La sous-unité p85 peut également se lier avec diverses protéines intracytoplasmiques telles que la protéine kinase C ou encore RAS, permettant ainsi l'interaction entre RAS et la sous-unité catalytique p110 (64).

I.3.2.2. AKT

L'activation d'AKT est consécutive à sa liaison à PIP3, ayant pour conséquence son recrutement membranaire. AKT est impliquée dans de nombreux processus cellulaires vitaux. Elle est activée dans de nombreux types tumoraux, entre autres le cancer des ovaires (40 à 70%), du pancréas (60 à 70%), du poumon (30 à 70%) et de la thyroïde (80 à 100%) (66). AKT fonctionne comme un interrupteur biologique oscillant entre un état inactif et un état actif, au cours duquel elle déclenche des cascades protéiques permettant la transduction du signal. Chez l'humain, on dénombre trois isoformes d'AKT : AKT1, AKT2 et AKT3. Ces enzymes appartiennent à la famille des sérine thréonine kinases. AKT1, qui prédomine dans la plupart des tissus, possède 2 sites de phosphorylation : la sérine 473 et la thréonine 308. Cette double phosphorylation est nécessaire à son activation. AKT serait indirectement régulée négativement par P53. Elle est enfin activée lors de la perte de fonctionnalité des suppresseurs de tumeur PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) et p27.

I.3.2.3. GSK3β

GSK3β est une sérine thréonine kinase multifonctionnelle activée à l'état normal. Elle participe à la phosphorylation de PTEN. Elle est, tout comme mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) ou BRCA1, l'un des nombreux substrats d'AKT. Elle est impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques : métabolisme du glycogène, transcription, régulation du cytosquelette, transport vésiculaire intracellulaire, progression du cycle cellulaire.

I.3.2.4. P70S6K

P70S6K est une sérine thréonine kinase dont la cible est la protéine ribosomale S6. Elle est activée par mTOR mais peut également être activée par d'autres voies de signalisation. P70S6K existe sous 2 isoformes, α et β, dont il existe pour chacune une forme cytoplasmique ainsi qu'une forme nucléaire obtenue par épissage alternatif. La translocation nucléaire de P70S6K serait un moyen de régulation de son expression cytoplasmique.

I.3.2.5. PTEN

La protéine PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome Ten) présente une activité lipide phosphatase en N-Terminal et apparaît comme le régulateur négatif majeur de la voie des PI3K/AKT. Le gène *PTEN* localisé sur le chromosome 10q23.3, fut identifié en 1997 comme étant un gène suppresseur de tumeur. Shen et al. ont démontré le rôle de PTEN dans la stabilité du génome (67).
Les anomalies génétiques du gène *PTEN* peuvent être de nature constitutionnelle, comme dans le syndrome de Cowden, associé à un risque élevé de cancer de la thyroïde et du sein, ou plus fréquemment d'origine somatique. Les mutations somatiques de *PTEN* sont détectées à une fréquence variable selon le type de cancer. La fréquence des mutations alléliques est estimée de 50 à 80% dans les tumeurs sporadiques; c'est le gène le plus fréquemment muté après *P53*. La protéine PTEN appartient au groupe des phosphatases à double spécificité, capable de déphosphoryler des résidus sérine, thréonine et tyrosine, et peut également hydrolyser PIP3 en PIP2 ; PTEN régule donc négativement la voie des PI3K/AKT. *P53*, PPARγ, et ATF2 peuvent induire l'expression de PTEN par fixation à son promoteur, tandis que TGFβ, NFκ-B et Jun peuvent réguler négativement la transcription de *PTEN*. PTEN peut également être régulée de manière post-transcriptionnelle par phosphorylation, acétylation, oxydation ou encore par contrôle de sa localisation cellulaire (64).

Les progrès considérables dans la connaissance de ces voies de signalisation impliquées dans l'oncogenèse et le maintien du phénotype tumoral constituent une avancée majeure en oncologie. De ces connaissances sont émises des hypothèses thérapeutiques qui, après évaluation préclinique, peuvent aboutir à des progrès thérapeutiques importants et les thérapies ciblées, anticorps monoclonaux ou inhibiteurs de kinase, constituent une famille thérapeutique en plein développement. Leur développement repose sur une stratégie

d'inhibition de la transduction du signal aboutissant au contrôle de la prolifération cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN ou l'angiogenèse (Figure 8).

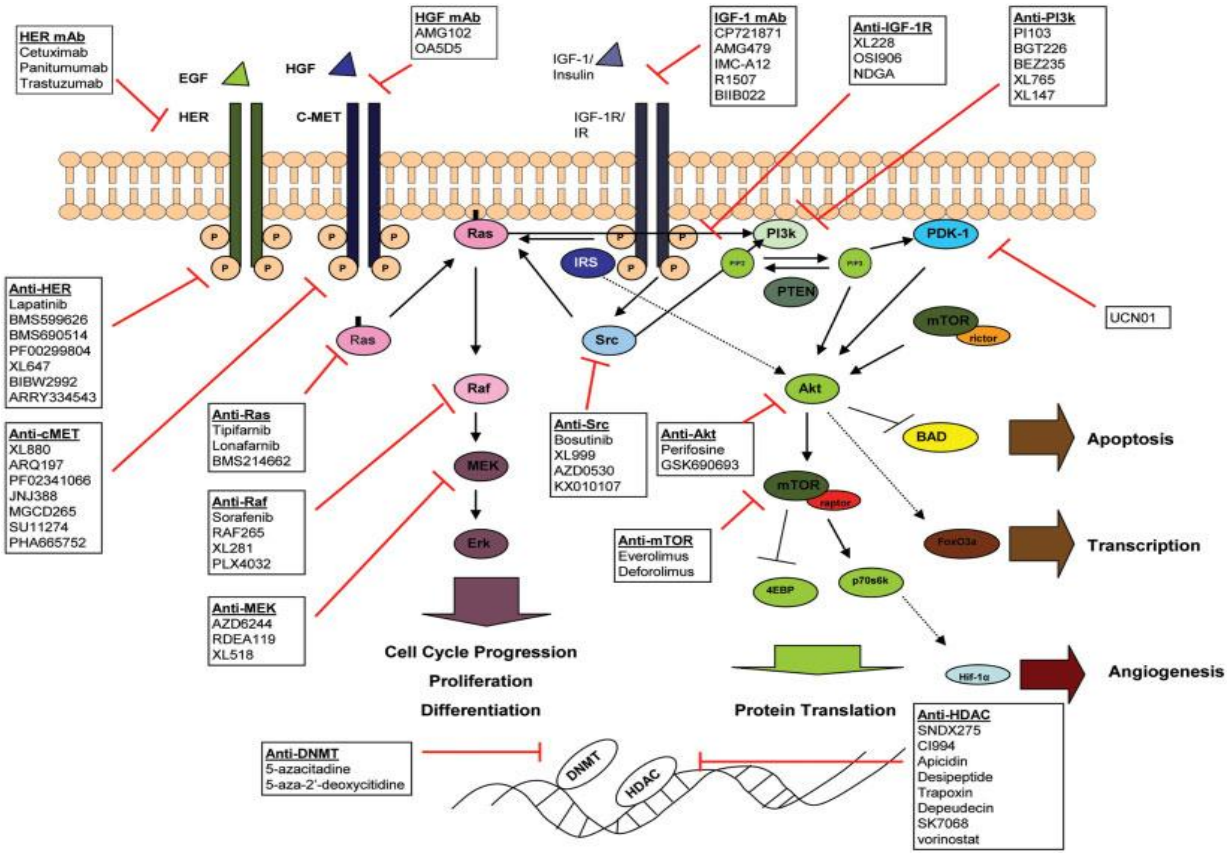


Figure 8 : Molécules commercialisées ou en cours de développement ciblant les récepteurs HER, cMET, IGF1R, diverses protéines impliquées dans la transduction du signal en aval de ces récepteurs, ainsi que les DNA méthyltransférases et les histones déacétylases. D'après (68).

L'émergence des thérapies moléculaires ciblées en cancérologie représente un changement important dans le mode de développement de molécules anticancéreuses. Les chimiothérapies anticancéreuses classiques étaient initialement sélectionnées en fonction de leur effet cytotoxique potentiel, et l'identification des mécanismes d'action étant secondaire à la mise en évidence de leur activité (69). En ce qui concerne les thérapies ciblées, les molécules sont développées en fonction de cibles thérapeutiques impliquées dans les mécanismes d'oncogenèse et le maintient du phénotype tumoral. L'utilisation de ces molécules en

cancérologie a permis une amélioration conséquente du pronostic de plusieurs pathologies cancéreuses.
Les cibles des thérapies étaient dans un premier temps essentiellement membranaires, puis les molécules ayant pour cible des protéines intracellulaires ou encore l'environnement tumoral ont également fait preuve d'efficacité.

Deux grandes classes de thérapies ciblées sont actuellement disponibles: les inhibiteurs de tyrosine kinase et les anticorps monoclonaux. Les inhibiteurs de tyrosine kinase sont des formes orales, de faible poids moléculaire à action intracellulaire et compétiteurs de l'ATP. Ils agissent au niveau du site de fixation de l'ATP, ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur. En fonction de la nature de l'inhibiteur de tyrosine kinase, cette fixation est réversible ou non. Les inhibiteurs de tyrosine kinase peuvent avoir une cible unique (erlotinib, Tarcéva®; géfitinib, Iressa®) ou plusieurs cibles (lapatinib, Tyverb®; sunitinib, Sutent®).

I.4. ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-EGFR

La découverte par Köhler et Milstein en 1975 de la technique des hybridomes a permis la sélection et la production d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre une cible unique. Malgré des essais cliniques décevants dans les années 80, plus de 20 anticorps ont depuis obtenu une approbation par la Food and Drug Administration (FDA) ainsi que l'European Medicines Agency (EMEA) dans diverses indications, et plusieurs nouvelles molécules sont en cours de développement dans le traitement des cancers.
Parmi les anticorps monoclonaux actuellement sur le marché, on compte plusieurs spécialités en cancérologie, dont 5 ciblent directement ou indirectement les récepteurs à tyrosine kinase. On compte parmi ces 5 spécialités deux anticorps anti-EGFR : cétuximab (Erbitux®) et panitumumab (Vectibix®) ; un anticorps anti-HER2 : trastuzumab (Herceptin®) et un anticorps anti-VEGF : bévacizumab (Avastin®) (Figure 9).

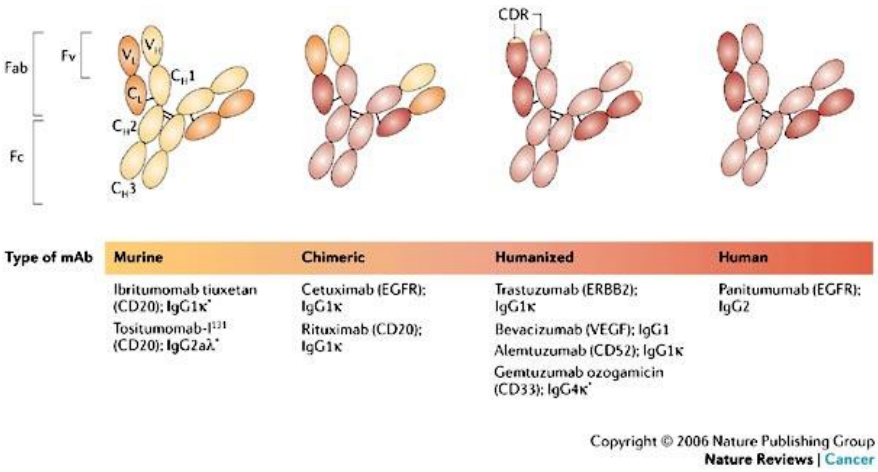


Figure 9 : Classification des anticorps monoclonaux en fonction de leur nature: murins, chimériques, humanisés ou humains. D'après (70)

I.4.1 Cétuximab

Le cétuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique de la classe des IgG1, dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF. Il dispose d'une AMM en France depuis juin 2004.

Le cétuximab est indiqué en cas de cancer épidermoïde de la tête et du cou, en association à la radiothérapie ou à une chimiothérapie à base de platine, ainsi que dans le cancer colorectal métastatique, seul ou en association à une chimiothérapie, et en l'absence de mutation du gène *KRAS*. Des résultats précliniques ont montré l'intérêt du cétuximab dans les cancers de la prostate hormono-résistants. Plusieurs études en cours devraient permettre d'évaluer son activité dans les cancers du sein triple négatifs.

L'administration du cétuximab se fait à rythme hebdomadaire. La dose de cétuximab 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 antagoniste H1 et par un corticoïde est recommandée.
Les effets secondaires notables du cétuximab sont hypomagnésémie, rash acnéiforme et choc anaphylactique. Le rash acnéiforme est la conséquence du blocage d'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 spontanément s'atténuer au cours du traitement, ou encore être prévenu par administration concomitante de doxycycline. Il apparaît chez 80% des patients et n'empêche pas la poursuite du traitement. D'autres toxicités chroniques ont été décrites : syndrome de poumon interstitiel, syndrome septique, insuffisance rénale, déshydratation, diarrhée. Ces symptômes sont cependant peu fréquents.

Le cétuximab est un antagoniste compétitif sélectif pour EGFR et ses hétérodimères. Il bloque la dimérisation du récepteur ainsi que sa phosphorylation et sa liaison avec ses ligands. Après fixation du cétuximab à l'EGFR, indépendamment de l'état de phosphorylation de ce dernier, le complexe cétuximab-EGFR est internalisé. Le cétuximab recrute également les cellules immunes effectrices cytotoxiques contre les cellules tumorales exprimant EGFR (cytotoxicité médiée par les cellules dépendantes des anticorps ou ADCC (antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity) (71). Dans modèles murins xénogreffés par des cellules humaines, on a pu également montrer une activité antiangiogénique (72, 73). L'inhibition d'EGFR a également pour conséquence une inhibition de divers médiateurs de l'angiogenèse (74) (tableau 4).

Tableau 4 : Mécanismes d'action des inhibiteurs d'EGFR. ADCC: antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity. NK: Natural Killer. D'après (75)

Mécanismes moléculaire	Mécanisme d'action
Inhibition de la liaison des ligands ou de l'affinité pour les ligands	Encombrement stérique (anticorps monoclonaux) ou variation de l'affinité (inhibiteurs de tyrosine kinase)
Inhibition de la progression dans le cycle cellulaire	Arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par augmentation de p27 et inhibition de PCNA
ADCC	Augmentation de l'ADCC par l'interleukine-2 via activation des cellules NK
Favorisation de l'entrée en apoptose	Altération de la balance Bax (porpaoptotique) / Bcl-2 (antiapoptotique) et promotion de l'apoptose
Potentialisation des effets de la radiothérapie	Entrée de la cellule tumorale dans des phases du cycle cellulaire favorisant la radio-sensibilité. Inhibition de la translocation nucléaire d'EGFR consécutive à l'irradiation.
Inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur	Inhibition de la transduction du signal en aval du récepteur

I.4.2. Panitumumab

Le panitumumab (Vectibix®) est un anticorps monoclonal entièrement humain de la classe des IgG2, dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF. Il dispose d'une AMM en France depuis 2007.

Le panitumumab est indiqué en monothérapie pour le traitement des patients atteints de cancer colorectal métastatique exprimant EGFR et en l'absence de mutation du gène *KRAS*, après échec des protocoles de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, oxaliplatine et irinotécan.

Le panitumumab est administré à la dose de 6 mg/kg une fois toutes les deux semaines. 90% des patients traités par panitumumab présentent les réactions dermatologiques classiques des inhibiteurs d'EGFR, décrites précédemment pour le cétuximab. Sont également observés des troubles pulmonaires (pneumonie interstitielle) pouvant entrainer l'arrêt du traitement, des troubles électrolytiques (hypomagnésémie et hypokaliémie), ainsi que des réactions liées à la perfusion.

Tout comme le cétuximab, le panitumumab est un antagoniste compétitif sélectif pour EGFR et bloque sa liaison avec ses ligands, sa dimérisation et sa phosphorylation. La fixation du panitumumab à l'EGFR induit l'internalisation du récepteur (tableau 4).

Actuellement, le seul marqueur prédictif de réponse aux anticorps anti-EGFR est le statut mutationnel *KRAS*, qui présente une valeur prédictive positive (VPP) élevée mais une valeur prédictive négative (VPN) insuffisante. C'est pourquoi il est nécessaire de mettre en évidence d'autres marqueurs complémentaires du statut *KRAS* afin d'améliorer la sélection des patients candidats à une thérapie par cétuximab ou panitumumab. La mise en évidence de biomarqueurs prédictifs de réponse de résistance aux anticorps anti-EGFR nécessite la compréhension des mécanismes de résistance à ces molécules.

I.5. MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-EGFR ET MARQUEURS VALIDES ET POTENTIELS

I.5.1. Généralités sur les biomarqueurs

D'après la définition du National Institute of Health (NIH), un biomarqueur se définit comme étant une caractéristique qui se mesure et s'évalue objectivement, et sert d'indicateur d'un process biologique normal, pathogénique ou de réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (76, 77). Un biomarqueur peut avoir une utilité dans le diagnostic précoce, une valeur pronostique, prédictive, ou encore permettre de monitorer la maladie. Certains auteurs ajoutent encore la notion de biomarqueurs pharmacodynamiques (2). Plusieurs paramètres peuvent servir de biomarqueurs : ADN, ARN, protéines, ou encore cellules tumorales circulantes, imagerie fonctionnelle. Un biomarqueur peut être représenté par un caractère unique ou par un groupe de caractères (signature). Certains auteurs excluent volontairement les notion de sensibilité intrinsèque du patient et excluent de la définition de biomarqueurs les paramètres cliniques tels que le rash acnéiforme dans la réponse aux anti-EGFR, ne définissant ainsi un biomarqueur que comme étant la ou les propriétés d'une tumeur associées au résultat clinique (78)

Un biomarqueur pronostique fournit des informations sur le devenir général du patient (77). Pour Van Custem et Sargent, dans le cas d'un marqueur pronostique, l'effet du traitement est bénéfique pour le groupe entier, mais la survie des patients qui expriment le marqueur est plus faible que la survie des patients qui ne l'expriment pas. Le marqueur est associé à une évolution différente entre les 2 groupes, quel que soit le traitement utilisé (Figure 10) (78, 79). Toutefois certains auteurs proposent l'utilisation des marqueurs pronostiques pour orienter une prise en charge thérapeutique (2, 80). D'autre part ces marqueurs peuvent également servir à la stratification des patients lors d'essais cliniques.

Un marqueur prédictif donne des informations sur l'effet d'une intervention thérapeutique (77) et permet de prédire la réponse à un traitement (Figure 10).
Pour Sawyers (2), idéalement, un marqueur prédictif de réponse (tout comme un marqueur pharmacodynamique) s'évalue en cours de traitement ; or en ce qui concerne les tumeurs solides (et contrairement aux tumeurs circulantes), on ne dispose que de matériel tumoral

correspondant à la biopsie diagnostique ou à la pièce opératoire (2). Cette approche implique cependant de traiter le patient avant d'obtenir un critère d'exclusion du traitement et ne devrait être utilisée qu'à défaut d'autre approche disponible.

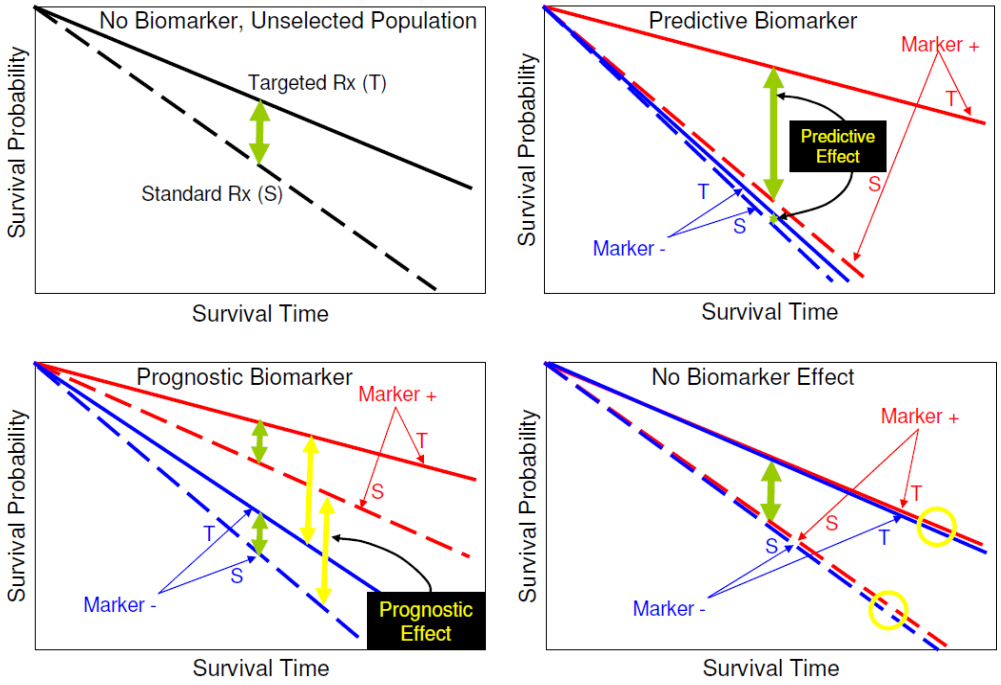


Figure 10 : Variation de la probabilité de survie en fonction du temps. A : chez des populations non sélectionnées, effet d'une molécule de référence (S) comparée à une autre molécule (T). B : cas des marqueurs prédictifs : aucun bénéfice du traitement T n'est observé par rapport au traitement de référence S dans la population de patients n'exprimant pas le marqueur M. On observe une effet du traitement T par rapport au traitement S uniquement dans le groupe de patients exprimant M. C : cas des marqueurs pronostiques : le traitement T est supérieur au traitement de référence S indépendamment de l'expression de M. En revanche dans chaque bras, la probabilité de survie est diminuée en cas d'absence d'expression de M. D : probabilités de survie en cas d'évaluation d'un marqueur M non pertinent.

Il existe d'autres types de biomarqueurs: les biomarqueurs diagnostiques, les biomarqueurs pharmacodynamiques, qui permettent d'orienter sur les choix des doses à administrer, et dont l'utilité se trouve essentiellement dans les stades précoces du développement d'une molécule, et les biomarqueurs qui se substituent aux critères d'évaluation clinique.

I.5.2. Marqueurs prédictifs de résistance aux anticorps anti-EGFR

On peut classer les modes de résistance aux thérapies anti-EGFR en deux grandes classes : résistance primaire ou intrinsèque, et résistance secondaire ou acquise.

Puisqu'EGFR est impliqué dans un large spectre de fonctions intracellulaires, les phénomènes de résistance aux anti-EGFR peuvent résulter de plusieurs anomalies moléculaires (Figure 11):

- mutations ou amplification du récepteur
- activation indépendante ou constitutive d'effecteurs intracellulaires en aval d'EGFR
- activation de voies de signalisation alternatives
- activation d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase
- production de ligands auto et paracrines
- contrôle altéré de l'angiogenèse
- micro-environnement tumoral

La résistance aux anti-EGFR peut également être la conséquence de facteurs liés à l'hôte. La compréhension de ces mécanismes de résistance permet de mettre en évidence des marqueurs potentiels de réponse aux thérapies anti-EGFR.

I.5.2.1 EGFR

Expression d'EGFR

Initialement, le cétuximab était indiqué en cas de surexpression d'EGFR. Contrairement à ce qui avait été montré dans le cas du trastuzumab dans les cancers du sein surexprimant HER2, aucun lien entre l'expression d'EGFR et la réponse aux anticorps anti-EGFR n'a été clairement mis en évidence; en effet le niveau d'expression d'EGFR ainsi que le pourcentage de cellules exprimant EGFR en immunohistochimie ne corrèlent pas avec les taux de réponse au cétuximab (41, 44, 81, 82) ni au panitumumab (83). Notamment une étude clinique a pu mettre en évidence des taux de réponse de l'ordre de 25% chez des patients atteints de cancer

des voies aérodigestives supérieures n'exprimant pas EGFR (41). Ceci se vérifie dans le cas de la réponse à l'erlotinib et au géfitinib dans le cancer du poumon (84, 85).

Plusieurs auteurs ont proposé des hypothèses suite à ces observations. En ce qui concerne l'aspect technique, il serait possible que le statut EGFR varie en fonction des kits d'immunohistochimie utilisés (17, 20). En effet les épitopes reconnus par les anticorps de

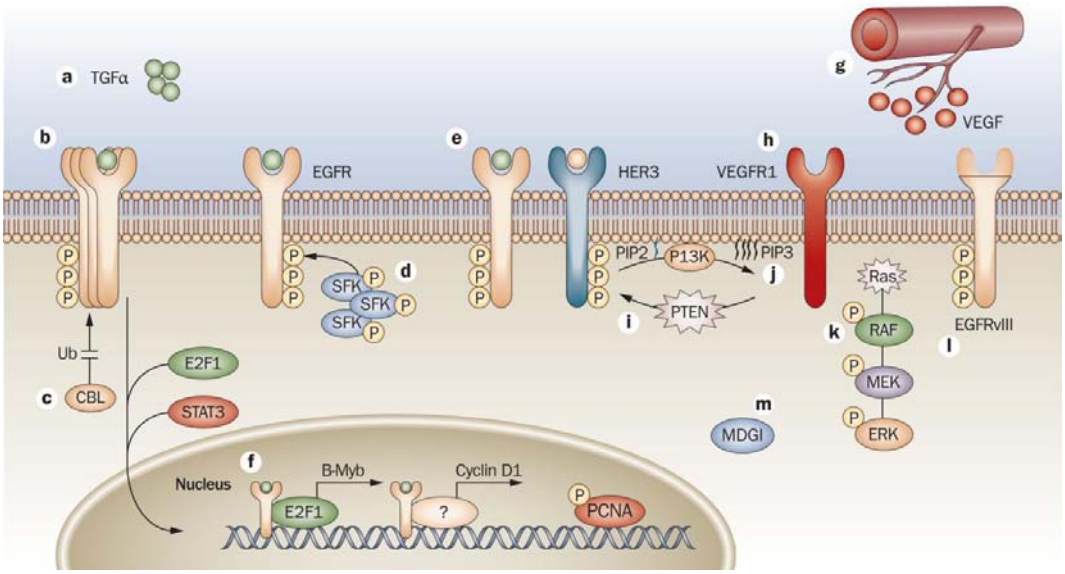


Figure 11 : Mécanismes de résistance aux anticorps anti-EGFR. a : surexpression des ligands d'EGFR (ici TGFα). b : surexpression d'EGFR : implication dans les phénomènes de résistance acquise. c : ubiqutylation. d : modulation d'EGFR par SFKs. e : formation d'hétérodimères d'EGFR avec HER2, 3 et 4. f : expression nucléaire d'EGFR. g-h : production accrue de VEGF expression de VEGFR. i-k : mutations inactivatrices (*PTEN*) ou activatrices (*KRAS*). l : EGFRvIII, forme tronquée d'EGFR, phosphorylée de manière constitutive indépendemment de la fixation d'un ligand. m : altération du trafic d'EGFR par MDGI (mammary-derived growth factor inhibitor). D'après (75).

marquage d'EGFR sont variables en fonction des kits utilisés et leur cross-validation n'a pas été réalisée avant leur commercialisation. De plus les anticorps de marquage d'EGFR marquent indifféremment les récepteurs de haute ou de basse affinité pour les ligands d'EGFR. Or une faible affinité d'EGFR pour son ligand peut être mise en relation avec une faible affinité pour le cétuximab (86). D'autre part, il existe une discordance entre l'expression d'EGFR dans la tumeur primitive et dans les métastases dans plus de 40% des cas (87).

L'expression d'EGFR reste cependant un marqueur pronostique dans les cancers colorectaux (17). D'autres paramètres tels que l'état de phosphorylation du récepteur, son amplification ou encore la présence de mutations ont été évalués dans diverses études.

Amplification d'EGFR

En fonction des études, l'augmentation du nombre de copies d'EGFR (3 à 5 fois) est observée à des fréquences comprises entre 0,6 et 31% (17). Les méthodes principales de mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies d'EGFR sont la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) et la CISH (Chromogenic In Situ Hybridization). L'augmentation du nombre de copies d'EGFR peut également être mise en évidence par PCR quantitative. Les études évaluant l'utilisation potentielle de ce paramètre comme marqueur prédictif de réponse au cétuximab ou au panitumumab sont contradictoires, mais une grande majorité des résultats mettent en évidence un lien avec les taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale des patients atteints de cancer colorectal (17, 88) (tableau 6).

Tableau 6 : Valeur prédictive de l'expression d'EGFR. PFS: survie sans progression. OS: survie globale. D'après (17).

Méthode utilisée	N	Impact clinique	Références
FISH	31	Taux de réponse	(89)
FISH	30	Taux de réponse	(90)
FISH	58	Taux de réponse, PFS, OS	(91)
FISH	27	Taux de réponse	(92)
FISH	87	Taux de réponse, OS	(93)
FISH	85	Taux de réponse, OS	(94)
FISH	32	Taux de réponse	(95)
FISH	47	Non	(96)
PCR	34	Non	(97)
PCR	80	Non	(98)

Cependant l'utilisation de ce paramètre en pratique clinique nécessite encore une standardisation des techniques d'évaluation du nombre de copies d'EGFR (88). En effet la reproductibilité de ces techniques est limitée et il n'existe pas de protocole standardisé pour l'obtention d'un score représentatif du niveau d'expression d'EGFR (88, 99).

Mutations d'EGFR

EGFRvIII ou ΔEGFR est la mutation la plus commune d'EGFR (38, 39). Cette mutation a pour conséquence l'expression d'une forme tronquée du récepteur. La partie extracellulaire absente empêche ainsi la fixation et donc l'activité des anticorps anti-EGFR (100). Cette mutation est observée dans les glioblastomes, ainsi que dans les cancers du sein et de la prostate (20). Cependant la fréquence de cette mutation dans les cancers colorectaux est très faible (<1%) (17, 20) et les conséquences en termes de résistance au cétuximab ou au panitumumab sont moindres (22, 23). En revanche la prévalence plus élevée de cette mutation dans les cancers des voies aérodigestives supérieures pourrait nécessiter une prise en charge spécifique de certains patients, et des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre EGFRvIII sont actuellement en cours de développement (100, 101).

En conclusion, les mutations d'EGFR sont rares dans les cancers colorectaux et seules les mutations des exons 19, 20 et 21 d'EGFR sont utilisées comme marqueur prédictif de réponse dans le cas des cancers bronchiques non à petites cellules traités par inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR.

I.5.2.2. Modulation de l'expression d'effecteurs intracellulaires en aval d'EGFR

Différents types d'effecteurs impliqués dans la transduction du signal en aval d'EGFR peuvent être impliqués dans la résistance aux anti-EGFR. Les voies de signalisation majoritairement impliquées dans ces phénomènes sont les voies des RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT (Figure 12).

I.5.2.2.1. Voie des RAS/RAF/MAPK

RAS

Les protéines RAS décrites précédemment sont codées par trois proto-oncogènes, HRAS, KRAS et NRAS. Certaines mutations de ces gènes ont pour conséquence l'expression d'une protéine RAS présentant des modifications conformationelles et fonctionnelles. Les mutations les plus décrites à ce jour sont les mutations du gène *KRAS*, en particulier les mutations situées dans les codons 12 et 13 de l'exon 2.

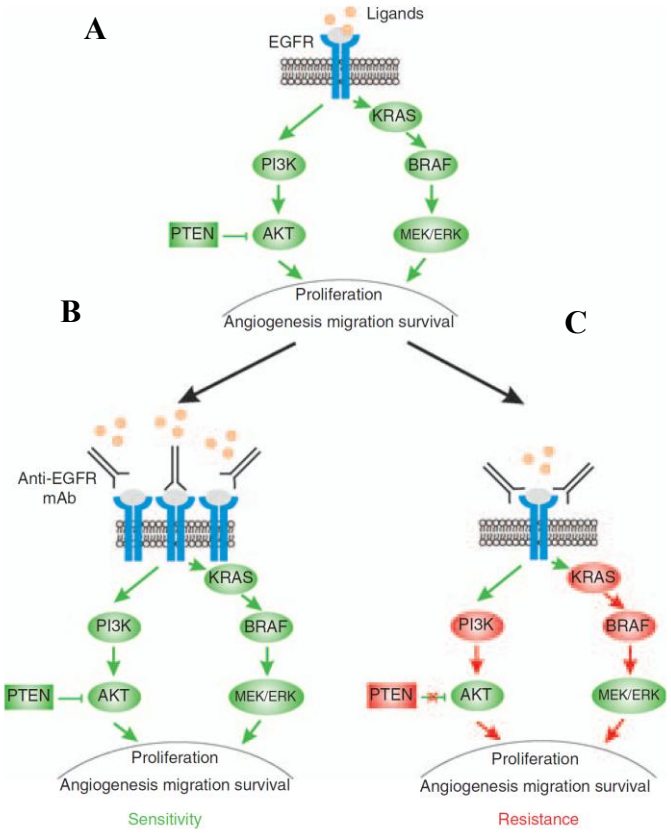


Figure 12 : A: EGFR et principales voies de transduction du signal. **B :** Fonctionnement normal d'un anticorps anti-EGFR. **C :** Résistance en cas d'altération d'effecteurs tels que RAS, RAF, PI3K (activations) ou PTEN (inactivation). D'après (102).

Ces mutations sont des mutations faux-sens ; en résulte une substitution d'une glycine par un autre acide aminé, ce qui a pour conséquence une altération de l'activité GTP-ase intrinsèque

de la protéine et son accumulation sous sa forme active, RAS-GTP, ainsi qu'une résistance aux protéines GAP (GTPase-activating proteins) (Figure 13) (103).

RAS se trouve donc sous sa forme active de manière constitutive, et ce indépendamment de l'état d'activation du récepteur, ce qui explique le rôle majeur de l'activation de cette protéine dans la résistance au cétuximab et au panitumumab dans les cancers colorectaux métastatiques.

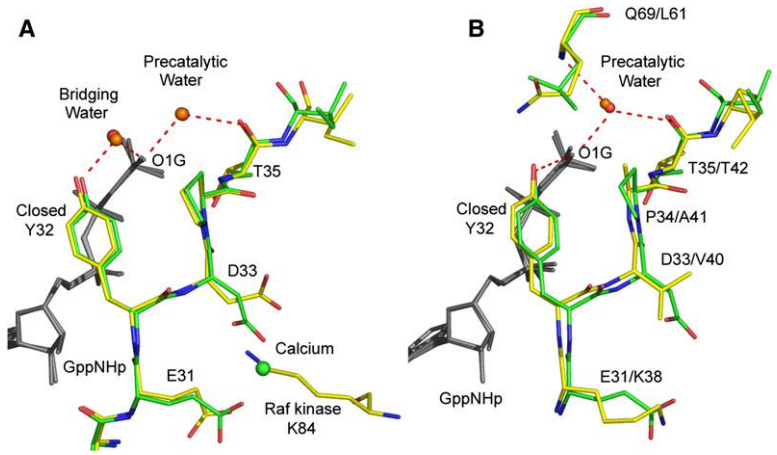


Figure 13 : Les mutations du gène *KRAS* ont pour conséquence l'expression d'une protéine RAS présentant une activité GTP-asique altérée. D'après (59).

Ces mutations, localisées sur les codons 12 et 13 de l'exon 1, ont lieu de manière précoce au cours de l'oncogenèse (104, 105) et concernent 35 à 40% des patients atteints de cancer colorectal métastatique (106). La prévalence de ces mutations est variable en fonction des types tumoraux : 90% des cancers du pancréas, 50% des cancers de la thyroïde, 15% des cancers du poumon, 6% des cancers du sein et des cancers des voies aérodigestives supérieures ; elle est également variable en fonction des types histologiques, comme par exemple dans le cas des cancers de l'ovaire dont la fréquence varie de 10% pour les carcinomes séreux à 70% pour les carcinomes mucineux (107).

L'impact de ces mutations dans la réponse clinique aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique a été mis en évidence en 2006 (90) et fut depuis confirmé par de nombreuses études (86, 92, 98, 108-114) (tableau 7). Dans ces études, les taux de réponse aux anticorps anti-EGFR évalués par les critères RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) étaient compris entre 0% et 4% parmi les patients

porteurs d'une mutation *KRAS*. La survie globale et la survie sans progression étaient également significativement diminuées parmi les patients porteurs d'une mutation de *KRAS* par rapport aux patients non porteurs d'une mutation *KRAS*.

Tableau 7 : Quelques exemples d'essais randomisés évaluant les conséquences de la présence de mutations des codons 12 et 13 du gène *KRAS* et son impact sur la réponse clinique aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique. N : Nombre de patients ; BSC : Best Supportive Care ; FOLFIRI : 5-Fluorouracile/irinotécan ; FOLFOX : 5-Fluorouracile/oxaliplatine ; M: Muté; NM: Non Muté. D'après (103).

Traitement	N	Réponse objective, % (n/N)		Survie sans progression		Survie globale		Références
		KRAS M	*KRAS* NM	*KRAS* M	*KRAS* NM	*KRAS* M	*KRAS* NM	
Panitumumab	208	0 (0/84)	17 (21/124)	7,4 semaines	12,3 semaines (P< 0,0001)	-	-	(108)
BSC	219	-	-	7,3 semaines	7,3 semaines	-	-	
Cétuximab	198	1,2 (1/81)	12,8 (15/117)	1,8 mois	3,7 mois (P < 0,001)	4,5 mois	9,5 mois (P < 0,001)	(112)
BSC	196	0 (0/83)	0 (0/113)	1,8 mois	1,9 mois	4,6 mois	4,8 mois	
Cétuximab + FOLFIRI	630	31,3 (67/214)	57,3 (181/316)	7,4 mois	9,9 mois	16,2 mois	23,5 mois	(113)
FOLFIRI	533	36,1 (66/183) (P = 0,34)	39,7 (143/360) (P < 0,0001)	7,7 mois (P = 0,26)	8,4 mois (P = 0,0012)	16,7 mois	20,0 mois (P =0,0094)	
Cétuximab + FOLFOX	159	33,8 (27/77)	57,3 (47/82)	5,5 mois	8,3 mois	13,4 mois	22,8 mois	(114)
FOLFOX	166	52,5 (31/59) (P = 0,029)	34 (33/97) (P = 0,0027)	8,6 mois (P= 0,015)	7,2 mois (P = 0,0064)	17,5 mois	18,5 mois (P= 0,38)	

L'absence de mutation *KRAS* est donc un excellent marqueur prédictif de réponse aux anticorps anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique ; sa valeur prédictive positive est proche de 100%. En revanche, sa valeur prédictive négative est faible, de l'ordre de 50% (115). C'est pourquoi d'autres marqueurs prédictifs de réponse, complémentaires du statut *KRAS* sont en cours d'évaluation.

Ces résultats ont conduit en 2008 à une modification de l'AMM du cétuximab et du panitumumab; la mise en évidence de l'absence de ces mutations est désormais requise avant toute prescription de l'une de ces deux molécules dans les cancers colorectaux métastatiques.

En ce qui concerne les patients atteints de cancer des voies aérodigestives supérieures, la recherche de ces mutations n'est pas effectuée en raison de leur faible prévalence (106).

D'autres mutations du gène *KRAS* sont également décrites au niveau du codon 61 de l'exon 3 et du codon 146 de l'exon 4 ; contrairement aux mutations décrites dans les codons 12 et 13 de l'exon 2, ces mutations n'affectent pas l'activité GTP-asique de la protéine RAS mais augmente d'un facteur 10 (codon 61) et 1000 (codon 146) les échanges GDP-GTP *in vitro* (59, 116). La prévalence de ces mutations est cependant faible et leur implication dans la résistance clinique aux anticorps anti-EGFR, bien que probable, reste à confirmer (103, 117, 118).

RAF

Tout comme RAS, la protéine RAF joue un rôle majeur dans la transduction du signal en aval d'EGFR. Il existe des mutations du gène codant la protéine RAF, notamment les mutations du gène *BRAF*. Les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* sont mutuellement exclusives (119).

La fréquence des mutations du gène *BRAF* varie en fonction des tissus (66% dans les mélanomes, 40% dans les cancers de la thyroïde, 20% dans les cancers de l'ovaire, 8% dans les cancers colorectaux) (120, 121). Le rôle de la protéine RAF dans la carcinogenèse colorectale est établi et son rôle de « driver mutation » pourrait expliquer le caractère exclusif des mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* (122).

Plus de 30 mutations somatiques du gène *BRAF* ont été décrites (106). La mutation la plus fréquente de *BRAF* est la mutation *BRAF V600E*, qui représente plus de 90% des mutations. Cette mutation correspond à la substitution d'une valine en position 600 par un acide glutamique ; elle correspond donc à l'insertion d'un acide aminé chargé négativement au niveau du site de phosphorylation de la protéine RAF, ce qui mimerait la phosphorylation de la protéine en position 598 (121). La conséquence de cette mutation est l'expression d'une protéine RAF dont l'activité kinase est multipliée par 10 (122), entraînant ainsi l'activation constitutive de RAF, indépendamment de l'état d'activation de la protéine RAS (121).

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication des mutations *BRAF V600E* dans la résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR (Figure 14) (109, 123).

En situation clinique, le rôle de la mutation *BRAF V600E* en tant que marqueur pronostique ou marqueur prédictif de réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR reste controversé. Pour Normanno et al., la mutation *BRAF V600E* serait plutôt un marqueur de mauvais pronostique indépendamment du traitement, qu'il s'agisse d'un traitement par chimiothérapie en association ou non à un anti-EGFR. De plus, les auteurs soulignent l'absence d'études prospectives randomisées avec bras témoin dédiée à classer ce marqueur comme marqueur prédictif (124).

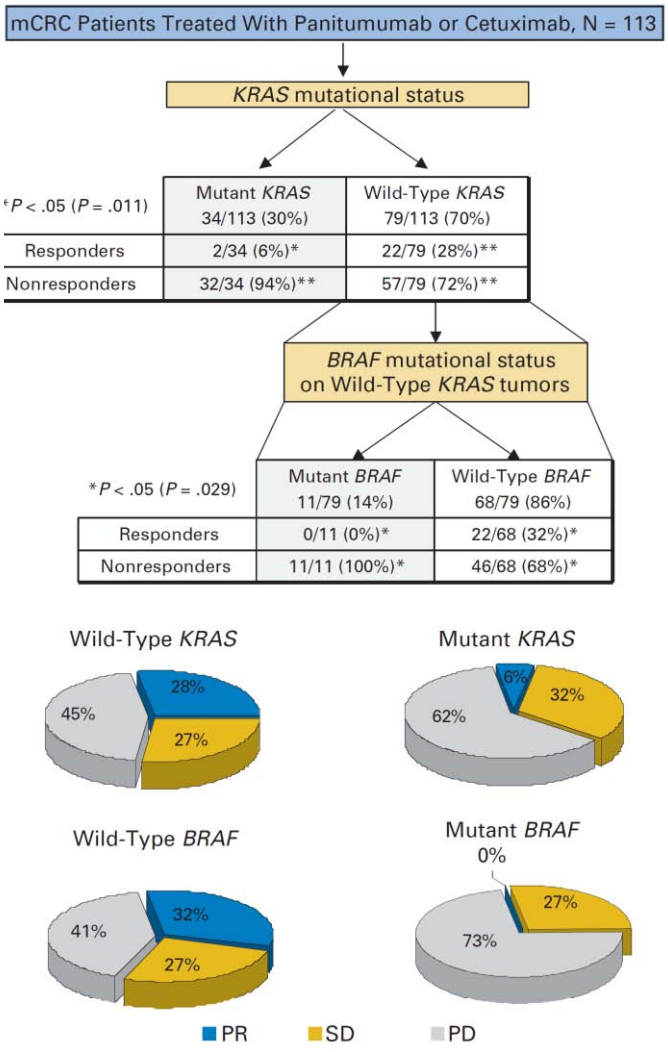


Figure 14 : Les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* sont responsables d'un défaut de réponse au traitement par anticorps monoclonaux anti-EGFR. PR : Partial Response. SD : Stable Disease. PD : Progressive Disease. D'après (123).

En revanche, les arguments de Siena et al. en faveur d'une utilisation de cette mutation comme marqueur prédictif de réponse aux anti-EGFR s'appuient sur les résultats de cinq

études cliniques rétrospectives : au cours de ces études, aucun des 38 patients atteints de cancer colorectal métastatique traité par cétuximab ou panitumumab et présentant une mutation *BRAF V600E* n'ont présenté de réponse objective au traitement par anti-EGFR (tableau 8) (125) ; de plus, la survie sans progression ainsi que la survie globale était également significativement plus faibles chez les patients porteurs d'une mutation *BRAF V600E* ; ces résultats sont confirmés par une méta analyse récente (120).

Tableau 8 : Valeur prédictive négative de la mutation *BRAF V600E*. M: muté. NM: non muté. N: nombre de patients D'après (125).

% Patients *BRAF V600E* M (N)	**% Réponse objective (n/N)**		**Références**
	BRAF V600E M	*BRAF V600E* NM	
14% (11)	32% (22/69)	0% (0/11)	(123)
4% (5)	47% (52/111)	0% (0/5)	(88)
10% (9)	17% (14/83)	0% (0/9)	(126)
15% (13)	32% (24/74)	0% (0/13)	(118)
Global			
10% (38)	**33% (112/342)**	**0% (0/38)**	

A noter qu'un biomarqueur peut être à la fois pronostique et prédictif, ce qui pourrait être le cas de la mutation *BRAF V600E* (79). De plus, la difficulté pour obtenir un niveau de preuve suffisant nécessaire à l'utilisation de ce marqueur comme marqueur prédictif de réponse est probablement lié à la faible prévalence de cette mutation dans les cancers colorectaux métastatiques.

I.5.2.2.2. Voie des PI3K/ATK

Tout comme les effecteurs intracellulaires appartenant à la voie des RAS/RAFMAPK, les éléments impliqués dans la voie de signalisation des PI3K/AKT sont également impliqués dans les mécanismes de résistance aux anticorps anti-EGFR. L'activation constitutive de cette voie de signalisation peut résulter de divers mécanismes, tels que l'amplification du gène

codant la protéine PI3K, la surexpression de divers effecteurs de cette voie de signalisation tels que AKT et P70S6K, ou encore la perte d'expression de la phosphatase PTEN.

PI3K

Le gène *PIK3CA* codant la sous-unité catalytique p110 de PI3K est muté dans 10 à 18% des cancers colorectaux. Ces mutations surviennent habituellement sur les exons 9 et 20 (127).

L'activation constitutive de PI3K peut également résulter d'une amplification du gène *PI3KCA*, en particulier dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. Ces altérations ont pour conséquence une activité accrue de la transduction du signal *via* la voie des PI3K/AKT, mais également *via* la voie des RAS/RAF/MAPK (21).

In vitro, l'association d'un inhibiteur de PI3K au géfitinib dans des lignées cellulaires résistantes au géfitinib permet de restaurer leur sensibilité (21). Ces résultats sont reproductibles dans des lignées cellulaires résistantes au cétuximab (128).

A nouveau, les études cliniques évaluant la valeur prédictive des mutations de *PIK3CA* sont contradictoires (tableau 9), bien que dans leur ensemble en faveur d'une valeur prédictive de réponse, de survie sans progression ou de survie globale chez les patients traités par cétuximab ou panitumumab.

Tableau 9 : Fréquence des mutations *PIK3CA* chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique. D'après (17).

Pourcentage de mutations	N	Impact clinique	Références
7 %	30	Non	(90)
6 %	30	Non	(89)
18 %	450	Survie globale	(129)
13,6 %	110	Survie sans progression	(130)
13 %	32	Taux de réponse	(131)

Cependant la prévalence de ces mutations est faible. Ceci pourrait expliquer pourquoi les résultats obtenus dans des populations de faible effectif sont non significatifs. De plus, les mutations de *PIK3CA* et des gènes *KRAS*, *BRAF* et *PTEN* ne sont pas mutuellement exclusives (Figure 15), ce qui rend délicate l'interprétation des résultats obtenus dans ces études. La validation éventuelle de ce paramètre pour une prise en compte dans la pratique clinique nécessitera donc une phase de validation sur de larges cohortes de patients (127). Cependant, bien que la valeur prédictive de ces mutations est probable, sa puissance devrait rester inférieure à celles des mutations *KRAS* et *BRAF* (127).

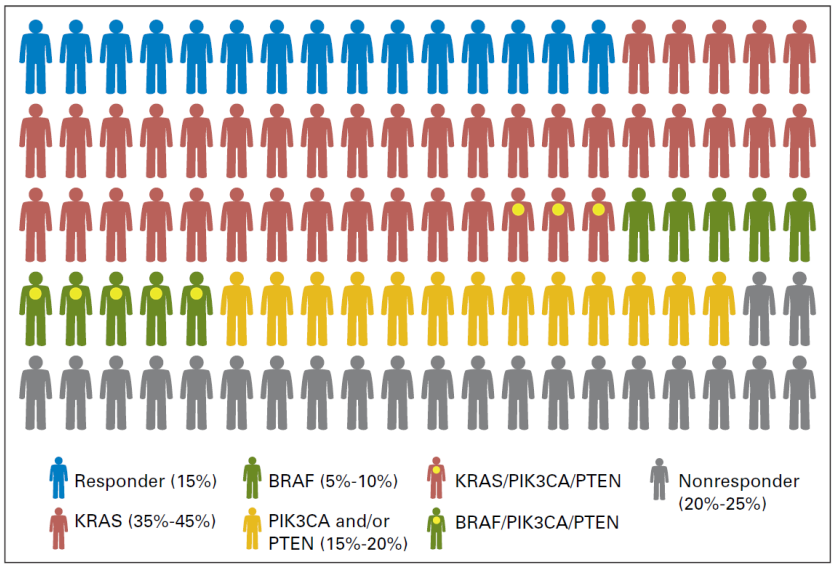


Figure 15 : Représentation graphique d'une cohorte de 100 patients atteints de cancer colorectal traités par cétuximab ou panitumumab. Fréquence d'expression des mutations *KRAS*, *BRAF V600E*, et *PIK3CA* et fréquence de la perte d'expression de la protéine PTEN. D'après (127).

PTEN

Dans la majorité des cancers humains, les altérations génétiques de *PTEN* sont somatiques. Les altérations observées sont essentiellement des mutations non-sens, des mutations faux sens et des mutations responsables d'une altération du cadre de lecture : délétions, insertions ou mutations du site d'épissage. Il existe également des réarrangements chromosomiques

ainsi que des amplifications géniques. *PTEN* peut également être inactivé par des modulations épigénétiques (127).
PTEN est muté dans divers types de cancers dont les cancers de prostate (132-134), les mélanomes (135, 136) et les lymphomes (137). Dans le cas des cancers du sein, les mutations somatiques sont associées à la progression de la tumeur et non à son initiation (138). Des anomalies structurales de la protéine PTEN sont présentes dans 37% des tumeurs primaires de cancers colorectaux (139).
L'implication de PTEN dans la réponse à diverses thérapies ciblées anti-HER a été largement décrite *in vitro*. Plusieurs études réalisées sur des modèles cellulaires délétés pour *PTEN* résistants au cétuximab au panitumumab, ou encore au trastuzumab mettent en évidence une restauration de la sensibilité de ces lignées par transfection de *PTEN*. De même, d'autres études ont mis en évidence une variation de la sensibilité de différentes lignées de cancer du poumon au géfitinib en fonction de la présence ou de la perte d'expression de PTEN (21).

La transposition de ces résultats en pratique clinique reste difficile. Lors d'une étude réalisée chez 27 patients atteints de cancer colorectal métastatique traités par cétuximab, parmi les 11 patients présentant une perte d'expression de PTEN, aucun bénéfice du traitement par cétuximab n'était mis en évidence (92).

Une autre étude a été réalisée chez 173 patients atteints de cancer colorectal métastatique et traités par cétuximab ou panitumumab (88). Dans cette étude, parmi les 116 patients non porteurs de mutation *KRAS*, l'étude de l'expression de PTEN en immunohistochimie mettait en évidence une différence de survie globale entre les patients exprimant PTEN et les patients présentant une perte de l'expression de PTEN, mais aucun lien avec la survie sans progression et les taux de réponse n'était mis en évidence.

Une étude plus récente a été réalisée chez 112 patients atteints de cancer colorectal métastatique traités par cétuximab. L'étude de l'expression de PTEN en immunohistochimie n'a pas mis en évidence de différence significative en termes de survie sans progression ou de survie globale entre les patients dont la tumeur exprimait normalement ou faiblement PTEN (140).

Comme dans le cas des études évaluant la valeur prédictive de l'expression d'EGFR, se posent ici des limites techniques. Là encore les anticorps de marquage de PTEN utilisés sont

variables d'une étude à l'autre, et l'attribution d'un score représentatif de l'intensité de marquage dépend, selon les études, du marquage cytoplasmique et/ou nucléaire, et d'un pourcentage variable de cellules marquées. Ces limitations techniques pourraient être à l'origine de ces discordances entre les différentes études cliniques. Ces discordances se retrouvent également dans les études sur la valeur prédictive de PTEN dans la réponse aux anti-HER2 dans les cancers du sein (17, 140-142).

I.5.2.3. Activation de récepteurs et voies de signalisation alternatifs

Plusieurs études ont démontré que le blocage d'EGFR peut entraîner une activation des mêmes fonctions cellulaires par d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que IGF1R, VEGFR, PDGFR ou encore c-MET activant ainsi des voies de signalisation redondantes (143-145).

Tout comme EGFR, IGF1R est responsable de l'activation des voies des PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK. IGF1R est surexprimé dans de nombreux cancers. Son implication dans la résistance au cétuximab et aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR a été démontrée dans diverses lignées cellulaires *in vitro*. Dans plusieurs études cliniques réalisées chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique, la surexpression d'IGF1R ou la présence de polymorphisme a pu être mis en relation avec une augmentation des taux de réponse au cétuximab, ainsi qu'une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale (144, 145). Actuellement, le ciblage simultané d'IGF1R et EGFR semble être une approche thérapeutique intéressante (146).

I.5.2.4. Autres marqueurs

P53

Les mutations du gène suppresseur de tumeurs *P53* pourraient également être prédictives de la sensibilité au cétuximab. Les mutations de *P53* comptent parmi les plus fréquentes dans la plupart des types tumoraux. Dans une étude récente, la présence de mutations de *P53* était significativement associée à des taux de réponse plus élevés au cétuximab chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique (147).

Amphirégulines et épirégulines

L'affinité de l'épiréguline pour EGFR et HER4 est plus faible que celle de l'EGF. En revanche, contrairement à l'EGF, sa fixation entraîne un état d'activation prolongé du récepteur. Une élévation des niveaux d'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline pourrait jouer un rôle important dans la croissance et la survie tumorales par stimulation autocrine d'EGFR (98). Plusieurs études réalisées chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique suggèrent un lien entre des niveaux d'expression de l'épiréguline et de l'amphiréguline élevés et l'absence de réponse clinique au cétuximab. Les résultats sont similaires en termes de survie sans progression et de survie globale (98, 148).

Il existe également des paramètres non dépendant des caractéristiques tumorales, dépendantes des caractéristiques propres au patient, et qui représentent des candidats potentiels comme marqueurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR.

ADCC et polymorphisme des gènes *FcγRIIa* et *FcγRIIIa*

Les récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines sont des récepteurs de surface pour les IgG situés sur les cellules immunes effectrices (natural killers et macrophages). Ces récepteurs joueraient un rôle dans l'ADCC, qui ferait partie des mécanismes d'action secondaires des anticorps monoclonaux de type IgG1, tels que le cétuximab et le trastuzumab (149). Bien que le panitumumab soit une IgG2, ce phénomène d'ADCC a été décrit récemment dans les cancers des voies aérodigestives supérieures, à des concentrations analogues à des doses thérapeutiques (150). Le polymorphisme des gènes codant ces récepteurs, *FcγRIIa* et *FcγRIIIa*, peut faire varier l'affinité des récepteurs pour les IgG. Ainsi, il a été démontré que les génotypes FcγRIIa-131HH et FcγRIIIa-158VV pouvaient avoir un impact sur la survie sans progression chez des patients traités par cétuximab atteints de cancer colorectal métastatique (71). Ces résultats ont été confirmés dans une étude récente (151).

Angiogenèse

Dans les cellules tumorales, EGFR contrôle partiellement la production de certains facteurs pro-angiogéniques, dont la production de VEGF. L'inhibition d'EGFR a pour conséquence une inhibition de l'angiogenèse médiée par le VEGF ainsi que de nombreux médiateurs de l'angiogenèse (21). L'induction de résistance à des anticorps monoclonaux, dont le cétuximab, ou encore à des inhibiteurs de tyrosine kinase, par injections itératives à des souris xénogreffées a permis de mettre en évidence une augmentation des niveaux d'expression du VEGF associée à une augmentation de l'angiogenèse (74, 152), sans modification majeure des niveaux d'expression d'autres protéines telles que EGFR, p53, MDM2 et AKT. Cette augmentation des niveaux d'expression de VEGF pourrait être responsable d'une résistance au cétuximab chez l'homme (153).

Rash acnéiforme

Le rash acnéiforme est un effet indésirable commun à toutes les thérapies ciblées anti-EGFR. Ces éruptions acnéiformes atteignent régions séborrhéiques de manière dose- et individu-dépendante, et surviennent chez plus de 90% des patients dans le cas du cétuximab et du panitumumab. Cet effet résulte du blocage d'EGFR au niveau des kératinocytes, des cellules épithéliales des glandes sébacées et des follicules pileux. Plusieurs études ont démontré que ce paramètre est un facteur de réponse aux anti-EGFR chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique (Figure 16) (44, 81, 153-155). Cependant, l'apparition de toxicité cutanée de grades 3 et 4 est observée dans moins de 5% des cas. L'étude Everest évaluait l'efficacité du cétuximab en escalade de dose jusqu'à apparition d'une toxicité cutanée et suggérait également une relation effet-dose du cetuximab. En effet, dans le bras escalade de dose, la réponse tumorale était supérieure au bras témoin (30 versus 13 %) ainsi que la survie sans progression (4,8 versus 3,9 mois) (156). Cependant, la sensibilité et la spécificité de ce paramètre ne sembleraient pas suffisantes pour l'utiliser en pratique clinique (154). De plus, la proportion de patients présentant une toxicité cutanée de grade 3 ou 4 est faible. Un dernier inconvénient de ce marqueur est le fait qu'il n'est évaluable qu'*a posteriori*.

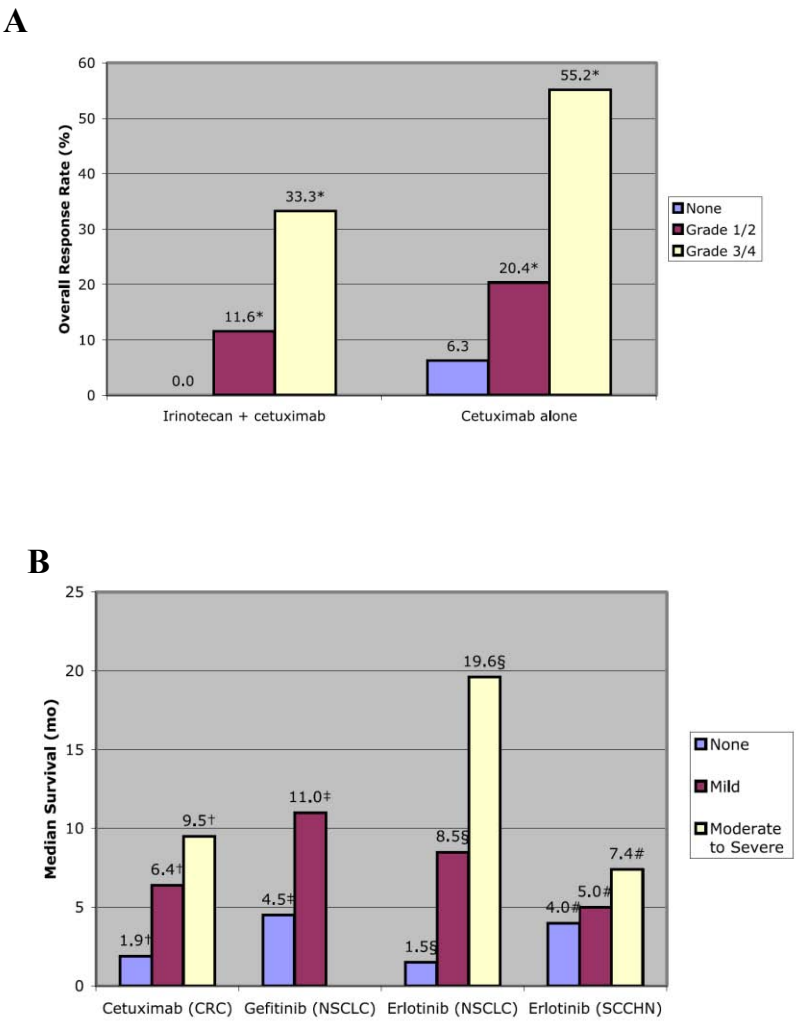


Figure 16 : Taux de réponse **(A)** et survie globale **(B)** en fonction de la toxicité cutanée des anti-EGFR. D'après (157).

La recherche sur les biomarqueurs est en plein essor. Cependant, si le nombre de publications sur ce sujet est en constante augmentation, le nombre de biomarqueurs validés par la FDA chaque année diminue (158). En effet la méthodologie de mise en évidence puis de validation d'un biomarqueur est délicate et nécessite une approche particulière et le design d'essais cliniques spécifiques et adaptés (78, 159-161).

Les techniques en -omics, c'est-à-dire l'étude du génome, du transcriptome ainsi que du protéome, sont en pleine révolution technologique, ceci permettant leur mise à disposition en

pratique clinique (qualitativement parlant mais également en terme de coût). Les applications potentielles pour la recherche de biomarqueurs sont nombreuses.
La génomique est considérée comme l'approche la plus fiable et présente des qualités de robustesse, de sensibilité et de spécificité difficilement égalables. Ces approches ont démontré leur intérêt manifeste.

Cependant, si au cours de l'oncogenèse l'acquisition des caractéristiques des cellules tumorales résulte de l'accumulation de nombreuses altérations génétiques (activation de proto-oncogènes ou inactivation de suppresseurs de tumeurs et des mécanismes de réparation de l'ADN), un inventaire précis de l'état des mutations à un instant donné ne peut rendre compte de la complexité de la cellule tumorale, et ceci pour deux raisons essentielles. D'une part de nombreuses altérations génétiques résultent de l'instabilité du génome et font partie des caractéristiques de la cellule tumorale, mais n'influencent en rien le phénotype tumoral. D'autre part il est nécessaire de considérer les modulations épigénétiques et les différents facteurs responsables des variations d'expression des ARNm ; de même l'expression des ARNm ne corrèle pas nécessairement au niveau d'expression des protéines, ni aux modifications post traductionnelles telles que la phosphorylation (158, 162). L'approche que nous allons proposer tente de tenir compte de ce constat. Nous verrons cependant que les approches de protéomique présentent de nombreuses limites techniques.

OBJECTIF DU TRAVAIL

L'étude des récepteurs HER (Human Epidermal growth factor Receptor) a conduit à une meilleure compréhension des mécanismes inhérents à la carcinogénèse ainsi qu'au développement des thérapeutiques ciblées. L'émergence de ces thérapies ciblées représente un progrès important en cancérologie. Leur efficacité, leur faible toxicité, en font des médicaments de choix dans la prise en charge de nombreuses pathologies cancéreuses.

L'efficacité des thérapies ciblées est limitée à des populations restreintes pour lesquelles les critères prédictifs de réponse à ces traitements restent à préciser ou à définir selon les cas. A terme, les décisions thérapeutiques seront prises à l'aide des profils moléculaires tumoraux, complémentaires des caractéristiques cliniques et anatomopathologiques. Cette approche devrait permettre aux cliniciens de personnaliser les traitements et donc de dispenser des traitements *a priori* plus efficaces et moins toxiques.

La fonctionnalité de la signalisation en aval des récepteurs HER est impliquée dans les phénomènes de résistance aux thérapies ciblées anti-HER. Le but de ce travail est dans un premier temps d'évaluer les conséquences d'anomalies de signalisation en aval des récepteurs HER sur la réponse cellulaire aux anti-EGFR. Ce travail sur modèle cellulaire est destiné à évaluer l'impact de perturbations de la fonctionnalité des voies de signalisation (voie des RAS/RAF/MAPK et voie des PI3K/AKT) en aval des récepteurs HER et leur implication dans la réponse cellulaire au cétuximab.

Une seconde partie de ce travail est destinée à l'évaluation technique de méthodes de génotypage et de méthodes d'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs HER. Dans un premier temps, nous comparons trois techniques de génotypage *KRAS* utilisées en pratique clinique (PCR TaqMan, HRM et PCR RFLP).

Puis, sur la base d'essais réalisés en BioPlex®, les niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation de la voie des RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT sont évalués puis comparés à une technique de référence. La qualité intrinsèque de la méthode est également évaluée conformément aux recommandations de la FDA. Cette étape, réalisée sur lignées

cellulaires et sur échantillons de tumeurs, est un pré requis nécessaire à la transposition clinique de ces résultats.

Enfin la dernière partie de ce travail porte sur la transposition clinique de ces résultats. Les niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation appartenant à la voie des RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT sont évalués par BioPlex® sur des échantillons tumoraux de patients atteints de cancer colorectal métastatique et traités par cétuximab ou panitumumab. Nous verrons que cette étape nécessite une approche multidimensionnelle pour l'évaluation globale de la fonctionnalité de la signalisation en aval des récepteurs HER.

CHAPITRE II

Influence de la fonctionnalité de PTEN et de P53 sur la réponse cellulaire au cétuximab

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

Cancer Gene Ther. 2009 Jun;16(6):498-507

Résumé

Introduction :

Le cétuximab (Erbitux®) est un anticorps monoclonal chimérique de la classe des IgG, dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF. Les données bibliographiques suggèrent que son mécanisme d'action est fortement lié à la fonctionnalité des voies de signalisation de PI3K/AKT et des MAPK. Notre projet a pour but d'évaluer l'influence de la fonctionnalité des protéines PTEN et P53 sur la survie cellulaire et sur l'activité du cétuximab. Les essais ont été réalisés *in vitro* sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome prostatique humain (PC3) porteuse de mutations des gènes *PTEN* et *P53*.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact de la restauration de l'expression des protéines PTEN et P53 par transfert de gène sur la réponse cellulaire au cétuximab (signalisation, cytotoxicité, apoptose).

Matériels et méthodes :

Les gènes *PTEN* et *P53* sont transfectés par un vecteur non viral, le polyéthylèneimine. Le potentiel cytotoxique du cétuximab, seul ou combiné au transfert de gène, est évalué par essai de cytotoxicité au MTT. L'induction d'apoptose est ensuite détectée par évaluation de la fragmentation de l'ADN et de l'expression de la caspase-3 active, ainsi que par l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. Les variations de fonctionnalité des voies de signalisation ont été évaluées par la mesure de l'expression des phospho-protéines de signalisation, parallèlement par Western blot et par Bioplex® phosphoprotein array.

Résultats :

La transfection des gènes suppresseurs de tumeur *PTEN* et *P53* produit des quantités suffisantes de protéines PTEN et P53 pour restaurer l'inhibition de croissance et l'induction d'apoptose dans la lignée PC3 de cancer de la prostate exposée au cétuximab. Le co-transfert de *PTEN* et *P53* est synergique en terme d'inhibition de croissance et d'induction d'apoptose. La restauration de PTEN et de P53 associée au cétuximab diminue significativement l'expression de pAKT et pERK1/2 et de ce fait potentialise l'inhibition de croissance et l'induction d'apoptose.

Conclusion :

Ces données mettent en évidence l'intérêt de la détermination des niveaux d'expression des phospho-protéines de signalisation pour évaluer la fonctionnalité des voies de signalisation dans la réponse au cétuximab. Ces résultats suggèrent que la fonctionnalité des voies de signalisation en aval de l'EGFR pourrait être proposée comme marqueur prédictif de la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR.

Cancer Gene Therapy (2009) 16, 498–507
© 2009 Nature Publishing Group All rights reserved 0929-1903/09 $32.00
www.nature.com/cgt

ORIGINAL ARTICLE

P53 and PTEN expression contribute to the inhibition of EGFR downstream signaling pathway by cetuximab

S Bouali[1], A-S Chrétien[1], C Ramacci[1], M Rouyer[1], S Marchal[2], T Galenne[3], P Juin[3], P Becuwe[4] and J-L Merlin[1]

[1]*Centre Alexis Vautrin, Unité de Biologie des Tumeurs, EA "Predicther" Nancy Université, Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France;* [2]*Centre Alexis Vautrin, CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France;* [3]*INSERM U601, CHU de Nantes, Institut de Biologie, Nantes, France and* [4]*Laboratoire de Biologie Cellulaire, Faculté des Sciences, EA "Predicther" Nancy Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France*

Cetuximab (Erbitux) is an anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody whose activity is related to the inhibition of EGFR downstream signaling pathways. P53 and phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) have been reported to control the functionality of PI3K/AKT signaling. In this study we evaluated whether reintroducing 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 and pten gene transfer additionally mediated cell growth inhibition and apoptosis induction by restoral of signaling functionality, which enabled the control of PI3K/AKT and MAPKinase 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.
Cancer Gene Therapy (2009) **16,** 498–507; doi:10.1038/cgt.2008.100; published online 23 January 2009

Keywords: EGF receptor inhibitors; cetuximab; P53; PTEN; gene transfer

Introduction

The high frequency of overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in various cancers[1] and its major function 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, which 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 homologue deleted on chromosome 10 (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 reintroduction has been shown to significantly produce greater apoptosis and tumor growth suppression than any other drug alone.[9] 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.[10] 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 relate to p53 mutation.[11] In addition, recent study showed that

Correspondence: Professor J-L Merlin, Unité de Biologie des Tumeurs, EA3452 Nancy Université, Centre Alexis Vautrin, 6 Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France. E-mail: jl.merlin@nancy.fnclcc.fr
Received 8 April 2008; revised 25 October 2008; accepted 26 November 2008; published online 23 January 2009

induction of P53 resulted in decreased in phosphorylated AKT activity in cell line, which 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.[12] It was reported that activation of p53-dependent downstream targets BAX with concomitant increase of MAPKinase (MAPK) pathways leading to apoptosis.[13] 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[14] and alteration of pten gene has been shown to promote prostate cancer progression.[15] PTEN antagonizes the action of PI3K and negatively controls the downstream pathway by inhibiting the phosphorylation of AKT.[16] Consequently, the loss of PTEN expression leads to an elevated activation of AKT.[17] A recent study investigating protein expression demonstrated that PTEN has a fundamental function in predicting the response to cetuximab against EGFR in metastatic colorectal cancer.[18] A previous study showed that loss of PTEN expression was associated with resistance to gefitinib, and that reintroduction of PTEN restored cell sensitivity of gefitinib, thus suggesting that signaling pathway may have a central function in the development of resistance to EGFR inhibitors.[19] 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% CO_2 in RPMI 1640, supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (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).

Gene transfer was performed as already published[20] with slight modifications. Briefly, the cells were seeded at the density of $5 \times 10^4\,ml^{-1}$ in six-well plates 48 h before transfection to reach 60–70% confluence at the time of transfection. pCMV-Luc or pNCNeo or pPTEN plasmids ($5\,\mu g\,ml^{-1}$) and corresponding amount of PEI were separately prepared and the resulting mixture was added to the cells. Twenty-four hours after transfection cells were submitted to $100\,\mu g\,ml^{-1}$ cetuximab (Merck Lipha Sante, Lyon, France) and analyzed for cytotoxicity and apoptotic induction. Pten and p53 co-transfer was achieved using $2.5\,\mu g\,ml^{-1}$ of each plasmid.

mRNA expression analysis

Pten-mRNA and p53-mRNA expression was analyzed using semiquantitative RT-PCR with β2-microglobulin (β2M1) as reference housekeeping gene as already reported.[20,21]

Western blot

Cells were exposed to epidermal growth factor (EGF, $100\,ng\,ml^{-1}$) 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, phosphorylated-AKT (pAKT), GSK3β, pGSK3β, P70S6K, pP70S6K, ERK1/2, pERK1/2, BAX and tubulin[22] (Table 1). Antibodies were used between

Table 1 List of primary antibodies

Proteins	*MW (kDa)*	*Antibody*	*Source*	*Supplier*	*Dilution*
EGFR	175	EGFR	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
pEGFR	175	Phospho-EGFR (Tyr^{1068})	Mouse	Cell Signaling	1:1000
PTEN	54	PTEN	Mouse	Santa Cruz	1:500
pPTEN	54	Phospho-PTEN (Ser^{473})	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
P53	53	P53	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
AKT	60	AKT	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
pAKT	60	Phospho-AKT (Ser^{473})	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
GSK3β	46	GSK	Rabbit	Cell Signaling	1:3000
pGSK3β	46	Phospho-GSK3β ($Ser^{21/9}$)	Rabbit	Cell Signaling	1:2000
P70S6K	71	P70S6K	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
pP70S6K	71	Phospho-P70S6K(Thr^{389})	Rabbit	Cell Signaling	1:1000
ERK1/2	42	ERK	Rabbit	Cell Signaling	1:2000
pERK1/2	42	Phospho-ERK (Thr^{202}/Tyr^{204})	Mouse	Cell Signaling	1:1000
BAX	20	BAX	Rabbit	Dako	1:1000
Tubuline	27	Tubuline	Rabbit	Santa Cruz	1:500

1:500 and 1:3000 dilution range and were provided by Cell Signaling, except PTEN, tubulin (Santa Cruz, Tebu-Bio, Le Perray, France) and BAX (Dako, Trappes, France). Quantification of relative band densities was performed using standard densitometry scanning techniques (Rasband, WS, ImageJ, US National Institute of Health, Bethesda, MD).

Immunocytochemistry
PC3 cells were immunocytochemically analyzed for total EGFR, PTEN and P53. After a 5-min cytospin at 1000 r.p.m. (Shandon Cytospin 4; Thermo Electron Corporation, Courtaboeuf, France), the slides (ThinPrep) were fixed 10 min in 96% ethanol. Immunocytochemistry was then performed after digestion in 10 mmol l^{-1} citrate buffer (pH 6), 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). Cells were then stained with biotinylated immunoglobulin secondary antibody according to the manufacturer's recommendations, revealed using LSAB kit (Dako). 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 (100 ng ml^{-1}) 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 25 µl 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 controls 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-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Briefly, the cells were seeded in 24-well dishes and allowed to grow for 48 h before being transfected with pten/PEI or p53/PEI complexes. Cells were then treated with cetuximab for 24 h. All incubations were terminated by adding 250 µl of MTT in each well. The reaction was allowed to proceed for 3 h at 37 °C. The formazan crystals were dissolved by adding 250 µl 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 (FACSCalibur; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) using propidium iodide labeling. Evidence of apoptotic cells was determined by the induction of DNA fragmentation (sub-G_1 peak). Briefly, cetuximab-treated cells were trypsinized, washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 70% ethanol for 30 min at 4 °C and suspended in PBS containing propidium iodide (1 mg ml^{-1}) and RNase A (20 mg ml^{-1}). Fixed cells were subjected to flow cytometry.

Active caspase-3 expression
Cells were washed with cold PBS and fixed in Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson). Then, cells were incubated with phycoerythrin-conjugated anti-active caspase-3 antibodies (PharMingen–Becton Dickinson) 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 analysis of variance with Dunnett's test or Kruskal–Wallis with Mann–Whitney test according to data distribution. $P \leqslant 0.05$ was regarded as statistically significant.

Results

EGFR, PTEN and P53 expression
The immunocytochemistry analysis of PC3 cells (Figure 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.

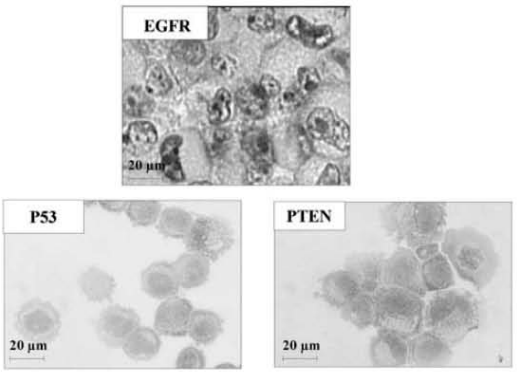


Figure 1 Epidermal growth factor receptor (EGFR), PTEN and P53 expression analysis using immunocytochemistry in PC3 prostate cancer cells.

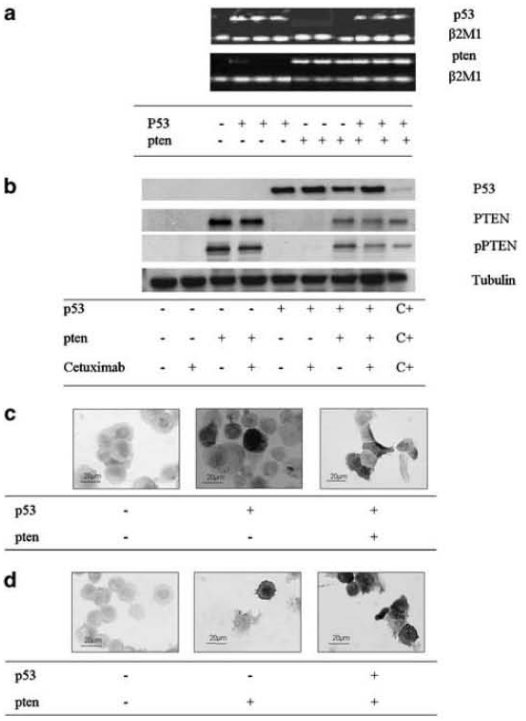


Figure 2 Analysis of gene transfer efficiency by reverse transcription (RT)–PCR, western blotting and immunocytochemistry. (**a**) Semiquantitative RT-PCR p53- or/and pten-mRNA expression analysis. β2-Microglobulin (β2M1) was used as housekeeping gene. (**b**) Western blotting P53, PTEN, pPTEN, protein expression analysis, β-tubulin was used as loading control. (**c**) P53 protein expression analysis using immunocytochemistry. (**d**) PTEN protein expression analysis using immunocytochemistry.

Gene transfer efficiency

Neither expression of p53- and pten-mRNA (Figure 2a), nor P53 and PTEN proteins (Figure 2b–d) was detected in PC3 cells. In transfected cells, the expression of p53- and pten-mRNA was restored (Figure 2a) and associated with P53 and PTEN protein expression as evidenced by western blots (Figure 2b) and immunocytochemistry (Figure 2c and d). Co-transfer of p53 and pten using 50:50 plasmid mixture induced intermediate expression of both p53- and pten-mRNA (Figure 2a) and P53 and PTEN proteins (Figure 2b–d).

Signaling

Untransfected control PC3 cells were found to constitutively overexpress pAKT in relation with pten-null phenotype (Figure 3a). Consequently, overexpression of downstream signaling phosphoproteins (pGSK3β and pP70S6K) was evidenced (Figure 3a). Overexpression of phosphorylated-ERK1/2 (pERK1/2) was also observed (Figure 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 ($P<0.001$). Therefore, all following considerations were calculated from Bio-Plex phosphoprotein array analyses.

Exposure of the untransfected cells to cetuximab led to a significant ($P<0.001$) major (98%) decrease in pEGFR expression (Figure 3a). Although it did not induce any significant ($P>0.05$) decrease of pAKT and pGSK3β expression, pP70S6K expression was significantly ($P<0.05$) reduced by 33%. pERK1/2 expression was also significantly ($P<0.01$) reduced by 54% (Figure 3a).

In p53-transfected cells (Figure 3a), inhibition of AKT signaling was observed with significant ($P<0.05$) reduction of pAKT expression by 40%, pGSK3β by 72% and pP70S6K by 35%. In addition, significant ($P<0.01$) decrease in pERK1/2 by 53% was observed. Exposure of p53-transfected cells to cetuximab further decreased the expression of all phosphoproteins.

In pten-transfected cells (Figure 3b), unexposed to cetuximab, no inhibition of pEGFR expression was observed, whereas inhibition of AKT signaling was found to be restored with significant ($P<0.01$) reduction of pAKT expression by 63%, pGSK3β by 38% and pP70S6K by 45% (Figure 3). In addition, significant ($P<0.01$) decrease in pERK1/2 by 27% was observed. Exposure of pten-transfected cells to cetuximab led to near-complete abrogation of pEGFR expression (95%) and further significantly ($P<0.05$) decreased the expression of all phosphoproteins.

In pten/p53-cotransfected cells (Figure 3c), similar results, that is, near-complete abrogation of pEGFR expression as well as AKT and ERK1/2 signaling inhibition, were achieved consistently with the data obtained in pten- or p53-transfected cells. Considering all experimental data achieved in PC3 cells using Bio-Plex phosphoprotein array, statistically significant correlations were found between pAKT expression and pGSK3β and pP70S6K expression ($r=0.816$, $P<0.05$ and $r=0.859$, $P<0.01$, respectively) (Figure 4). No correlation was found between pAKT and pERK1/2 expression ($P>0.05$) (data not shown). Because the results observed with the co-transfer of pten and p53 genes were achieved with a 50:50 mixture of the plasmids and provided the same extent of inhibition of signaling, the combined effect was considered at least as additive.

In all experimental conditions, data achieved from immunocytochemistry (for EGFR only, data not shown) and numerized of western blots analyses revealed that no significant reduction of total protein expression was observed.

Growth inhibition and apoptosis induction

Negative controls, consisting in untransfected cells and cells transfected with irrelevant plasmid (pCMV-Luc),

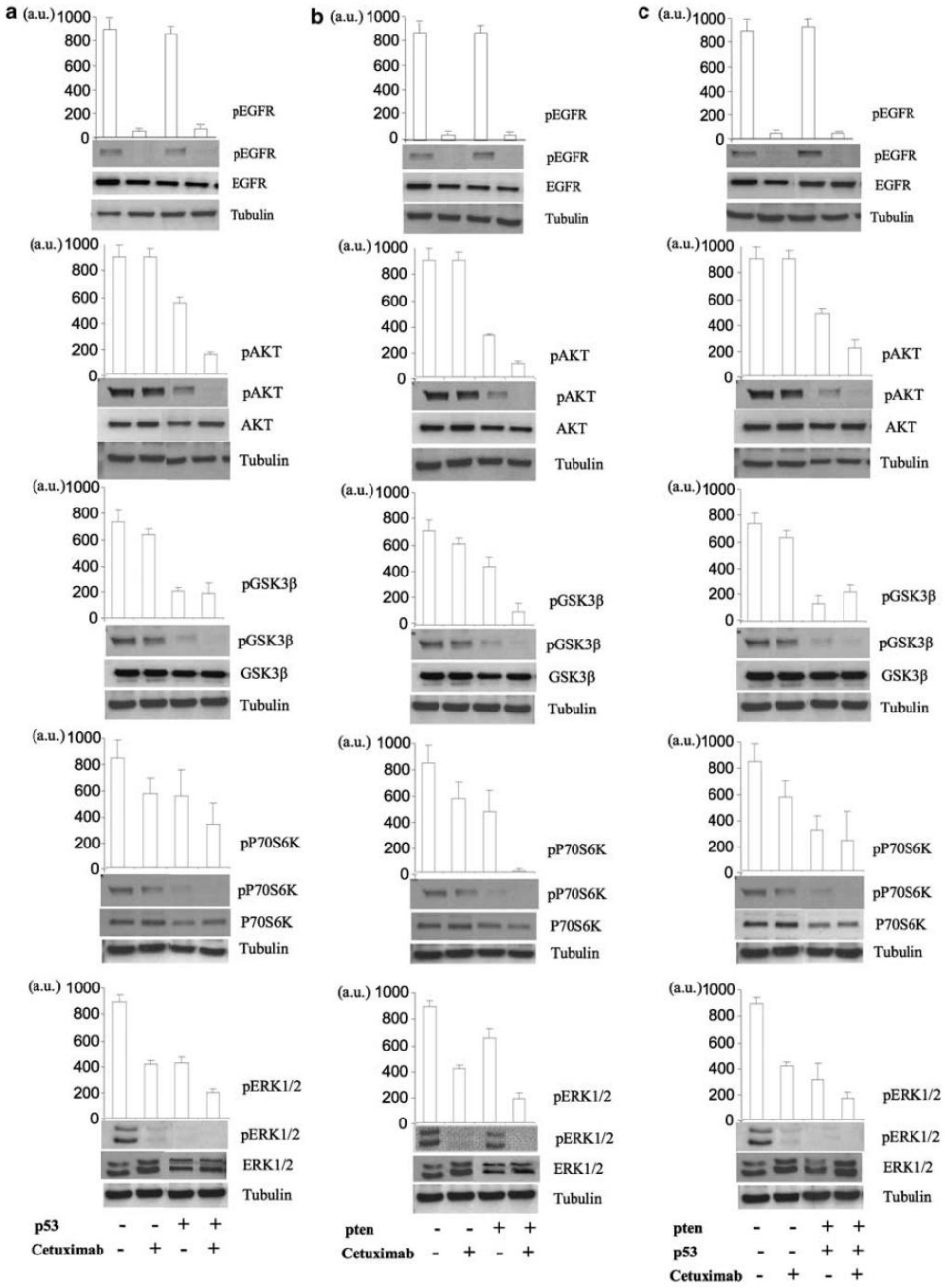


Figure 3 Analysis epidermal growth factor receptor (EGFR) phosphorylation and AKT and MAPK signaling pathways functionality using Bio-Plex phosphoprotein array and western blotting analysis. Effect of p53 (**a**), pten (**b**), pten/p53 (**c**) restoration and exposure to cetuximab on AKT and MAPK signaling pathways. In each gene transfer condition, pEGFR, pAKT, pGSK3β, pP70S6K and pERK1/2 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.

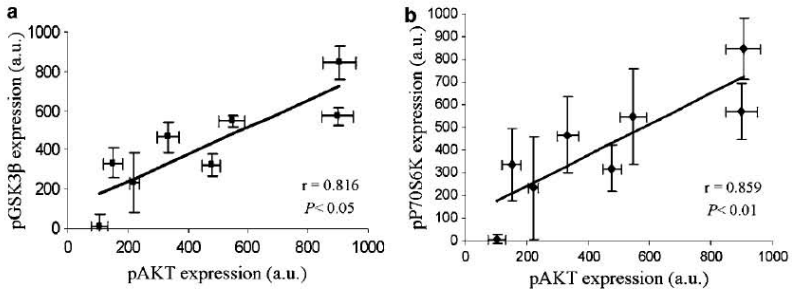


Figure 4 Correlation analyses of the relative expression levels of AKT signaling pathways phosphoproteins. (**a**) Correlation between pAKT and pGSK3β. (**b**) Correlation between pAKT and pP70S6K.

then p53-, pten- and p53/pten-transfected PC3 cells were exposed to cetuximab (100 μg ml^{-1} for 24 h) and assayed for cytotoxicity using MTT assays. Apoptosis induction was determined using flow cytometry determination of sub-G_1 cells, active caspase-3 expression and BAX expression using western blot.

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

In p53-transfected cells (Figure 5), this lack of cytotoxicity was found to be associated with significant ($P<0.01$) moderate cell cytotoxicity (20%; Figure 5a) with spontaneous apoptosis induction (16% sub-G_1; Figure 5b) consistent with increased caspase-3-expressing cell fraction (12%; Figure 5c) and BAX expression (Figure 5d). P53 gene transfer was found to significantly ($P<0.01$) sensitize PC3 cells to cetuximab with 37% increase in cell cytotoxicity, increase in sub-G_1 cell fraction (up to 21%). No subsequent increase in caspase-3-expressing cell fraction (10%) and BAX expression was evidenced. Pten gene transfer (Figure 5), PTEN protein expression led to a significant ($P<0.01$) decrease (35%) in cell growth (Figure 5a) and in consequence a significant ($P<0.05$) increase in cell apoptosis (11% sub-G_1 (Figure 5b), 6% caspase-3-expressing cell fraction (Figure 5c) consistent with increased BAX expression (Figure 5d)). Pten gene transfer was found to ($P<0.01$) sensitize significantly PC3 cells to cetuximab as a 30% increase in cytotoxicity, with increased apoptosis induction (22.5% sub-G_1), 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 (Figure 5) yielded significant ($P<0.05$) further increase in cytotoxicity (35%; (Figure 5a)) as compared to results achieved with either pten or p53 gene transfer alone. Apoptosis induction was significantly ($P<0.01$) increased as compared to pten gene transfer alone (18% sub-G_1 (Figure 5b), 15% caspase-3-expressing cell fraction (Figure 5c) and increased BAX expression (Figure 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 ($P<0.01$) 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-G_1, 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 reestablished sensitivity to cetuximab. As in the signaling analyses, because the results observed with the co-transfer of pten and p53 genes were achieved with a 50:50 mixture of the plasmids and provided the same extent of cell growth inhibition and apoptosis induction, the combined effect was considered at least as additive.

Signaling phosphoproteins expression and cellular sensitivity to cetuximab

As illustrated by cytotoxicity assays (Figure 6a) as well as by sub-G_1 apoptosis induction assays (Figure 6b), cell response to cetuximab was found to correlate significantly with pAKT, pGSK3β, 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–Altman plot analysis as shown in Figure 7. The Passing–Bablok regression analysis showed a statistically significant correlation between the two methods (Figure 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

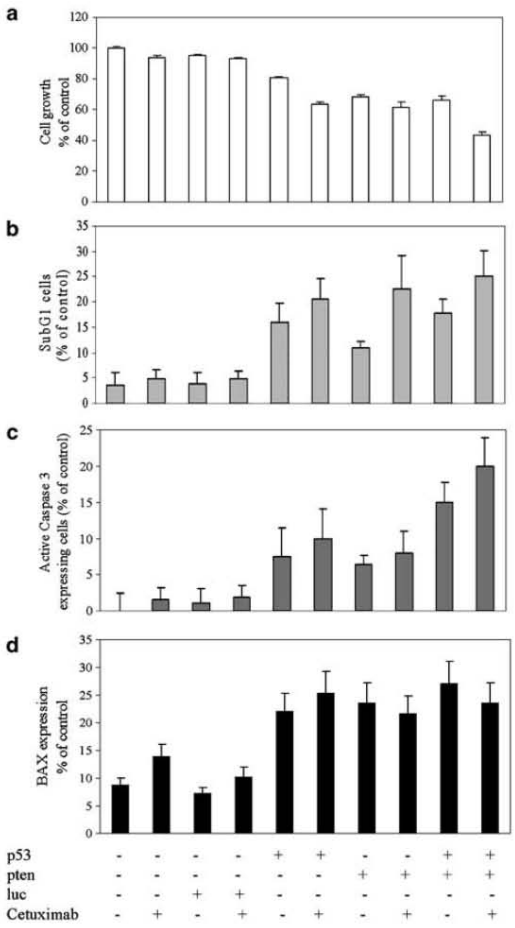


Figure 5 Analysis of cytotoxicity and apoptosis induction in p53- and/or pten-transfected PC3 cells. Pten-transfected, p53-transfected or pten/p53-cotransfected PC3 cells were exposed to cetuximab for 48 h. Cell proliferation was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (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.

expression[23] and leads to resistance to apoptosis and many chemotherapeutic agents.

In addition, 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 pAKT 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 as PC3 cells were found to be resistant to apoptosis induced by cetuximab.[25]

Our hypothesis was that reintroducing 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 function 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 downregulation of PIK3-CA (encoding p110 catalytic subunit of PI3K) independently of PTEN. Conversely, in pten intact cells, induction of p53 downregulates PIK3CA and increases PTEN protein expression[12] through a p53 response element located into PIK3CA promoter. These data were recently further confirmed as p53 was shown[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,[11] 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 importance 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, in addition 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. In addition to its influence on PI3K activity and consequent inhibition of AKT signaling, P53 could further influence the cell response to

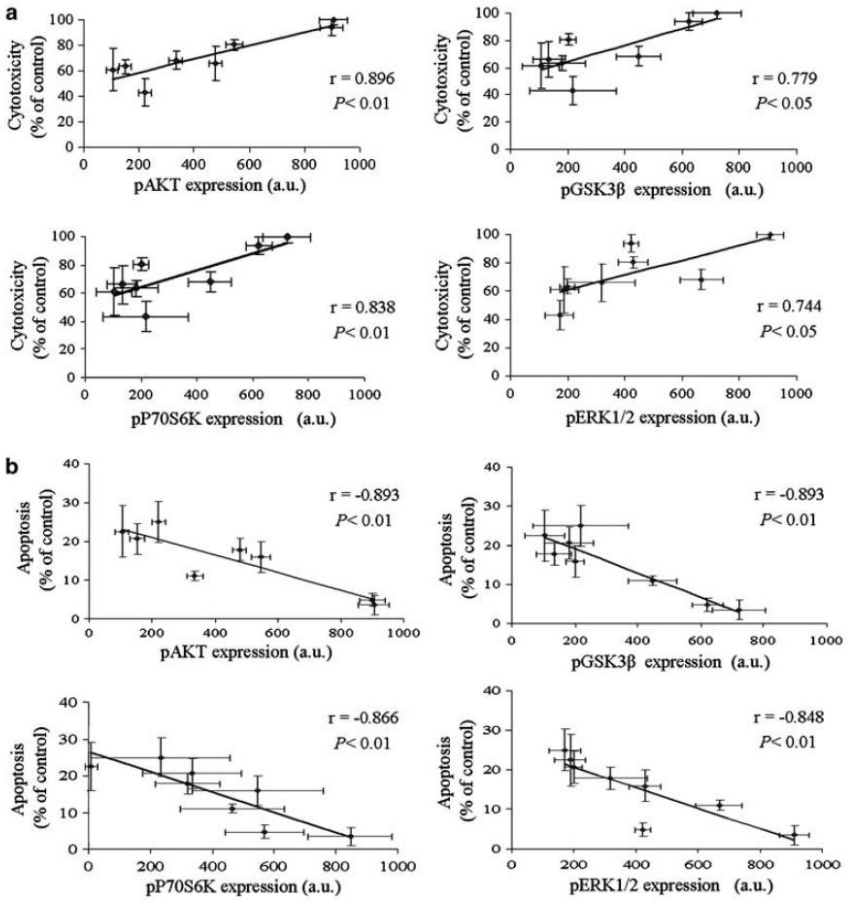


Figure 6 Correlation between phosphoproteins expression and cytotoxicity (**a**), apoptosis (**b**) induction in PC3 cells. Phosphoproteins expression was quantified using Bio-Plex phosphoprotein array.

cetuximab through its potential consequence onto PDK1. Furthermore, PDK1-mediated activation of NF-κB signaling pathways was shown to occur through direct IKKB 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-κB 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 upregulation 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 pten[18] and ras mutation[32] in colorectal cancer treated by cetuximab. Functional diagnostic criteria could be the determination of signaling phosphoprotein expression in tumors.[33] Preliminary results achieved in breast[34] and head and neck[35] and colon[36] tumors 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 colon cancer,[36] our results demonstrated that signaling defects in K-Ras nonmutated tumors could additionally serve to predict progression-free survival. 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.[37]

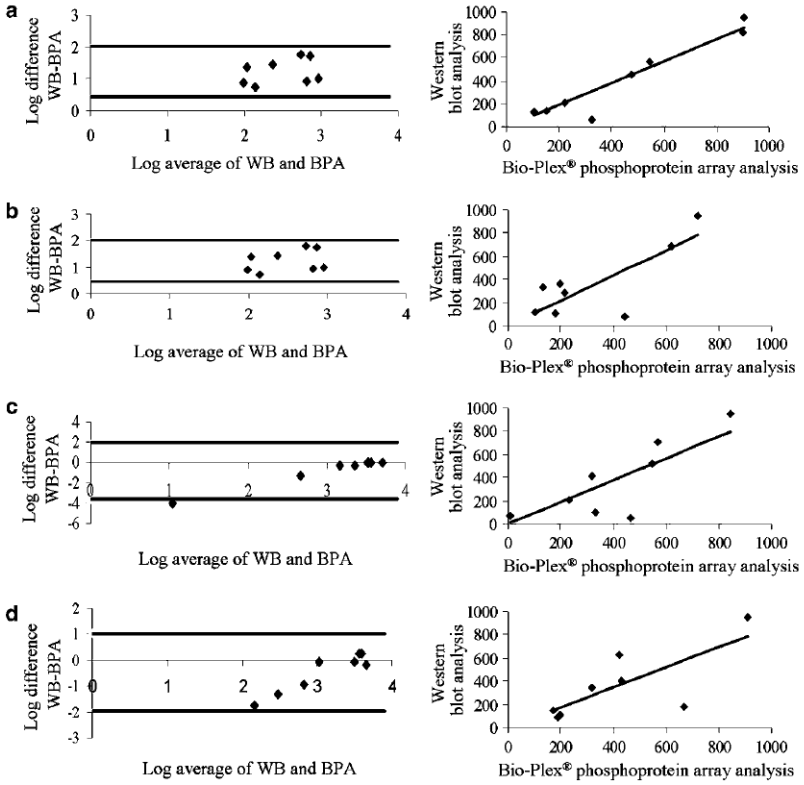


Figure 7 Quantitative correlation analysis between western blot and Bio-Plex phosphoprotein array. Comparison were performed using Bland–Altman graphic method (left panel) and Passing–Bablok regression method (right panel) for the analysis of pAKT (**a**), pGSK3β (**b**), pP70S6K (**c**) and pERK1/2 (**d**). For Bland and Altman analysis, the *y* axis in each panel represents the log difference between western blot and Bio-Plex phosphoprotein array values, and the *x* axis represents the log average of the western blot and Bio-Plex phosphoprotein array values. Solid lines are 1.96 × s.d. value, dotted lines are mean values.

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**: 6550–6565.
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**: 419–427.
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**: 4885–4892.
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–S8.
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**: 221–228.
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**: 2237–2246.
7 Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **59**: 21–26.
8 Brooks JD, Bova GS, Ewing CM, Piantadosi S, Carter BS, Robinson JC *et al*. An uncertain role for p53 gene alterations in human prostate cancers. *Cancer Res* 1996; **56**: 3814–3822.
9 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**: 169–178.
10 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**: 1163–1169.
11 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**: 1568–1578.
12 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**: 984–993.
13 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**: 2137–2146.
14 Li J, Yen C, Liaw D, Bose S, Wang SI, Puc J *et al*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; **275**: 1943–1947.
15 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**: 4291–4296.
16 Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13375–13378.
17 Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T *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**: 1139–1145.
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**: 4340–4346.
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**: 1575–1581.
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**: 459–465.
22 Ndoye A, Dolivet G, Hogset A, Leroux A, Fifre 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**: 1156–1162.
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**: 900–906.
24 Sharrard RM, Maitland NJ. Phenotypic effects of over-expression of the MMAC1 gene in prostate epithelial cells. *Br J Cancer* 2000; **83**: 1102–1109.
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**: 525–535.
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**: 203–210.
27 Ndoye 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**: 884–894.
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**: 664–674.
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**: 1904–1914.
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**: 1263–1284.
31 Tanaka H, Fujita N, Tsuruo T. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated IkappaB kinase beta (IkkB) phosphorylation activates NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 2005; **280**: 40965–40973.
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**: 3992–3995.
33 Merlin JL, Genin P, Harle A, Giacometti 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, Longavenne 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, Ramacci C, Rouyer M, Genin P *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 Merlin JL, Perkins G, Lièvre A, Ramacci C, Emile J, Boige V *et al*. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS mutation for response prediction to cetuximab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 209s.
37 Vattemi E, Claudio PP. Adenoviral gene therapy in head and neck cancer. *Drug News Perspect* 2006; **19**: 329–337.

CHAPITRE III

Validation d'une méthode de caractérisation de la signalisation en aval des récepteurs à tyrosine kinase par phosphoprotein array dans le cancer du sein.

Chrétien AS*, Chergui F*, Bouali S, Ramacci C, Rouyer M, Bastogne T, Genin P, Leroux A, Merlin JL.

* Contributed equally to the paper.

Clin Chem. 2009 Jul;55(7):1327-36.

Résumé

Introduction

La démarche d'évaluation lors de la mise en place d'une technique destinée à la recherche de biomarqueur doit se superposer à celle utilisée lors du développement de tout examen diagnostique, et se décompose en 5 niveaux. Le premier niveau doit évaluer la qualité intrinsèque de la méthode analytique : l'examen doit présenter les qualités techniques nécessaires pour fournir une information valide en termes de précision, d'exactitude et de limite de détection. Le second doit évaluer son apport informationnel en évaluant les sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positives et négatives, ainsi que les valeurs seuils. Le 3ème niveau doit permettre d'élaborer des arbres de décision en pratique clinique. Enfin les 4ème et 5ème niveaux doivent évaluer les notions d'efficacité et d'utilité au sens de l'OMS.

Ce travail se situe dans cette démarche et a pour but de valider une méthode de détection des phosphoprotéines de signalisation en aval des récepteurs HER par BioPlex® Phosphoprotein Array (BPA), et permet de comparer le BPA au Western Blot, considéré comme « gold standard ».

Matériels et méthodes

Les analyses des niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation appartenant à la voie des PI3K/AKT (pAKT, pP70S6K, pGSK3β) et à la voie des RAS/RAF/MAPK (pERK1/2, pMEK1) ainsi que pP38MAPK et pEGFR sont évalués en multiplex par BPA dans une lignée cellulaire de cancer du sein (MCF7) ainsi que dans 49 échantillons congelés de cancer du sein. Les résultats obtenus sont comparés avec les niveaux d'expression évalués en Western Blot. La validation de l'essai par BPA est réalisée conformément aux recommandations de la FDA.

Résultats

La régression linéaire réalisée sur les résultats obtenus par BPA et Western Blot met en évidence des corrélations fortes entre les deux techniques, avec des coefficients de corrélations compris entre 0.71 et 0.87 (P<0,001). D'après la représentation de Bland-Altman, moins de 5% des valeurs sont comprises en dehors des limites de concordance pour toutes les phosphoprotéines étudiées, permettant de mettre en évidence l'interchangeabilité des deux techniques. L'évaluation des niveaux d'expression des phosphoprotéines sur échantillons de

cancer du sein souligne l'importante variabilité interindividuelle de la fonctionnalité de la signalisation en aval des récepteurs HER.

Conclusion

Ces résultats valident l'utilisation de la détection des phosphoprotéines de signalisation en aval des récepteurs HER en multiplex par BPA sur échantillons cliniques de tumeurs humaines. Cette approche permet l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs HER et pourraient trouver des applications dans la recherche de marqueurs pronostiques ou prédictifs de réponse aux thérapies ciblées.

Clinical Chemistry 55:7
1327–1336 (2009)

Validation of a Phosphoprotein Array Assay for Characterization of Human Tyrosine Kinase Receptor Downstream Signaling in Breast Cancer

Fadila Chergui,[1,3†] Anne-Sophie Chrétien,[1,3†] Sanae Bouali,[1,3] Carole Ramacci,[1,3] Marie Rouyer,[1,3] Thierry Bastogne,[4] Pascal Genin,[2,3] Agnès Leroux,[2,3] and Jean-Louis Merlin[1,3*]

BACKGROUND: Human epidermal growth factor receptor (HER) downstream signaling kinases have important effects on tumor response to anti-HER monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. We validated an assay that uses phosphoprotein arrays for measurement of HER downstream signaling functionality in breast carcinomas.

METHODS: Using the Bio-Plex® phosphoprotein array (BPA), we performed multiplex immunoanalysis to investigate the expression of phosphorylated epidermal growth factor receptor and phosphorylated HER downstream signaling proteins (phosphorylated protein kinase B, phosphorylated glycogen synthase kinase -3β, phosphorylated P70 ribosomal protein S6 kinase, and phosphorylated extracellular signal regulated kinase 42/44) in 49 frozen specimens of ductal infiltrating breast carcinoma taken at diagnosis. BPA was cross-validated with Western blot analysis. Sample size, homogenicity, tumor content, protein extraction, and monoclonal antibody detection were in accordance with optimized standard operating procedures.

RESULTS: Linear regression showed significant quantitative correlations between BPA and Western blot, with regression coefficient values of 0.71–0.87 ($P < 0.001$). BPA intra- and interassay CVs were <17% and 15%, respectively. Compared to limits of detection established by using the mean + 3SD of 10 blanks, large variations of phosphoprotein expression, up to several hundred-fold, were observed among the 49 tumor specimens.

CONCLUSIONS: Our results validate the use of the multiplex phosphoprotein array assay in human clinical tumor specimens. Further prospective evaluation is warranted to investigate the use of HER downstream signaling phosphoproteins as predictive and/or surrogate markers for clinical response to anti-HER targeted therapy.

© 2009 American Association for Clinical Chemistry

The human epidermal growth factor receptor (HER)[5] family has been extensively studied because of its key role in cancer biology *(1)*. Activation of the HER receptors leads to the activation of several signal transduction pathways, among which the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and RAS/RAF/mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase pathways play a major role *(2)*.

HER are overexpressed in many human malignancies, including breast cancer, head and neck squamous cell carcinoma, colon cancer, and lung cancer, and are associated with poor prognosis *(3)*. Therefore, inhibition of HER has been investigated as a therapeutic strategy and has opened the way for so-called targeted therapies. In breast cancer, targeted therapy includes HER1- and HER2-directed monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors *(4–6)*.

The PI3K/AKT signaling pathway is regulated by phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN). Molecular defects of PTEN, which have been reported in breast cancer tumors as well as in other tumor types, lead to the constitutive phosphorylation of AKT and dramatically alter the cellular response to anti-HER drugs *(7–11)*.

The RAS/RAF/MAPK signaling pathway is also involved in the cellular response to anti-HER drugs. Mu-

[1] Unité de Biologie des Tumeurs; [2] Laboratoire d'Anatomie Pathologique; [3] EA SIGRETO Nancy Université, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France; [4] UMR7039 CNRS-UHP-INPL, Faculté des Sciences, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France.
[†] F. Chergui and A.-S. Chrétien contributed equally to the paper.
* Address correspondence to this author at: Jean-Louis Merlin, Unité de Biologie des Tumeurs, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. Fax +33-383-59-85-69; e-mail jl.merlin@nancy.fnclcc.fr.
Received September 4, 2008; accepted April 3, 2009.
Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2008.116632

[5] Nonstandard abbreviations: HER, human epidermal growth factor receptor; PI3K/AKT, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; MEK, mitogen-activated extracellular signal regulated kinase–activating kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; BPA, Bio-Plex® protein array; p, phosphorylated; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β; ERK1/2, extracellular signal regulated kinase 42/44; P70S6K, P70 ribosomal protein S6 kinase; a.u., arbitrary units.

tations of genes associated with Ras and Raf occur frequently (approximately 50% of tumors) in several malignancies, such as colorectal and lung cancers *(12)*, and occur to a lesser extent (approximately 5% of mutated tumors) in breast cancer *(13)*. Retrospective studies *(14, 15)* have demonstrated the importance of documenting Ras mutational status in colorectal tumors, with Ras mutation leading to a dramatic reduction of response to cetuximab-based therapy and progression-free survival. Consequently, Ras genotyping has now been included in the prescription criteria of cetuximab and panitumumab in colorectal cancer patients. Recently, we demonstrated that analysis of the functionality of the RAS/RAF/MAPK signaling pathway could yield additional markers for identification of patients who have wild-type *KRAS* (the human homolog of the Kirsten rat sarcoma-2 virus oncogene) tumors but are still at risk for low progression-free survival *(16)*.

Molecular diagnosis may be a useful tool in formulating strategies for alternative individualized therapy, as suggested by recent results achieved in gefitinib-resistant cells *(17)*, which demonstrated that growth inhibition and apoptosis were restored by downstream blockade of the RAS/RAF/MAPK pathway by mitogen-activated extracellular signal regulated kinase–activating kinase (MEK).

These experimental results highlight the importance of examination of the functionality of selected proteins involved in the PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK signaling pathways in tumor tissues, because these proteins may be useful in predicting the response to anti-HER drugs *(18)*. In the currently approved indications for breast cancer treatment, paradoxically, HER2 expression status remains the only molecular criterion currently evaluated to identify patients eligible for trastuzumab therapy *(19)*.

Novel detection methods, similar to those recently adopted for *KRAS* mutation analysis in colorectal cancer, have been proposed to delineate the genetic and proteomic profiles of breast cancers. For example, a multiplex assay to measure the expression of PTEN, insulin-like growth factor receptors 1 and 2, and P95HER2/neu together with epidermal growth factor receptor (EGFR) and P185HER2/neu has been proposed to aid treatment decisions regarding trastuzumab and tyrosine kinase inhibitors *(20)*.

Thus, exploring the functionality of HER downstream signaling could identify fingerprinting molecular defects that could impair the tumor response to HER-targeted therapies. The evaluation of the functionality of the signaling pathways can be assessed through the determination of multiple key phosphoproteins. In clinical studies the exploration of signaling phosphoprotein expression remains a technical challenge because only needle biopsies are available at diagnosis or during treatment, and these should be performed for multiple examinations. Development of an innovative technology allowing the determination of multiple key proteins is critical. The Bio-Plex® protein array (BPA) technology (Bio-Rad), which uses Luminex® beads and immunofluorescence, can be used for small clinical biopsies to evaluate the functionality of signal transduction pathways through the quantification of the expression of phosphorylated forms of multiple signaling proteins. A recent comparative study *(21)* established that the Luminex technology can be applied to detect multiple antigen–antibody reactions in patient samples in which these interactions are traditionally assessed individually by ELISA.

We validated the use of BPA for determination of multiplex signaling phosphoprotein in breast cancer clinical specimens before investigating the potency of signaling phosphoprotein expression for response prediction to anti-HER targeted therapy.

Patients, Materials, and Methods

PATIENTS AND TUMOR CHARACTERISTICS

Frozen tumor samples of primary breast cancer, obtained from 49 patients with infiltrating ductal carcinoma confirmed by immunohistochemical analysis, were obtained from our tumor bank, in accordance with the French regulations (bioethical law from August 6, 2004) and after we obtained approval of the study by the steering committee of the tumor bank. The median patient age at diagnosis was 56 years (range 28–93 years).

Breast cancer tissues, initially macroscopically selected by the pathologists, were obtained immediately after surgery (maximal ischemia time was 30–45 min from clamping of the vessels to freezing of the tumor specimens), shock frozen in liquid nitrogen, and then cryopreserved at −80 °C. Specimens were banked during the period 2006–2007.

Immunohistochemical analysis used to detect HER-2 overexpression revealed that tissue samples from 35% of the patients were HER2 positive and from 65% were HER2 negative, 74% of the tumors were SBR (Scarff Bloom Richardson) grade 3 and 26% were grade 2. Estrogen-receptor status determined by immunohistochemistry was positive in cancer tissue from 29 patients (63%) and negative in 20 (37%). Progesterone receptor status was positive in 14 (39%) and negative in 35 (61%). None of the patient sample donors had received any preoperative adjuvant hormone therapy or chemotherapy.

Frozen protein extracts from the HER1-overexpressing human breast cancer cell line (MCF7) exposed to EGF were used as positive controls.

Table 1. Phosphorylation-specific antibodies used in the Bio-Plex phosphoprotein array (BPA) and Western blot assays.

Phosphoprotein	BPA antibody[a]	Western blot antibody[b]
p-EGFR	Tyr (Ref. 171-V23120)	ND[c]
p-AKT	Ser^{473} (Ref. 171-V21075)	Ser^{473} Antibody #9271
p-GSK3β	Ser^{21}/Ser^{9} (Ref. 171-V23318)	Ser^{21}/Ser^{9} Antibody #9331
p-P70S6K	Thr^{421}/Ser^{424} (Ref. 171-V24155)	ND
p-MEK1	$Ser^{217/221}$ (Ref. 171-V25340)	ND
p-ERK1/2	Thr^{202}/Tyr^{204}, $Thr1^{85}/Tyr^{187}$ (Ref. 171-V22238)	Thr^{202}/Tyr^{204} (E10) Antibody #9106
p-P38MAPK	Thr^{180}/Tyr^{182} (Ref. 171-V21336)	Thr^{180}/Tyr^{182} Antibody #9211

[a] See www.bio-rad.com.
[b] See www.cellsignal.com.
[c] ND, not determined.

PROTEIN EXTRACTION

We extracted proteins from cell cultures or tumor specimens by using a cell lysis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's recommendations. Tumor specimens weighing 20 ± 5 mg were first disrupted for 15 min by use of a steel-bead tissue lyser (Quiagen).

Cell cultures and disrupted tumor tissues were exposed for 10 s to the lysis solution containing phenylmethylsulfonyl fluoride antiprotease. Proteins were stored frozen at −80 °C until analyzed.

WESTERN BLOT ANALYSIS

We used previously reported protocols, with slight modifications, to perform Western blots on protein extracts *(22)*. The proteins were electrophoretized at 100 V for 150 min (PowerPac 200, Bio-Rad) in SDS-polyacrylamide gels (5%–10%) and then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad) at 80 mA for 30 min by use of a Transblot SD (Bio-Rad). Nonspecific binding was blocked with 5% milk in DMEM PBS/0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature. Immunodetection of the proteins was performed with specific primary antibodies (Cell Signaling) directed against phosphorylated (p)-AKT, p–glycogen synthase kinase 3β (p-GSK3β), p–extracellular signal regulated kinase 42/44 (p-ERK1/2), and p-P38MAPK, within the dilution range 1/500–1/3000, and incubated overnight at 4 °C (Table 1). Tubulin was used as the internal loading control. The membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase–secondary anti-IgG1 polyclonal antibodies (Cell Signaling). Immunoreactive proteins were visualized by using using electrochemiluminescent reagent (Amersham Biosciences).

Each dried blot was numerized at 100 dpi (Perfection 1670 scanner; Epson) and processed using ImageJ, Java-based image processing software (Rasband WS; NIH).

The area of the peak was outlined, and the proportion of the peak area as a percentage of the MCF7 positive control (for simplicity referred to as peak area) was used for statistical analysis.

BPA ASSAY

To analyze the expression of the signaling phosphoproteins, we used BPA (Bio-Rad) based on multiplex sandwich bead immunoassays previously used in breast, head and neck *(18)*, and colorectal tumor specimens *(16)*. Three independent technicians participated in the study. Protein extracts were transferred into 96-well dishes and diluted with 25.10^{-6} L buffered solution. Fluorescent capturing beads coupled to antibodies (Table 1) directed against p-AKT, p-GSK3β, p-P70 ribosomal protein S6 kinase (p-P70S6K), p-MEK1, p-ERK1/2, and p-P38MAPK phosphoproteins were mixed. p-EGFR expression was analyzed separately according to the manufacturer's instructions. The antibody-conjugated beads were added into each well and incubated overnight. The plates were washed and incubated with biotinylated antibodies to fix each target protein. Streptavidin–phycoerythrin solution was then added. The analysis consisted of a double-laser fluorescence detection, which allowed simultaneous identification of the target protein through the red fluorescence emission signal of the bead and quantification of the target phosphoprotein through the fluorescence intensity of phycoerythrin. A positive control, consisting of a standard protein extract from control cell line, was added to each series. Results were recorded as mean fluorescence intensities and normalized to the data measured in the positive controls.

BPA was performed at the same time (same protein extract, same initiation day) as the Western blots. Results were recorded blindly.

VALIDATION PROCEDURE

Validation of the BPA was performed according to the US Food and Drug Administration guidelines *(23)*. Because phosphoprotein reference materials were not available, we were unable to validate some parameters. Therefore, our validation program included assessment of linearity, limit of detection, lower limit of quantification, and upper limit of quantification.

We calculated the limit of detection and lower limit of quantification by using the mean value plus 3 and 10 SDs, respectively, of the fluorescence intensity of 10 blanks containing 250 mg/L BSA. The criterion for acceptance of upper limit of quantification values was based on CV below 20%. Assay linearity was determined from 1/1–1/16 dilutions of the protein extracts from the control cell line.

We fitted the calibration curves by using nonlinear 5-parameter logistic equation (Logistic-5PL, Brendman Technologies):

$$y = (a - d)/[1 + (x/c)^b]^m,$$

where x is the concentration; y is the mean fluorescence intensity, a is the estimated mean fluorescence intensity at zero concentration; b is the slope of the tangent midpoint; c is the midpoint; d is the estimated mean fluorescence intensity at infinite concentration; and m is the asymmetry parameter.

This regression model allowed better handling of asymmetry, a common cause of poor fit for 4-parameter logistic regression *(24)*, poor replicates, and outliers (e.g., by use of weighting) in the standard curves *(25)*. Goodness of fit for all standard curves was assessed by the method of Davies, which consists of back-calculation of standard value, defined as (observed/expected × 100). Calculated values within 70%–130% of expected values were accepted.

The Pearson correlation coefficient r was calculated with least-squares linear regression analysis to determine correlation between values measured by BPA and Western blot. Bland–Altman analyses *(26)* were performed to calculate limits of agreement and systematic errors, and the results were plotted with y as the value of the difference between BPA and Western blot, x as the mean of the BPA and Western blot log-transformed values, and the upper and lower limits defined by the mean difference ±2SD. In all statistical analyses, the limit of significance was set at $P < 0.05$.

A hierarchical cluster analysis was applied to the experimental data obtained with BPA. A euclidian dissimilarity distance and a complete agglomeration method were used. Results were described by a dendrogram in which the y axis measured distances between clusters. This analysis was performed by the algorithm *hclust* implemented into R, a free software environment for statistical computing and graphics.

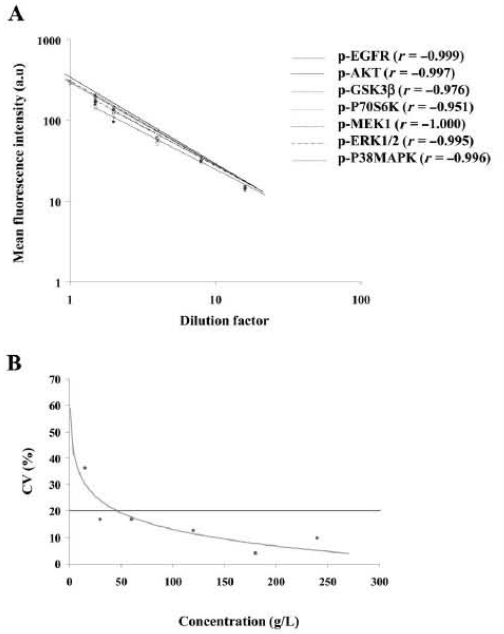


Fig. 1. Assay precision.

(A), Calibration curve performed from serial dilutions of the positive control protein extract for p-EGFR, p-AKT, p-GSK3β, p-P70S6K, p-MEK1, p-ERK1/2, and p-P38MAPK combined as a 6-plex (p-EGFR as a single plex) fitted using the 5-parameter logistic regression algorithm using MCF7 cell dilution. (B), Mean functional sensitivity for multiplex determination, defined as the concentration at which assay CV reaches 20%.

Results

ASSAY DEVELOPMENT

To assess linearity of BPA, we analyzed successive dilutions of protein extracts from the positive control cell line, within the optimal concentration range recommended (200–900 mg/L). Regression coefficient values (r) ranged from −0.951 to −1.000 ($P < 0.001$) (Fig. 1A) for p-EGFR, p-AKT, p-GSK3β, p-P70S6K, p-ERK1/2, and p-P38MAPK. The imprecision profiles (Fig. 1B) revealed a CV <20% for multiplex phosphoprotein determination for total protein concentration above 50 mg/L. Goodness of fit was confirmed from back calculation of standard values (Table 2), with all

Table 2. Goodness of fit for standard curves assed by the method of Davies (see Methods section).

	% of expected values	
Phosphoprotein	Range	Mean
p-EGFR	94–108	99
p-AKT	83–125	104
p-GSK3β	87–121	103
p-P70S6K	83–116	98
p-MEK1	79–130	104
p-ERK1/2	94–101	98
p-P38MAPK	79–130	104

data lying within the accepted 70%–130% range. We checked for any matrix effect in diluting specimens in protein (BSA) containing buffer to maintain constant total protein concentration at 250 mg/L or 1000 mg/L.

No matrix effect was observed because there was no significant variation in either slope or *y*-intercept [See Supplemental Figs. 1 and 2 in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at http://www.clinchem.org/content/vol55/issue7 for p-AKT (A), p-GSK3β (B), p-P70S6K (C), p-MEK1 (D), p-ERK1/2 (D), and p-P38MAPK (E)].

ASSAY VALIDATION

The established limit of detection, lower limit of quantification, and upper limit of quantification are shown in Table 3. The BPA assay application was validated by use of 49 breast carcinoma surgical specimens obtain from patients before they underwent chemotherapy.

Linear regression was performed to compare BPA with Western blotting as reference method. As a whole, as well as protein by protein, all data obtained from BPA analysis correlated ($P < 0.001$) with data calculated from numerized Western blot with Pearson correlation coefficients (r) for each phosphoprotein exceeding 0.70 (p-AKT, 0.85; p-GSK3β, 0.87; p-ERK1/2, 0.83; p-P38MAPK, 0.71) (Fig. 2, left panels).

The Bland–Altman plots of differences and means of results obtained from BPA and numerized Western blot assays (Fig. 2, right panels) showed that for each protein analyzed, <5% of the values were located outside of the 95% limits-of-agreement interval (p-AKT, 5%; p-GSK3β, 4%; p-ERK1/2, 4%; p-P38MAPK, 2%), demonstrating approximate normality. The systematic differences between the 2 assays were calculated to be 0.337, 0.084, 0.166, and 0.157 arbitrary units (a.u.) for p-AKT, p-GSK3β, p-ERK1/2, and p-P38MAPK, respectively. Interassay and intraassay reproducibility achieved with BPA (Table 3) never exceeded 14.9% and 17.3% respectively, and were within the same range as values usually achieved with numerized Western blot analysis. In 47 of 49 cases, the difference observed between BPA and Western blot values compared to positive control values never exceeded 1 or 2 log (i.e., 10 or 100 a.u., representing approximately 10% of the values measured), respectively, in low (Fig. 2, B and C) and high (Fig. 2, A and D) detection range; and these variations were lower than intra- and interexperimental variations.

ASSAY APPLICATION

The results shown in Fig. 3 demonstrate that large variations (up to several hundred-fold) in phosphoprotein expression could be observed among the tumors.

When the geometric mean was used as the threshold value, overexpression of the PI3K/AKT-related signaling phosphoproteins p-AKT, p-GSK3β, and p-P70S6K were observed in 59%, 53%, and 65% of the patients, respectively.

All p-AKT overexpressing samples also overexpressed p-GSK3β, and 86% overexpressed p-P70S6K. In addition, 87% of p-GSK3β–overexpressing samples also overexpressed p-P70S6K.

Table 3. Characteristics of the BPA assay in breast carcinoma clinical specimens.

Phosphoprotein	LOD (MFI)	LLOQ (MFI)	ULOQ (MFI)	Pearson r	Interassay CV (%)	Intraassay CV (%)
p-EGFR	<110	<300	>5000	0.97	10.8	6.8
p-AKT	74	125	>25 000	0.99	12.6	8.5
p-GSK3b	<20	<50	ND[a]	0.97	14.9	16.4
p-P70S6K	27	65	>25 000	0.98	14.3	3.3
p-MEK1	<10	<25	>25 000	0.99	11.8	5.5
p-ERK1/2	13	36	>3500	0.95	10.4	3.4
p-P38MAPK	<45	<110	>750	0.94	11.4	17.3

[a] ND, not determined.

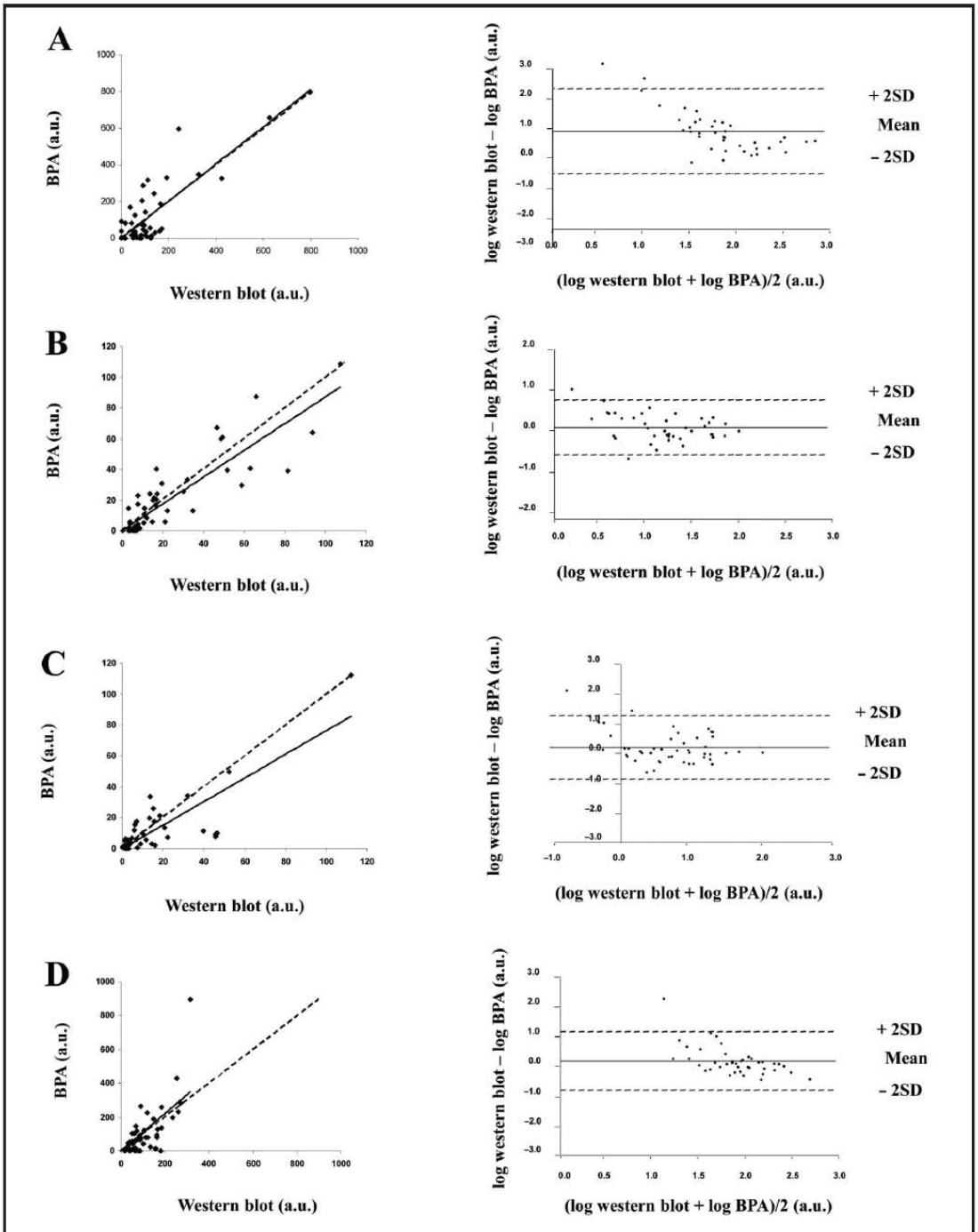


Fig. 2. Assay validation.

Linear regression analysis (left panels) and Bland–Altman plots (right panels) for p-AKT (A), p-GSK3β (B), p-ERK1/2 (C), and p-P38MAPK (D). The dashed lines for the left panels represent the lines of identity; a.u., arbitrary units.

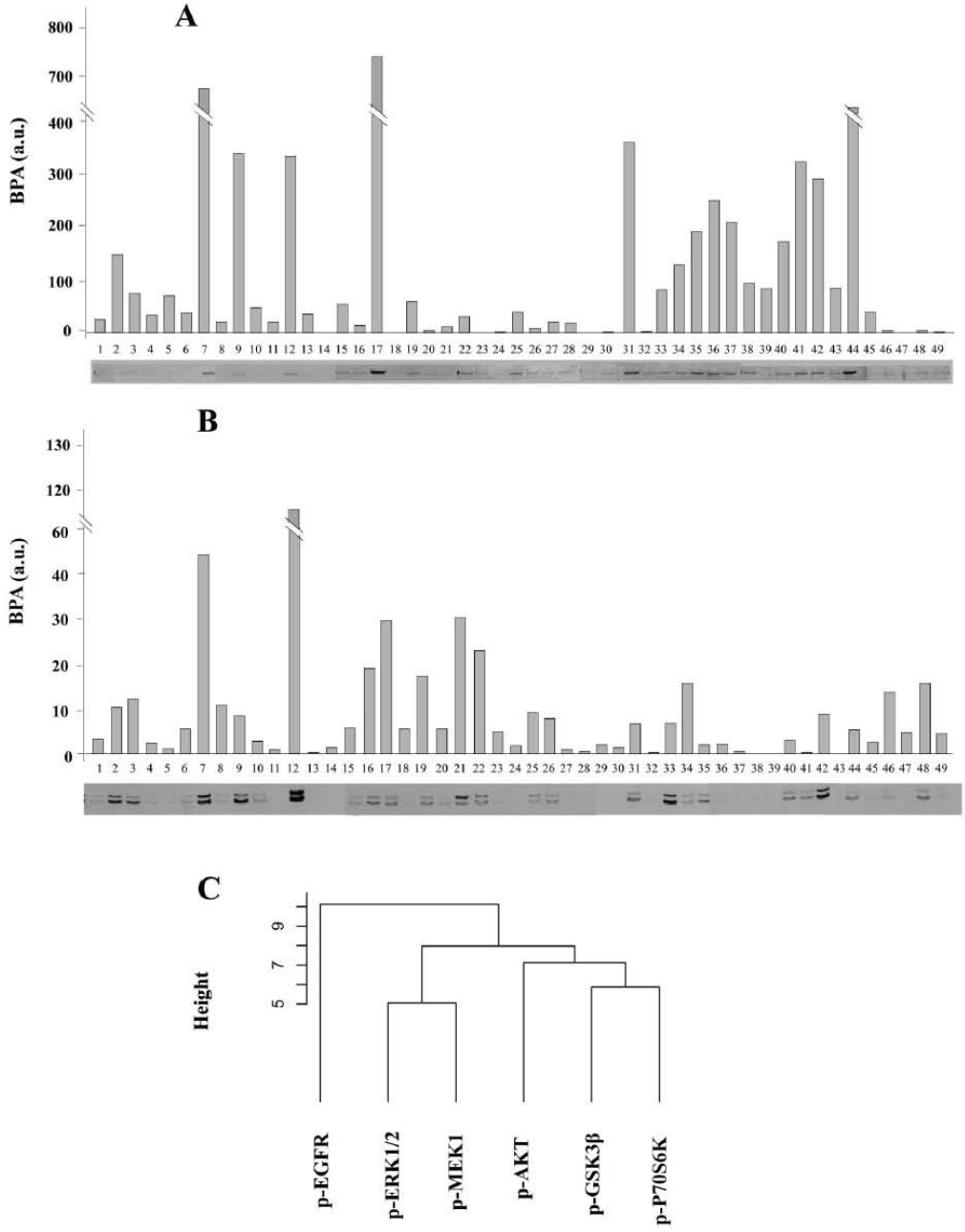


Fig. 3. Assay application.

Expression of representative signaling phosphoproteins p-AKT (A) and p-ERK1/2 (B) in ductal infiltrating breast carcinoma in 49 patients tumors using BPA and Western blot. (C), Hierarchical cluster analysis applied to the BPA experimental data. Results of this hierarchical cluster analysis were described by a dendrogram in which the *y*-axis measures euclidian distances between clusters. Typology of this dendrogram is consistent with the functional representation of EGFR downstream signaling pathway and therefore illustrates biological relevance of the BPA data; a.u., arbitrary units.

p-AKT expression correlated with p-GSK3β expression ($r = 0.47$, $P < 0.001$) and p-P70S6K expression ($r = 0.53$, $P < 0.001$).

All overexpression values ranged between 1.1- and 30.6-fold the threshold value, with median values at 8.1-, 4.9-, and 4.6-fold the threshold value, respectively, for p-AKT, p-GSK3β, and p-P70S6K.

Overexpression of the MAPK-related signaling phosphoproteins p-ERK1/2 and p-P38MAPK was observed in 57% and 49% of the samples, respectively. Most (75%) p-ERK1/2–overexpressing samples also overexpressed p-P38MAPK. All overexpression values ranged between 1.1- and 31-fold the threshold value, with median values at 4.7- and 2.9-fold the threshold value, respectively, for p-ERK1/2 and p-P38MAPK.

p-ERK1/2 expression correlated with p-P38MAPK expression ($r = 0.39$, $P < 0.001$).

Results of the hierarchical cluster analysis are described by the dendrogram in Fig. 3C. Three main clusters of proteins were determined: p-EGFR; p-ERK1/2 and p-MEK1; and p-AKT, p-GSK3β, and p-P70S6K. Typology of this dendrogram is consistent with the functional representation of the EGFR downstream-signaling pathway and therefore illustrates biological relevance of the BPA data.

Although a high level of coexpression was observed (mean 77%, range 67%–82%) within each signaling pathway (PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK), a lower coexpression frequency was found between p-EGFR and the expression of any downstream-signaling phosphoprotein (mean 61%, range 55%–65%). This result illustrates that p-EGFR expression cannot be used as unique marker for the functionality of all downstream signaling as a whole.

Discussion

Prescription of monoclonal antibodies or tyrosine kinases inhibitors as treatment directed against HER is based on the identification of the targets (HER) in tumor biopsies, mostly achieved using immunohistochemistry or in situ hybridization.

In approximately half of patients with HER2-overexpressing breast cancers, the disease does not initially respond to trastuzumab or it becomes resistant to this drug, an effect attributed to the activation of HER downstream signaling pathways, the PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK pathways *(11, 17)*.

Because of the high risk of resistant disease, many studies have been designed to identify signaling intermediates that could predict the clinical response to anti-HER drugs and be used as diagnostic markers to allow better selection of patients likely to respond. Most studies investigated one or a small set of markers in tumor tissue by using immunohistochemistry or tissue microarray analyses. No global multiple determination of signaling phosphoprotein able to fingerprint HER downstream signaling has been reported, however, probably because of the complexity of the signaling pathways and the limited availability of tumor tissue taken from diagnostic biopsies.

Our study is the first validation and application of a multiplex bead immunoassay that uses BPA assay for the determination of multiple phosphoprotein expression in breast cancer clinical specimens.

A previous reported study investigated various protocols for validation of multiplex beads immunoassays *(21)* for multiple cytokine determination in clinical specimens. In the present study, we followed the minimal criteria outlined in the US Food and Drug Administration guidance document for industry and bioanalytical method validation *(23)*. This procedure had to be amended, however, because analysis of analyte-free specimen (biopsy) was not achievable, and phosphoprotein standards were unavailable. Under these conditions, the results we achieved using BPA fulfilled all requirements and were fully consistent with those achieved using Western blots with similar protocols and antibodies.

Technically, this study demonstrates some major advantages of BPA for multiple signaling phosphoprotein analysis. When compared with conventional Western blot analyses, on the basis of the determination of 7 proteins in triplicate, the suspension beads protein array requires 5-fold less time than Western blotting, reduces the risk of multiple pipetting errors and reduces hands-on time and therefore cost. Additionally, the use of BPA improves the quality of results because the need for freezing/thawing, typically required for the measurement of multiple analytes by Western blot, is reduced. In addition, we our results demonstrate that BPA can be used with size-limited tumor specimens (15 mg of tissue) approximately corresponding to a 18-G needle biopsy, a feature that is of particular importance for clinical diagnosis. Compared with immunohistochemistry, the main advantage of BPA appears to be the ability to automate the whole process, giving access to multiple quantitative results. However, BPA does not provide subcellular localization data and does not take into account the heterogenicity of the tumor tissue, as opposed to immunohistochemistry, which allows specific analysis of identified tumor areas.

ACTIVATED HER DOWNSTREAM SIGNALING PATHWAYS IN BREAST TUMOR TISSUE

Upregulation of AKT signaling cascades has been commonly found in a variety of human cancers, including breast carcinoma. In the present study, the constitutive expression of p-AKT observed in 59% of patients agrees with other studies that used immunohistochemistry analysis, reporting p-AKT expression rate from 33% to 70% *(27–31)* in invasive breast cancers. A lower

rate of p-AKT expression (15%) was recently reported in early stage breast cancers *(32)*, tending to confirm that increased expression of p-AKT could be increased in advanced and metastatic disease. In most of these studies, high expression of p-AKT was also correlated with poor prognosis and resistance to chemotherapy and hormonal therapy. Downstream from AKT, a high frequency (50%) of expression of p-P70S6K and p-GSK3β was observed in the present series, confirming the data previously reported using tissue microarray, which showed 40% of p-P70S6K expression in breast cancer *(31)*. The results achieved in the present study are consistent with the hypothesis that complete constitutive activation of the PI3K/AKT pathway was achieved, because expression of p-AKT was always associated with expression of p-GSK3β and p-P70S6K, as already suggested *(33)* by tissue microarray data showing that 70% of invasive breast carcinomas expressed p-PDK-1, p-AKT, p-P70S6K, and p-EGFR. The hierarchical cluster analysis illustrates biological relevance of the BPA data, whereas low coexpression frequency between p-EGFR and the expression of any downstream signaling phosphoprotein further suggest that p-EGFR expression cannot be used as a unique marker for the functionality downstream signaling as a whole.

Few data are available regarding the expression rate of phosphorylated-MAPK in breast cancer, and p-ERK1/2 and p-P38MAPK have been mostly associated with poor prognosis and chemoresistance. In this study, the expression of p-ERK1/2 was detected in 57% of the tumors, consistent with immunohistochemistry data reporting expression of p-ERK1/2 in 35%–70% of the tumors *(32, 33)*.

p-P38MAPK was expressed in 49% of the tumors, in agreement with immunohistochemistry data (20%–50%) in breast cancer primary tumors and effusions *(34)*.

As a whole, these data clearly demonstrate the importance of molecular fingerprinting of HER downstream signaling functionality in breast cancer. Monoparametric analyses are not sufficient for individualization of therapeutic regimens, as already shown in colorectal cancer, in which not only the RAS/RAF/MAPK but also the PI3K/AKT pathway has been recently reported *(35)* to impair clinical response to cetuximab.

In conclusion, this study demonstrated advantages of multiplex HER downstream-signaling phosphoprotein analysis using BPA. This technique is accurate and precise, reduces sample size and time–cost, and provides quantitative results that are fully consistent with Western blot.

Clinically, BPA assays revealed that before treatment initiation HER downstream-signaling functionality can dramatically differ from patient to patient, results that warrant further prospective evaluation of this parameter as a predictive and/or surrogate marker for clinical response to anti-HER targeted therapy. Use of BPA as a prospective screening technique could help identify biomarkers that could be used at diagnosis to help physicians select the most promising individual HER-targeted therapy for cancer patients.

Author Contributions: *All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.*

Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest: *Upon manuscript submission, all authors completed the Disclosures of Potential Conflict of Interest form. Potential conflicts of interest:*

Employment or Leadership: None declared.
Consultant or Advisory Role: None declared.
Stock Ownership: None declared.
Honoraria: None declared.
Research Funding: Grants from the French "Ligue Nationale contre le Cancer," "Fondation pour la Recherche Médicale," and Alexis Vautrin Cancer Center private research funds. J-L. Merlin, Merk Serono.
Expert Testimony: None declared.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

References

1. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. Trends Mol Med 2007;13:527–34.
2. Grant S, Qiao L, Dent P. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. Front Biosci 2002;7:376–89.
3. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical indications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. Adv Cancer Res 2000;77:25–79.
4. Meric-Bernstam F, Hung MC. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. Clin Cancer Res 2006;12:6326–30.
5. Engel RH, Kaklamani VG. HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies. Drugs 2007;67:1329–41.
6. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in cancer, therapeutic implications. Curr Cancer Drug Targets 2008;8:187–98.
7. She QB, Solit D, Basso A, Moasser MM. Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3′-kinase/Akt pathway signaling. Clin Cancer Res 2003;9:4340–6.
8. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell 2004;6:117–27.
9. Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, et al. PTEN activity could

be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. Br J Cancer 2006;94:247–52.
10. Berns K, Horlings H, Hennessy B, Madiredjo M, Hijmans M, Beelen K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. Cancer Cell 2007;12:395–402.
11. Pandolfi PP. Breast cancer–loss of PTEN predicts resistance to treatment. N Engl J Med 2004;351: 2337–8.
12. Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. Biochim Biophys Acta 2005; 1756:127–44.
13. von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR. Ras activation in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2000; 62:51–62.
14. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol 2008;26:374–9.
15. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. Br J Cancer 2007;96:1166–9.
16. Merlin JL, Perkins G, Lièvre A, Ramacci C, Emile J, Boige V, et al. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS mutation for response prediction to cetuximab in colorectal cancer [Abstract]. J Clin Oncol 2008;26:209s.
17. Normanno N, De Luca A, Maiello MR, Campiglio M, Napolitano M, Mancino M, et al. The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. J Cell Physiol 2006;207:420–7.
18. Merlin JL, Genin P, Harle A, Giacometti G, Chergui F, Bouali S, et al. Phosphoprotein array in tumors biopsies for molecular diagnosis of PI3–kinase and MAP-kinase signaling functionality [Abstract]. Mol Cancer Ther 2007;6:3540s.
19. Di Leo A, Dowsett M, Horten B, Penault-Llorca F. Current status of HER2 testing. Oncology 2002; 63:25–32.
20. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. J Clin Invest 2007;117:2051–8.
21. Kofoed K, Schneider UV, Scheel T, Anderssen O, Eugel-Olsen J. Development and validation of a multiplex add-on assay for sepsis biomarkers using xMAP technology. Clin Chem 2006; 52:1284–93.
22. Ndoye A, Dolivet G, Høgset A, Leroux A, Fifre 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. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), and Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for industry: bioanalytical method validation. http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf. (Accessed August 2008).
24. Baud M. Data analysis, mathematical modeling. In: Masseyeff RF, ed. Methods of immunological analysis: fundamentals. Vol. 1. New York: VCH; 1993. p 656–71.
25. Nix B, Wild D. Calibration curve-fitting. In: Wild D, ed. The immunoassay handbook. 2nd ed. New York: Nature Publishing Group; 2001. p 198–210.
26. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;1:307–10.
27. Tokunaga E, Kimura Y, Oki E, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, et al. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. Int J Cancer 2006;118:284–9.
28. Park SS, Kim SW. Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with HER2 overexpression. Oncol Rep 2007;18:139–43.
29. Shcherbakov AM, Gershtein ES, Anurova OA, Kushlinskii NE. [Vascular endothelial growth factor and two types of its receptors in breast cancer]. Bull Exp Biol Med 2005;139:608–10.
30. Sahoo S, Brickley DR, Kocherginsky M, Conzen SD. Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. Eur J Cancer 2005;41:2754–9.
31. Lin HJ, Hsieh FC, Song H, Lin J. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. Br J Cancer 2005;93: 1372–81.
32. Svensson S, Jirstrom K, Ryden L, Roos G, Emdin S, Ostrowski MC, et al. ERK phosphorylation is linked to VEGFR2 expression and Ets-2 phosphorylation in breast cancer and is associated with tamoxifen treatment resistance and small tumours with good prognosis. Oncogene 2005;24: 4370–9.
33. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Grund D, Hemminger G, Muller V et al. Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. Br J Cancer 2005;92:2206–15.
34. Davidson B, Konstantinovsky S, Kleinberg L, Nguyen MT, Bassarova A, Kvalheim G, et al. The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma. Gynecol Oncol 2006;102: 453–61.
35. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. Ann Oncol 2009;20:84–90.

CHAPITRE IV

Optimisation de la procédure de génotypage *KRAS* pour la prescription rationnelle et individualisée des thérapies ciblées en première ligne dans le cancer colorectal métastatique (CCRm)

Chrétien AS, Harlé A, Meyer-Lefebvre M, Rouyer M, Husson M, Ramacci C, Leroux A, Genin P, Merlin JL.

Human mutation (En cours de soumission)

Résumé

Introduction :

La recherche de mutation du gène *KRAS* représente la première étape de l'individualisation des prises en charge thérapeutiques en fonction des caractéristiques de chaque patient. Le génotypage de *KRAS* est obligatoire pour envisager la prescription d'anticorps monoclonaux anti-EGFR dans les cancers colorectaux métastatiques. La plateforme régionale lorraine de phénotypage *KRAS* réalise en routine environ 700 analyses par an. Afin d'optimiser la qualité des analyses et de réduire les délais de réponse, plusieurs approches techniques sont envisagées.

Patients et Méthodes :

Cette étude rapporte une analyse comparative de trois techniques : la PCR-RFLP (Polymérase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism), la PCR-Taqman et l'HRM (High Resolution Melting). Entre Janvier 2008 et Décembre 2009, 790 échantillons de cancer colorectal métastatique (CCRm) ont été analysés en routine en vue d'une prescription d'anticorps anti-EGFR. Les échantillons emparaffinés ont été transmis par les anatomopathologistes de la région lorraine suite à une demande de génotypage *KRAS* émanant d'oncologues. Les prélèvements reçus sont dans un premier temps macrodisséqués après lecture d'une lame colorée à l'hématoxiline-éosine par un pathologiste par afin d'assurer un contenu minimal de 20% de cellules tumorales. L'extraction d'ADN est ensuite réalisée. La recherche de mutation du gène *KRAS* réalisée sur les codons 12 et 13 de l'exon 2 par PCR-RFLP, PCR TaqMan et par HRM.

Résultats :

Parmi les 790 prélèvements analysés, 2.8% des échantillons présentaient une dégradation importante de l'ADN et n'ont pu être génotypés. Les mutations de *KRAS* ont été détectées dans 40,6% (310/768) des échantillons analysables. 82% des mutations étaient localisées dans le codon 12 et 18% dans le codon 13. Une excellente corrélation est observée entre les trois techniques. Cependant, parmi les 549 échantillons pour lesquels les trois techniques ont été utilisées, 15 cas de discordance ont été mis en évidence. Dans ces cas, la totalité de la procédure (depuis l'extraction d'ADN) a été répétée. 47% des discordances étaient attribuables à la PCR-RFLP, 36% à la PCR TaqMan, et 18% à HRM.

Les techniques les plus rapides sont les techniques PCR-Taqman et HRM, la PCR-RFLP nécessitant une double digestion enzymatique longue. A terme, la technique HRM pourrait constituer une technique de screening permettant d'identifier rapidement les échantillons porteurs de mutations, la technique PCR-Taqman permettant de confirmer ces résultats et d'identifier la mutation.

Conclusion :

Les résultats obtenus montrent une excellente corrélation entre les 3 techniques utilisées. Leur utilisation en routine diagnostique est validée et permet de disposer de méthodes complémentaires qui garantissent un haut niveau de qualité de diagnostique moléculaire.

OPTIMIZATION OF ROUTINE *KRAS* MUTATION DETECTION PROCEDURE FOR RATIONAL INDIVIDUALIZED FIRST LINE TARGETED THERAPY SELECTION IN METASTATIC COLORECTAL CANCER (mCRC)

Anne-Sophie Chretien[1,3], Alexandre Harlé[1,3], Magali Meyer-Lefebvre[2], Marie Rouyer[1], Marie Husson[1], Carole Ramacci[1], Agnes Leroux[2,3,] Pascal Genin[2,3], Jean-Louis Merlin[1,3]

[1]Unité de Biologie des Tumeurs, [2]Laboratoire d'anatomie pathologique, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France, [3]EA 4421 SiGReTO Nancy Université.

Correspondence:

Jean-Louis Merlin, PharmD, PhD

Unité de Biologie des Tumeurs

Centre Alexis Vautrin

Avenue de Bourgogne

54511 Vandoeuvre-les-Nancy cedex, France

Tel : +33 383 59 83 07 Fax : +33 383 59 85 69 Email: jl.merlin@nancy.fnclcc.fr

KEY WORDS: *KRAS* mutation detection, metastatic colorectal cancer, cetuximab, panitumumab, High Resolution Melting Analysis, TaqMan PCR, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Background: *KRAS* mutation detection represents a first step towards individualized therapy and has become a crucial issue in mCRC. The optimization of *KRAS* mutation detection delay enabling rational prescription of first line treatment in metastatic colorectal cancer (mCRC) including anti-EGFR targeted therapy requires robust and rapid molecular biology techniques.

Methods: Between jan-2008 and dec-2009, 790 mCRC have been analyzed for *KRAS* mutations. Following prescription of *KRAS* mutation detection by medical oncologists, the tumor specimens were collected from private and academic pathologists, as paraffin-embedded tissue specimens, and macrodissected after hematoxylin-eosin slide analysis by a pathologist to ensure a minimum of 20% tumor tissue content. DNA was then extracted and controlled. Routine *KRAS* mutation detection, restricted to exon 2 mutations in codon 12 and 13, was performed using three molecular biology techniques i.e. high resolution melting (59), PCR-RFLP and allelic discrimination PCR (TaqMan PCR).

Results: Among the 790 tumor specimens, 2.8% (22/790) had excessive DNA degradation and could not be analyzed. *KRAS* mutations were detected in 40.6% (310/768) of the analysable specimens with 82.3% (255/310) of the mutations being located in codon 12 and 18% (55/310) in codon 13. Among 549 specimens in whom all three techniques were used, 15 (2.7%) cases of discordance between the three techniques were observed. In these discordant cases, the whole procedure (from DNA extraction) was systematically repeated. 47% of the discordances were due to PCR-RFLP, as revealed by a second analysis of the same sample, 36% to TaqMan PCR, 18% to HRM. From these results, in order to reduce the duration of *KRAS* mutation detection, HRM and TaqMan PCR are used as mutation detection techniques and PCR-RFLP only used in cases of discordance, helping to optimize the mutation detection delay that is a crucial point for the prescription of first line treatment in mCRC. Optimisation

of the routine procedure consisted of proceeding to systematic *KRAS* detection using HRM and TaqMan PCR and PCR-RFLP in case of discordance, and allowed significant decrease in delays.

Conclusions: The results obtained show an excellent correlation between the three techniques used. Using HRM and TaqMan PCR warrants high quality and rapid routine *KRAS* mutation detection in paraffin-embedded tumor specimens. Optimized routine *KRAS* mutation detection procedure consists of screening mutations with HRM and identification with TaqMan PCR, and using PCR-RFLP in case of discordance. This procedure allowed a significant decrease in delays for reporting results, enabling rational prescription of first line targeted therapy in mCRC.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cause of cancer and at least one million new cases are diagnosed every year (163). The World Health Organization estimates that 639 000 people die every year from clinical complications and metastasis of CRC(164).

The standard treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC) consists in the administration of the combination of different drugs such as 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin (LV) and oxaliplatin or 5-FU, LV and irinotecan. Targeted therapy agents such as bevacizumab (Avastin®), and cetuximab (Erbitux®) in first line and panitumumab (Vectibix®) in recurrent mCRC can now be used and improve the progression free survival of the patients.

Bevacizumab is a humanized monoclonal antibody directed against vascular endothelial growth factor (VEGF) (165). Several studies have reported benefits in tumor response rate (RR) and progression free survival (PFS) when bevacizumab was added to chemotherapy as 5-FU and LV, or LV/5-FU/oxaliplatin (FOLFOX) or LV/5-FU/irinotecan (FOLFIRI) (166). Serious side effects have been observed with this molecule such as bowel perforation and severe bleeding or arterial embolic events (166), which limits its prescription.

Cetuximab, a chimeric IgG1 immunoglobulin, has been the first epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor approved for the treatment of mCRC (166). The OPUS (FOLFOX 4 +/- cetuximab) and the CRYSTAL (FOLFIRI +/- cetuximab) trials have shown benefits for the patients with wild *KRAS* status for the cetuximab arms. In the OPUS and further trials, the RR was significantly higher for patients with wild-type *KRAS* in the FOLFOX 4 + cetuximab arm (61% vs. 37%; odds ratio = 2.54; $P = 0.011$) (114, 167). In the CRYSTAL trial, PFS was significantly longer for group with FOLFIRI + cetuximab (8.9 vs 8 months) and RR was significantly increased too (46.9% vs. 38.7%, $P = 0.005$). Adverse effects of cetuximab are limited to skin reactions, perionyxis and diarrhea (168).

Panitumumab is a fully human recombinant IgG2 monoclonal antibody which binds specifically and with high affinity to the extracellular domain of EGFR (169). Panitumumab has been first approved in monotherapy. In a phase III trial with 463 patients with EGFR-positive mCRC resistant to fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan, panitumumab plus best supportive care (170) was compared to BSC alone (171). In the panitumumab plus BSC arm, the RR was 10% vs 0% in the BSC alone arm ($p < 0.001$). The PRIME study investigated panitumumab plus FOLFOX 4 vs FOLFOX 4 alone as first-line treatment in mCRC patients. For wild-type *KRAS*, median PFS was 9.6 months for the arm with panitumumab and 8.0 months for FOLFOX 4 alone arm; median overall survival (OS) was 23.9 vs 19.7 months (172). Another phase III trial compared panitumumab plus FOLFIRI to FOLFIRI alone (173). For wild-type *KRAS*, median PFS was 5.9 months for the panitumumab plus FOLFIRI arm and 3.9 months for the FOLFIRI alone arm; median OS was 14.5 vs 12.5 months. As cetuximab, panitumumab is sometimes associated to serious adverse effects such as dermatological or ocular toxicities, hypomagnesaemia, diarrhea or infusion reaction (174).

The anti-EGFR monoclonal antibodies, cetuximab (Erbitux®) and panitumumab (Vectibix®) can be used, depending of the patient's *KRAS* status. It has been shown by several studies that *KRAS* mutations are a predictor of resistance to cetuximab or panitumumab therapies (86, 88, 90, 92, 98, 108-111, 115, 175, 176), which justifies that the use of cetuximab and panitumumab should be restricted for patients with wild-type *KRAS* tumor, according to the FDA and EMEA authorizations. About 35-40% of CRC carry mutations in this gene which occur early in colorectal carcinogenesis (104, 105). *KRAS* mutations cause RAS protein accumulation in an active state through intrinsic GTPase activity inhibition, which leads to the constitutive activation of the RAS/RAF/MAPK signalling pathway (103). Most of the *KRAS* mutations in colorectal cancer are located in exon 2 codon 12 and 13, and more rarely in codon 61 and 146 (117).

Although the EGFR signalling pathway is thought to play a central role in proliferation and malignant transformation, no correlation has been shown between EGFR expression and response to treatment. Furthermore, *EGFR* mutations are rare (<1%) in colorectal cancer (176) and had no influence on anti-EGFR response in mCRC and therefore cannot be used to predict the clinical response to anti-EGFR monoclonal antibodies. Based on this, it is now mandatory to use *KRAS* testing for the optimal selection of patients with mCRC likely to benefit from anti-EGFR monoclonal antibodies (177) and to avoid unworthy toxicities.

The introduction of targeted therapies i.e. anti-VEGF and anti-EGFR monoclonal antibodies, have substantially enriched the therapeutic options in mCRC and long term survival (>48 months) can now be achieved in approximately one third of the patients (178). In addition, improvement of the rate of resectability of metastases after conversion chemotherapy results in cure for numerous patients (179). Therefore, the selection of first line therapy in mCRC is crucial and must be individualized according to the treatment strategy, the patient tumor biology and the toxicity associated with each therapeutic option. As far as the tumor biology is concerned, the main difference between anti-VEGF and anti-EGFR introduction in first line therapy is actually the health authorities regulatory restriction of the prescription of the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab to wild type *KRAS* tumor patients. Until now, no molecular diagnostic has been required for the prescription of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab. Based on this, routine *KRAS* mutation detection plays a major role and it is obvious that the choice between these two first lines therapeutic options must be made by the oncologists in relation with the patients' need in a rationale way i.e. with all decision making data being available, and not by default because *KRAS* mutation detection results are not available at the time of initiation of the first line therapy.

Although mandatory, there is no standardized method for *KRAS* mutation testing. Sequencing is often considered as the "gold standard" but has been reported to suffer from a lack of specificity and sensitivity (180), justifying extensive evaluation of alternative techniques for routine *KRAS* detection analysis.

The aim of this study conducted in Alexis Vautrin Cancer center, was to establish a rapid, robust and sensitive *KRAS* mutations determination routine procedure in order to provide reliable results to the oncologists with the shortest delay, contributing to the best care providing to the patients. Some hypotheses regarding the quality on the tumour tissue specimens are also discussed. Thus we compared High Resolution Melting (59) analysis, Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR RFLP) and TaqMan PCR techniques for determination of *KRAS* mutations, then we crossed our data with the literature and we finally evaluate the impact of the techniques on the delay between analysis prescription by the oncologist and the result reporting.

PATIENTS AND METHODS

Study population

A total of 790 paraffin-embedded biopsies and resection specimens have been collected from academic and private pathology laboratories for routine *KRAS* status assessment in the Alexis Vautrin Cancer Center from january 2008 to december 2009. Of the 790 samples, 682 were from colorectal primitive tumors (86.3%) and 97 from metastatic site (12.3%). This information was not available for 11 samples. The sex ratio M/F was 1.43 and the median age was 65.1 years.

DNA extraction

Tumor specimens were macrodissected after hematoxylin-eosin slide analysis by a pathologist to ensure a minimum of 20% tumor tissue content as recommended by Bibeau et al. (181) (Fig.1). Five 10µm-thick serial sections were cut from each paraffin block and collected in Eppendorf® vials. DNA isolation was performed using the QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) protocol. Briefly, paraffin was removed by extraction with toluene and centrifuged. The pellet was then washed with ethanol, centrifuged and resuspended with 180µL of tissue lysis buffer (buffer ATL, Qiagen) and 20µL of proteinase K. The sample was gently mixed, incubated at 56°C for 1h and 90°C for 1h under agitation. DNA was extracted with MinElute Columns (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The nucleic acids were eluted in a volume of 100µL and diluted to have a final concentration of 20ng/µL. DNA extracts from cell lines bearing G12S (A549), G12V (SW620) and G13D (LoVo) *KRAS* mutations as well as anonymous DNA from patients with G12R, G12C, G12D and G12A mutations were used as positive controls. DNA extracted from WiDr cell line was used as wild type negative control.

TaqMan PCR

The presence of the 7 most common *KRAS* mutations in mCRC (codon 12: G12D, G12V, G12C, G12S, G12A, G12R; codon 13: G13D) was determined by TaqMan allelic discrimination assay according to Lievre et al. (86). Specific probes for each allele (mutated and nonmutated alleles) were labelled respectively with the fluorescence reporter dyes FAM and VIC at their 5'-end. Reactions were performed in 5µL comprising 20ng of DNA using 384 well plates (Roche Diagnostics, Meylan, France), specific primers and probes, and TaqMan Mutation detection Master Mix (Applied Biosystems). DNA was then submitted to the following cycle conditions: 95°C for 10 minutes; 40 cycles, 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Data were analyzed with LC480 software (Roche Diagnostics). All assays were performed in duplicate.

High Resolution Melting (59) Analysis

HRM analysis was performed using the LC 480 HRM Master kit (Roche Diagnostics) and 384 well plates (Roche Diagnostics) according to Krypuy et al. (182). 40µg of DNA was amplified in a final volume of 18µL by using the following: 10µL of Master Mix HRM LC480, 2µL of $MgCl_2$, (25 mM), 1µL of primers (4µM) (Eurogentec, Seraing, Belgium), 2µL of water. DNA was then submitted to the following cycle conditions: initial denaturation at 95°C for 10 minutes followed by 45 cycles of 10 seconds at 95°C, 15 seconds at 67°C and 10 seconds at 72°C. For the HRM melting profile, samples were denatured with an initial hold of 1 minute at 95°C and 1 minute at 40°C and a melting profile from 65°C to 95°C with a ramping degree of 0.02°C/second. All assays were performed in duplicate.

PCR-RFLP

A two-step PCR-RFLP was performed according to Schimanski (183) as previously described (184, 185). Briefly, 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. The first digest (2 µl) was used as template for the second PCR in which primer RAS C (antisense; 5'-GGATGGTCCTCCACC AGTAATATGGATATTA-3') was used instead of RAS B. Second PCR product (7µl) was digested with either BstXI or XcmI. The digest product (10µl) was submitted to 4% agarose gel stained with ethidium bromide and analyzed under UV light (GelDoc EQ, Bio-Rad).

Statistics

Significance of the concordance of mutation detection with different methods was assessed by κ statistics. The χ^2 test was used to compare mutation frequencies within data or with those obtained from literature. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

KRAS somatic mutation detection was assessed for routine diagnostic in a blinded fashion using TaqMan PCR (777 cases), HRM (692 cases) and PCR-RFLP (779 cases) assays (Fig.2). PCR-RFLP provided 4.7% of non interpretable results, 3.0% for TaqMan PCR and 5.2% for HRM (Table 1). Overall, among the 790 tumor specimens, 2.8% (22/790) remained non interpretable, even combining the results of the 3 techniques, because of excessive DNA degradation.

A crossover comparison of these three methods yielded κ values exceeding 0.9 (P <0.001), showing an excellent correlation between the three techniques used (Table 2). Among 549 specimens in whom all three techniques were used, 15 (2.7%) cases of discordance between the three techniques were observed. In these discordant cases, the whole procedure (from DNA extraction) was systematically repeated. Mutated samples, detected as non mutated samples were considered as false positive. Non mutated samples, detected as mutated samples were considered as false negative. 47% of the discordances were attributable to PCR-RFLP, as revealed by a second analysis of the same sample, 36% to TaqMan PCR, 18% to HRM. Overall, the mean percentages of discordant results per method revealed that HRM analysis had the lowest percentage of discordant results (0.5% including 0.3% false positive and 0.2% false negative results), followed by TaqMan PCR (0.9% including 0.9% false positive and 0.0% false negative results), and PCR-RFLP (1.2% including 0.1% false positive and 1.1% false negative results) (Table 1).

Among the 754 interpretable cases, TaqMan PCR revealed 304 cases (40.3%) with mutation in either codon 12 (82.9%) or codon 13 (17.1%) (Fig.3). Mutations were distributed as follows: 112 cases in G12D (14.9%), 79 cases in G12V (10.5%), 20 cases in G12C (2.7%), 21 cases in G12A (2.8%), 16 cases in G12S (2.1%), 4 cases in G12R (0.5%), and 52 in G13D

(6.9%). Among the 656 interpretable cases, HRM revealed 267 *KRAS* mutations (40.7%) (Fig.3). PCR-RFLP revealed 299 out of 742 interpretable cases (40.3%) with *KRAS* mutations, among which 247/299 (82%) were located in codon 12 and 52/299 (18%) in codon 13 (Fig.3). Overall, as well as for each technique, all mutations frequencies were compared with data extracted from the Sanger Cosmic data base (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/) and were found to be fully consistent with the reference frequencies (χ^2 test non significant for all the data). A comparison of mutations frequencies between resections and biopsies revealed no significant difference, as already evidenced by Weichert et al. (186) (Fig.4) (χ^2 test).

Optimisation of the routine procedure consisted of proceeding to systematic *KRAS* detection using HRM and TaqMan PCR instead of simultaneous use of HRM, TaqMan PCR and PCR-RFLP. The use of PCR-RFLP was restricted to discordant cases (Fig.5). This new operating procedure allowed to significantly reduce the reporting delay from 10.5 ± 7.0 days to 8.5 ± 3.3 days (P<0.001), corresponding to a 19% decrease.

DNA quality

2.7% of the samples provide non interpretable (NI) results. 66% of the NI results come from 5% of pathology laboratories; the percentage of non interpretable results could even reach 20% for the same laboratory (data not shown). In a given pathology laboratory, NI results range from 0% to 100% by pathologist, which suggests the pre-analytical steps (paraffin embedding and fixation) could be responsive for DNA degradation. Among discordant results, 30% are provided by these 5% laboratories. This may suggest that the pre-analytical step could be responsive for increased false positive patients. However, no significant

difference was found when comparing the frequency of *KRAS* mutations between pathology laboratories (data not shown).

DISCUSSION

Determination of *KRAS* status before prescription of anti-EGFR therapy is now mandatory for patients with metastatic colorectal carcinoma (mCRC). The rational selection of the 1st line individualized therapy between anti-EGFR therapy and anti-VEGF therapy is only possible if the patient benefits of tumor mutation detection, whereas without *KRAS* status determination, the therapeutic choice would be done by default. This improvement of the personalized management implicates that the oncologist should be provided with reliable results within delay that is consistent with the clinical management of the patient. Therefore the optimization of *KRAS* mutations analysis for prescription of cetuximab and panitumumab in mCRC needs rapid and robust molecular biology techniques. However, validated methods and standardized testing procedures are lacking. Here we report a comparison between three methods for *KRAS* mutation detection: HRM, TaqMan PCR and PCR RFLP. These methods are found to be equivalent; however, HRM seems to be more accurate as already shown by Weichert et al (186) and represents a fast method for scanning somatic sequence alterations (187). HRM sensitivity is close to 100% (187-189), but should be coupled with another technique to allow the identification of the mutations located in codons 12 and 13, e.g. 98% of *KRAS* mutations (122), in accordance with European *KRAS* Quality Assurance Program (176). Thus, the use of Taqman PCR allows mutations identification and is reliable and sensitive (86, 190, 191). In our study, no false negative was detected when compared to other techniques. Moreover, Taqman PCR method is fast and cost-effective, and allows simultaneous use with HRM. This simultaneous analysis allows mutation detection and identification in all the samples and improves sensitivity of the approach, contrary to some other approaches only screening mutations with HRM coupled with sequencing in mutated samples.

Mutations located in codons 61 and 146 are less frequent and their detection is not mandatory before anti-EGFR antibodies prescription, although prevalence of these mutations is higher than some of the mutations in codon 12 (116, 117, 192). Since functional consequences on RAS protein could be different of codons 12 and 13 mutations, the clinical implication of these mutations remained unclear until recently (112, 176). However, recent studies emphasize the negative impact of these mutations on the response rates to anti-EGFR monoclonal antibodies (117, 118) and might highlight the need for simultaneous detection of mutations in codons 12, 13, 61 and 146 using, for example, multiplex amplification of exons 2, 3 and 4, as proposed by several authors (193, 194).

In our institute, the new procedure consisting in using HRM and TaqMan PCR in all specimens and to restrict the use of PCR RFLP to discordant cases was found to significantly reduce the delay of result reporting, but also to improve the accuracy. Combining three mutation detection techniques greatly reduces the probability to get false negative or false positive result. The alternative approach consisting in systematically repeating the whole procedure (195) (e.g. confirmation of *KRAS* mutations by 2 independent analyses) would lead to increases of the reporting delay, consuming of tumor sample and would probably not overcome the lack of sensitivity or specificity of a single method. However, TaqMan PCR, HRM and PCR RFLP need further validation, in accordance with European *KRAS* Quality Assurance Program (176).

This study also emphasized that the pre-analytical procedure needs to be strictly controlled since DNA degradation was found to be the main cause of late reporting of the results, and is responsible for an over cost when repeating the analysis. Moreover these samples are also unusable for other genetic tests. One possible cause of DNA degradation is Bouin fixation, but also the fixation time, as evidenced by Inoue et al. (107) who demonstrated that if the

samples are fixed in 10% non-buffered formalin for 1 day, 100% of samples show successful PCR, while only 44% of samples show successful PCR when fixed for 2-3 days. In addition, several recent studies reported that paraffin embedding and fixation procedures may induce nucleotide changes and potentially affects the results of the analysis through generation of uracil and hypoxanthine, leading to artifactual C>T and G>A transitions (196, 197). Therefore, the pre-analytical steps should be optimized and controlled in order to warrant the quality of nucleic acids.

Beside fixation, the step of macrodissection has been reported to be highly critical (198-200). According to the authors, the detection rates of mutations clearly decreased with the percentage of tumor cells, and the limit of 20% of tumor material seems to be critical, with a dramatic increase of the risk of false negative results. In our study, every samples were macrodissected in order to ensure a minimum of 20% of tumor material, and the percentages of each mutations were found to be fully consistent with literature data (116).

Follows the question of samples with low cellularity (particularly in the case of neo adjuvant treatment); some authors recommend that a biopsy should be always dedicated to molecular biology before treatment, or to replace the step of macrodissection by laser microdissection (199).

To conclude, the present study emphasizes the fact that *KRAS* mutations analysis in mCRC needs quality control procedures from pre-analytical to analytical steps. Our experience using HRM and TaqMan PCR in routine shows that reporting delays suitable with the oncologist expectation could be achieved and enable rational, fully documented, selection of first line therapy in mCRC. However, with only approximately 50% of the patients responding to anti-EGFR monoclonal antibodies, it should be kept in mind that *KRAS* status has a poor positive predictive value (115). This emphasizes the need for additional response predictive markers to improve the selection of potential responders among wild-type patients (127, 181).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was performed within the framework of the “Plateformes de Génétique Moléculaire INCa, Région Lorraine”. The authors are grateful to the French Ligue Contre le Cancer, Comités Lorrains” and to all academic and private pathologists for providing tumor specimens and to V. Harter for helpful collaboration.

TABLE LEGENDS

Table 1: Non interpretable results and discordances for PCR-RFLP, TaqMan PCR and HRM. An analysis of the percentages of discordant results per method revealed that HRM analysis had the lowest percentage of discordant results (0.56%), followed by TaqMan PCR (0.94%), and PCR-RFLP (1.31%).

Table 2 : Crossover comparison of mutation frequency as determined by PCR-RFLP, PCR Taqman and HRM: κ values exceed 0.9 (P <0.001), showing an excellent correlation between the three techniques used.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Macrodissection step to ensure a minimum of 20% tumor tissue content. **A, B and C:** hematoxylin-eosin slide with selected area **(B)** containing more than 20% tumor cells. **D and E:** macrodissection step.

Figure 2: A: *KRAS* mutation analysis using PCR-RFLP. DNA extracts from tumor samples were submitted to double PCR amplification after *Bst*XI and *Xcm*I enzymatic digestion allowing discrimination of codon 12 and 13 mutations. Codon 12 and 13-mutated cell lines (SW620 and LoVo cell lines respectively) were used as positive controls. WiDr cell line was used as non mutated control and water were used as negative controls. **B:** Example of codon 12 *KRAS* mutation detection using TaqMan PCR. Left panel represents amplification control (VIC). Right panel represents G12S mutation detection (FAM). A549 cell line was used as

G12S mutated control. **C:** Example of codon 12 *KRAS* mutation detection using HRM. SW620 cell line was used as codon 12 mutated control. WiDr cell line was used as non mutated control.

Figure 3: Comparison of mutation frequency as determined by the different detection methods. Overall as well as for each technique, all mutations frequencies were compared with average data from the Sanger Cosmic data base and were found to be fully consistent with the theoretical frequencies (χ^2 test non significant for all the data).

Figure 4: Comparison of mutation frequencies in resections and biopsies. No significant difference was evidenced (χ^2 test).

Figure 5: Operating procedure with systematic **(A)** or conditional **(B)** RFLP analysis. The new operating procedure **(B)** allows a significant reduction of delays for providing the results to the oncologist.

Table 1

	PRC-RFLP		TaqMan PCR		HRM	
Non interpretable	37/742	**(4.7%)**	23/754	**(3.0%)**	36/656	**(5.2%)**
False positive	1/747	**(0.1%)**	7/754	**(0.9%)**	2/656	**(0.3%)**
False negative	8/747	**(1.1%)**	0/754	**(0.0%)**	1/656	**(0.2%)**

Table 2

	HRM	**TaqMan PCR**
PCR-RFLP	n = 638 κ = 0.935 *P* < 0.001	n = 745 κ = 0.916 *P* < 0.001
HRM		n = 674 κ = 0.935 *P* < 0.001

Figure 1

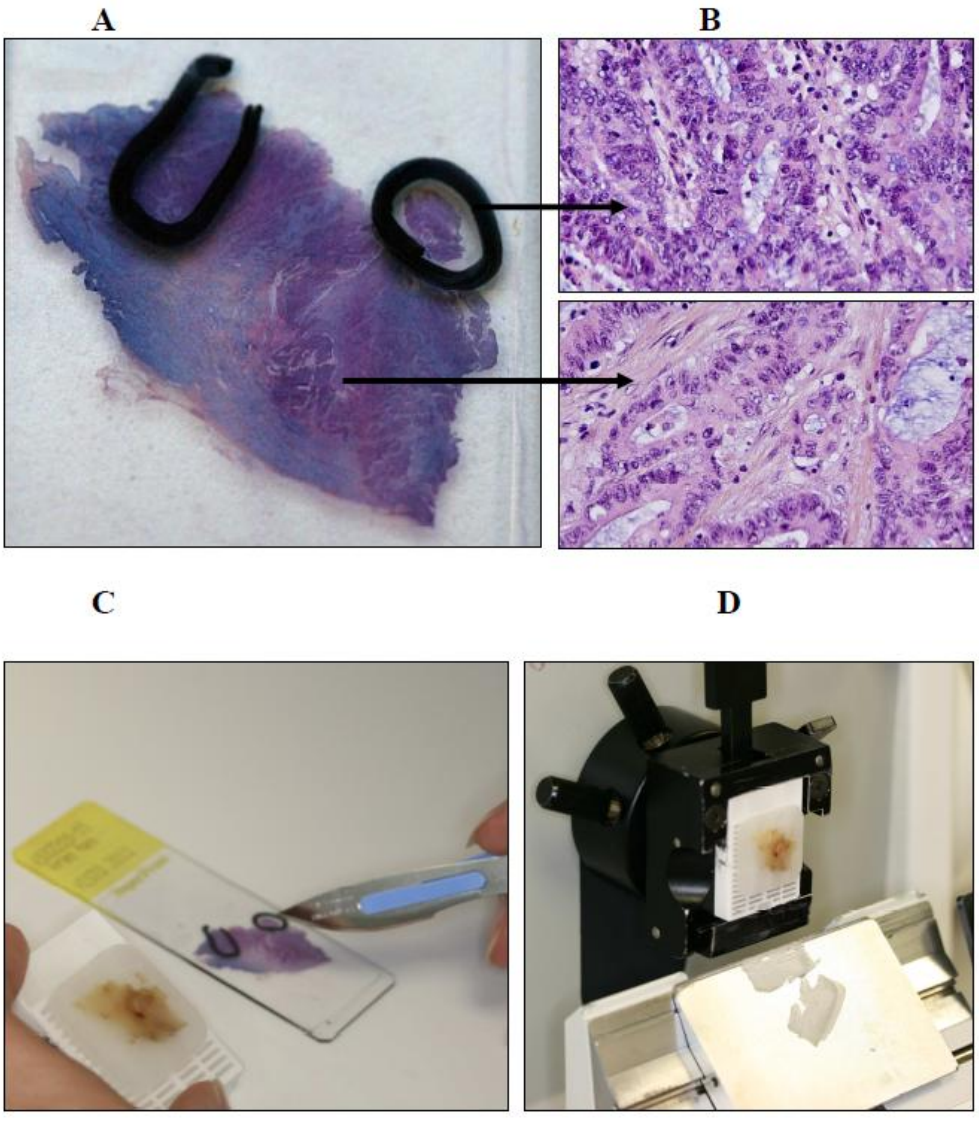


Figure 2

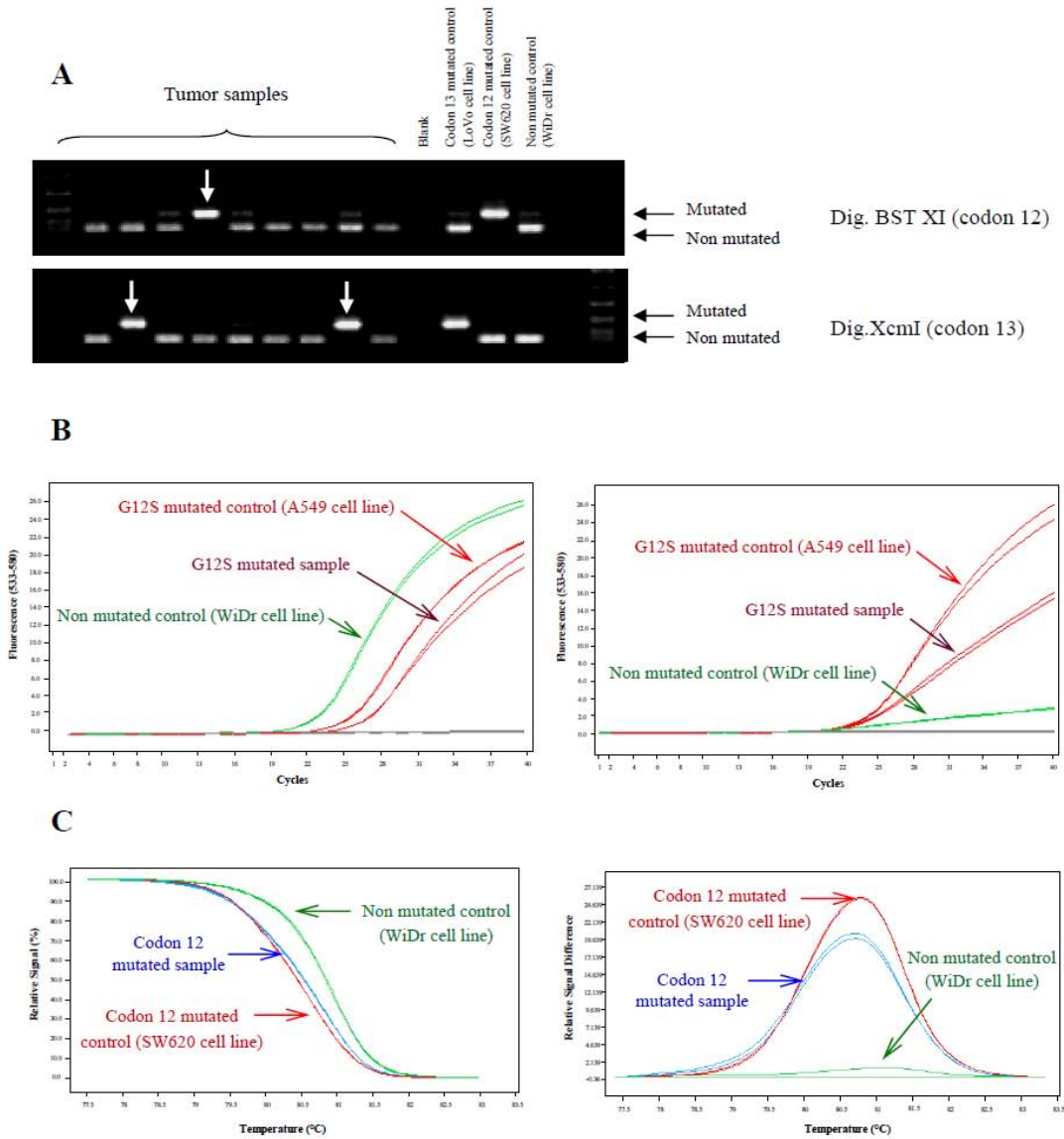

A
Tumor samples
Blank
Codon 13 mutated control (LoVo cell line)
Codon 12 mutated control (SW620 cell line)
Non mutated control (WiDr cell line)
Mutated
Non mutated
Dig. BST XI (codon 12)
Mutated
Non mutated
Dig.XcmI (codon 13)
B
G12S mutated control (A549 cell line)
G12S mutated sample
Non mutated control (WiDr cell line)
Fluorescence (533-580)
Cycles
G12S mutated control (A549 cell line)
G12S mutated sample
Non mutated control (WiDr cell line)
Fluorescence (533-580)
Cycles
C
Non mutated control (WiDr cell line)
Codon 12 mutated sample
Codon 12 mutated control (SW620 cell line)
Relative Signal (%)
Temperature (°C)
Codon 12 mutated control (SW620 cell line)
Codon 12 mutated sample
Non mutated control (WiDr cell line)
Relative Signal Difference
Temperature (°C)

Figure 3

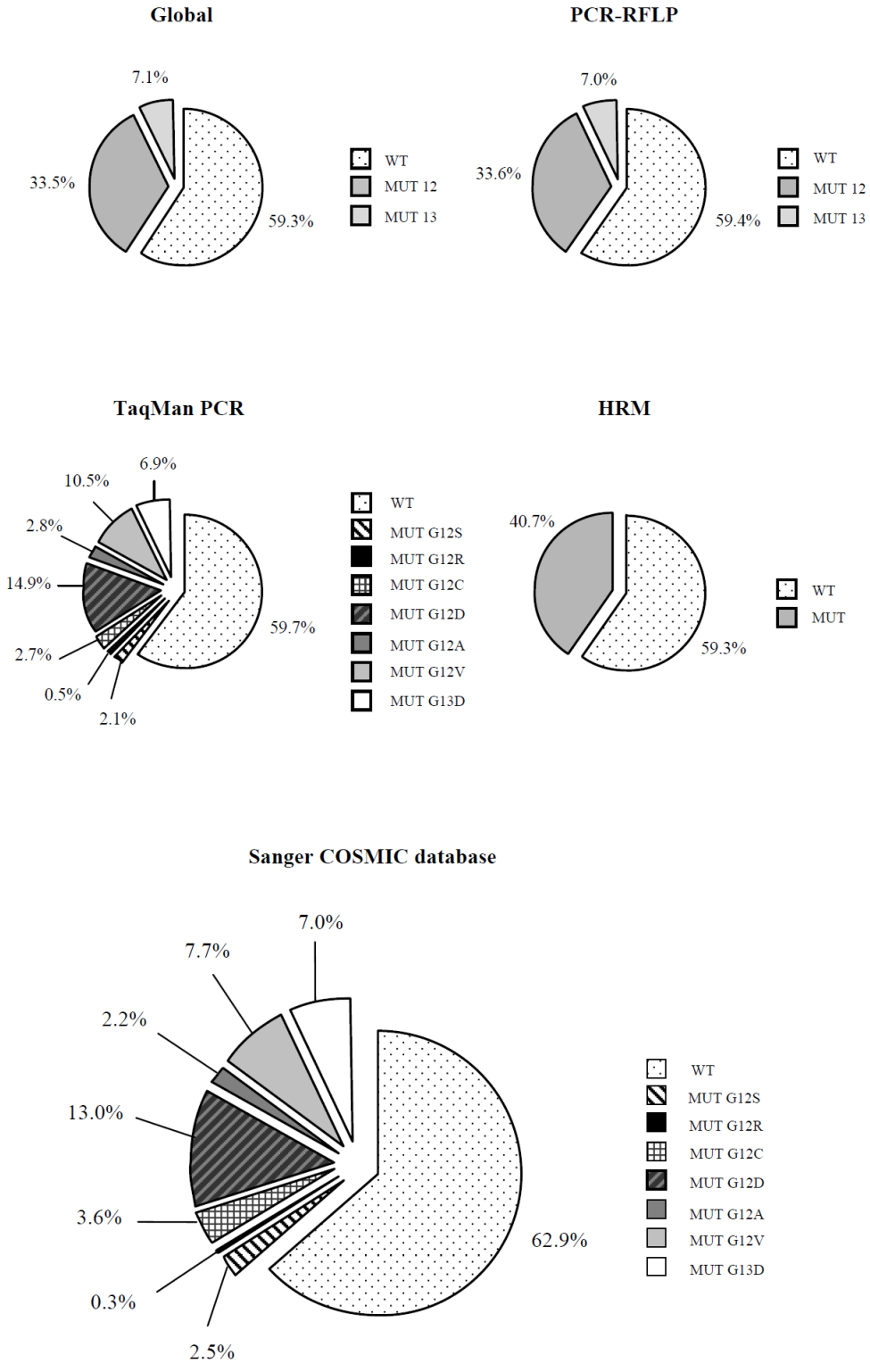

Global
7.1%
33.5%
59.3%
WT
MUT 12
MUT 13
PCR-RFLP
7.0%
33.6%
59.4%
WT
MUT 12
MUT 13
TaqMan PCR
6.9%
10.5%
2.8%
14.9%
59.7%
2.7%
0.5%
2.1%
WT
MUT G12S
MUT G12R
MUT G12C
MUT G12D
MUT G12A
MUT G12V
MUT G13D
HRM
40.7%
59.3%
WT
MUT
Sanger COSMIC database
7.0%
7.7%
2.2%
13.0%
3.6%
0.3%
2.5%
62.9%
WT
MUT G12S
MUT G12R
MUT G12C
MUT G12D
MUT G12A
MUT G12V
MUT G13D

Figure 4

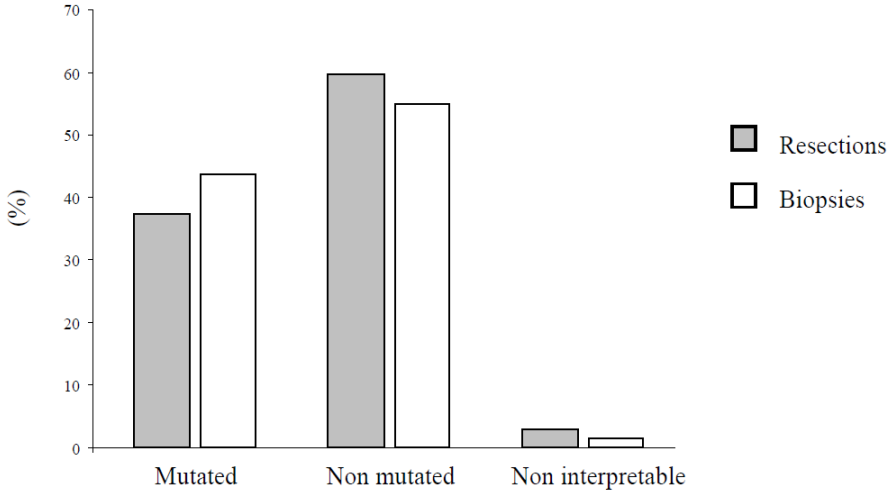
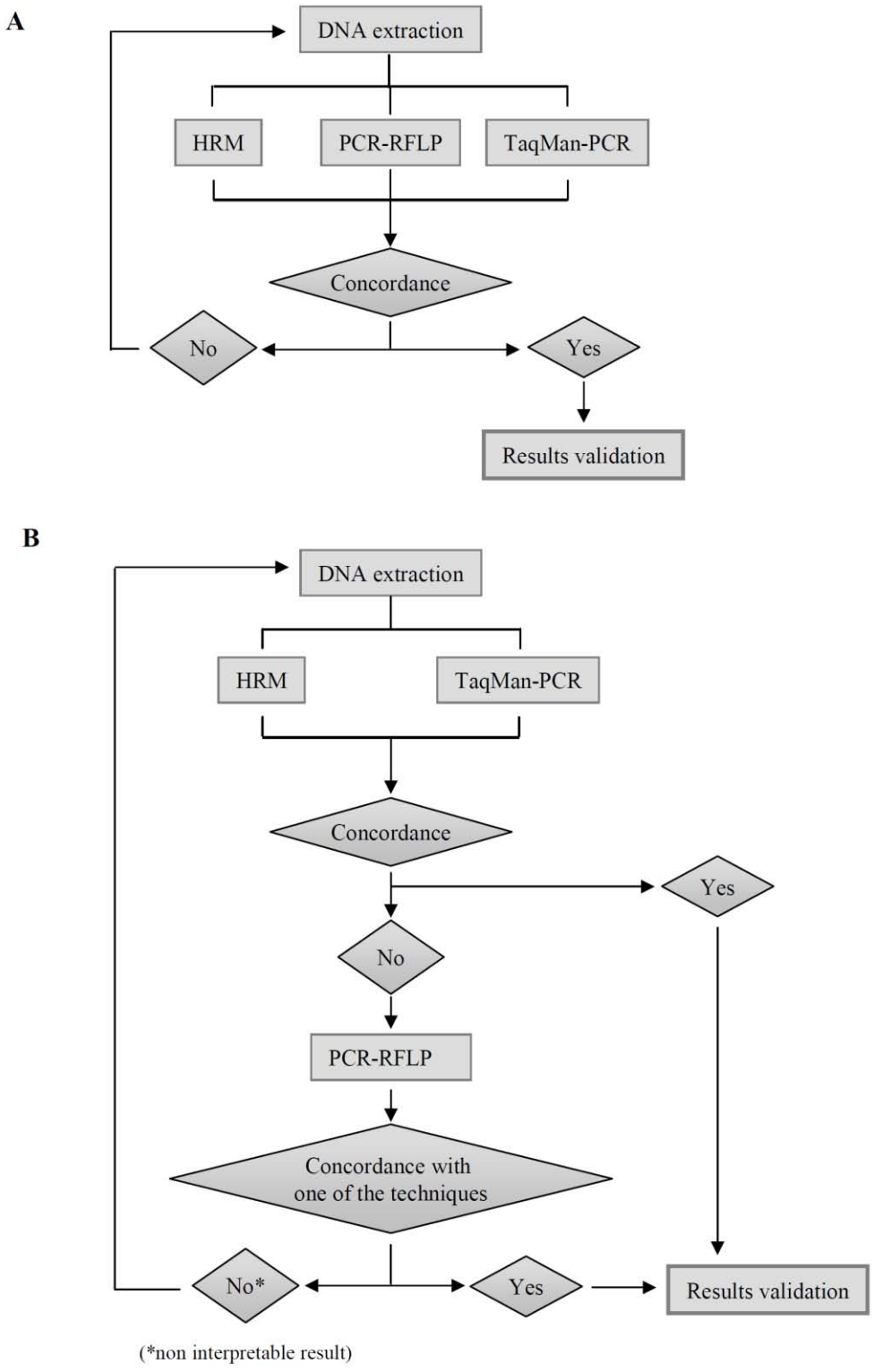

70
60
50
40
30
20
10
0
(%)
Mutated
Non mutated
Non interpretable
Resections
Biopsies

Figure 5


A
DNA extraction
HRM
PCR-RFLP
TaqMan-PCR
Concordance
No
Yes
Results validation
B
DNA extraction
HRM
TaqMan-PCR
Concordance
Yes
No
PCR-RFLP
Concordance with
one of the techniques
No*
Yes
Results validation
(*non interpretable result)

REFERENCES

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R and others. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 26(10):1626-34.

Bardelli A, Siena S. 2010. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J Clin Oncol 28(7):1254-61.

Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. 2007. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. Cancer Res 67(6):2643-8.

Bibeau F, Frugier H, Crapez E, Lamy P, Ychou M, Boissière-Michot F. 2010. KRAS mutation testing in patients with metastatic colorectal carcinoma: An 18-month experience emphasizing the risk of false-negative results. J Clin Oncol. (Suppl 20; abstr 3572).

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C and others. 2009. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 27(5):663-71.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, Zampino M, Donea S, Ludwig H, Zubel A, Koralewski P. 2007. Cetuximab plus 5-FU/FA/oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): OPUS, a randomized phase II study. J Clin Oncol. (Suppl 20; abstr 4035).

Bouali S, Chretien AS, Ramacci C, Rouyer M, Becuwe P, Merlin JL. 2009. PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells. Oncol Rep 21(3):731-5.

Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, Chai C, Lu HC, Hsu NC, Chang JG. 2009. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. BMC Cancer 9:179.

Cidon EU. 2010. The challenge of metastatic colorectal cancer. Clin Med Insights Oncol 4:55-60.

De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. 2005. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. Mutat Res 573(1-2):111-35.

De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, Kalogeras KT, Kotoula V, Papamichael D, Laurent-Puig P and others. 2010. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol 11(8):753-62.

De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y and others. 2008. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol 19(3):508-15.

Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboue R, Tuech JJ and others. 2007. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. Br J Cancer 96(8):1166-9.

Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. 2008. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. BMC Cancer 8:142.

Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, Greenman C, Davies H, Dalgliesh G, Forbes S and others. 2006. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol Ther 5(8):928-32.

Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, Francois E, Formento P, Renee N, Laurent-Puig P, Chazal M, Benchimol D, Delpero JR and others. 2008. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. Clin Cancer Res 14(15):4830-5.

Fadhil W, Ibrahem S, Seth R, Ilyas M. 2010. Quick-multiplex-consensus (QMC)-PCR followed by high-resolution melting: a simple and robust method for mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. J Clin Pathol 63(2):134-40.

Fakih M, Vincent M. 2010. Adverse events associated with anti-EGFR therapies for the treatment of metastatic colorectal cancer. Curr Oncol 17 (Suppl 1:S18-30).

Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61(5):759-67.

Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. Nature Medicine 9(6):669-676.

Forbes S, Clements J, Dawson E, Bamford S, Webb T, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Wooster R, Futreal PA and others. 2006. Cosmic 2005. Br J Cancer 94(2):318-22.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. 2007. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. Br J Cancer 97(8):1139-45.

Gallegos Ruiz MI, Floor K, Rijmen F, Grunberg K, Rodriguez JA, Giaccone G. 2007. EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded versus frozen specimens. Cell Oncol 29(3):257-64.

Gibson NJ. 2006. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta 363(1-2):32-47.

Gonzalez-Bosquet J, Calcei J, Wei JS, Garcia-Closas M, Sherman ME, Hewitt S, Vockley J, Lissowska J, Yang HP, Khan J and others. 2011. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. PLoS One 6(1):e14522.

Inoue T, Nabeshima K, Kataoka H, Koono M. 1996. Feasibility of archival non-buffered formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for PCR amplification: an analysis of resected gastric carcinoma. Pathol Int 46(12):997-1004.

J. Selves DG, R. Guimbaud, K. Gordien, S. Valmary, E. Delabesse, M. Danjoux, E. Tournier, S. Kirzin, P. Brousset. 2010. Impact of the amount of tumor cells in tissue samples for detection of KRAS mutations in colorectal cancer. J Clin Oncol. (Suppl 20; abstr 3571).

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer Statistics, 2010. CA Cancer J Clin.

Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ and others. 2007. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N Engl J Med 357(20):2040-8.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S and others. 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med 359(17):1757-65.

Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK and others. 2007. Expression of epiregulin and

amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. J Clin Oncol 25(22):3230-7.
Kobunai T, Watanabe T, Yamamoto Y, Eshima K. 2010. The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: a comparison between direct sequencing and real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 395(1):158-62.
Kohne CH. 2010. How to integrate molecular targeted agents in the continuum of care. Ann Oncol 21 (Suppl 7:vii134-vii139).
Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, Grothey A, Vauthey JN, Nagorney DM, McWilliams RR. 2009. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. J Clin Oncol 27(22):3677-83.
Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. 2006. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. BMC Cancer 6:295.
Lamy A, Blanchard F, Le Pessot F, Houlle S, Bossut J, Di Fiore F, Sesboüé R, Sabourin J. 2010. Metastatic CRCs KRAS genotyping in routine diagnosis: Results and pitfalls. J Clin Oncol (Suppl 20; abstr 294).
Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lievre A, Landi B, Boige V and others. 2009. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. J Clin Oncol 27(35):5924-30.
Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouche O, Landi B, Louvet C and others. 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol 26(3):374-9.
Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M and others. 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res 66(8):3992-5.
Lievre A, Blons H, Laurent-Puig P. 2010. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. Oncogene 29(21):3033-43.
Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, Papadimitriou CA, Murray S. 2008. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol 9(10):962-72.
Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, Masi G, Stasi I, Canestrari E, Rulli E and others. 2009. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 101(4):715-21.
Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. 2009. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. Nat Rev Clin Oncol 6(9):519-27.
Peeters M, Cervantes-Ruiperez A, Strickland A, Ciuleanu T, Mainwaring PN, Tzekova VI, Santoro A, Johnson CW, Zhang A, Gansert JL. 2010. Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFIRI versus FOLFIRI alone as second-line treatment (tx) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis by tumor epidermal growth factor receptor (EGFR) staining. J Clin Oncol (Suppl 20; abstr 282).
Perkins G, Lievre A, Ramacci C, Meatchi T, de Reynies A, Emile JF, Boige V, Tomasic G, Bachet JB, Bibeau F and others. 2010. Additional value of EGFR downstream

signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. Int J Cancer 127(6):1321-31.
Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. 1993. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. J Natl Cancer Inst 85(24):2004-7.
Rouleau E, Spyratos F, Dieumegard B, Guinebretiere JM, Lidereau R, Bieche I. 2008. KRAS mutation status in colorectal cancer to predict response to EGFR targeted therapies: the need for a more precise definition. Br J Cancer 99(12):2100.
Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G and others. 2008. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. Oncologist 13(12):1270-5.
Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. 1999. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. Cancer Res 59(20):5169-75.
Selves J, Grand D, Guimbaud R, Gordien K, Valmary S, Delabesse E, Danjoux M, Tournier E, Kirzin S, Brousset P. Impact of the amount of tumor cells in tissue samples for detection of KRAS mutations in colorectal cancer; 2010. J Clin Oncol.
Siena S, Peeters M, Van Cutsem E, Humblet Y, Conte P, Bajetta E, Comandini D, Bodoky G, Van Hazel G, Salek T and others. 2007. Association of progression-free survival with patient-reported outcomes and survival: results from a randomised phase 3 trial of panitumumab. Br J Cancer 97(11):1469-74.
Siena S, Tabernero J, Cunningham D, Koralewski P, Ruff P, Rother M, Johnson CW, Zhang A, Gansert JL, Douillard J. 2010. Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFOX4 compared to FOLFOX4 alone as first-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC): PRIME trial analysis by epidermal growth factor receptor (EGFR) tumor staining. J Clin Oncol. (Suppl 20; abstr 283).
van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Flejou JF, Plato Hansen T, de Hertogh G and others. 2008. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. Virchows Arch 453(5):417-31.
Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J, Stenzinger A, Joos H, Landt O, Heiser V and others. 2010. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. J Mol Diagn 12(1):35-42.
Wittwer CT. 2009. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. Hum Mutat 30(6):857-9.
Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. 2001. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. Crit Rev Oncol Hematol 38(1):17-23.

CHAPITRE V

Evaluation intégrative de la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR

Application à la prédiction de la réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique

---

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent-Puig (Hopital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris) et a déjà fait l'objet d'une publication (181). Cette partie propose un mode d'interprétation des données par une approche multidimensionnelle, l'analyse en composante principale.

INTRODUCTION :

Le cancer colorectal est une des premières causes mondiales de mortalité par cancer. En Europe, le nombre de décès s'élève à 212 000 cas en 2008 (201). La diminution de mortalité au cours de la dernière décennie peut être attribuée au dépistage et à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique. La médiane de survie des patients atteints de cancer colorectal métastatique inclus dans des essais thérapeutiques est passée d'approximativement 6 mois à 2 ans (79). Cette augmentation peut s'expliquer par deux avancées dans la prise en charge des patients: la première est l'introduction de nouvelles molécules dont les agents biologiques, ainsi qu'une meilleure sélection des patients. La seconde est l'approche multidisciplinaire du cancer colorectal métastatique, avec une amélioration des techniques de résection, en particulier des métastases hépatiques (79).

Le traitement standard des patients atteints de cancer colorectal métastatique inclut une fluoropyrimidine en association à l'irinotécan ou à l'oxaliplatine et une molécule ciblant EGFR (cétuximab ou panitumumab) ou un inhibiteur de l'angiogenèse (bévacizumab).

Comme nous l'avons vu précédemment, actuellement, le seul marqueur prédictif de réponse aux anticorps anti-EGFR est le statut mutationnel *KRAS*, qui présente une valeur prédictive positive (VPP) élevée mais une valeur prédictive négative (VPN) insuffisante. C'est pourquoi il est nécessaire de mettre en évidence d'autres marqueurs complémentaires du statut *KRAS* afin d'améliorer la sélection des patients candidats à une thérapie par anticorps anti-EGFR.

Les approches les plus fréquentes pour tenter de mettre en évidence des sous-groupes de patients susceptibles de répondre aux anticorps anti-EGFR utilisent la présence ou l'absence de mutations de gènes impliqués dans la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR. Cependant la présence ou l'absence de mutation ne reflète pas systématiquement l'expression ou la fonctionnalité des protéines codées par ces gènes. En effet des phénomènes épigénétiques tels que la méthylation ou l'acétylation de l'ADN, et des modifications post traductionnelles telles que la phosphorylation sont susceptibles d'influencer la fonctionnalité des protéines. C'est pourquoi nous avons choisi dans cette étude de nous baser sur les niveaux d'expression des formes phosphorylées, c'est-à-dire fonctionnelles, des protéines de signalisation des voies RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT.

L'interprétation des jeux de données issus de systèmes biologiques complexes peut nécessiter l'utilisation d'outils mathématiques particuliers. En effet, la possibilité de réaliser *a posteriori*, au sein d'un essai, des analyses par sous-groupes est souvent et à juste titre critiquée : ces analyses peuvent entraîner une augmentation du risque de faux-positifs (inflation du risque alpha) et de faux-négatifs (manque de puissance dans les petits sous-groupes). Elles sont très fréquemment réalisées, mais ne peuvent ainsi qu'être exploratoires et indicatives, donnant des pistes pour de futurs essais.

Ici nous proposons l'utilisation de l'analyse en composante principale (ACP) pour l'exploitation des données. L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode d'analyse de données faisant partie du groupe des méthodes exploratoires multidimensionnelles, également appelées méthodes factorielles. Les méthodes factorielles sont des méthodes descriptives qui ne s'appuient pas sur un modèle probabiliste mais dépendent d'un modèle géométrique (202). Elles permettent, entre autres, de classer les populations en sous-groupes, et de prédire l'appartenance d'individus à des groupes.

L'ACP permet de réduire la dimensionnalité d'un jeu de données quantitatives, tout en conservant au mieux la variabilité présente dans ce jeu de données et de faire la synthèse de l'information contenue dans un grand nombre de variables (203).
Cet outil permet également de :

- mettre en évidence des tendances
- décrire de façon synthétique les relations entre les variables
- étudier les structures de liaisons linéaires sur l'ensemble des variables considérées
- déterminer les relations entre les variables étudiées, et voir si ces relations sont vérifiées pour tous les éléments du groupe
- faire émerger une structure, non connue *a priori* au sein d'un groupe
- distinguer des sous-populations
- détecter des points aberrants ou des individus au comportement original dans un ensemble de données d'après un grand nombre de paramètres (202-205).

Jolliffe propose un exemple simple pour illustrer l'utilisation de l'ACP dans la détection de valeurs aberrantes (204). En effet une valeur aberrante est simple à mettre en évidence dans un jeu de données, par représentation graphique ; cette valeur se distingue parfaitement des autres valeurs et se repère visuellement. Si l'on considère maintenant 2 paramètres, le poids et

la taille d'enfants de 5 à 15 ans, et que l'un des sujets présente une taille de 175 cm et un poids de 25 kg : ces valeurs sont tout à fait cohérentes avec les valeurs du jeu de données. En revanche la combinaison 175cm/25kg n'est pas conforme à la corrélation globale du jeu de données observées. Ce résultat est visuellement évident, mais ne l'est plus lorsque le nombre de variables est élevé, et il est possible qu'aucun point n'apparaisse aberrant de manière évidente (204).

L'ACP permet donc de synthétiser les données en construisant de nouvelles variables, les composantes principales (205). Par exemple, si on considère deux variables A et B correspondant au niveau d'expression de deux phosphoprotéines, toutes deux appartenant au réseau de kinases de signalisation intracellulaire en aval d'EGFR. Puisque ces protéines fonctionnent en réseau, leur niveau d'expression est globalement corrélé. On représente les individus chez qui on a évalué ces niveaux d'expression dans un repère à 2 dimensions, A en abscisses (x) et B en ordonnées (y). On obtient un nuage de points, et il existe des individus pour lesquels cette corrélation ne se vérifie pas (Figure 17 A).

On trace une droite D (qui correspond sous certaines conditions à la droite de corrélation entre A et B). Cette droite est notre première composante principale. On trace alors une seconde droite D' perpendiculaire à D, et décrivant au mieux le nuage de points dans sa largeur. D' est notre seconde (et dernière) composante principale. D' représente les individus pour lesquels les niveaux d'expression de A et de B sont moins bien corrélés. Les équations de chaque droite D et D' sont les combinaisons linéaires de variables A et B.
On effectue alors un changement de repère ; les droites D et D' deviennent les axes (x') et (y') en remplacement des axes (x) et (y). Le long de l'axe (x') vont donc se répartir les points pour lesquels les corrélations entre A et B sont fortes, et le long de l'axe (y') vont se répartir les points pour lesquels les corrélations entre A et B sont faibles. La détection des valeurs aberrantes se fait donc classiquement sur les dernières composantes principales (ici y') (Figure 17 B).

Pour résumer, les derniers axes obtenus par analyse en composante principale sont les axes permettant de décrire des phénomènes très décorrellés, contrairement aux premiers axes qui mettent en évidence les corrélations fortes entre différents paramètres (204).

L’ACP n’est qu’une méthode descriptive que nous couplons ici à une méthode de classification, l’analyse discriminante linéaire. La projection orthogonale des points sur le dernier axe permet d’obtenir une valeur numérique appelée score d’analyse discriminante linéaire ou score LDA (Linear Discriminant Analysis) (Figure 17 C). Plus les paramètres A et B sont décorrélés pour un individu, et plus ce score LDA sera élevé.

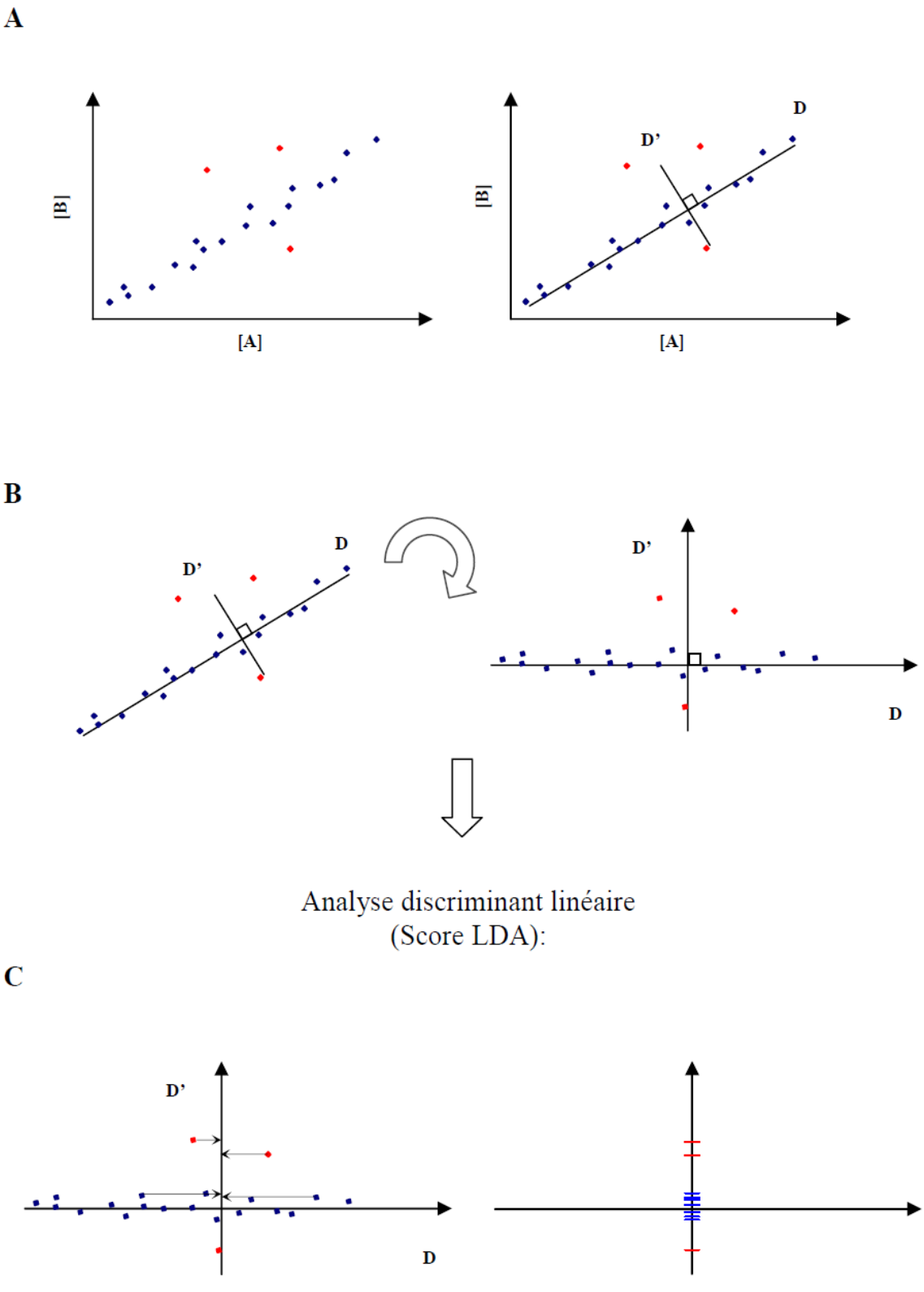


Figure 17 : Principe de l'analyse en composante principale (ACP) couplée à l'analyse discriminante linéaire (53). **A:** Une première droite D correspond à la droite de corrélation entre les paramètres A et B. Une seconde droite D' correspond à la perpendiculaire à D. **B:** Un changement de repère est réalisé: D et D' deviennent les nouveaux axes également appelés "composantes principales". **C:** Analyse discriminante linéaire: la projection orthogonale des points sur D' permet l'obtention d'un score, le score LDA.

Objectif de l'étude

Le but de cette étude est d'évaluer la fonctionnalité des protéines de signalisation en aval d'EGFR dans des échantillons de tumeurs de patients atteints de cancer colorectal métastatique non porteurs de mutation *KRAS* et de mettre en relation ce paramètre avec la réponse clinique aux anticorps monoclonaux anti-EGFR.

PATIENTS ET METHODES

Patients

Des échantillons tumoraux congelés de 45 patients (âge moyen : 61,4 ans) présentant un adénocarcinome colorectal métastatique traité par cétuximab (n=44) ou panitumumab (n=1) ont été analysés. L'analyse de l'expression d'EGFR a été réalisée par immunohistochimie et considérée comme positive si au moins 1% des cellules tumorales étaient marquées (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA or Dako, Glostrup, Denmark). Cette étude rétrospective a été réalisée en accord avec les lois d'éthique.

Le traitement anti-EGFR a été administré en seconde, troisième, quatrième ou cinquième ligne dans 19, 17, 5 et 3 cas respectivement. Deux patients ont reçu du cétuximab en première ligne sans chimiothérapie. La médiane de suivi est de 11,3 mois. La réponse tumorale est évaluée par tomodensitométrie et selon les critères RECIST. Dans cette étude, les patients présentant une réponse complète (CR) ou partielle (PR) au traitement sont considérés comme répondeurs, et les patients présentant une maladie stable (SD) ou en progression (PD) sont considérés comme non répondeurs aux anti-EGFR.

Génotypage *KRAS*, *BRAF* et *PIK3CA*

L'ADN est extrait des échantillons tumoraux obtenus avant traitement. Le statut *KRAS* est déterminé rétrospectivement par PCR TaqMan de l'exon 2 (codons 12 et 13) et vérifié par séquençage. Les mutations *BRAF V600E* sont également recherchées par PCR TaqMan. Les mutations *PIK3CA* sont mises en évidence par séquençage direct. Toutes les mutations somatiques mises en évidence on fait l'objet d'une confirmation par une nouvelle amplification indépendante et par séquençage.

Phosphoprotein array

Les niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation de la voie des PI3K/AKT (pAKT, pP70S6K et pGSK3β) et des RAS/RAF/MAPK (pERK1/2, pMEK1 et pP90SRK), ainsi que pEGFR et pP38MAPK, sont analysés en multiplex par Bio-Plex® phosphoprotein array comme décrit précédemment (chapitre III).

Méthodes de classification :

Les variables (pAKT, pGSK3β, pP70S6K, pMEK1, pERK1/2, pP38MAPK, pP90RSK et pEGFR) sont centrées et réduites. Une ACP est réalisée (logiciel R) est suivie de la détermination du score d'analyse discriminante linéaire ou score LDA (Linear Discriminant Analysis), compris entre 0 et 1. Une limite à 0,5 est fixée et correspond au barycentre des 2 sous-populations. Les patients sont alors classés en 2 groupes en fonction de ce score (>0,5 ou <0,5).

La classification est ensuite validée en appliquant l'algorithme de leave-one out : l'analyse est répétée 22 fois (autant qu'il y a de patients). La première analyse est réalisée sur 21 patients, le 22ème patient est classé en fonction des résultats obtenus avec les 21 premiers, et ainsi de suite. La prédiction de réponse ainsi obtenue est alors comparée à la réponse clinique évaluée par les critères RECIST.

Analyse statistique :

Un test de Mann Whitney est utilisé pour la comparaison des scores LDA. L'influence des critères retenus sur la survie globale et la survie sans progression est évaluée un test du log-rank. Un résultat est considéré comme significatif si $P < 0,05$.

Analyse en composante principale (ACP) et analyse discriminante linéaire (LDA)

Le pouvoir discriminant des 8 axes obtenus par ACP a été testé. Seul le 7ème axe est discriminant et sera retenu pour la suite de l'analyse. Les paramètres qui composent majoritairement ce 7ème axe sont les niveaux d'expression des phosphoprotéines pGSK3β (46,1%) et pP70S6K (48,2%). Cependant la prise en compte de la totalité des données est nécessaire à l'obtention d'une classification correcte.

Les scores LDA calculés lors des 22 analyses sont détaillés dans la figure 18 et se répartissent entre les valeurs 0 et 1. Les patients sont ici représentés en fonction de leur score LDA et de la réponse clinique selon les critères RECIST (en bleu les patients ayant présenté une réponse clinique partielle ou complète au traitement (patients répondeurs); en rouge les patients ayant présenté une stabilisation ou une progression de la maladie sous traitement (patients non répondeurs)).

Le score LDA moyen est significativement plus bas chez les patients répondeurs que chez les patients non répondeurs aux anti-EGFR (respectivement 0,36±0,32 *vs* 0,77±0,28, $P = 0,003$). Les patients présentant une mutation activatrice de la voie de signalisation des MAPK (mutation *BRAF V600E* ou *PIK3CA*) sont identifiés sur la figure 18. Tous les patients (4/4) présentant l'une des ces mutations activatrices présentent un score LDA élevé (>0,5). Un de ces patients présentant un score LDA élevé ainsi qu'une mutation activatrice *PIK3CA*, a tout de même présenté une réponse partielle au traitement par cétuximab.

Qualité de classement

Parmi les 22 patients *KRAS* sauvages traités par anti-EGFR, 50% des patients (11/22) ont présenté une réponse (partielle ou complète) au traitement, et 50% (11/22) une stabilisation ou progression de la maladie sous traitement.
Parmi les patients *KRAS* sauvages présentant un score LDA bas (<0,5), 88,9% (8/9) ont présenté une réponse partielle ou complète au traitement. Parmi les patients *KRAS* sauvages

présentant un score LDA élevé (>0,5), 76,9% (10/13) présentaient une stabilisation ou une progression de la maladie sous traitement. Le tableau 11 résume les qualités de classement des 45 patients inclus dans cette étude en fonction de leur statut *KRAS* (tableau 11A) ou de la combinaison du statut *KRAS* et du score LDA (tableau 11B).

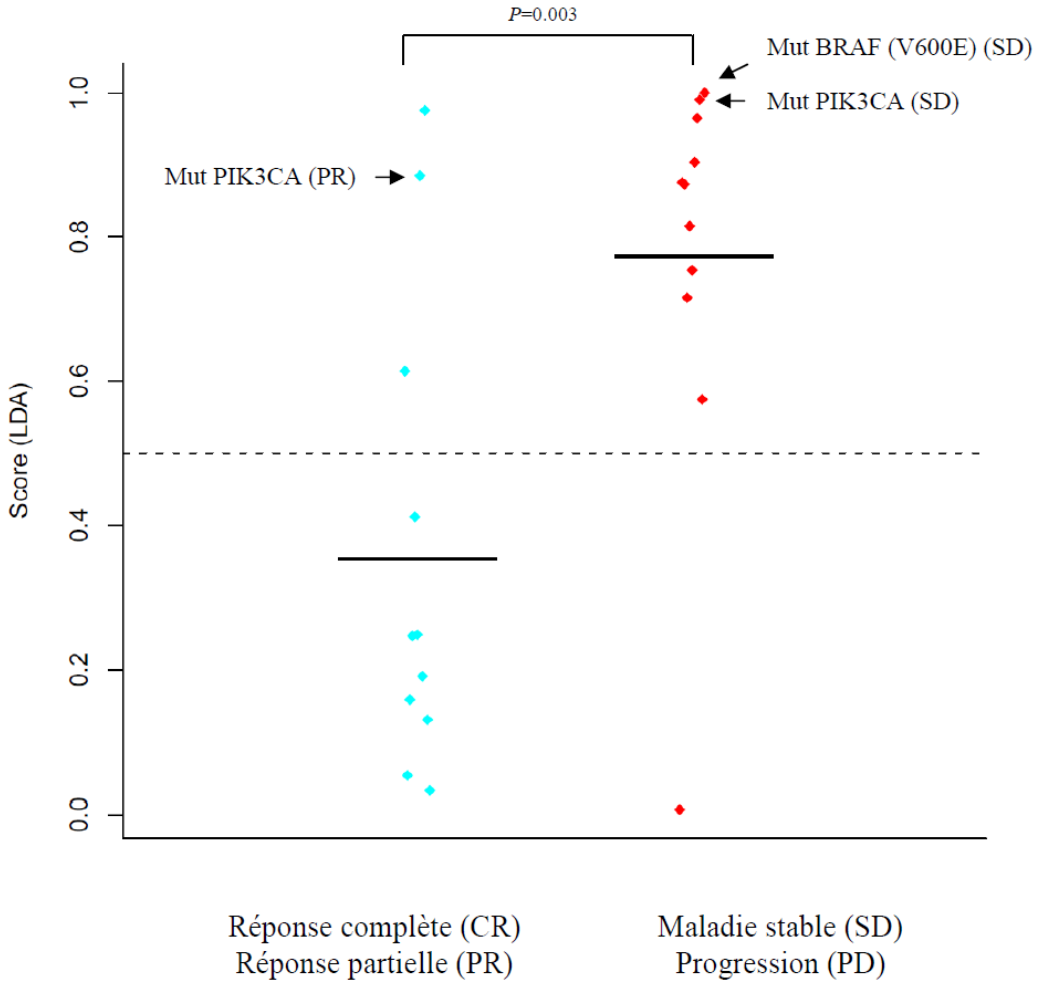


Figure 18 : Score LDA (Linear Discrimination Analysis) obtenu par ACP (Analyse en Composante Principale) réalisée sur les niveaux d'expression de pAKT, pGSK3β, pP70S6K, pMEK1, pERK1/2, pP38MAPK, pP90RSK et pEGFR. Le seuil est fixé à 0,5 et correspond au barycentre des deux sous-populations. La différence est significative entre les scores des 2 sous-populations *(P*= 0,003). ◆ Patients ayant présenté une réponse clinique partielle ou complète au traitement (patients répondeurs). ■ Patients ayant présenté une stabilisation ou une progression de la maladie sous traitement (patients non répondeurs).

Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives

Le tableau 12 compare les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative des deux approches, c'est-à-dire le statut *KRAS* ou le statut *KRAS* combiné au score LDA. Le statut *KRAS* seul présente une spécificité de 100% et une valeur prédictive positive de 100%. En revanche, la sensibilité et la valeur prédictive négative sont faibles (respectivement 68% et 50%).

Tableau 12 : Classification des patients en répondeurs (réponse partielle (PR) ou complète (CR)) ou non répondeurs (maladie stable (SD) ou progression (PD)) aux thérapies anti-EGFR. Le tableau A nous donne les résultats du classement en fonction du statut *KRAS*. Le tableau B représente les résultats obtenus en combinant le statut *KRAS* et le score LDA. Le tableau C compare les sensibilité, spécficité, valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN) des deux approches.

A

		Réponse		
		SD PD	CR PR	Total
Statut *KRAS*	mut	23	0	23
	NM	11	11	22
	Total	34	11	45

B

	Réponse		
	SD PD	CR PR	Total
KRAS mut ou NM+ score LDA >0.5	33	3	36
KRAS NM + score LDA <0.5	1	8	9
Total	34	11	45

C

	Statut *KRAS*	Score LDA + Statut *KRAS*
Sensibilité	68%	97%
Spécificité	100%	73%
VPP	100%	92%
VPN	50%	89%

La combinaison du statut *KRAS* et du score LDA diminue la spécificité (73%) ainsi que la valeur prédictive positive (92%) mais augmente la sensibilité (97%) ainsi que la valeur prédictive négative (89%). Parmi les 22 patients *KRAS* sauvages traités par anti-EGFR, 11 patients ont présenté une réponse au traitement, et 11 patients une stabilisation ou une progression de la maladie.

Survie globale et survie sans progression

La figure 19 compare la survie sans progression (19A) et la survie globale (19B) des patients *KRAS* mutés, des patients *KRAS* sauvages présentant un score LDA élevé et des patients *KRAS* sauvages présentant un score LDA bas.

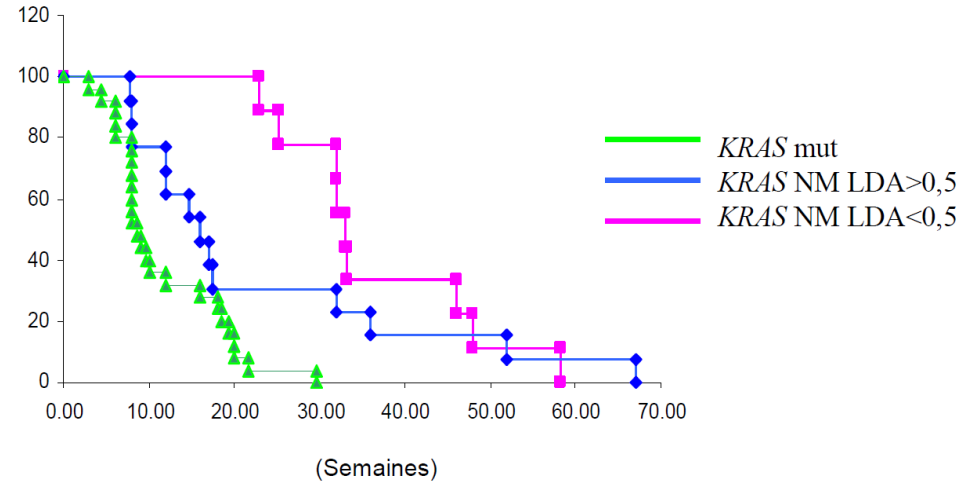
La médiane de survie sans progression des patients *KRAS* mutés est significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA élevé (respectivement 8,6 ± 6.6 semaines *vs* 16,0 ± 18,6 semaines (P = 0,0187) et 33,0 ± 11,6 semaines (P < 0,0001)) (Figure 19A).

En ce qui concerne la survie globale, les patients *KRAS* mutés présentent une médiane de survie qui n'est pas significativement différente de celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA élevé (respectivement 7.8 ± 5.0 mois *vs* 9.6 ± 12.3 mois (P = 0,125) et 21.0 ± 6.9 mois (P = 0,0007)) (Figure 19B).

DISCUSSION - CONCLUSION

L'analyse en composante principale (ACP) représente une approche potentiellement adaptée à l'étude de systèmes complexes tels que les réseaux de protéines de signalisation, et à la mise en évidence de biomarqueurs diagnostiques (206) ou encore de marqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées (207-209). Cette méthode présente l'avantage de minimiser les risques de surapprentissage sur de petites séries de données. En ce qui concerne la réponse aux thérapies anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique, ces résultats préliminaires permettent de classer des patients non mutés *KRAS* en répondeurs (réponse

A Survie sans progression en fonction du statut *KRAS* et du score LDA



B Survie globale en fonction du statut *KRAS* et du score LDA

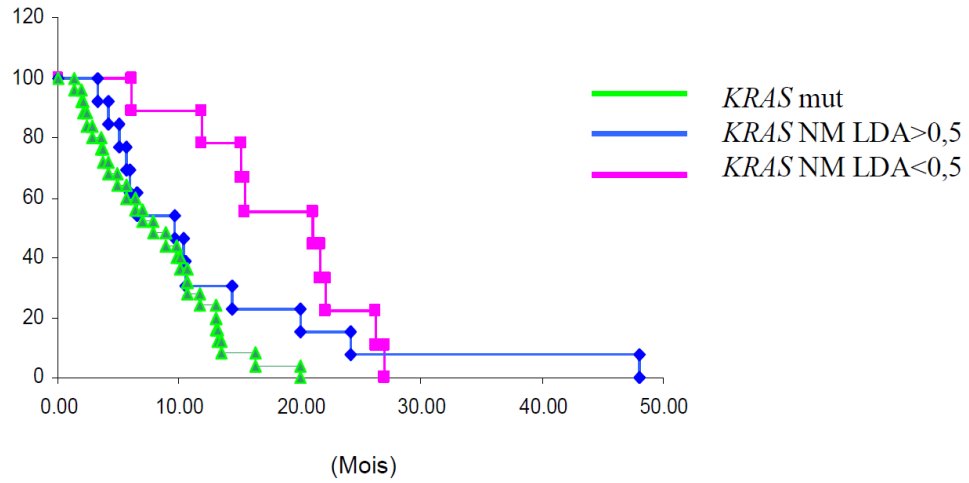


Figure 19: A: La médiane de survie sans progression des patients *KRAS* mutés est significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA élevé (respectivement 8.6 ± 6.6 semaines *vs* 16.0 ± 18.6 semaines ($P = 0.0187$) et 33.0 ± 11.6 semaines ($P < 0.0001$)).

B: Survie globale: les patients *KRAS* mutés présentent une médiane de survie globale qui n'est pas significativement différente de celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA bas, et significativement plus basse que celle du groupe *KRAS* sauvage + score LDA élevé (respectivement 7.8 ± 5.0 mois *vs* 9.6 ± 12.3 mois ($P = 0.125$) et 21.0 ± 6.9 mois ($P = 0.0007$)).

partielle ou complète) ou non répondeurs (stabilisation ou progression de la maladie) aux thérapies anti-EGFR (cétuximab et panitumumab) dans 82% des cas, en fonction des données issues de paramètres représentatifs de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval du récepteur à l'EGF. La valeur prédictive négative de la combinaison du statut *KRAS* et du score LDA est augmentée, en revanche la valeur prédictive positive est diminuée. Ceci pose la question de la priorité à donner lors du développement d'un biomarqueur entre la sensibilité et la spécificité.

Ces résultats suggèrent l'importance de la fonctionnalité de signalisation en aval d'EGFR et l'intérêt potentiel de l'évaluation des niveaux d'expression des kinases de signalisation chez les patients à même de bénéficier d'une thérapie ciblant EGFR. Ces résultats doivent cependant être validés par une seconde série de données. Cette étape de validation est en cours. Les applications potentielles de cette approche permettraient d'adapter les traitements anti-EGFR aux caractéristiques biologiques des tumeurs et pourraient ainsi diminuer le risque d'administrer aux patients des traitements inefficaces et potentiellement toxiques.

Les perspectives d'amélioration de ce modèle portent sur l'intégration d'autres paramètres biologiques tels que les niveaux d'expression de PTEN, ou encore des paramètres mutationnels tels que les mutations de gènes codant des protéines de la voie des MAPK (mutation *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, mutations de *KRAS* hors codons 12 et 13) ou de la voie des PI3K telles que les mutations *PIK3CA*. D'autres paramètres tels que les polymorphismes des récepteurs FCγ, également impliqués dans la réponse au cétuximab (11) pourraient représenter un moyen d'augmenter la puissance de prédiction de ce modèle, de même que la surexpression de l'amphiréguline et de l'épiréguline, qui seraient également prédictifs de la réponse aux anti-EGFR (98). A noter cependant que ces paramètres sont binaires (présence ou absence de mutation, présence ou absence de polymorphisme) et impliquent d'utiliser une ACP dite généralisée (également appelée analyse factorielle multiple) (210), c'est-à-dire applicable aux variables qualitatives et quantitatives.
D'autres approches comme la régression logistique, non abordées ici, sont également adaptées à ces données, mais nécessitent de binariser la totalité des données et ne prennent pas en compte la variabilité importante de certains niveaux d'expression des kinases de signalisation.

Enfin les approches les plus adaptées à ces questions biologiques sembleraient être les approches par séparateurs à vastes marges (SVM) (162, 211) ou encore par réseaux de

neurones. Ces approches étaient dans notre étude inutilisables en raison du faible effectif de notre population. En effet les risques de surapprentissage sont trop importants sur des effectifs de quelques dizaines de sujets.

La découverte de l'implication de la mutation *KRAS* dans la résistance aux anti-EGFR a marqué une étape importante dans la progression vers la médecine personnalisée des cancers colorectaux métastatiques. Il reste à développer de nombreux biomarqueurs, pour les anti-EGFR mais également pour les autres thérapies ciblées et les chimiothérapies cytotoxiques, tant dans le domaine des prédictions de réponse que dans le domaine des prédictions de toxicité.

Evaluation intégrative de la fonctionnalité de la signalisation en aval d'EGFR
Application à la prédiction de la réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR
dans le cancer colorectal métastatique

Chretien AS, Perkins G, Lievre A, Harter V, Laurent-Puig P, Merlin JL.

ESMO 2010
Ann Oncol 21 suppl 8, 2010 (abstr 589P)

RESUME

Introduction :
Les anticorps monoclonaux anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) comme le cétuximab et le panitumumab, sont indiqués dans le cancer colorectal métastatique. Le statut mutationnel *KRAS* est actuellement le seul biomarqueur prédictif de réponse aux thérapies ciblées validé pour la prescription d'anticorps monoclonaux anti-EGFR. Bien que ce paramètre présente une excellente valeur prédictive négative (prédiction de non-réponse) proche de 100%, sa valeur prédictive positive (prédiction de réponse) demeure faible, de l'ordre de 50%. Il apparait par conséquent nécessaire de mettre en évidence des biomarqueurs complémentaires du statut *KRAS* afin d'améliorer la sélection des patients à même de bénéficier d'une thérapie par cétuximab ou panitumumab.

Patients et méthodes :
Des échantillons tumoraux congelés provenant de 45 patients (âge moyen: 61.4 ans) présentant un adénocarcinome colorectal métastatique prouvé par histologie et traités par cétuximab ou panitumumab ont été analysés. Des mutations de *KRAS* ont été détectées chez 23 (51%) patients. Parmi les 22 patients dont les tumeurs étaient dépourvues de mutations *KRAS* (*KRAS* sauvages), l'expression des phosphoprotéines de signalisation appartenant à la voie des RAS/Raf/MAPK (pMEK1, pERK1/2, pP90RSK) et à la voie des PI3K (pAKT, pGSK3β, pP70S6K) ainsi que pP38MAPK et pEGFR ont été rétrospectivement analysées par

phosphoprotein array. Les patients ont ensuite été classés en 2 groupes par analyse en composante principale (ACP) suivie d'un classement par analyse discriminante linéaire (53), permettant d'attribuer un score à chaque patient compris entre 0 et 1, le seuil étant fixé à 0,5. Les proportions de patients répondeurs (réponse complète ou partielle) et non répondeurs (maladie stable ou progression) ont ensuite été évaluées dans chaque groupe.

Résultats :

Comparée au statut *KRAS*, l'ACP sur des données de phosphoprotéines présente une meilleure sensibilité (97 vs 68%) ainsi qu'une meilleure valeur prédictive positive (89 vs 50%), mais une spécificité et valeur prédictive négative plus basses (respectivement 73 vs 100% et 92 vs 100%). Les scores LDA sont significativement plus élevés chez les patients répondeurs (0.36±0.32) que chez les non répondeurs (0.77±0.28) (P=0.003), et permettent de prédire la réponse aux traitements chez 81% des patients *KRAS* sauvages contre 50% d'après le statut *KRAS*.

Conclusion:

Les approches par analyse multiparamétrique telles que l'ACP sont des approches qui pourraient permettre d'évaluer des combinaisons de biomarqueurs, et sont particulièrement adaptées aux problèmes de résistance aux thérapies ciblées puisque leur mécanisme d'action implique des systèmes biologiques complexes. Ces résultats préliminaires mettent en évidence l'intérêt de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs à l'EGF pour prédire la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR.

Integrative evaluation of EGFR downstream signalling functionality to predict response to anti-EGFR monoclonal antibodies in *KRAS* wild-type mCRC

Anne-Sophie Chrétien[1], Geraldine Perkins[3,4], Astrid Lièvre[3,4,5], Valentin Harter[2], Pierre Laurent-Puig[3,4,5], Jean-Louis Merlin[1].

[1]Unité de Biologie des Tumeurs, [2]Unité d'épidémiologie et biostatistique, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, [3]Institut National de la Recherche et de la Santé Médicale (INSERM), UMR-S775, Paris, France
[4]Université Paris Descartes, Paris, France, [5]Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

INTRODUCTION

KRAS mutational status was shown to be a highly predictive marker for tumour response to anti-epidermal growth factor receptor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (cetuximab, panitumumab) in metastatic colorectal cancer (mCRC). However, *KRAS* status has a poor negative predictive value (NPV), which clearly suggests that additional mechanisms of resistance to EGFR inhibitors exist. Therefore, additional biomarkers are needed to further optimise the selection of *KRAS* wild-type patients for personalized targeted therapy.

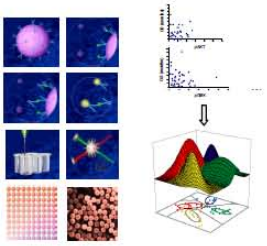
PATIENTS AND METHODS

- N= 45 patients (mean age: 61.4 years)
- histologically proven metastatic colorectal adenocarcinoma
- treated with either cetuximab or panitumumab
- *KRAS* mutations were detected in 23 (51%) patients.
- Retrospective analysis of expression of signaling phosphoproteins in 22 KRAS wild-type patients :
  - pEGFR
  - Ras/Raf/MAPK pathway (pMEK1, pERK1/2, pP90RSK)
  - PI3K/AKT pathway (pAKT, pGSK3β, pP70S6K)
  - pP38MAPK

- Response to anti-EGFR therapy was evaluated according to RECIST criteria

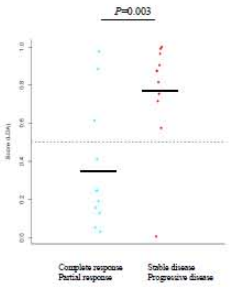
- Data analysis:

KRAS wild-type patients were blindly classified as responders (complete response or partial response) or non responders (stable disease or progressive disease) using principal component analysis (PCA) based on phosphoprotein expression, followed by a linear discrimination analysis (LDA). Quality of classification assessed by the leave-one-out method.



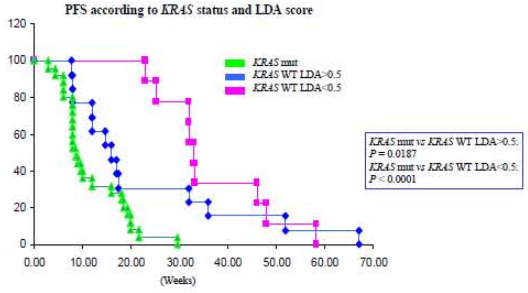
RESULTS

Patients classification according to LDA scores

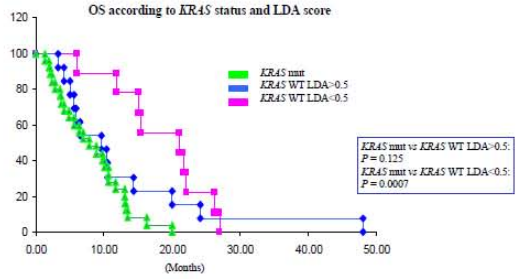


Linear Discrimination Analysis (LDA) scores following Principal Component Analysis (PCA) on the expression level of 8 phosphoproteins (pAKT, pGSK3β, pP70S6K, pMEK1, pERK1/2, pP38MAPK, pP90RSK et pEGFR) in 22 wild-type *KRAS* patients. The threshold (0.5) was determined as the barycenter of the 2 populations.
Mean LDA score : 0.36±0.32 vs 0.77±0.28, $P = 0.003$ (Mann-Whitney)

PFS according to *KRAS* status and LDA score



OS according to *KRAS* status and LDA score



Patients classification:

LDA score allows correct classification of patients as responders or non responders in 81% of cases (A), compared to 50% for WT KRAS status (B).



A

KRAS status	Response: SD PD	CR PR	Total
mut	23	0	23
WT	11	11	22
Total	34	11	45

B

	Response: SD PD	CR PR	Total
KRAS mut or WT+ PCA score >0.5	33	3	36
KRAS WT+ PCA score <0.5	1	8	9
Total	34	11	45

C

	KRAS status	PCA + *KRAS* status
Se	68%	97%
Sp	100%	73%
VPP	100%	92%
VPN	50%	89%

Patients classification using KRAS status (A), or a combination of KRAS status and LDA score among WT KRAS patients (B). Table C compares sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the two approaches.

CONCLUSION

Multiparameter analysis tools such as PCA are key approaches to evaluate multiple biomarkers. This is of particular concern with targeted therapies since their mechanism of action involves complex biological systems such as cell signaling. In this study, PCA and LDA analysis allows to predict 81% of responses to anti-EGFR therapy in wild-type *KRAS* patients. These preliminary results may emphasize the interest of integrative evaluation of EGFR downstream functionality as predictive marker of response to anti-EGFR therapy.

ACKNOWLEDGMENTS: Tchao Méatchi [3], Aurélien de Reynies [4], Jean-François Emile [5,6], Valérie Boige [7], Gorana Tomasic [7], Jean-Baptiste Bachet [5,6], Fréderic Bibeau [8], Olivier Bouché [9,10], Frédérique Penault-Llorca [11,12]

[1] Institut National de la Recherche et de la Santé Médicale (INSERM), UMR-S775, Paris, France [2] Université Paris Descartes, Paris, France [3] Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France [4] Programme Carte d'Identité des Tumeurs (CIT), Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France [5] Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France [6] Université de Versailles, Saint-Quentin-en-Yvelines, Versailles, France [7] Institut Gustave Roussy, Villejuif, France [8] Centre Val d'Aurelle Montpellier, France [9] CHU Reims, Hôpital Robert Debre, Reims, France [10] Université Reims Champagne-Ardenne, Reims, France [11] Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France 12 Université Auvergne, Equipe Associée EA4233, Clermont-Ferrand, France.

Financial support: Merck Serono - Ligue contre le cancer, Comités Lorrains

DISCUSSION GENERALE

Avec quelques exemples marquants en oncologie tels que l'expression d'HER2 et la réponse au trastuzumab dans le cancer du sein, les mutations de cKIT et la réponse à l'imatinib dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, ou encore les mutations de *KRAS* dans la réponse aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique, le développement de la recherche sur les biomarqueurs est actuellement en plein essor. Cependant, le nombre de biomarqueurs validés reste insuffisant, en particulier en ce qui concerne les biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées. La mise en évidence de ces marqueurs est pourtant nécessaire à une prise en charge des patients conforme à une démarche de médecine personnalisée. En effet, l'adaptation des traitements aux caractéristiques cliniques et histopathologiques n'est pas suffisante, et nécessite le recours à l'analyse des profils moléculaires tumoraux.

Les thérapies ciblées semblaient indiquées en cas d'expression de la cible tumorale. Si ceci se vérifie dans le cas de la surexpression du récepteur HER2 en rapport avec la réponse au traitement par trastuzumab dans le cancer du sein (104). En revanche, les limites de ce concept sont rencontrées dès l'utilisation du cétuximab, anti-EGFR pour lequel l'expression de la cible thérapeutique ne peut être mise en relation avec une réponse clinique (41, 44, 81-83). La mise en évidence de marqueurs prédictifs de réponse à une thérapie ciblée n'est donc pas un problème qui se résume à faire la preuve de la présence de la cible thérapeutique. Cette question est bien plus complexe et nécessite une compréhension fine des mécanismes d'action de ces nouvelles molécules.

Actuellement, la plupart des biomarqueurs validés, prédictifs de réponse aux thérapies ciblées, présentent de bonnes performances en termes de valeur prédictive négative. C'est le cas de la présence de mutation du gène *KRAS* impliqué dans la résistance au cétuximab et au panitumumab. Ces marqueurs sont cependant encore insuffisants en terme de valeur prédictive positive, c'est à dire pour prédire la réponse thérapeutique. Il est par conséquent nécessaire de les compléter par des marqueurs additionnels prédictifs de réponse afin de rationnaliser la prescription des thérapies ciblées. A terme, cette démarche doit permettre d'améliorer la prise en charge personnalisée des patients en fonction des caractéristiques moléculaires des tumeurs.

La première partie de ce travail a porté sur l'étude des mécanismes de résistance cellulaire au cétuximab. Ce travail a été réalisé *in vitro* sur un modèle cellulaire tumoral, la lignée PC3, porteuse de délétions de deux gènes suppresseurs de tumeurs, *PTEN* et *P53*. Les protéines PTEN et P53 sont impliquées dans la régulation de la signalisation en aval des récepteurs HER. PTEN régule négativement les voies des PI3K/AKT et des RAS/RAF/MAPK par inhibition de l'expression de PI3K (64). De même, il a été montré que la perte d'expression de P53 est responsable de l'activation de ces mêmes voies de signalisation. Le modèle cellulaire étudié ici présente donc une activation de ces voies de signalisation, ainsi qu'une résistance au cétuximab. La restauration de l'expression de PTEN, P53, ou de la co-expression simultanée de ces deux protéines permet de restaurer la sensibilité des cellules PC3 au cétuximab, objectivée par une augmentation significative de l'effet cytotoxique et du pourcentage de cellules en apoptose. Cet effet est corrélé à une diminution des niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation étudiées, pAKT, pP70S6K, pGSK3β (voie des PI3K/AKT) ainsi que pERK 1/2 (voie des RAS/RAF/MAPK).
Ces résultats ont permis de mettre en évidence la possibilité d'évaluer la fonctionnalité de la signalisation en aval des récepteurs HER par BioPlex® Phosphoprotein Array (BPA) *in vitro*. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus par Western Blot, considéré comme "gold standard". Associés à d'autres études réalisées au laboratoire (212, 213), ce travail permet d'envisager l'utilisation de cette approche dans la prédiction des résistances aux thérapies ciblées anti-HER en pratique clinique.

La transposition clinique des résultats obtenus dans cette première partie nécessite une phase de validation technique des méthodes de détection des phosphoprotéines par BPA sur échantillons de tumeur humaine. Cette étape de validation fait l'objet de la seconde partie de ce travail. Le BPA est une technique de détection des phosphoprotéines en multiplex, et permet la détection simultanée d'un grand nombre de protéines dans des échantillons de petite taille correspondant à des quantités de tissus obtenues par biopsie. L'étape de validation technique a permis de mettre en évidence une bonne corrélation avec les résultats obtenus par Western Blot pour toutes les phosphoprotéines étudiées (pAKT, pP70S6K, pGSK3β, pMEK1, pERK 1/2, pP38MAPK et pEGFR). De plus, la détection des phosphoprotéines de signalisation par BPA présente de bonnes performances en termes de reproductibilité et répétabilité. Elle est également peu coûteuse et rapide, et ne nécessite pas de disposer de grandes quantités de matériel tumoral, contrairement au Western Blot.

Cette approche présente également un avantage majeur : parmi les thérapies ciblées, de nombreuses molécules en cours de développement ciblent les voies de signalisation étudiées ici, qu'il s'agisse de stratégies d'inhibition des récepteurs ou des kinases de signalisation en aval de ces récepteurs. Ainsi les récepteurs HER2 sont préférentiellement ciblés dans les cancers du sein et de l'estomac, les récepteurs HER1 dans les cancers colorectaux, les cancers du poumon et des voies aérodigestives supérieures, et de nouveaux inhibiteurs de récepteurs HER sont en cours de développement et ciblent plusieurs types de récepteurs HER (inhibiteurs mixtes HER1/2, pan inhibiteurs de HER) ou plusieurs voies de signalisation en aval de ces récepteurs. L'approche que nous proposons ici reste valable, qu'il s'agisse d'une cible unique ou de cibles multiples, et que la cible soit le ligand, le récepteur ou un intermédiaire de signalisation intracellulaire, puisque l'ensemble des éléments impliqués dans la signalisation est pris en considération. Ceci est également potentiellement transposable à l'étude des mécanismes de résistance aux inhibiteurs d'autres récepteurs tels que IGF1R, activant les mêmes voies de signalisation que les récepteurs HER. Cette approche est donc transposable à l'étude des mécanismes de résistance au trastuzumab ou au lapatinib dans les cancers du sein, au cétuximab et au panitumumab dans les cancer colorectaux et ORL, à l'imatinib dans les GIST, mais également aux inhibiteurs de mTOR, de PI3K ou encore d'IGF1R en cours de développement.

Cependant, plusieurs limites s'imposent en ce qui concerne l'étude des phosphoprotéines sur des échantillons cliniques. La première concerne les problèmes de variabilité pré-analytique des échantillons. Souvent considérée comme une boite noire, elle est pourtant réelle et peut grandement influencer les résultats obtenus, particulièrement en ce qui concerne les ARNm et les épitopes labiles tels que les phosphoprotéines (214). En effet plusieurs variables per- et post-opératoires vont influencer la qualité du prélèvement, et en particulier l'hypoxie peropératoire ainsi que le temps d'ischémie froide. Rimm et al. ont montré sur des pièces opératoires d'utérus que le temps entre l'exérèse de la pièce et l'analyse peut faire varier les niveaux d'expression des phosphoprotéines, notamment en ce qui concerne les niveaux d'expression de pAKT, pEGFR, pERK, pGSK et pP38MAPK (215). Ceci s'explique par la grande sensibilité de ces protéines aux phosphatases. pP70S6K est cependant moins sensible que les autres phosphoprotéines, et serait même insensible aux temps d'ischémie froide. A noter que la vitesse de dégradation des phosphoprotéines est, de plus, fonction de l'organe étudié (214). D'autre part la dégradation des phosphoprotéines est précédée d'une augmentation de leur concentration dans l'échantillon. La qualité des échantillons est donc

primordiale. En ce qui concerne l'analyse des phosphoprotéines, elle nécessite de disposer de tissus congelé à -80°C. Lors de la phase de validation du BPA, des essais de stabilité des phosphoprotéines réalisés dans notre laboratoire sur pEGFR, pAKT, pGSK3β, pP70S6K pERK1/2, pMEK1, pP90RSK et pP38MAPK, ont également mis en évidence une variation rapide des niveaux d'expression des phosphoprotéines dans des échantillons laissés à température ambiante, et nous ont amené à restreindre les temps avant congélation. Ainsi, les échantillons doivent être congelés dans des délais inférieurs à une heure post exérèse (résultats non publiés).

Il existe de nombreuses autres variables pré-analytiques parfois difficilement maitrisables. Par exemple lors d'une exérèse tumorale, le temps d'ischémie chaude, entre le moment du clampage et la congélation de la pièce opératoire est très variable et impossible à maîtriser, et nécessiterait a minima de connaître l'heure du clampage lors de chaque opération pour pouvoir estimer ce paramètre afin d'en tenir compte dans la phase analytique.

Pour plusieurs auteurs, une solution potentielle est la quantification de protéines témoins d'hypoxie et de souffrance tissulaire, qui pourraient être les protéines les plus sensibles aux changements qui interviennent pendant le temps d'ischémie froide (216, 217). Plusieurs protéines seraient à même de remplir cette fonction de "chronographes moléculaires" : pJak1, pPAK 1/2, pGSKαβ, pATF2 ainsi que peNOS (217). Ainsi ces marqueurs d'ischémie pourraient permettre de s'affranchir de cette difficulté, qui représente encore une limite au développement des techniques de protéomique en pratique clinique, et qui ont des conséquences directes en termes de reproductibilité des résultats. L'utilisation de ces protéines comme marqueur de dégradation ne sera toutefois possible que s'il existe une protéine parmi celles citées précédemment dont l'expression basale est constante chez tous les patients, au moins pour une pathologie donnée.

La détection des protéines par des techniques autres que l'immunohistochimie présente un inconvénient majeur : l'absence de possibilité de localisation subcellulaire des protéines. En effet celle-ci présente une importance pour la recherche de marqueurs. Ceci peut s'illustrer par une étude portant sur 500 mélanomes pour lesquels ont été testés 70 marqueurs potentiels par des algorithmes génétiques (217). Parmi ces 70 marqueurs potentiels, cinq marqueurs se sont révélés pertinents dans l'évaluation du pronostique, et deux de ces cinq marqueurs, deux facteurs de transcription, n'étaient exploitables qu'associés aux informations sur leur

localisation, nucléaire ou cytoplasmique. Il a également été démontré que la compartimentation de certaines protéines, par exemple nucléaire, peut avoir des conséquences sur leur fonction. C'est le cas par exemple d'EGFR et de PTEN (31, 33, 34, 64).

La question de l'hétérogénéité tumorale est également soulevée par de nombreux auteurs. La quantité de cellules tumorales, bien que les zones tumorales sélectionnées dans notre étude contiennent au moins 50% de cellules tumorales, représente une source importante de variabilité. En effet le stroma est présent en proportions variables dans le tissu tumoral (Figures 20 et 21).

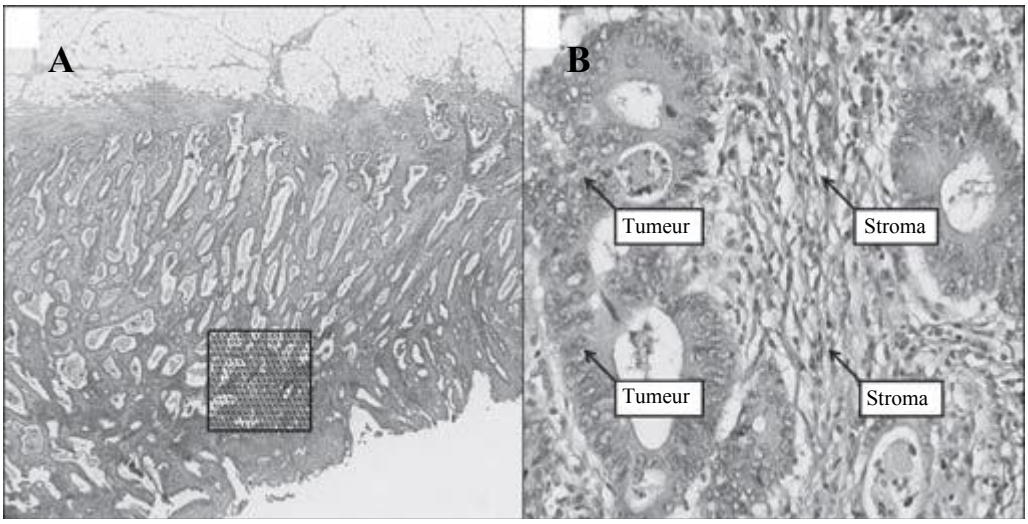


Figure 20 : A: Coupe histologique de cancer colorectal (coloration HES) sur une surface de 9mm². **B:** Composition hétérogène en cellules stromales et tumorales. D'après (170).

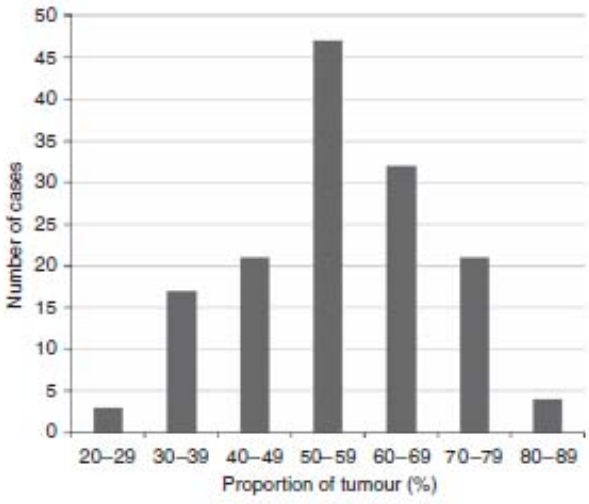


Figure 21 : Distribution de la proportion de cellules tumorales chez les patients atteints de cancer colorectal. D'après (170).

En revanche, l'utilisation du BPA couplée à l'analyse en composante principale permet de s'affranchir des problèmes de cellularité des échantillons, puisque l'on considère les niveaux d'expression des phosphoprotéines les uns par rapport aux autres et non plus de manière absolue. Par exemple si l'on dispose de cinq échantillons dans lesquels on dose deux protéines A et B et que l'on obtient les résultats suivants :

Echantillon n°	[Protéine A]	[Protéine B]
1	2	4
2	3	6
3	4	8
4	5	10
5	6	6

La corrélation entre [A] et [B] (Figure 22) est respectée en cas de dilution de l'échantillon 4 au ½, et un point aberrant (échantillon 4), dilué au ½ ou non, reste aberrant.

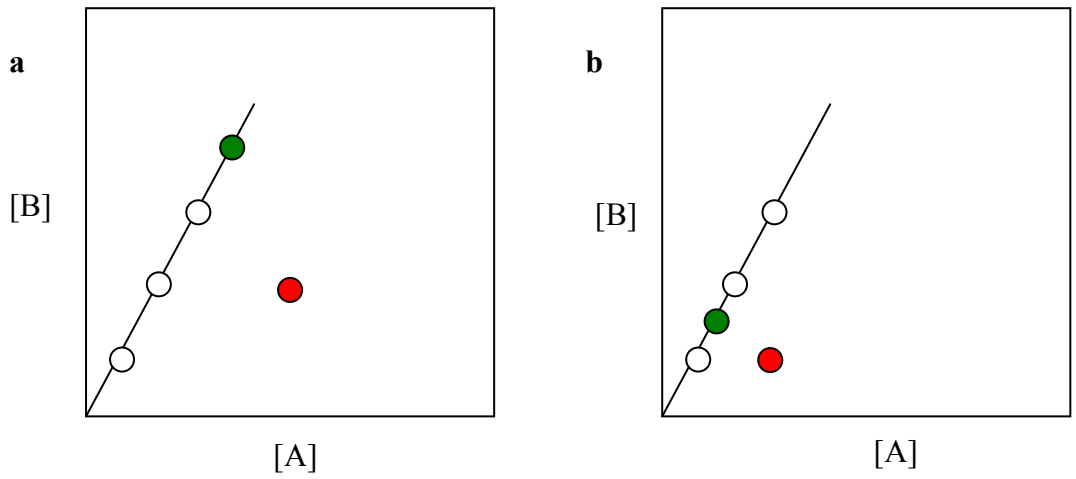


Figure 22 : Corrélation entre les concentrations des protéines A et B avant (a) et après (b) dilution.

De ce fait, si le matériel non tumoral n'est pas un tissu qui exprime excessivement les phosphoprotéines d'intérêt, alors la « dilution » du matériel tumoral dans le stroma conjonctif n'aura pas de conséquence sur la détection des individus aberrants.

Les questions qui restent à prendre en compte de manière générale sur ces approches portent sur le design des études à proposer pour une validation fiable et sur le niveau de preuve à atteindre pour ces nouveaux marqueurs.

Les études rétrospectives présentent des limites. Les nouvelles molécules sont typiquement évaluées chez des patients présentant un stade avancé de la maladie, et ces mêmes patients ne sont pas nécessairement re-biopsiés; si un marqueur apparaît tardivement au cours de l'évolution de la pathologie, une analyse réalisée sur un échantillon de tissus plus ancien pourrait empêcher la mise en évidence d'un marqueur pertinent. En ce qui concerne le statut *KRAS*, l'apparition de mutations est un évènement précoce dans l'oncogenèse. Ainsi l'analyse peut être réalisée sur des prélèvements très antérieurs à la prescription d'une thérapie anti-EGFR. Ceci n'est pas vrai en ce qui concerne d'autres paramètres. Sawyers et al. citent l'exemple d'une étude réalisée chez des patients atteints de cancer du poumon traités par géfitinib ou par erlotinib. Une résistance secondaire au traitement était associée à un changement dans le statut mutationnel du domaine kinase d'EGFR par rapport à la biopsie primaire (2). D'autres auteurs ont également pu mettre en évidence une variation de l'expression des pAKT et pERK en IHC entre la tumeur primitive et les métastases correspondantes dans plus de 10% des cas (218).

D'autre part, les études prospectives adaptées à la recherche de biomarqueurs sont difficiles à mettre en œuvre, et la plupart des essais cliniques ne prévoient pas encore suffisamment de collecte de matériel tumoral. Une des raisons évoquées par Sawyers et al. est la lenteur d'inclusion dans les essais qui présentent cette contrainte supplémentaire. Un autre problème évoqué par Ratain et al. est le coût engendré par l'évaluation de biomarqueurs au cours des essais (s'élevant en moyenne à 6700$ par patient) (219). Ratain propose ainsi de ne commencer l'étude des biomarqueurs qu'en phase IIb et uniquement sur des molécules ayant fait preuve d'efficacité. Ainsi, on estime qu'actuellement seulement 4 à 5% des essais de phase III prévoient l'analyse d'un biomarqueur dans le but d'améliorer la sélection des patients.

En ce qui concerne les études rétrospectives, l'évaluation des niveaux d'expression des phosphoprotéines présente d'autres difficultés. En effet ces études ne peuvent être réalisées que sur matériel tumoral congelé, en raison des problèmes de stabilité des phosphoprotéines évoqués précédemment ; or la congélation de matériel tumoral n'est pas systématique. L'utilisation de nouveaux fixateurs tels que le RCL2 épargnant les ARN et les phosphoprotéines tout en garantissant une stabilité de l'ADN ainsi qu'une morphologie

cellulaire semblable à celle obtenue classiquement avec les fixateurs formolés, apparaît comme une alternative intéressante au stockage de tissus congelé (220, 221). Ainsi, les études rétrospectives pourraient être réalisées sur des séries beaucoup plus larges, et ce mode de conservation permettrait de s'affranchir des problèmes inhérents à la manipulation de tissu congelé tels que les décongélations itératives des échantillons.

Au-delà des considérations techniques que nous venons d'évoquer, se posent des questions d'ordre analytique. En effet les mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses relèvent de phénomènes complexes et multiparamétriques. L'interprétation des données doit tenir compte de cette complexité.

Cette question fait l'objet de la troisième partie de ce travail, qui a pour but de transposer en situation clinique le travail réalisé *in vitro*. Dans cette étude réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Laurent-Puig[1], les niveaux d'expression des phosphoprotéines de signalisation ont été analysées par BPA sur des échantillons de tumeurs de patients atteints de cancer colorectal métastatique et traités par cétuximab ou panitumumab.

Les résultats de cette étude publiés récemment mettent en évidence un lien entre l'expression de pMEK1, pP70S6K, et la survie sans progression, ainsi qu'un lien entre l'expression de pP70S6K et la survie globale chez les patients non porteurs de mutation *KRAS* (181).

L'approche complémentaire que nous proposons ici a pour but de prendre en compte la globalité des variables étudiées, c'est-à-dire le statut mutationnel *KRAS* associé à un score représentatif de la fonctionnalité du réseau de signalisation en aval d'EGFR. Ce score est obtenu par analyse en composante principale (ACP) couplée à une analyse discriminante linéaire (53). Les patients présentant un score élevé sont considérés comme non-répondeurs, et les patients présentant un score bas sont considérés comme répondeurs au traitement par anti-EGFR. Globalement, la qualité de classement des patients en répondeurs et non répondeurs obtenue est légèrement supérieure à 80%. De plus, la différence de survie sans progression et de survie globale en fonction de ce score dans le groupe de patients porteurs de tumeurs *KRAS* non mutées est significative.

L'interprétation des données pourrait se faire de la manière suivante. Le score LDA est obtenu par analyse discriminante des derniers axes résultant de l'analyse en composante principale. Les derniers axes obtenus par ACP sont des axes représentant des paramètres très décorrélés.

[1] INSERM UMRS 775, Paris Descartes, APHP, HEGP.

En d’autres termes, ces axes servent à mettre en évidence des individus pour lesquels la corrélation globale entre les paramètres mesurés ne se vérifie pas, ce qui pourrait correspondre aux patients présentant une rupture à un endroit quelconque du réseau de signalisation en aval du récepteur. On entend ici par rupture une élévation anormalement élevée du niveau d’expression d’une phosphoprotéine, indépendamment de l’état d’activation de la protéine en amont de celle-ci.

Cependant, le modèle que nous proposons présente des limites, notamment en ce qui concerne le nombre de sujets inclus dans l’étude, et nécessite plusieurs étapes de validation avant d’envisager une application clinique.

Plusieurs auteurs tendent également à utiliser des approches multiparamétriques pour la prédiction de réponse aux thérapies ciblées. Ainsi, plusieurs études récentes mettent en évidence une complémentarité des données de génétique constitutionnelle, de génétique somatique et des données fonctionnelles, qui sont complémentaires et font l'objet d'analyses intégrées (71, 119, 211, 222-224). Les résultats obtenus tendent à mettre en évidence que le pouvoir prédictif de marqueurs combinés est supérieur au pouvoir prédictif de ces mêmes paramètres utilisés seuls (192, 211, 223, 225). De ces approches émerge depuis quelques années le concept d'interactome (226). Les données de protéomique ne se combinent pas comme des paramètres dont l'effet est cumulatif, mais les interactions entre les paramètres mesurés contiennent des informations qu'il est utile de considérer. Tandis que certains auteurs proposent d'éliminer les variables très corrélées entre elles avant de réaliser les analyses, d'autres en revanche proposent d'étudier et de modéliser les interactions entre les protéines étudiées (227, 228). Ces travaux devraient à terme permettre de modéliser finement les réseaux de signalisation en aval des récepteurs HER, en tenant compte de paramètres complexes tels que les rétrocontrôles ou encore les cinétiques d'interactions entre les protéines, et pourraient permettre d'étudier *in silico* l’efficacité d’un traitement en fonction des caractéristiques moléculaires d'un patient donné. Cette approche devrait également permettre d'évaluer l'efficacité de combinaisons de thérapies ciblées ayant pour cibles plusieurs récepteurs, ou un récepteur et plusieurs autres kinases en aval de ce récepteur, ce qui est conforme aux démarches en cours d'évaluation en pratique clinique, mais dont les choix se font actuellement de manière empirique. D'autre part, la méthodologie de mise en évidence puis de validation d’un biomarqueur est délicate et nécessite une approche particulière et le design d’essais cliniques spécifiques et adaptés (78, 159-161, 229-231).

CONCLUSION

Les thérapies ciblées, anticorps monoclonaux et inhibiteurs de kinase, dirigées contre les récepteurs HER représentent un progrès majeur en cancérologie. Indépendamment de l'expression de la cible moléculaire, l'activité des thérapies ciblées est tributaire de la présence dans le tissu tumoral d'anomalies génétiques capables de perturber la signalisation cellulaire tumorale en aval des récepteurs.

L'utilisation des biomarqueurs en pratique clinique permet d'adapter des traitements aux caractéristiques individuelles de chaque patient. La découverte de l'implication de la mutation *KRAS* dans la résistance aux anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique a marqué une étape importante dans la progression vers la médecine personnalisée en cancérologie. Il reste à développer de nombreux biomarqueurs, pour les anti-EGFR mais également pour les autres thérapies ciblées et les chimiothérapies cytotoxiques, tant dans le domaine des prédictions de réponse que dans le domaine des prédictions de toxicité.

Les révolutions techniques que connait actuellement la biologie moléculaire devraient permettre de mettre rapidement à disposition des cliniciens les moyens de choisir de manière rationnelle les thérapies ciblées, dont le nombre devrait augmenter extrêmement rapidement dans les prochaines années. Les techniques de protéomique évoluent rapidement vers une plus grande automatisation, et présentent des améliorations en termes de reproductibilité et de robustesse. Elles pourraient ainsi très rapidement satisfaire les critères requis pour le diagnostic clinique. Ces évolutions permettront de réaliser l'analyse intégrée des données de génétique constitutionnelle, de génétique somatique et des données fonctionnelles.

Notre travail a consisté à évaluer l'intérêt de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation par analyse multiplexe des niveaux d'expression des formes phosphorylées des principales kinases intracellulaires en aval des récepteurs HER sur lignées cellulaires et sur échantillons de tumeurs. Ce travail met en évidence l'impact d'anomalies génétiques tumorales sur la fonctionnalité des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT et sur la réponse au cétuximab.

Les résultats obtenus au cours d'une étude clinique rétrospective dans les cancers colorectaux métastatiques suggèrent que l'utilisation des données issues de l'évaluation de la

fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs HER combinée à une approche de biologie intégrative pourraient à terme trouver des applications en qualité de marqueurs prédictifs de réponse clinique aux thérapies ciblées anti-HER. L'approche que nous proposons est potentiellement transposable à l'étude des mécanismes de résistance diverses thérapies ciblées, inhibiteurs de tyrosines kinase ou anticorps monoclonaux, ciblant les voies de signalisation des RAS/RAF/MAPK et des PI3K/AKT.

En conclusion, un travail transdisciplinaire est nécessaire pour la mise en évidence et la validation de nouveaux marqueurs potentiels. Ce travail nécessite la coopération de cliniciens, de pathologistes et de biologistes autour de projets de recherche translationnelle. D'autre part, les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées mettent en jeu des systèmes complexes, et la mise en évidence de biomarqueurs, prédictifs ou pronostiques, nécessite également l'utilisation d'outils mathématiques adaptés.

ANNEXE

Impact du silencing de *PTEN* sur la réponse cellulaire au cétuximab dans une lignée de cancer des voies aérodigestives supérieures

Mriouah J, Boura C, Pinel S, Chretien AS, Fifre A, Merlin JL, Faivre B.

Int J Oncol. 2010 Dec;37(6):1555-63.

Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced HNSCC cell line

JIHANE MRIOUAH[1], CEDRIC BOURA[1], SOPHIE PINEL[1], ANNE-SOPHIE CHRETIEN[1,3], ALEXANDRE FIFRE[2], JEAN-LOUIS MERLIN[1,3] and BEATRICE FAIVRE[1]

[1]EA 4421 SiGReTO Signalisation, Genomique et Recherche Translationnelle en Oncologie, UHP-Nancy 1, Nancy-Universite, 54500 Vandoeuvre-les Nancy; [2]CNRS EAC 7054, Centre de Recherches Chirurgicales Henri-Mondor, Universite Paris XII-Creteil, 94010 Creteil cedex; [3]Unite de Biologie des Tumeurs, Centre Alexis Vautrin, 54500 Vandoeuvre-Les-Nancy, France

DOI: 10.3892/ijo_xxxxxxxx

Abstract. The implication of loss of PTEN expression in resistance to targeted therapy has already been described in many tumor types. The absence of response to anti-EGFR agents in PTEN-deficient tumors relies on persistent activation of signaling pathways downstream of pEGFR. To investigate the role of PTEN loss of expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) response to cetuximab, we used siRNA in Cal 27 cells and then evaluated key signaling protein activation (pAKT and pERK 1/2) as well as cell viability and proliferation. PTEN silencing in Cal 27 cells led to a constitutive activation of signaling pathways evidenced by a strong increase in pAKT and pERK 1/2 expression. Moreover, siPTEN cells did not show any significant changes either in cell viability or proliferation, only slight modifications on cell cycle. Additionally and unpredictably, our results indicated that PTEN silencing, led to a drastic reduction in pEGFR expression whereas total EGFR level did not significantly vary. Strikingly, despite this overactivation of signaling pathways ruling cell survival and proliferation in siPTEN cells, cetuximab fully exerted pAKT and pERK 1/2 inhibition of expression, similarly to its effect in untransfected Cal 27 cells. In conclusion, our study established that in Cal 27 cells, cetuximab keeps full ability to inhibit EGFR-dependent mechanisms, as shown by a decreased pAKT and pERK 1/2 level of expression, despite a strong PTEN silencing-induced overactivation. In Cal 27 cells, loss of PTEN expression does not lead to a loss of cetuximab efficacy in inhibiting EGFR-downstream signaling pathways, contrarily to data shown in previous works conducted in other tumor types.

Correspondence to: Dr Beatrice Faivre, EA 4421 SiGReTO, UHP-Nancy 1, Nancy Universite, Faculte de Pharmacie, 5-7 rue Albert Lebrun, BP 80401, 54001 Nancy cedex, France
E-mail: beatrice.faivre@pharma.uhp-nancy.fr

Key words: head and neck squamous cell carcinoma, pEGFR, cetuximab, PTEN, AKT, ERK 1/2, G_2M phase

Introduction

For the last decade, EGFR (epidermal growth factor receptor) has been extensively investigated because of its key role in cancer biology (1,2). EGFR is implicated in cell proliferation, differentiation and growth, as well as angiogenesis and cell adhesion (3). EGFR activation by ligand binding induces dimerization then autophosphorylation of the receptor, and activates several signaling pathways among which, PI3K/AKT and MAPK pathways play a major role (1). EGFR is over-expressed in many human malignancies including colorectal cancer, breast cancer, and lung cancer. In head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), EGFR overexpression has been detected in 90-100% of tumor specimens and has been correlated to a worse prognosis (4,5). Based on this, anti-EGFR targeted therapies have been proposed to prevent EGFR activation and its downstream signaling pathways. Monoclonal antibodies, such as cetuximab, directed against the extracellular portion of EGFR, have been reported to reduce proliferation and enhance apoptosis in cancer cells (5-7).

Nevertheless, since cetuximab has been approved by the FDA (Food and Drug Administration) in 2003, cases of resistance to cetuximab have been progressively reported. Notably in HNSCC patients, Cohen (8) reported modest response rates (5-15%) to cetuximab depending on dose and schedule. In this work, the author underlined the lack of identification of subgroups of patients that could respond or benefit of the use of targeted agents. Predictive markers for response to targeted therapies are needed and prospected in persistent activation of the PI3K/AKT and MAPK signaling proteins, which, have been related to loss of efficacy of anti-EGFR therapies in HNSCC as well as in other tumor types (9-12).

KRAS activating mutations are validated as a predictive marker for no response to cetuximab in metastatic colorectal cancer (13,14). However, wild-type *KRAS* patients do not necessarily benefit from such treatment (15), demonstrating thus, that determining *KRAS* status is not sufficient to ensure cetuximab treatment efficiency.

PI3K/AKT pathway constitutive activation has also been frequently pointed out in mechanisms of resistance to targeted therapies. As the main regulator of PI3K/AKT pathway activation, the key role of PTEN phosphatase has been high-

lighted in resistance towards anti-HER therapies in non-small cell lung cancer (16), breast cancer (17,18), colorectal cancer (19,20), and prostate cancer cells (21). *PTEN* is one of the most mutated in human cancers (22,23). PTEN antagonizes PI3K, preventing then PDK1-mediated activation of AKT via PiP_3. An indirect PTEN regulation on MAPK pathway has also been established, by inhibiting Shc-mediated Ras activation (24). Hence, PTEN modulation of PI3K/AKT and MAPK pathways is critical to impair cell survival and proliferation. PTEN has also a direct implication in limitation of cell cycle progression from G_0/G_1 to S (25).

Therefore, loss of PTEN expression, leads to persistent activation of signaling proteins and provides a sizeable advantage to cells in term of survival and proliferation. In HNSCC tumors, loss of PTEN expression occurs in 10-30% of the cases (23,26). Squarize *et al* in their study (27) showed a correlation between PTEN expression and histological malignancy: PTEN was expressed in adjacent non-tumor epithelium whereas tumors with a high score of malignancy did not express PTEN. Despite the observations made about loss of PTEN expression, there is no evidence of its eventual role in modest efficacy of cetuximab monotherapy in HNSCC.

The aim of our work was to investigate whether PTEN loss of expression has an impact on HNSCC cells sensitivity to cetuximab, regarding its impact on EGFR downstream signaling pathways. Using siRNA transfection in Cal 27 human HNSCC cell line, we establish that loss of PTEN expression induces as expected, a strong upregulation of pAKT and pERK 1/2 but does not play a determinant role in Cal 27 cells in cetuximab sensitivity. Strikingly our results suggest that persistent activation of EGFR signaling pathways induced by PTEN silencing does not lead to a loss of molecular activity of cetuximab.

Materials and methods

Cal 27 cell line and chemicals

Cell culture. Cal 27, a human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell line derived from a tongue squamous cell carcinoma isolated from a patient prior to treatments, was obtained from Dr J.L. Fischel (Centre Antoine Lacassagne, Nice, France) (CRL-2095™, ATCC). The cell line was cultured in phenol-red free RPMI-1640 (Invitrogen) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Sigma Aldrich, France), 2 mM of L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin at 37˚C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air.

KRAS genotyping. Cal 27 cells were checked for *KRAS* mutations (codons 12 and 13) using two-step PCR-RFLP (for restriction fragments length polymorphism) according to Schimanski *et al* (28). Briefly, DNA was extracted from 10^9 cells suspension. The amount of DNA isolated was determined spectrometrically and 100 ng was used as template for the first PCR (Master Cycler Gradient, Eppendorf, Germany) with the oligonucleotide primers Ras A (sense 5'-ACTGAATAT AAACTTGTGGTCCATGGAGCT-3') and Ras B (antisense 5'-TTATCTGTATCAAAGAATGGTCCTGCACCA-3'). PCR products were then submitted to enzymatic digestion with either *Bst*XI or *Xcm*I, restricting the amplicon if the first two bases of codon 12 (*Bst*XI) and codon 13 (*Xcm*I) were wild-type. The first digest (2 μl) was used as template for the second PCR in which primer Ras C (antisense 5'-GGATG GTCCTCCACCAGTAATATGGATATTA-3') was used instead of Ras B. Second PCR (7 μl) was digested with either *Bst*XI or *Xcm*I. The digest (10 μl) was submitted to PAGE stained with ethidium bromide and analysed under UV light (GelDoc EQ, Bio-Rad). DNA extracts from cell lines bearing codon 12 or/and 13 mutations were added as positive controls.

Chemicals. Cetuximab (Erbitux™), a chimeric monoclonal antibody targeting EGFR (Merck Serono, Lyon, France) and was diluted to the final concentration of 20 μg/ml in fresh medium containing 2% FCS before each experiment. Cetuximab concentrations and duration of exposure have been determined from previous experiments performed on three different HNSCC cell lines (FaDu, Cal 33, Cal 27). Culture medium was replaced by cetuximab solution at day 5 following cell seeding.

PTEN silencing

Design and construction of small interfering RNA of PTEN. Based on human PTEN mRNA sequence (accession no. NM 000314), specific siRNA duplexes designed, synthesized and annealed by Eurogentec (Seraing, Belgium) were evaluated and the duplex leading to the highest silencing of PTEN expression was selected. During our experiments, we have tested five duplexes targeting different regions of PTEN mRNA then selected one for the subsequent study. The selected RNA duplex is defined as sense: 5'-GCUACCUGUUAAAGAA UCA-3' and antisense: 5'-UGAUUCUUUAACAGGUAG-3'. The negative control siRNA sequence was developed by Eurogentec and has no significant homology to any known human gene sequence.

SiRNA transfection. Cal 27 cells were plated at day 0 in 6-well plates at $8x10^4$ cells per well in 2 ml phenol-red free supplemented RPMI-1640 medium and allowed to grow. When cells were 60% confluent (day 3), the culture medium was replaced by a FCS-free RPMI-1640 medium. Each well received then 10 nM siRNA by using INTERFERin™ according to the manufacturer's recommendations (PolyPlus Transfection, Illkirch, France). After 4 h, the transfection was stopped by replacing serum-free RPMI-1640 medium with 10% FCS-RPMI-1640 medium.

The transient PTEN-deficient cells (defined as 'SiPTEN cells') and cells transfected by the control sequence (defined as 'siRNA neg. cells') were expanded and ultimately used to monitor PTEN protein expression, 48, 72, 96 and 120 h of transfection by Western blot analysis. The expression of phosphoproteins among EGFR signaling pathways (pEGFR, pAKT, pERK 1/2) was quantified using Bio-plex® protein array (BPA) technology as described previously (29) and checked by Western blot analysis while PTEN expression was inhibited.

Protein assays

Proteins extraction. Proteins were extracted from monolayered cell cultures using a cell lysis kit (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) according to the manufacturer's recom-

mendations. Briefly, cell cultures were exposed for 15 min to the lysis solution containing phenylmethylsulfonyl fluoride antiprotease. After centrifugation at 1200 g at 4˚C, soluble proteins from supernatant were stored frozen at -80˚C until used. Protein analyses were then performed using Western blot analysis and BPA.

Western blot analysis. Protein aliquots (6 µg) were denatured in the Laemmli buffer, containing ß mercapto-ethanol and by heating for 5 min at 95˚C, before to be resolved in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The separated proteins were transferred using a Mini TransBlot cell onto PVDF membranes (Amersham Biosciences, Orsay, France). To avoid non-specific binding, the membranes were blocked by 1-h incubation in Tris base-buffered saline prepared with 0.1% (v/v) Tween-20 (TBST buffer) containing 5% (w/v) bovine serum albumin. The PVDF membranes were then allowed to react overnight at 4˚C with the primary antibodies diluted in TBST buffer containing 5% bovine serum albumin as follows: mouse antibodies against human PTEN (Monoclonal 3627, Dako, 1:1000 dilution), against phospho-EGFR (no. 2236, Cell Signaling 1:1000 dilution), phospho-ERK 1/2 (no. 9106, Cell Signaling, 1:1000 dilution), and rabbit antibodies phospho-AKT (no. 9271, Cell Signaling, 1:1000 dilution), and ß-tubulin (no. 9104; Santa Cruz, 1:3000 dilution) were used as the internal control.

After being washed with TBST buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with specific horseradish-peroxidase-secondary anti-IgG1 polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnlogy, Heidelberg, Germany). Subsequently, immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence procedure (Amersham). Quantification of relative band densities was performed using standard densitometry scanning techniques (Rasband, WS, ImageJ, US National Institute of Health, Bethesda, MD).

Bio-Plex® phosphoprotein array. Phosphoprotein expression was analyzed using Bio-Plex protein array (30) based on multiplex sandwich bead immunoassays. Phosphoprotein determination kits (Bio-Rad) were used according to the manufacturer's recommendations. Briefly, protein extracts (6 µg in 25 µl) were transferred into 96-well dishes and diluted with 25 µl buffered solution (assay buffer, Phosphoprotein Reagent kit, Bio-Rad). Fluorescent capturing beads coupled to antibodies (Bio-Plex phosphoprotein assays, Bio-Rad) directed against p-EGFR or downstream signaling phospho-proteins (p-AKT, p-ERK 1/2) were mixed, and added into each well and incubated overnight at 20˚C. The plates were then washed (Bio-Plex phosphoprotein assays, Bio-Rad) and incubated for 30 min at room temperature with the detection biotinylated antibodies under shaking, fixing each target protein. The streptavidin-phycoerythrin solution (Bio-Plex phosphoprotein assays, Bio-Rad) was then added for 10 min at room temperature. 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 phosphoprotein expression through the fluorescence intensity of phycoerythrin. Results were recorded as fluorescence intensities and compared to positive controls. Positive controls consisting in standard protein extract from cell lines were added to each series.

Cell viability and proliferation

Metabolic activity. Cellular metabolic activity was determined by monitoring the mitochondrial activity using 3-(4,5 dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide assay (MTT, Sigma). Briefly, $2x10^4$ cells were plated in 1 ml/well of 10% FCS-RPMI-1640 into 24-well dishes. At day 5 (2 days after transfection), the culture medium was replaced by 2% FCS-RPMI-1640 medium containing 0 or 20 µg/ml cetuximab for 48 h.

After this incubation period, 0.5 µmol/l MTT were added into each well. Following a 2-h incubation at 37˚C, formazan crystals resulting from MTT metabolization were solubilized and cells were lysed by adding 400 µl of DMSO into each well. The absorbance of the resulting solution was measured at 570 nm using wells without cells as blank (Multiskan Ascent microplate photometer, Thermo Scientific, Gometz-Le-châtel, France).

Proliferation assays. For trypan-blue exclusion assay, cells were cultivated in a 6-well dishes and exposed to cetuximab following PTEN silencing (as mentioned above). Cells were detached using a 5X-trypsin-EDTA solution (Sigma) for 7 min at 37˚C and resuspended in a complete medium. Cells were then stained with 0.4% trypan-blue solution and viable cells were counted twice using a Malassez hemocytometer.

Cell cycle analysis. The effects of cetuximab and of the loss of PTEN silencing on cell proliferation were determined using flow cytometry analysis of cell cycle progression. Either transfected or untransfected Cal 27 cells were washed twice with calcium magnesium-free-PBS (CMF-PBS) before being trypsinized and harvested. The cells were then pelleted at 200 g for 10 min and fixed in 70% ethanol (v/v) and stored at 4˚C until analyzed.

Before analysis, all samples were washed twice and resuspended in CMF-PBS. DNA was stained at room temperature with 1 mg/ml propidium iodide (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) in the presence of 10 µg/ml of RNase A (Sigma, St. Louis, MO). DNA content was determined by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) analysis using flow cytometry FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France). Data from at least 10,000 events were analyzed using ModFit LT software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

Statistical analysis. All experiments were performed at least in triplicate and the 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

Cal 27 cells sensitivity to cetuximab. Cetuximab effect on cell viability of HNSCC cell lines was first investigated in FaDu (HTB-43), Cal 27 (CRL-2095) and Cal 33. Our results

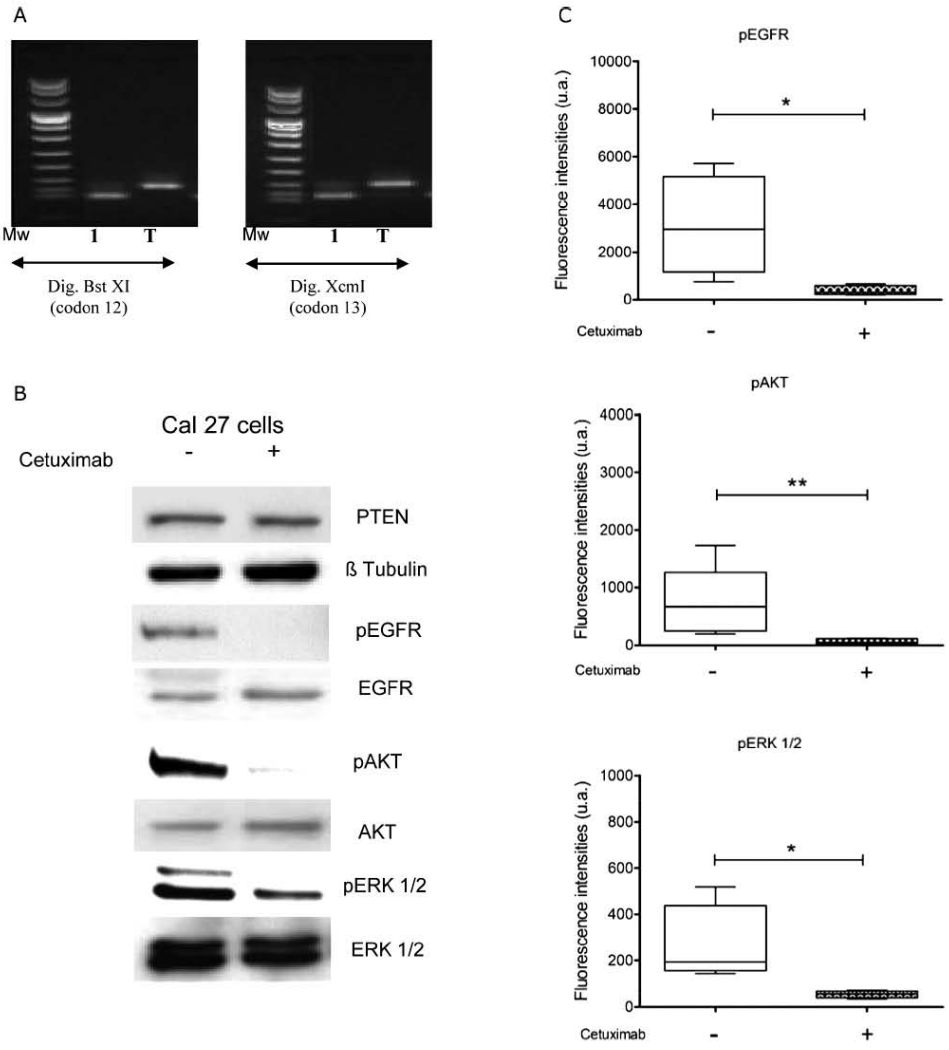


Figure 1. Signaling proteins status of expression in Cal 27 cells. Cal 27 cells were found non-mutated for *KRAS* using PCR-RFLP. (A) Agarose gel loaded with products from PCR-RFLP: DNA extracts from Cal 27 (line 1) cells line were submitted to double PCR amplification after *Bst*XI and *Xcm*I enzymatic digestions allowing discrimination of codons 12 and 13 mutations. Codons 12 and 13-mutated cell lines were used as positive controls (line T). Cetuximab induced a strong inhibition on EGFR signaling phosphoproteins of Cal 27 cells. Proteins extracts were collected from cells exposed, or not, to cetuximab (20 μg/ml) for 48 h. Phosphoprotein expression was investigated by Western blotting using specific antibodies. ß tubulin was used as control for the equal loading of proteins (B). Levels of pEGFR, pAKT and pERK 1/2 expression were also determined by Bioplex Protein Array assay and are presented as fluorescence intensities measured in protein extracts. The same amount of proteins was used in all BPA experiments. *P<0.05, **P<0.01, versus untreated control cells (C).

established that FaDu cell line was resistant to cetuximab. Conversely Cal 27 and Cal 33 cell lines were found sensitive (data not shown). As the aim of the work was to identify the role of PTEN protein in cells sensitivity to cetuximab, the most sensitive cell line was chosen for all further experiments. Moreover, there is no PTEN-deficient HNSCC cell line available, so we used the siRNA directed against PTEN mRNA in Cal 27 cells.

Cal 27 cells were characterized for *KRAS* status, and PTEN, EGFR and downstream signaling phosphoprotein expression. Using two-step PCR-RFLP (restriction fragments length polymorphism), we determined that Cal 27 cells were *KRAS* wild-type (Fig. 1A). Then, using Western blotting and Bioplex protein assay (BPA) arrays, Cal 27 cells were found to express basal pEGFR, PTEN and phosphoprotein levels (Fig. 1B and C).

Exposure to cetuximab induced a 90%-inhibition of pEGFR expression, leading to the subsequent downregulation of pAKT (93%) and pERK 1/2 (71%) (Fig. 1B and C). As a consequence, Cal 27 cells were found sensitive to cetuximab as cell viability was reduced by 20% (Fig. 2A) and cells number was reduced by 31% (Fig. 2B). This can be linked to

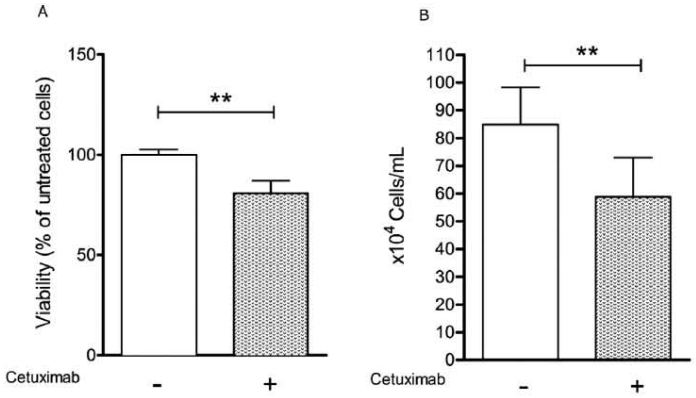


Figure 2. Effect of cetuximab on cells viability and proliferation of Cal 27 cells. Cells were exposed, or not to cetuximab (20 μg/ml), for 48 h in 2% FCS RPMI-1640 medium. Mitochondria metabolic activity was measured by MTT tests and reported to the untreated controls. (A). Cal 27 cells proliferation was evaluated by trypan-blue exlusion assays and presented as concentration (cells number x 10^4/ml). Each sample was stained with 0.4% trypan-blue solution and counted twice. Data are means ± SE of at least 3 experiments; **P<0.01 versus untreated control cells.

Table I. Effect of cetuximab treatment on cell cycle distribution.[a]

	Cell cycle distribution (%)	
Cetuximab	-	+
G_0/G_1	69.4±3.3	80.9±4.7[c]
S	16.3±3.6	7.1±1.5[c]
G_2/M	14.4±2.5	12.0±4.3

[a]Cells exposed or not to cetuximab (20 μg/ml) for 24 h were incubated with propidium iodide. Cell cycle was analyzed by flow cytometry and proportion of cells in each phase of cell cycle was calculated using ModFit software and was expressed as percentage. Cetuximab-untreated cells versus cetuximab-treated cells: [b]P<0.05; [c]P<0.01.

the cetuximab-induced cell cycle perturbations shown by a significant increase (11.5%; Table I, P<0.01) in G_0/G_1-phase fraction, leading to depletion in S-phase fraction. Taken together, these results confirmed the ability of cetuximab in Cal 27 cells to block EGFR and downstream signaling activation, and to produce a significant inhibition in proliferation.

Efficacy of PTEN silencing in Cal 27 cells. As expected, PTEN silencing by siRNA sequence delivery through a non-viral transfection was shown to be a progressive and transient phenomenon. To assess silencing efficacy, PTEN protein expression was evaluated by Western blot analyses (Fig. 3). Downregulation of PTEN expression started 48 h after transfection with a significant (P<0.01) 55±4% reduction of PTEN expression as compared to siRNA neg. cells. Maximal PTEN silencing was found to reach 90±6% (P<0.001), 72 and 96 h after transfection. Then, PTEN expression was detected again 120 h after transfection at 25±6% of siRNA

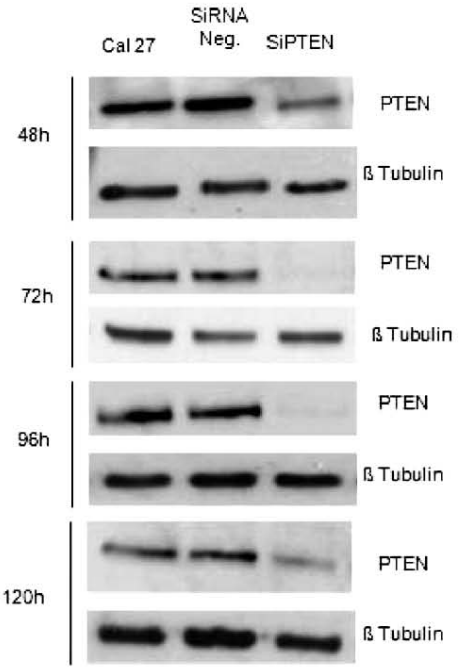


Figure 3. Efficacy of PTEN silencing by siRNA in Cal 27 cells. Cells were transfected with siRNA targeting PTEN or siRNA negative control. Total proteins were extracted every day after transfection (48, 72, 96 and 120 h) and subjected to Western blot analysis with the specific antibodies against PTEN.

neg. cells. Based on these results, further experiments in siPTEN cells were scheduled during the time period of maximal PTEN silencing (48-96 h after transfection). No significant difference was found between untransfected Cal 27 and siRNA neg. cells either in signaling pathways or cell proliferation (numeration, cell cycle distribution) and cell

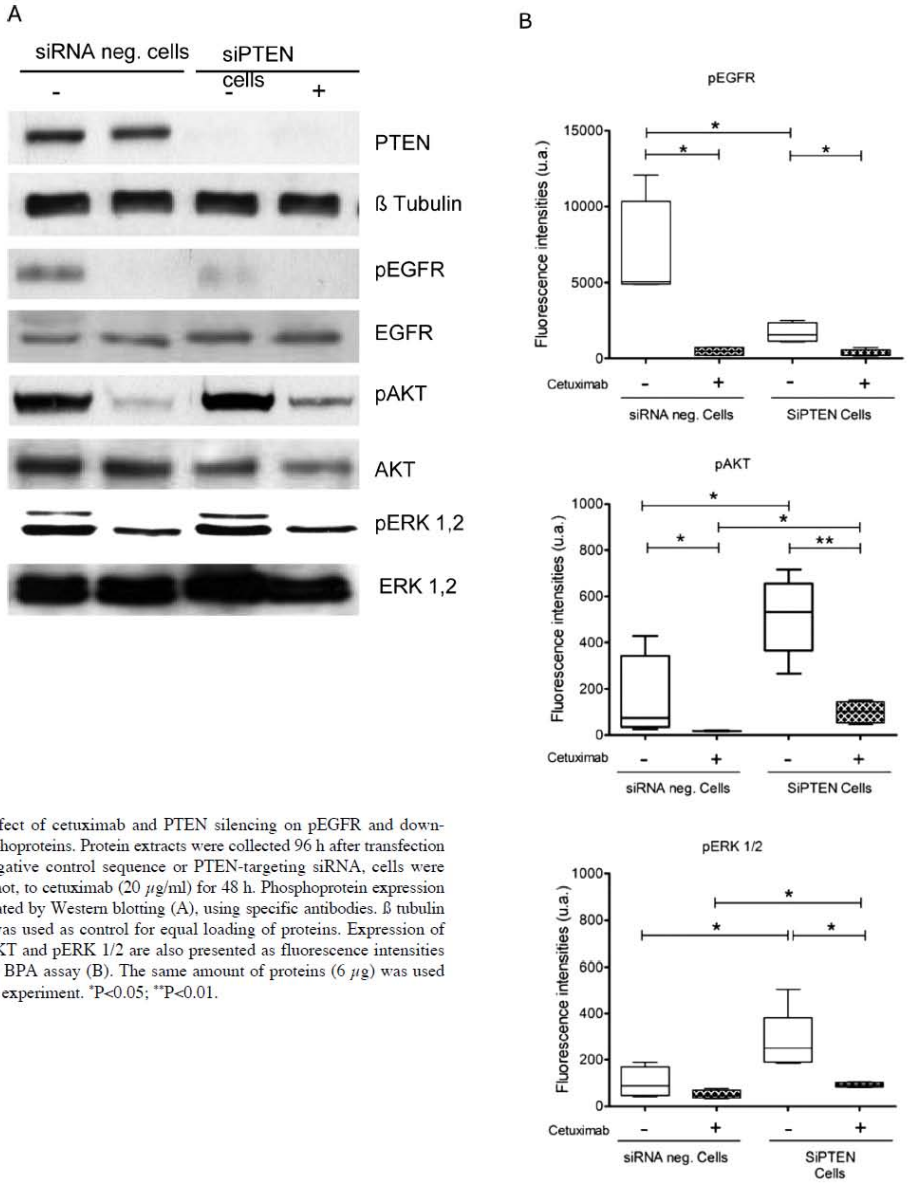


Figure 4. Effect of cetuximab and PTEN silencing on pEGFR and downstream phosphoproteins. Protein extracts were collected 96 h after transfection either by negative control sequence or PTEN-targeting siRNA, cells were exposed, or not, to cetuximab (20 μg/ml) for 48 h. Phosphoprotein expression was investigated by Western blotting (A), using specific antibodies. ß tubulin expression was used as control for equal loading of proteins. Expression of pEGFR, pAKT and pERK 1/2 are also presented as fluorescence intensities measured by BPA assay (B). The same amount of proteins (6 μg) was used in each BPA experiment. *P<0.05; **P<0.01.

viability. Consequently, every further comparative analysis was performed using siRNA neg. cells as reference.

Impact of PTEN silencing and cetuximab on signaling pathway activation. As expected, 96 h after transfection, significant and important increases in pAKT (7-fold) and pERK 1/2 (3-fold) expression are shown (P<0.05, Fig. 4B) in siPTEN cells as compared to siRNA neg. cells. This result indicates the signaling pathway overactivation while PTEN inhibition of expression is maximal. Surprisingly, pEGFR expression was importantly downregulated in siPTEN cells (61% inhibition) contrarily to total EGFR expression, which was found constant (Fig. 4A). In siPTEN cells, the overactivation of pAKT and pERK 1/2 occurred in this context of pEGFR downregulation, demonstrating thus the constitutive activation of signaling pathways.

Unpredictably, and despite the pEGFR downregulation, cetuximab exposure led to an efficient inhibition of AKT and ERK 1/2 activation in siPTEN cells, to an even greater extent than its effect in siRNA neg. cells. Indeed, in siRNA neg. cells, pEGFR expression was inhibited by 58% (Fig. 4B) after cetuximab exposure and pAKT and pERK 1/2 expression was inhibited by 74 and 48%, respectively. In siPTEN cells, pEGFR expression was found to be reduced by 85% (P<0.05,

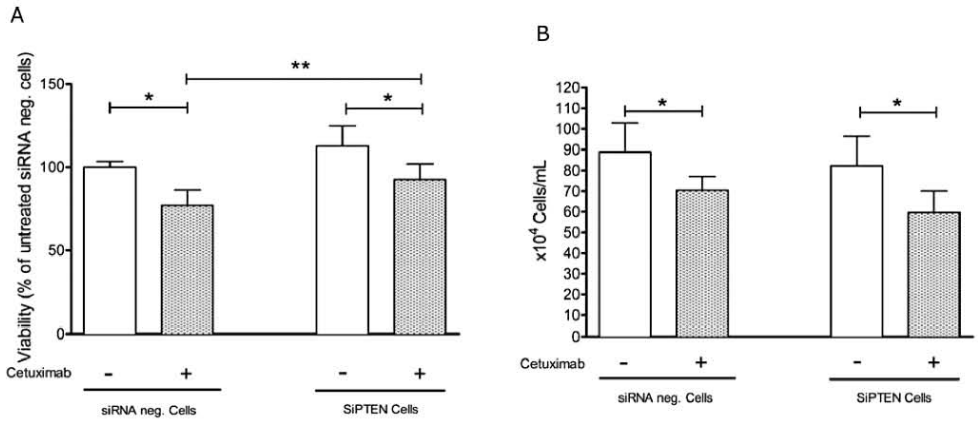


Figure 5. Effect of cetuximab and PTEN silencing on Cal 27 cell viability and proliferation. Forty-eight hours after transfection with either negative control or PTEN siRNA, cells were exposed, or not, to cetuximab (20 μg/ml) for 48 h in 2% FCS RPMI-1640 medium. Cell viability was measured by MTT test and compared to the untreated controls (A). For cell numeration, each sample was stained with 0.4% trypan-blue solution and counted twice (B). Data are the mean ± SE of at least 3 experiments; *P<0.05; **P<0.01.

Table II. Effect of cetuximab treatment and PTEN silencing on cell cycle distribution.[a]

	Cell cycle distribution (%)			
	-		+	
Cetuximab	SiRNA control cells	SiPTEN control cells	SiRNA cells	SiPTEN cells
G_0/G_1	70.3±2.7	66.0±2.0[d]	77.7±4.0[b]	73.8±5.2[b]
S	15.9±2.9	16.1±3.3	8.2±1.8[b]	8.0±2.5[b]
G_2/M	13.8±3.5	17.9±2.6[d]	14.1±3.2	18.2±1.0

[a]Cells exposed or not to cetuximab for 24 h were incubated with propidium iodide. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. Proportion of cells in each phase of cell cycle was calculated using ModFit software and was expressed as percentage. Cetuximab-untreated cells versus cetuximab-treated cells: [b]P<0.05; [c]P<0.01. SiPTEN cells versus siRNA control cells: [d]P<0.05.

Fig. 4B), consequently pAKT and pERK 1/2 expression was significantly decreased by 81 and by 70%, respectively (P<0.05, Fig. 4B). Even though cetuximab was efficient in blocking signaling pathway activation in siPTEN cells, there was a slight residual level of the phosphoprotein expression. Signaling pathway activation in siPTEN cells exposed to cetuximab was then stronger than in siRNA neg. cells unexposed to cetuximab (P<0.05) and that, independently of pEGFR, which, was equally inhibited in siPTEN, and siRNA neg. cells. Strikingly, these results established that the PTEN silencing-mediated constitutive activation of signaling pathways in Cal 27 cells, can be efficiently overcome by cetuximab exposure.

Impact of PTEN silencing and cetuximab on cell viability and proliferation. PTEN silencing did not induce any significant change in Cal 27 cells viability (Fig. 5A, 100±7 vs. 113±6%). Cetuximab exposure induced a decrease of 20±3% (P<0.05) in cells viability (Fig. 5A) in each case. Thus, no significant difference in cetuximab effect on cell viability was found depending on PTEN status in Cal 27 cells. However, as siPTEN cells were found to express residual pAKT and pERK 1/2 despite cetuximab exposure, cell viability of siPTEN cells was maintained at 93% of siRNA neg. cells not exposed to cetuximab (considered as the 100% viability).

Unexpectedly, PTEN silencing did not produce any impact in Cal 27 cell proliferation as no significant difference was found between the number of siRNA neg. cells and siPTEN cells (P>0.2). Similarly, cetuximab exposure led to the same decrease in proliferation of siRNA neg. cell and siPTEN cells, as the cell number was reduced by 25±5 and 20±2% respectively (P>0.3, Fig. 5B).

PTEN silencing at its maximal efficacy (72 h after transfection), induced significant modifications in cell cycle distribution, with first, a decrease in G_0/G_1-phase fraction (P<0.05) from 70.3±2.7% in siRNA neg. cells to 66±2% in siPTEN cells (Table II). This effect of PTEN silencing on G_0/G_1-phase fraction was associated with a significant increase (P<0.05) in G_2/M-phase fraction from 13.8±3.5 to 17.9±2.6% whereas S-phase fraction was unaffected.

A 24-h exposure of siPTEN cells to cetuximab induced a significant and expected increase in G_0/G_1-phase fraction from 66±2 to 73.8±5.2% (Table II, P<0.05) to the same extent than in siRNA neg. cells. This accumulation resulted in a significant depletion in S-phase fraction. Contrarily, the increase in G_2/M-phase fraction observed in siPTEN cells was not influenced by cetuximab exposure (17.9±2.6 vs. 18.2±1%).

Taken together, the results achieved in all experiments suggest that Cal 27 cell proliferation and viability do not rely on PTEN status. Consequently, cetuximab effects in Cal 27 cells are not dependent on PTEN expression.

Discussion

Targeted therapies, such as anti-EGFR monoclonal antibody have been developed to enhance specificity of anti-cancer treatment. In HNSCC samples from patients, EGFR over-expression is a very common event (90-100%). However, even in case of a strong expression of the molecular target, modest response rates have been observed, especially when cetuximab is used as monotherapy (5-15% responsive patients) (8). Contrarily to colorectal cancers, detection of *KRAS* activating mutation in HSNCC as a predictive marker of response to cetuximab therapy seems to be less relevant as these mutations only occur in ~6% (30). Conversely, constitutive activation of PI3K/AKT pathway is found in 30% of cases, independently of *KRAS* status (26,31,32). Based on this, we hypothesized that the reported modest response of HNSCC to cetuximab monotherapy could rely on constitutive activations in PI3K/AKT signaling pathway. Among the mechanisms inducing such activation, PTEN loss of expression has been implicated in several cancer types (14,16,17,21). Recently, Frattini *et al* (20) have shown that loss of PTEN expression in metastatic colorectal cancer is correlated to cetuximab resistance. To our knowledge, PTEN implication in the response to cetuximab has not been clearly elucidated to date in HNSCC. The aim of our study was to investigate, using siRNA in Cal 27 cell line, the impact of PTEN functionality on cell response to cetuximab.

First, we established that Cal 27 cells were sensitive to cetuximab as signaling pathway activation was substantially inhibited. Cetuximab exposure led to an expected increase in G_0/G_1-phase due to its previously described effect of blockade in cell cycle (33,34). Despite this alteration in cell cycle distribution, a modest impact on cell viability and proliferation was found. Additionally and unpredictably, our results indicate that PTEN silencing, led to a drastic reduction in pEGFR expression whereas total EGFR level did not significantly vary.

However, our results confirmed the expected effects of PTEN silencing on the regulation of PI3K/AKT and MAPK signaling pathways, in agreement with already reported data (35,36). Indeed, PTEN silencing in Cal 27 cells led to a constitutive activation of signaling pathways evidenced by a strong increase in pAKT and pERK 1/2 expression, though without inducing any significant promotion of proliferation or cell viability. This downregulation of pEGFR could be related to a negative feedback involving activated ERK 1/2 (37). Taken together, these results suggest that Cal 27 cells are not strictly dependent on EGFR for their viability and proliferation. Further investigations on potential cross talk occurring in Cal 27 cells might be meaningful.

Strikingly, despite this overactivation of signaling pathways ruling cell survival and proliferation in siPTEN cells, cetuximab fully exerts pAKT and pERK 1/2 inhibition of expression, similarly to its effect in untransfected Cal 27 cells. Thus, our study established that in Cal 27 cells, loss of PTEN expression does not lead to a loss of cetuximab efficacy in inhibiting EGFR-downstream signaling pathways, contrarily to data shown in previous works conducted in other tumor types (14,19-21).

In parallel, our results show slight but significant changes in cell cycle distribution of PTEN-silenced cells. A significant decreased in G_0/G_1-phase fraction was observed, suggesting that siPTEN cells entered the S phase more rapidly. It has been described that PTEN is able to control G_1/S transition either by PI3K/AKT-dependent or independent effects (25,38), notably through its nuclear localization. Our results are in line with the observations made by Chung *et al* (39) concerning the PTEN-mediated growth control through its function in the nucleus. In this study, PTEN has been reported to be able to down-regulate cyclin D1 protein level, inducing a G_0/G_1-cell cycle arrest (38).

It is of interest to note that a slight accumulation of siPTEN cells in G_2/M-phase was also observed, without any change in S phase, additionally to the effects on G_0/G_1-phase. Cetuximab exposure did not affect this accumulation of cells in G_2/M-phase fraction, but kept its ability to block G_1/S transition regardless of the PTEN status.

Collectively, our results achieved in siPTEN cells, strikingly indicate that cetuximab keeps full ability to inhibit EGFR-dependent mechanisms, as shown by a decreased pAKT and pERK 1/2 level of expression, despite a strong PTEN silencing-induced overactivation. Moreover, siPTEN cells did not show any significant changes either in cell viability or proliferation, only slight modifications on cell cycle. As siRNA silencing was a transient phenomenon, it is likely that the direct impact relying on PTEN loss of expression is a strong and immediate activation of signaling pathways (within 24-48 h), whereas cellular effects like proliferation might be delayed. Indeed, cell cycle analysis revealed slight changes but our experimental set up did not allow observing the expected PTEN silencing effects on cell proliferation. A sustained inhibition by shRNA in Cal 27 cells might provide supplementary data and constitute a more accurate model of PTEN-deficient tumors *in vitro*.

In conclusion, cetuximab exposure was able to induce a significant reduction in cell viability independently of PTEN expression and kept an effect of inhibition on pAKT and pERK 1/2 despite a PTEN-silencing overactivation of key signaling pathway proteins.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Carole Ramacci and Marie Rouyer in Centre Alexis Vautrin for their helpful technical support. We are very thankful to Professor Philippe Becuwe for his critical review of this manuscript and Dr Stephanie Grandemange for her valuable collaboration. We Thank Dr Patrick Erbacher (PolyPlus Transfection) for providing INTERFERin. This study was supported by grants from the

French 'Ligue Nationale contre le Cancer' and the 'Region Lorraine'.

References

1. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garett TP, Ward CW and Burgess AW: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. Exp Cell Res 284: 31-35, 2003.
2. Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. Eur J Cancer 4: S3-S8, 2001.
3. Mendelsohn J and Baselga J: The EGF receptor family as target for cancer therapy. Oncogene: 19: 6550-6565, 2000.
4. Monnier L, Milano G, Penault-Llorca F, and Merlin JL: Targeting of membrane receptor tyrosine kinases: is there resistance in the HER? Bull Cancer 91: 685-694, 2004.
5. Reuter CWM, Morgan MA and Eckardt A: Targeting EGF-receptor-signaling in squamous cell carcinomas of the head and neck. Br J Cancer 96: 408-416, 2007.
6. Ford AC and Grandis JR: Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. Head Neck 25: 67-73, 2003.
7. Harari PM: Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer 11: 689-708, 2004.
8. Cohen EEW: Role of epidermal growth factor receptor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol 24: 2659-2665, 2006.
9. Morgillo F, Bareschino MA, Bianco R, Tortora G and Ciardello F: Primary and acquired resistance to anti-EGFR targeted drugs in cancer therapy. Differentiation 75: 788-799, 2007.
10. Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI and Hong SP: Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. J Clin Pathol 58: 1199-1205, 2005.
11. Yamatodani T, Ekblad L, Kjellen E, Johnsson A, Mineta H and Wennerberg J: EGFR status and persistent activation of Akt and p44/p42 MAPK pathways correlate with the effect of cetuximab in head and neck and colon cancer cell lines. J Cancer Res Clin Oncol 135: 395-402, 2009.
12. Albanell J, Codony-Servat J, Rojo J, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, Raspall G, Giralt J, Rosello J, Nicholson RI, Mendelsohn J and Baselga J: Activated extracellular signal-regulated kinases: association with EGFR/TGFα expression in HNSCC and inhibition by anti-EGFR treatments. Cancer Res 61: 6500-6510, 2001.
13. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, Rougier P, Lièvre A, Landi B, Boige V, Ducreux M, Ychou M, Bibeau F, Bouché O, Reid J, Stone S and Penault-Llorca F: Analysis of PTEN, BRAF and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. J Clin Oncol 27: 5924-5930, 2009.
14. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, Masi G, Graziano F, Cremolini C, Rulli E, Canestrari E, Funel N, Schiavon G, Petrini I, Magnani M, Tonini G, Campani D, Floriani I and Cascinu S: PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 27: 2622-2629, 2009.
15. Balko JM and Black EP: A gene expression predictor of response to EGFR-targeted therapy stratifies progression-free survival to cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. BMC Cancer 9: 145-155, 2009.
16. Janmaat ML, Kruyt FAE, Rodriguez JA and Giaccone G: Response to EGFR inhibitors in NSCLCC: limited antiproiferative effects and absence of apoptosis associated with persistent activity of ERK or AKT kinase pathways. Clin Cancer Res 9: 2316-2326, 2003.
17. She QB, Solit D, Basso A, and Moasser MM: Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling. Clin Cancer Res 9: 4340-4346, 2003.
18. Pandolfi PP: Breast Cancer - loss of PTEN predicts resistance to treatment. N Engl J Med 351: 337-2338, 2004.
19. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez Soler R and Mariadason JM: PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the EGFR inhibitor cetuximab. Cancer Res 68: 1953-1961, 2008.
20. Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F and Mazzucchelli L: PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. Br J Cancer 97: 1139-1145, 2007.
21. Bouali S, Chrétien AS, Ramacci C, Rouyer M, Becuwe P and Merlin JL: PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAFMAPK downstream signaling in *KRas* wild-type hormone refractory prostate cancer cells. Oncol Rep 21: 731-735, 2009.
22. Liu W, Zhou Y, Reske SN and Shen C: PTEN mutation: many birds with one stone in tumorigenesis. Anticancer Res 28: 3613-3620, 2008.
23. Ali IU, Schriml LM and Dean M: Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. J Natl Cancer Inst 91: 1922-1932, 1999.
24. Gu J, Tamura M and Yamada K: Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated MAP kinase signaling pathways. J Cell Biol 143: 1375-1383, 1998.
25. Sansal I and Sellers WR: The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. J Clin Oncol 22: 2954-2963, 2004.
26. Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Ki Hong W and Mao L: Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127: 1441-1445, 2001.
27. Squarize CH, Castilho RM and Santos Pinto D: Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. J Oral Pathol Med 7: 379-384, 2002
28. Schimanski CC, Linnemann U and Berger MR: Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. Cancer Res 59: 5169-5175, 1999.
29. Chergui F, Chrétien AS, Bouali S, Ramacci C, Rouyer M, Bastogne T, Genin P, Leroux A and Merlin JL: Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. Clin Chem 55: 1327-1336, 2009.
30. Weber A, Langhanki L, Sommerer S, Markwarth A, Wittekind C and Tannapfel A: Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oncogene 22: 4757-4759, 2003.
31. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, De Placido S, Myers JN and Papadimitrakopoulou VA: Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. Cancer 104: 2430-2436, 2005.
32. Pedrero JMG, Carracedo DG, Munoz Pinto C, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS and Gonzalez MV: Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer 114: 244-248, 2005.
33. Kiyota A, Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Ueyama Y, Matsumara T, Tachikawa T and Wong DT: Anti-epiderml growth factor receptor monoclonal antibody 225 upregulates $p27^{(Kip1)}$ and $p15^{(Ink4B)}$ and induces G1 arrest in oral squamous carcinoma cell lines. Oncology 63: 92-98, 2002.
34. Harari PM and Huang SM: Head and neck cancer as a clinical model for molecular targeting of therapy: combining EGFR blockade with radiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 49: 427-433, 2001.
35. Maehama T: PTEN: its deregulation and tumorigenesis. Biol Pharm Bull 30: 1624-1627, 2007.
36. Vitolo MI, Weiss MB, Szmacinski M, Tahir K, Waldman T, Ho Park B, Martin SS, Weber DJ and Bachman KE: Deletion of PTEN promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells. Cancer Res 69: 8275-8283, 2009.
37. Hayashi H, Tsuchiya Y, Nakayama K, Satoh T and Nishida E: Down-regulation of the PI3-kinase/AKT pathway by ERK MAP Kinase in growth factor signaling. Genes Cells 13: 941-947, 2008.
38. Weng LP, Brown JL and Eng C: PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through PI3K/AKT-dependent and independent pathways. Hum Mol Genet 10: 237-242, 2001.
39. Chung JH, Ostrowski MC, Roomigh T, Minaguchi T, Waite KA and Eng C: The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. Hum Mol Genet 17: 2553-2559, 2006.

1. Byers T. Two decades of declining cancer mortality: progress with disparity. Annu Rev Public Health. 2010 Apr 21;31:121-32.
2. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. Nature. 2008 Apr 3;452(7187):548-52.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
5. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature. 2001 May 17;411(6835):355-65.
6. Hubert P. [Growth factors of the EGF family and their receptors]. Bull Cancer. 2007;94(7 Suppl):F137-45.
7. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. Cell Signal. 2005 Oct;17(10):1183-93.
8. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:195-217.
9. Azria D, Spano J. Thérapies ciblées en cancérologie: Libbey Eurotext; 2006.
10. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. Trends Mol Med. 2007 Dec;13(12):527-34.
11. Cai W, Niu G, Chen X. Multimodality imaging of the HER-kinase axis in cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008 Jan;35(1):186-208.
12. Amin DN, Campbell MR, Moasser MM. The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. Semin Cell Dev Biol. 2010 Dec;21(9):944-50.
13. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. Cell Mol Life Sci. 2008 May;65(10):1566-84.
14. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. Exp Cell Res. 2003 Mar 10;284(1):99-110.
15. Robert J. Signalisation cellulaire et cancer: Springer; 2010.
16. Kataoka H. EGFR ligands and their signaling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. J Dermatol Sci. 2009 Dec;56(3):148-53.
17. Garcia-Saenz JA, Sastre J, Diaz-Rubio Garcia E. Biomarkers and anti-EGFR therapies for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. Clin Transl Oncol. 2009 Nov;11(11):737-47.
18. Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 25;96(11):6235-40.
19. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004 May;4(5):361-70.
20. Gusterson BA, Hunter KD. Should we be surprised at the paucity of response to EGFR inhibitors? Lancet Oncol. 2009 May;10(5):522-7.
21. Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardiello F, Tortora G. Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors. Targeted Oncology. 2007;2(1):31-7.
22. Azuma M, Danenberg KD, Iqbal S, El-Khoueiry A, Zhang W, Yang D, et al. Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor variant III gene expression in metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer. 2006 Sep;6(3):214-8.
23. Spindler KL, Olsen DA, Nielsen JN, Brandslund I, Poulsen HS, Villingshoj M, et al. Lack of the type III epidermal growth factor receptor mutation in colorectal cancer. Anticancer Res. 2006 Nov-Dec;26(6C):4889-93.

24. Weihua Z, Tsan R, Huang WC, Wu Q, Chiu CH, Fidler IJ, et al. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. Cancer Cell. 2008 May;13(5):385-93.
25. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. Cell. 2002 Sep 20;110(6):669-72.
26. Defize LH, Boonstra J, Meisenhelder J, Kruijer W, Tertoolen LG, Tilly BC, et al. Signal transduction by epidermal growth factor occurs through the subclass of high affinity receptors. J Cell Biol. 1989 Nov;109(5):2495-507.
27. Ozcan F, Klein P, Lemmon MA, Lax I, Schlessinger J. On the nature of low- and high-affinity EGF receptors on living cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5735-40.
28. Ringerike T, Stang E, Johannessen LE, Sandnes D, Levy FO, Madshus IH. High-affinity binding of epidermal growth factor (EGF) to EGF receptor is disrupted by overexpression of mutant dynamin (K44A). J Biol Chem. 1998 Jul 3;273(27):16639-42.
29. Krall JA, Beyer EM, MacBeath G. High- and low-affinity epidermal growth factor receptor-ligand interactions activate distinct signaling pathways. PLoS One. 2011;6(1):e15945.
30. Sako Y, Minoghchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. Nat Cell Biol. 2000 Mar;2(3):168-72.
31. Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. Cancer Res. 2011 Feb 1;71(3):1103-14.
32. Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. Br J Cancer. 2007;96 Suppl:R16-20.
33. Lo HW. Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications. Discov Med. 2010 Jul;10(50):44-51.
34. Lo HW, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Huang SF, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. Cancer Res. 2005 Jan 1;65(1):338-48.
35. Penault-Llorca F, Bibeau F, Arnould L, Bralet MP, Rochaix P, Sabourin JC. [EGFR expression in colorectal cancer and role in tumorigenesis]. Bull Cancer. 2005 Aug;92(Spec no):S5-11.
36. Baselga J. Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. J Clin Oncol. 2001 Sep 15;19(18 Suppl):41S-4S.
37. Moon C, Chae YK, Lee J. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. Exp Biol Med (Maywood). 2010 Aug;235(8):907-20.
38. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol. 1997 Dec;8(12):1197-206.
39. Pines G, Kostler WJ, Yarden Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. FEBS Lett. 2010 Jun 18;584(12):2699-706.
40. Rivera F, Vega-Villegas ME, Lopez-Brea MF, Marquez R. Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. Acta Oncol. 2008;47(1):9-19.
41. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. J Clin Oncol. 2005 Mar 20;23(9):1803-10.

42. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. J Clin Oncol. 1993 Oct;11(10):1873-8.
43. Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, et al. Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGRF) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. Eur J Cancer. 2005 Feb;41(3):453-60.
44. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2004 Jul 22;351(4):337-45.
45. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. Clin Cancer Res. 2001 Jul;7(7):1850-5.
46. Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Benedetti JK, Baker AF, et al. Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. J Clin Oncol. 2006 Oct 20;24(30):4922-7.
47. Lordick F, Luber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Woll E, et al. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). Br J Cancer. Feb 2;102(3):500-5.
48. Burtness B. Her signaling in pancreatic cancer. Expert Opin Biol Ther. 2007 Jun;7(6):823-9.
49. Giltnane JM, Ryden L, Cregger M, Bendahl PO, Jirstrom K, Rimm DL. Quantitative measurement of epidermal growth factor receptor is a negative predictive factor for tamoxifen response in hormone receptor positive premenopausal breast cancer. J Clin Oncol. 2007 Jul 20;25(21):3007-14.
50. Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. Cancer Control. 2007 Jul;14(3):295-304.
51. Cohen D, Lane B, Jin T, Magi-Galluzzi C, Finke J, Rini BI, et al. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. Clin Genitourin Cancer. 2007 Mar;5(4):264-70.
52. Raizer JJ. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. J Neurooncol. 2005 Aug;74(1):77-86.
53. Pelloski CE, Ballman KV, Furth AF, Zhang L, Lin E, Sulman EP, et al. Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. J Clin Oncol. 2007 Jun 1;25(16):2288-94.
54. Edwards J, Traynor P, Munro AF, Pirret CF, Dunne B, Bartlett JM. The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. Clin Cancer Res. 2006 Jan 1;12(1):123-30.
55. Bellone S, Frera G, Landolfi G, Romani C, Bandiera E, Tognon G, et al. Overexpression of epidermal growth factor type-1 receptor (EGF-R1) in cervical cancer: implications for Cetuximab-mediated therapy in recurrent/metastatic disease. Gynecol Oncol. 2007 Sep;106(3):513-20.
56. Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1127-32.
57. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci. 2005 Mar 1;118(Pt 5):843-6.

58. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. Clin Cancer Res. 2010 Jul 1;16(13):3329-34.
59. Buhrman G, Wink G, Mattos C. Transformation efficiency of RasQ61 mutants linked to structural features of the switch regions in the presence of Raf. Structure. 2007 Dec;15(12):1618-29.
60. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene. 2007 May 14;26(22):3100-12.
61. Wang S, Ghosh RN, Chellappan SP. Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. Mol Cell Biol. 1998 Dec;18(12):7487-98.
62. Gardner AM, Vaillancourt RR, Lange-Carter CA, Johnson GL. MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. Mol Biol Cell. 1994 Feb;5(2):193-201.
63. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40(12):2707-19.
64. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. Adv Cancer Res. 2009;102:19-65.
65. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat Rev Cancer. 2009 Aug;9(8):550-62.
66. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. Adv Cancer Res. 2005;94:29-86.
67. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. Cell. 2007 Jan 12;128(1):157-70.
68. Ma WW, Adjei AA. Novel agents on the horizon for cancer therapy. CA Cancer J Clin. 2009 Mar-Apr;59(2):111-37.
69. Vignot S, Soria JC. Thérapies moléculaires ciblées - De la biologie aux applications: John Libbey; 2008.
70. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. Nat Rev Cancer. 2006 Sep;6(9):714-27.
71. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, et al. Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. J Clin Oncol. 2009 Mar 1;27(7):1122-9.
72. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. Am J Pathol. 1997 Dec;151(6):1523-30.
73. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Caputo R, Pomatico G, et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. Clin Cancer Res. 2000 Sep;6(9):3739-47.
74. Viloria-Petit A, Crombet T, Jothy S, Hicklin D, Bohlen P, Schlaeppi JM, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. Cancer Res. 2001 Jul 1;61(13):5090-101.
75. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. Nat Rev Clin Oncol. 2010 Sep;7(9):493-507.
76. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001 Mar;69(3):89-95.

77. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. Eur J Cancer. 2008 May;44(7):946-53.
78. Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. J Clin Oncol. 2005 Mar 20;23(9):2020-7.
79. Van Cutsem E, Dicato M, Arber N, Berlin J, Cervantes A, Ciardiello F, et al. Molecular markers and biological targeted therapies in metastatic colorectal cancer: expert opinion and recommendations derived from the 11th ESMO/World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2009. Ann Oncol. 2010 Jun;21 Suppl 6:vi1-10.
80. Buyse M. Statistical issues in identifying, validating, and using molecular markers in clinical trials. ESMO - Impakt Breast cancer conference; 2009 7-9 may 2009; Brussel; 2009.
81. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. J Clin Oncol. 2004 Apr 1;22(7):1201-8.
82. Hebbar M, Wacrenier A, Desauw C, Romano O, Cattan S, Triboulet JP, et al. Lack of usefulness of epidermal growth factor receptor expression determination for cetuximab therapy in patients with colorectal cancer. Anticancer Drugs. 2006 Aug;17(7):855-7.
83. Hecht JR, Mitchell E, Neubauer MA, Burris HA, 3rd, Swanson P, Lopez T, et al. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2010 Apr 1;16(7):2205-13.
84. Perez-Soler R, Chachoua A, Hammond LA, Rowinsky EK, Huberman M, Karp D, et al. Determinants of tumor response and survival with erlotinib in patients with non--small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2004 Aug 15;22(16):3238-47.
85. Parra HS, Cavina R, Latteri F, Zucali PA, Campagnoli E, Morenghi E, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib ('Iressa', ZD1839) in non-small-cell lung cancer. Br J Cancer. 2004 Jul 19;91(2):208-12.
86. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2008 Jan 20;26(3):374-9.
87. Krause M, Baumann M. Clinical biomarkers of kinase activity: examples from EGFR inhibition trials. Cancer Metastasis Rev. 2008 Sep;27(3):387-402.
88. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. J Clin Oncol. 2009 Dec 10;27(35):5924-30.
89. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. Lancet Oncol. 2005 May;6(5):279-86.
90. Lievre 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 Apr 15;66(8):3992-5.
91. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. J Clin Oncol. 2007 Aug 1;25(22):3238-45.
92. 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 Oct 22;97(8):1139-45.
93. Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, De Hertogh G, De Schutter J, Biesmans B, et al. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. Clin Cancer Res. 2008 Sep 15;14(18):5869-76.

94. Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, Janne PA, Carnaghi C, Calandri C, et al. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. Ann Oncol. 2008 Apr;19(4):717-23.
95. Goncalves A, Esteyries S, Taylor-Smedra B, Lagarde A, Ayadi M, Monges G, et al. A polymorphism of EGFR extracellular domain is associated with progression free-survival in metastatic colorectal cancer patients receiving cetuximab-based treatment. BMC Cancer. 2008;8:169.
96. Italiano A, Follana P, Caroli FX, Badetti JL, Benchimol D, Garnier G, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors for which FISH analysis does not detect an increase in EGFR gene copy number. Ann Surg Oncol. 2008 Feb;15(2):649-54.
97. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. J Clin Oncol. 2006 Oct 20;24(30):4914-21.
98. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2007 Aug 1;25(22):3230-7.
99. Richman SD, Hutchins GG, Seymour MT, Quirke P. What can the molecular pathologist offer for optimal decision making? Ann Oncol. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii123-vii9.
100. Chopra A. [177Lu]-Labeled [(R)-2-amino-3-(4-isothiocyanatophenyl)propyl]-trans-(S,S)-cyclohexane-1,2 -diamine-pentaacetic acid (CHX-A"-DTPA) conjugated monoclonal antibody L8A4 against epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII). Molecular Imaging & Contrast Agent Database. 2010;NIH.
101. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. Clin Cancer Res. 2006 Sep 1;12(17):5064-73.
102. Di Fiore F, Sesboue R, Michel P, Sabourin JC, Frebourg T. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2010 Dec 7;103(12):1765-72.
103. Lievre A, Blons H, Laurent-Puig P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. Oncogene. 2010 May 27;29(21):3033-43.
104. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
105. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. J Natl Cancer Inst. 1993 Dec 15;85(24):2004-7.
106. http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/.
107. Fujita M, Enomoto T, Inoue M, Tanizawa O, Ozaki M, Rice JM, et al. Alteration of the p53 tumor suppressor gene occurs independently of K-ras activation and more frequently in serous adenocarcinomas than in other common epithelial tumors of the human ovary. Jpn J Cancer Res. 1994 Dec;85(12):1247-56.
108. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
109. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. Cancer Res. 2007 Mar 15;67(6):2643-8.

110. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol. 2008 Mar;19(3):508-15.
111. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. Br J Cancer. 2007 Apr 23;96(8):1166-9.
112. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med. 2008 Oct 23;359(17):1757-65.
113. Van Custem E. A meta-analysis of the CRYSTAL and OPUS studies combining cetuximab with chemotherapy (CT) as 1stline treatment for patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): results according to KRAS and BRAF mutation status. Eur J Cancer 7(Suppl): 345. 2009.
114. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann J, De Braud F, Schuch G, Zubel A. Cetuximab plus 5-FU/FA/oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): OPUS, a randomised phase II study. J Clin Oncol 25 (172 suppl) (2007) abstr 4035. 2007.
115. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol. 2008 Oct;9(10):962-72.
116. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, et al. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol Ther. 2006 Aug;5(8):928-32.
117. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. The Lancet Oncology. 2010;11(8):753-62.
118. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2009 Aug 18;101(4):715-21.
119. Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Di Nicolantonio F, Pozzi F, Funaioli C, Gambi V, et al. Integrated molecular dissection of the epidermal growth factor receptor (EFGR) oncogenic pathway to predict response to EGFR-targeted monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. Target Oncol. 2010 Mar;5(1):19-28.
120. Mao C, Liao RY, Qiu LX, Wang XW, Ding H, Chen Q. BRAF V600E mutation and resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. Mol Biol Rep. 2011 Apr;38(4):2219-23.
121. Russo A, Rizzo S, Bronte G, Silvestris N, Colucci G, Gebbia N, et al. The long and winding road to useful predictive factors for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal carcinoma: the KRAS/BRAF pathway. Oncology. 2009;77 Suppl 1:57-68.
122. Lievre A, Rouleau E, Buecher B, Mitry E. [Clinical significance of BRAF mutations in colorectal cancer]. Bull Cancer. 2010 Dec;97(12):1441-52.
123. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008 Dec 10;26(35):5705-12.
124. Normanno N, Tejpar S, Ciardiello F. Re: Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2010 Apr 21;102(8):573; author reply -5.

125. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Response: Re: Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2010 Apr 21;102(8):573-5.
126. Souglakos J, Philips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2009 Aug 4;101(3):465-72.
127. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2010 Mar 1;28(7):1254-61.
128. Kim SM, Kim JS, Kim JH, Yun CO, Kim EM, Kim HK, et al. Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells. Cancer Lett. 2010 Oct 28;296(2):150-9.
129. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. J Clin Oncol. 2009 Mar 20;27(9):1477-84.
130. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer Res. 2009 Mar 1;69(5):1851-7.
131. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. Ann Oncol. 2009 Jan;20(1):84-90.
132. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. Cancer Res. 1997 Nov 15;57(22):4997-5000.
133. Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C, Mulligan LM. Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas. Oncogene. 1998 Apr 2;16(13):1743-8.
134. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Apr 28;95(9):5246-50.
135. Guldberg P, thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. Cancer Res. 1997 Sep 1;57(17):3660-3.
136. Robertson GP, Furnari FB, Miele ME, Glendening MJ, Welch DR, Fountain JW, et al. In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 4;95(16):9418-23.
137. Gronbaek K, Zeuthen J, Guldberg P, Ralfkiaer E, Hou-Jensen K. Alterations of the MMAC1/PTEN gene in lymphoid malignancies. Blood. 1998 Jun 1;91(11):4388-90.
138. Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. Am J Pathol. 1999 Oct;155(4):1253-60.
139. Nassif NT, Lobo GP, Wu X, Henderson CJ, Morrison CD, Eng C, et al. PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer. Oncogene. 2004 Jan 15;23(2):617-28.
140. Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, Sfakianaki M, Pega F, Kalikaki A, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in >/= 2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. PLoS One. 2011;6(1):e15980.
141. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell. 2004 Aug;6(2):117-27.

142. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. J Clin Oncol. 2010 Jan 10;29(2):166-73.
143. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. Oncogene. 2008 Jun 26;27(28):3944-56.
144. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, et al. Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. Br J Cancer. 2008 Jul 8;99(1):83-9.
145. Winder T, Zhang W, Yang D, Ning Y, Bohanes P, Gerger A, et al. Germline polymorphisms in genes involved in the IGF1 pathway predict efficacy of cetuximab in wild-type KRAS mCRC patients. Clin Cancer Res. 2010 Nov 15;16(22):5591-602.
146. Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E. Mechanisms of disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway--therapeutic perspectives in cancer. Nat Clin Pract Oncol. 2007 Oct;4(10):591-602.
147. Oden-Gangloff A, Di Fiore F, Bibeau F, Lamy A, Bougeard G, Charbonnier F, et al. TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy. Br J Cancer. 2009 Apr 21;100(8):1330-5.
148. Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2009 Oct 20;27(30):5068-74.
149. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2009 Oct 7;101(19):1308-24.
150. Lopez-Albaitero A, Ferris RL. Immune activation by epidermal growth factor receptor specific monoclonal antibody therapy for head and neck cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2007 Dec;133(12):1277-81.
151. Paez D, Pare L, Espinosa I, Salazar J, del Rio E, Barnadas A, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and KRAS mutations: are they useful biomarkers of clinical outcome in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR-based therapy? Cancer Sci. 2010 Sep;101(9):2048-53.
152. Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, Caputo R, Damiano V, Troiani T, et al. Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy. Clin Cancer Res. 2004 Jan 15;10(2):784-93.
153. Vallbohmer D, Zhang W, Gordon M, Yang DY, Yun J, Press OA, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. J Clin Oncol. 2005 May 20;23(15):3536-44.
154. Lievre A, Laurent-Puig P. [Predictive factors of response to anti-EGFR treatments in colorectal cancer]. Bull Cancer. 2008 Jan;95(1):133-40.
155. Vincenzi B, Santini D, Rabitti C, Coppola R, Beomonte Zobel B, Trodella L, et al. Cetuximab and irinotecan as third-line therapy in advanced colorectal cancer patients: a single centre phase II trial. Br J Cancer. 2006 Mar 27;94(6):792-7.
156. Tejpar S, Peeters M, Humblet Y, Gelderblom H, Vermorken J, Viret F. Phase I/II study of cetuximab dose-escalation in patients with metastatic colorectal cancer with no or slight skin reactions on cetuximab standard dose treatment (Everest) : pharmacokinetic, pharmacodynamic and efficacy data. Proc Am Soc Clin Oncol 2007 ; 25 : 4037.
157. Sipples R. Common side effects of anti-EGFR therapy: acneform rash. Semin Oncol Nurs. 2006 Feb;22(1 Suppl 1):28-34.

158. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat Rev Cancer. 2005 Nov;5(11):845-56.
159. Mandrekar SJ, Sargent DJ. Clinical trial designs for predictive biomarker validation: theoretical considerations and practical challenges. J Clin Oncol. 2009 Aug 20;27(24):4027-34.
160. Freidlin B, Simon R. Adaptive signature design: an adaptive clinical trial design for generating and prospectively testing a gene expression signature for sensitive patients. Clin Cancer Res. 2005 Nov 1;11(21):7872-8.
161. Jiang W, Freidlin B, Simon R. Biomarker-adaptive threshold design: a procedure for evaluating treatment with possible biomarker-defined subset effect. J Natl Cancer Inst. 2007 Jul 4;99(13):1036-43.
162. Okano T, Kondo T, Fujii K, Nishimura T, Takano T, Ohe Y, et al. Proteomic signature corresponding to the response to gefitinib (Iressa, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2007 Feb 1;13(3):799-805.
163. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010 Jul 7.
164. Lee D, Yu M, Lee E, Kim H, Yang Y, Kim K, et al. Tumor-specific apoptosis caused by deletion of the ERBB3 pseudo-kinase in mouse intestinal epithelium. J Clin Invest. 2009 Sep;119(9):2702-13.
165. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nature Medicine. 2003;9(6):669-76.
166. Cidon EU. The challenge of metastatic colorectal cancer. Clin Med Insights Oncol. 2010;4:55-60.
167. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2009 Feb 10;27(5):663-71.
168. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N Engl J Med. 2007 Nov 15;357(20):2040-8.
169. Yang XD, Jia XC, Corvalan JR, Wang P, Davis CG. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. Crit Rev Oncol Hematol. 2001 Apr;38(1):17-23.
170. West NP, Dattani M, McShane P, Hutchins G, Grabsch J, Mueller W, et al. The proportion of tumour cells is an independent predictor for survival in colorectal cancer patients. Br J Cancer. 2010 May 11;102(10):1519-23.
171. Siena S, Peeters M, Van Cutsem E, Humblet Y, Conte P, Bajetta E, et al. Association of progression-free survival with patient-reported outcomes and survival: results from a randomised phase 3 trial of panitumumab. Br J Cancer. 2007 Dec 3;97(11):1469-74.
172. Siena S, Tabernero J, Cunningham D, Koralewski P, Ruff P, Rother M, et al. Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFOX4 compared to FOLFOX4 alone as first-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC): PRIME trial analysis by epidermal growth factor receptor (EGFR) tumor staining. J Clin Oncol. 2010. No 15_suppl (May 20 Supplement), 2010: 3566.
173. Peeters M, Cervantes-Ruiperez A, Strickland A, Ciuleanu T, Mainwaring PN, Tzekova VI, et al. Randomized phase III study of panitumumab (pmab) with FOLFIRI versus FOLFIRI alone as second-line treatment (tx) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis by tumor epidermal growth factor receptor (EGFR) staining. 2010 ASCO Annual Meeting; 2010; Chicago, USA: J Clin Oncol; 2010.
174. Fakih M, Vincent M. Adverse events associated with anti-EGFR therapies for the treatment of metastatic colorectal cancer. Curr Oncol. 2010 Jul;17 Suppl 1:S18-30.

175. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. Oncologist. 2008 Dec;13(12):1270-5.
176. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. Virchows Arch. 2008 Nov;453(5):417-31.
177. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. Nat Rev Clin Oncol. 2009 Sep;6(9):519-27.
178. Kohne CH. How to integrate molecular targeted agents in the continuum of care. Ann Oncol. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii134-vii9.
179. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. J Clin Oncol. 2009 Aug 1;27(22):3677-83.
180. Kobunai T, Watanabe T, Yamamoto Y, Eshima K. The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: a comparison between direct sequencing and real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Apr 23;395(1):158-62.
181. Perkins G, Lievre A, Ramacci C, Meatchi T, de Reynies A, Emile JF, et al. Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer. Int J Cancer. 2010 Sep 1;127(6):1321-31.
182. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. BMC Cancer. 2006;6:295.
183. Schimanski CC, Linnemann U, Berger MR. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. Cancer Res. 1999 Oct 15;59(20):5169-75.
184. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, Francois E, Formento P, Renee N, et al. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. Clin Cancer Res. 2008 Aug 1;14(15):4830-5.
185. Bouali S, Chretien AS, Ramacci C, Rouyer M, Becuwe P, Merlin JL. PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells. Oncol Rep. 2009 Mar;21(3):731-5.
186. Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J, et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. J Mol Diagn. 2010 Jan;12(1):35-42.
187. Gonzalez-Bosquet J, Calcei J, Wei JS, Garcia-Closas M, Sherman ME, Hewitt S, et al. Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers. PLoS One.6(1):e14522.
188. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. Hum Mutat. 2009 Jun;30(6):857-9.
189. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. BMC Cancer. 2008;8:142.
190. De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. Mutat Res. 2005 Jun 3;573(1-2):111-35.

191. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta. 2006 Jan;363(1-2):32-47.
192. De Petris P. Discovery and validation of protein biomarkers for lung cancer. Thèse. 2010.
193. Fadhil W, Ibrahem S, Seth R, Ilyas M. Quick-multiplex-consensus (QMC)-PCR followed by high-resolution melting: a simple and robust method for mutation detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. J Clin Pathol. 2010 Feb;63(2):134-40.
194. Xia W, Wei Y, Du Y, Liu J, Chang B, Yu YL, et al. Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. Mol Carcinog. 2009 Jul;48(7):610-7.
195. Lamy A, Blanchard F, Le Pessot F, Houlle S, Bossut J, Di Fiore F, et al. 2010. Metastatic CRCs KRAS genotyping in routine diagnosis: Results and pitfalls. 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol.
196. Gallegos Ruiz MI, Floor K, Rijmen F, Grunberg K, Rodriguez JA, Giaccone G. EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded versus frozen specimens. Cell Oncol. 2007;29(3):257-64.
197. Bibeau F, Frugier H, Crapez E, Lamy P, Ychou M, Boissière-Michot F. KRAS mutation testing in patients with metastatic colorectal carcinoma: An 18-month experience emphasizing the risk of false-negative results. ASCO; 2010: J Clin Oncol; 2010. p. suppl; abstr 3572.
198. J. Selves DG, R. Guimbaud, K. Gordien, S. Valmary, E. Delabesse, M. Danjoux, E. Tournier, S. Kirzin, P. Brousset. Impact of the amount of tumor cells in tissue samples for detection of KRAS mutations in colorectal cancer. ASCO; 2010: Journal of Clinical Oncology; 2010. p. suppl; abstr 3571.
199. F. Bibeau HF, E. Crapez, P. Lamy, M. Ychou, F. Boissière-Michot. KRAS mutation testing in patients with metastatic colorectal carcinoma: An 18-month experience emphasizing the risk of false-negative results. Journal of clinical Oncology; 2010; 2010.
200. Selves J, Grand D, Guimbaud R, Gordien K, Valmary S, Delabesse E, et al. Impact of the amount of tumor cells in tissue samples for detection of KRAS mutations in colorectal cancer. ASCO; 2010: J Clin Oncol; 2010.
201. Quirke P, Risio M, Lambert R, von Karsa L, Vieth M. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European recommendations. Virchows Arch. 2011 Nov 9.
202. Duby C, Robin S. Analyse en composantes principales. Grignon; 2006.
203. Falissard B. Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie: Masson; 2005.
204. Jolliffe JT. Principal component analysis, second edition: Springer; 2002.
205. Cassin P. Analyse des données et des panels de données: De Boeck Université; 1999.
206. Pan J, Chen HQ, Sun YH, Zhang JH, Luo XY. Comparative proteomic analysis of non-small-cell lung cancer and normal controls using serum label-free quantitative shotgun technology. Lung. 2008 Jul-Aug;186(4):255-61.
207. Boyd ZS, Wu QJ, O'Brien C, Spoerke J, Savage H, Fielder PJ, et al. Proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes and biomarkers of response to targeted kinase inhibitors using reverse-phase protein microarrays. Mol Cancer Ther. 2008 Dec;7(12):3695-706.
208. Verhoeckx KC, Bijlsma S, de Groene EM, Witkamp RF, van der Greef J, Rodenburg RJ. A combination of proteomics, principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line. Proteomics. 2004 Apr;4(4):1014-28.

209. Marko-Varga G, Ogiwara A, Nishimura T, Kawamura T, Fujii K, Kawakami T, et al. Personalized medicine and proteomics: lessons from non-small cell lung cancer. J Proteome Res. 2007 Aug;6(8):2925-35.
210. Pagès J. Analyse factorielle multiple appliquée aux variables qualitatives et aux données mixtes. Revue de Statistique Appliquée. 2002;L(4):5-37.
211. Miyanaga A, Gemma A, Noro R, Kataoka K, Matsuda K, Nara M, et al. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. Mol Cancer Ther. 2008 Jul;7(7):1923-30.
212. Bouali S. Transfert des gènes p53 et pten par vectorisation non virale : effet pro-apoptotique et potentialisation de le réponse cellulaire au cétuximab - Thèse d'université. 2008.
213. Mriouah J. Etude de l'impact de la perte d'expression de PTEN sur la réponse cellulaire au cetuximab et l'induction de l'angiogenèse par un modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou. 2010.
214. Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, Salter J, Detre S, A'Hern R, et al. Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. Breast Cancer Res. 2010 Sep 28;12(5):R76.
215. Siddiqui S, Rimm DL. Pre-analytic variables and phospho-specific antibodies: the Achilles heel of immunohistochemistry. Breast Cancer Res. 2010 Dec 20;12(6):113.
216. Espina V, Mueller C, Edmiston K, Sciro M, Petricoin EF, Liotta LA. Tissue is alive: New technologies are needed to address the problems of protein biomarker pre-analytical variability. Proteomics Clin Appl. 2009 Aug 1;3(8):874-82.
217. Rimm DL. Beyond IHC: Accurate, Reproducible, and Quantitative Measurement of Protein Analyte Concentrations in Fixed Tissue. College of American Pathologists Foundation's Futurescape conference; 2009; Rosemont; 2009.
218. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Pierantoni C, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway in primary colorectal tumours and related metastatic sites: optimising EGFR-targeted treatment options. Br J Cancer. 2007 Jul 2;97(1):92-7.
219. Ratain MJ, Glassman RH. Biomarkers in phase I oncology trials: signal, noise, or expensive distraction? Clin Cancer Res. 2007 Nov 15;13(22 Pt 1):6545-8.
220. Belief V, Boissiere F, Bibeau F, Desmetz C, Berthe ML, Rochaix P, et al. Proteomic analysis of RCL2 paraffin-embedded tissues. J Cell Mol Med. 2008 Oct;12(5B):2027-36.
221. Delfour C, Roger P, Bret C, Berthe ML, Rochaix P, Kalfa N, et al. RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. J Mol Diagn. 2006 May;8(2):157-69.
222. Gruson D, Bodovitz S. Rapid emergence of multimarker strategies in laboratory medicine. Biomarkers. 2010 Jun;15(4):289-96.
223. Galleges Ruiz MI, Floor K, Steinberg SM, Grunberg K, Thunnissen FB, Belien JA, et al. Combined assessment of EGFR pathway-related molecular markers and prognosis of NSCLC patients. Br J Cancer. 2009 Jan 13;100(1):145-52.
224. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, Saletti P, et al. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. PLoS One. 2009;4(10):e7287.
225. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. N Engl J Med. 2005 Nov 10;353(19):2012-24.
226. Bonetta L. Protein-protein interactions: Interactome under construction. Nature. 2010 Dec 9;468(7325):851-4.

227. Kholodenko B. Employing Systems Biology to Quantify Receptor Tyrosine Kinase Signaling in Time and Space Springer; 2010.
228. Kholodenko BN, Hancock JF, Kolch W. Signalling ballet in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Jun;11(6):414-26.
229. Simon R. Clinical trial designs for evaluating the medical utility of prognostic and predictive biomarkers in oncology. Per Med. 2010 Jan 1;7(1):33-47.
230. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). Eur J Cancer. 2005 Aug;41(12):1690-6.
231. Vickers AJ, Jang K, Sargent D, Lilja H, Kattan MW. Systematic review of statistical methods used in molecular marker studies in cancer. Cancer. 2008 Apr 15;112(8):1862-8.

RESUME

Les thérapies ciblées, anticorps monoclonaux et inhibiteurs de kinase, dirigées contre les récepteurs de la famille des *Human Epidermal Growth Factor Receptors* (HER) représentent un progrès majeur en cancérologie. Leur efficacité repose sur leur capacité à inhiber la signalisation oncogénique notamment recrutant les voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT.

Indépendamment de l'expression de la cible moléculaire, l'activité des thérapies ciblées est tributaire de la présence dans le tissu tumoral d'anomalies génétiques capables de perturber la signalisation cellulaire tumorale en aval des récepteurs dont la recherche fait maintenant partie des critères de prescription.

C'est ainsi que dans les cancers colorectaux, la prescription des anticorps anti-EGFR est restreinte aux patients dont la tumeur est dépourvue de mutations *KRAS*. Cependant, ce critère génétique apparait encore insuffisant et il apparaît primordial d'identifier des marqueurs additionnels pertinents, pour prédire efficacement l'efficacité thérapeutique.

Notre travail a consisté à évaluer l'intérêt de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation par analyse multiplexe des niveaux d'expression des formes phosphorylées des principales kinases intracellulaires en aval des récepteurs HER. La preuve de concept a été tout d'abord apportée sur des modèles cellulaires génétiquement modifiés, en montrant l'impact d'anomalies génétiques tumorales sur la fonctionnalité des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT et sur la réponse au cétuximab. Dans la seconde partie de ce travail, après validation des techniques utilisées en situation clinique, nous avons montré la pertinence d'une approche de biologie intégrative combinant analyse de génétique moléculaire et analyses fonctionnelles avec analyse en composante principale. Nos résultats, obtenus au cours d'une étude clinique rétrospective dans les cancers colorectaux métastatiques, suggèrent que l'utilisation des données issues de l'évaluation de la fonctionnalité des voies de signalisation en aval des récepteurs HER, pourraient à terme trouver des applications en qualité de marqueurs prédictifs de réponse clinique aux thérapies ciblées anti-HER.

Mots clé : cancer, cétuximab, panitumumab, EGFR, signalisation cellulaire

ABSTRACT

Targeted therapies, monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors, directed against the *Human Epidermal Growth Factor Receptors* (HER) family, represent a major advance in oncology. Their efficacy depends on their ability to inhibit oncogenic signalling, including the RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT signalling pathways.

Regardless of the expression of the molecular target, the efficacy of targeted therapies is independent on the genetic abnormalities of the tissue which are able to disrupt tumour cell signalling, and the research of these abnormalities is now included in the prescription criteria.

Thus, in colorectal cancer, anti-EGFR antibodies prescription is restricted to patients bearing KRAS wild-type tumour. However, this genetic criterion appears still insufficient and identification of additional markers for predicting therapeutic efficiency are needed.

The aim of this work was to evaluate the usefulness of assessing HER downstream signalling functionality using multiplex analysis of the phosphorylated forms of key intracellular kinase signalling. Proof of concept was first introduced with genetically modified cell lines models, showing the consequences of tumour genetic abnormalities on RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT signalling pathways and on response to cetuximab. In the second part of this work, after validation of the techniques used in clinical situation, we demonstrated the relevance of system biology approach, combining molecular biology and functional analysis with principal component analysis. Our results obtained in a retrospective clinical study in metastatic colorectal cancer, suggests that the use of data from the evaluation of HER downstream signalling pathways functionality could eventually find applications as predictive markers of clinical response to anti-HER targeted therapies.

Key-words: cancer, cetuximab, panitumumab, EGFR, cell signalling