Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Laboratoire GRC n°04 Theranoscan

Facteurs de résistance à la chimiothérapie à base de sels de platine dans les cancers bronchiques non à petites cellules

Rôle de la voie Sonic Hedgehog dans la chimiorésistance

Par Etienne GIROUX LEPRIEUR

Thèse de doctorat de Sciences du Vivant

Dirigée par Marie WISLEZ

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2014

Devant un jury composé de :

Jacques Cadranel, Professeur des Universités, Université Paris 6 (Président du jury)
Marie Wislez, Professeur des Universités, Université Paris 6 (Directrice de thèse)
Nathalie Heuze, Chargée de recherche, Université de Tours (Rapporteur)
Julien Mazières, Professeur des Universités, Université de Toulouse (Rapporteur)
Thierry Chinet, Professeur des Universités, Université Versailles – Saint Quentin en Yvelines
Amandine Hurbin, Chargée de recherche, Université de Grenoble

Remerciements

- Je tiens d'abord à remercier Marie Wislez, qui a été ma directrice de thèse pendant ces quatre années. Ses qualités humaines et professionnelles, son énergie et sa rigueur scientifique ont été pour moi exemplaires. Je la remercie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'avoir permis de travailler sur la voie Sonic Hedgehog, et facilité toutes les collaborations que nous avons développées dernièrement.

- Un grand merci également à David Jablons et Biao He, qui m'ont ouvert les portes de leur unité de recherche à l'Université de Californie à San Francisco. Ce séjour a été pour moi extrêmement enrichissant, et m'a permis de travailler sur de nombreux projets de grande qualité.

- Je remercie aussi Martine Antoine, Nathalie Mathiot et Laurène Schlick pour leur aide précieuse dans la réalisation des différents projets. Je n'aurais pas réussi cette thèse sans leur travail et leurs conseils.

- Merci également à Thierry Chinet qui a grandement facilité la réalisation de cette thèse, en me donnant le temps nécessaire pour mon travail au laboratoire.

- Enfin, je remercie le Président du Jury (Jacques Cadranel), les rapporteurs de cette thèse (Nathalie Heuze et Julien Mazières) et les examinateurs du jury (Thierry Chinet et Amandine Hurbain) pour leur temps consacré à cette soutenance.

- Je dédicace enfin cette thèse à Céline, Arthur et Chloé.

Table des matières

I. INTRODUCTION 6

1. Données épidémiologiques du cancer bronchique 6

2. Facteurs de risque du cancer bronchique 7

2.1. Tabac 7

2.2. Amiante 8

2.3. Autres facteurs de risque 8

3. Classification anatomo-pathologique du cancer bronchique 9

4. Stadification TNM 12

5. Principaux oncogènes et anomalies moléculaires des CBNPC 16

5.1. Mutations de *Kras* 18

5.2. Mutations de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR, ErbB1) 18

5.3. Translocation d'*ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) 19

5.4. Mutations d'*HER2* (ErbB2) 20

5.5. Mutations de *Braf* 20

5.6. Autres anomalies moléculaires des CBNPC 21

6. Stratégie thérapeutique des CBNPC 21

6.1. Stade I et II (CBNPC résécable) 21

6.2. Stade III (CBNPC localement avancé) 23

6.3. Stade IV (CBNPC métastatique) 23

6.3.1. En l'absence de mutation d'EGFR ou si impossibilité de rechercher la mutation 24

6.3.2. En cas de mutation activatrice d'EGFR 26

6.3.3. Traitement de maintenance 26

6.4. Populations particulières : patients âgés et patients avec altération de l'état général 29

6.5. Chimiothérapie de 2ième et 3ième ligne 30

7. Principaux produits de chimiothérapie utilisés dans le traitement des CBNPC 30

7.1. Cisplatine (cis-diaminedichloroplatine(II)) et carboplatine (paraplatine) 30

7.2. Anti-métabolites 31

7.3. Inhibiteurs du fuseau 32

8. Facteurs impliqués dans la résistance aux sels de platine dans les études cliniques 33

8.1. ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementary group 1*) 35

8.2. BRCA1 (*Breast Cancer 1*) 38
8.3. ABC transporteurs 41
8.3.1. P-glycoprotéine (P-gp, MDR1) 41
8.3.2. MRP1, MRP2, MRP3 (ABCC1, ABCC2, ABCC3) 42
8.3.3. ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP) 43
8.4. Gluthatione-s-transferase-pi (GSTP1) 43
8.5. p53 44
8.6. XPD (ERCC2, *Excision Repair Cross-Complementary group 2*) 44
8.7. Kras 45
8.8. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) 45
8.9. Synthèse sur les facteurs de résistance à la chimiothérapie à base de platine dans le CBNPC 47
9. Voie Sonic Hedgehog 48
9.1. Protéine Sonic Hedgehog 48
9.2. Activation de la voie Shh 48
9.3. Rôle du cilium primaire à l'état physiologique 50
9.4. Phénomènes de rétrocontrôle négatif 52
9.5. Voie Shh dans le développement 52
9.6. Voie Shh et cancer 53
9.7. Gènes cibles de l'activation de Shh dans le cancer 56
9.8. Voie Shh, CSC et chimiorésistance 58
9.8.1. Généralités sur les CSC 58
9.8.2. Marqueurs de CSC 58
9.8.3. Limites de l'utilisation des marqueurs actuels pour la détection des CSC 61
9.8.4. Voie Shh et CSC 62
9.8.5. CSC et chimiorésistance 63
9.9. Voie Shh et c-Myc 65
II. OBJECTIFS DE LA THESE 67
III. RESUME DES ARTICLES ET MANUSCRITS 68
1. Etude des caractéristiques cliniques et moléculaires des patients avec CBNPC de stade avancé réfractaires à la chimiothérapie à base de platine 68
1.1. Présentation de l'article et commentaires 68
1.2. Article 1 68
2. Rôle de la voie Shh dans les cancers thoraciques 76
2.1. Article 2 76

3. Etude du rôle de l'activation de la voie Shh dans la résistance à la chimiothérapie à base de sel de platine dans les CBNPC de stade avancé 102

3.1. Présentation de l'article et commentaires 102

3.2. Article 3 105

4. Etude de l'interaction entre l'activation de la voie Shh et la TEM dans les carcinomes épidermoïdes bronchiques 128

4.1. Présentation de l'article et commentaires 128

4.2. Article 4 130

5. Activation de la voie Shh et chimiorésistance : exemple du mésothéliome pleural malin 137

5.1. Présentation de l'article et commentaires 137

5.2. Article 5 137

6. Etude de l'impact des cellules souches cancéreuses dans l'agressivité et la prolifération tumorale dans les CBNPC : exemple du rôle de c-Myc et de hPAF1C (Human RNA Polymerase II Associated Factor 1 Complex) 140

6.1. Présentation de l'article et commentaires 152

6.2. Article 6 154

IV. DISCUSSION 176

V. CONCLUSION 184

VI. ANNEXE : autres manuscrits 185

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 226

VIII. TABLE DES FIGURES 263

IX. TABLE DES TABLEAUX 264

I. INTRODUCTION

1. Données épidémiologiques du cancer bronchique

Le cancer bronchique se classe à la 4ième place des cancers en France, avec une incidence d'environ 39 495 nouveaux cas par an en 2012, soit 11,1% de l'ensemble des cancers (données Institut National du Cancer (InCa)). Il s'agit de la première cause de mortalité par cancer, avec environ 29 949 décès estimés par an en 2012. Le pronostic est particulièrement sombre, avec une médiane de survie à 5 ans de 14% (tous stades confondus). Il touche préférentiellement les hommes (70%), et l'âge moyen au diagnostic est de 65 ans. Chez l'homme, le cancer bronchique est le 2ième cancer incident avec 28 211 nouveaux cas en 2012 (14,1% des cancers de l'homme), derrière le cancer de prostate, et reste la première cause de décès par cancer (21 326 décès en 2012, 25% des décès par cancer chez l'homme). Après une augmentation constante du nombre de cancers bronchiques chez l'homme jusqu'au début des années 2000, on assiste à une lente décroissance de son incidence (incidence standardisée de 52,9 pour 100 000 en 2000, et de 51,7 pour 100 000 en 2012). Chez la femme, le cancer bronchique est le 3e cancer incident avec 11 284 nouveaux cas en 2012 (7,3% des cancers de la femme), derrière le cancer du sein et le cancer colorectal, et la 2ième cause de décès par cancer dans cette population (8 623 décès en 2012, 13,7% des décès par cancer chez la femme). A l'inverse de la population masculine, on assiste actuellement à une augmentation de l'incidence et de la mortalité du cancer bronchique chez la femme (incidence standardisée de 9,7 pour 100 000 en 2000, et de 18,6 pour 100 000 en 2012). Cette hausse touche essentiellement les femmes jeunes, entre 45 et 60 ans (mortalité par cancer bronchique multipliée par 2,6 dans cette tranche d'âge chez la femme). L'évolution de l'incidence du

cancer bronchique est liée à l'évolution du tabagisme en France. En effet, la consommation tabagique a commencé à diminuer chez les hommes à partir du début des années 1980, tandis que celle des femmes a commencé à diminuer à partir des années 1990. De plus, le risque de cancer bronchique, à tabagisme égal, est supérieur chez les femmes par rapport aux hommes (Powell 2013). On peut donc s'attendre à une poursuite de l'augmentation de l'incidence et de la mortalité du cancer bronchique chez la femme pendant encore plusieurs années.

2. Facteurs de risque du cancer bronchique

2.1. Tabac

Le principal facteur de risque est le tabac. On estime qu'il est responsable d'environ 90% des cancers bronchiques. Le risque relatif de cancer bronchique en cas de tabagisme est de 10, et est corrélé à la durée d'exposition au tabac, l'âge de début de l'intoxication, et la quantité de tabac consommé (Doll 1994). L'effet carcinogène du tabac est lié à la présence, dans la fumée de cigarette, d'un grand nombre de produits chimiques connus comme étant cancérogène chez l'homme (par exemple : 4-(N-méthylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, arsenic, benzène, Benzo[a]pyrène, Cadmium, chromium héxavalent, formaldéhyde, nickel…) (Smith 2003). L'hypothèse actuellement acceptée de carcinogénèse multi-étape, faisant intervenir une succession de mutations somatiques et d'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, explique le délai souvent prolongé entre l'intoxication tabagique et la survenue d'un cancer bronchique cliniquement décelable.

Le tabagisme passif, c'est-à-dire l'exposition aux fumées de tabac dans son environnement, est également prouvé comme étant un facteur de risque de cancer bronchique (Afsset, Inserm

2008). On estime ainsi que le tabagisme passif domestique entraîne un sur-risque de 30% de cancer bronchique, et serait responsable d'environ 25% des cancers du non-fumeur.

2.2. Amiante

L'exposition à la poussière d'amiante expose à un risque relatif de cancer bronchique de 5 (Boffetta 2004). Il existe par ailleurs un effet synergique du tabac et de l'amiante : en cas d'exposition à l'amiante chez un fumeur, le risque relatif de cancer bronchique est de 50 (Boffetta 2004). Il existe deux principaux types de fibre d'amiante : le chrysotile et les amphiboles (essentiellement crocidolite et amosite), toutes deux cancérigènes. Il s'agit en France principalement d'exposition professionnelle, surtout dans les métiers du bâtiment (tôliers-chaudronniers, soudeurs, ajusteurs, carrossiers, plombiers, charpentiers, électriciens…). L'utilisation industrielle de l'amiante est interdite en France depuis le 1e janvier 1997. Il existe également des cas d'exposition environnementale, notamment en Grèce, en Afghanistan, en Chypre et en Turquie, où certaines roches peuvent contenir des fibres d'amiante.

2.3. Autres facteurs de risque

D'autres facteurs de risque ont été décrits. Ainsi l'exposition professionnelle à certains toxiques, comme les radiations ionisantes, l'arsenic, le nickel, l'acide chromique et certains chromates, le cadmium, les fumées de Diesel est reconnue comme maladie professionnelle en cas de survenue de cancer bronchique (Boffetta 2004).

L'exposition au radon serait la deuxième cause de cancer bronchique en France. Le radon est un gaz libéré lors de la désintégration de l'uranium du sol ou de la pierre. Ainsi, certaines

régions en France sont connues comme étant particulièrement exposées, comme le Massif Central, la Corse, la Bretagne et les Vosges.

Le rôle de la pollution atmosphérique reste débattu (Raaschou-Nielsen 2013). L'expertise collective de l'INSERM et L'Afsset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) sur « Cancer et Environnement » suggère que la pollution atmosphérique serait liée à un sur-risque modéré de cancer bronchique. Ce sur-risque serait dû à la présence de certains gaz (dioxyde de souffre, ozone, dioxyde d'azote) et la fumée de Diesel. Des études plus approfondies et sur de longues périodes de temps sont néanmoins nécessaires pour confirmer le rôle carcinogène de la pollution atmosphérique sur la survenue de cancer bronchique.

D'autres facteurs de risque de cancer bronchique ont également été décrits, comme certaines maladies pulmonaires chroniques (silicose, bérylliose, tuberculose), l'irradiation dans un cadre médical (radiothérapie thoracique), ou la consommation de cannabis.

3. Classification anatomo-pathologique du cancer bronchique

La grande majorité des cancers bronchiques correspondent au cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC, 85%), le reste étant constitué des cancers bronchiques à petites cellules (15%). La classification actuelle des CBNPC repose sur la classification de l'OMS 2004 (Travis 2004), dont les principales catégories sont : les lésions pré-néoplasiques, les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules.

Les lésions pré-néoplasiques regroupent trois entités : les dysplasies et carcinomes *in situ* bronchiques (lésion précurseur des carcinomes épidermoïdes), les hyperplasies alvéolaires

atypiques (lésion précurseur des adénocarcinomes), et l'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique (lésion précurseur des carcinoïdes). La carcinogénèse bronchique suit un processus dit « en champ ». Il s'agit de l'évolution de manière multicentrique et multi-étape de plusieurs lésions accumulant successivement des anomalies moléculaires et génétiques. Ainsi, suite à l'exposition répétée à différents carcinogènes, on passera d'un épithélium bronchique normal à une dysplasie (légère : atteinte du premier tiers de l'épithélium ; modérée : atteinte des deux-tiers de l'épithélium ; sévère : atteinte de toute la hauteur de l'épithélium), puis à un carcinome *in situ* (dysplasie sévère plus absence d'orientation de l'épithélium, et respect de la membrane basale épithéliale), et enfin à un carcinome invasif épidermoïde (atteinte de la membrane basale). L'hyperplasie alvéolaire atypique (HAA) correspond à la lésion prénéoplasique de l'adénocarcinome *in situ* (non mucineux le plus souvent, ou mucineux). Il s'agit d'une lésion de moins de 5 millimètres (mm), faite de cellules alvéolaires le long de la paroi alvéolaire et des bronchioles. L'HAA est fréquente chez le fumeur, et notamment chez les patients avec un adénocarcinome pulmonaire (incidence dans ce cas autour de 21%). La séquence HAA – adénocarcinome *in situ* – adénocarcinome invasif est encore incomplètement comprise, et la présence de multiples lésions d'HAA est possible sans une évolution systématique vers un phénotype agressif. L'hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique correspond aux lésions précurseurs des tumeurs carcinoïdes, qui font parties des tumeurs neuro-endocrines. Elle se caractérise par une prolifération de cellules neuroendocrines disséminée dans la paroi bronchique, au contact de la membrane basale de l'épithélium bronchique et bronchiolaire, avec une fréquente association à des ilôts de tumeurs carcinoïdes. La séquence hyperplasie neuroendocrine diffuse – tumeurs carcinoïdes – CBPC reste actuellement largement incomprise.

Les adénocarcinomes sont subdivisés en plusieurs catégories, selon la nouvelle classification proposée par l'IASLC/ATS/ERS (Travis 2011). Il s'agit de la forme histologique la plus

fréquente parmi les CBNPC (50%), avec une proportion croissante. La présentation radio-clinique est typiquement un nodule pulmonaire périphérique, de révélation fortuite ou tardive. On décrit les adénocarcinomes invasifs en fonction de leur architecture : acinaire (formation de tubes ou de glandes), papillaire (formation de papilles), micropapillaire (formation de papilles mais sans axe conjonctivo-vasculaire), solide (massifs de cellules de grande taille), lépidique (prolifération cellulaire le long des parois alvéolaires et bronchiolaires sans modification de l'architecture pulmonaire sous-jacente). Il existe également un certain nombre de variants : adénocarcinome mucineux à prédominance lépidique, cystadénocarcinome mucineux, adénocarcinome colloïde, adénocarcinome fœtal et adénocarcinome entérique. Enfin, une nouvelle entité intermédiaire a été décrite : l'adénocarcinome à invasion minime (adénocarcinome à prédominance lépidique avec moins de 5 mm ou moins de 10% d'invasion).

Le carcinome épidermoïde représente environ 30% des CBNPC. Il est intimement lié au tabac, et se présente volontiers sous la forme d'une tumeur proximale envahissant les grosses bronches. Les cellules tumorales sont de grande taille, avec des ponts d'union intercellulaire et/ou produisant de la kératine. Il existe quelques variantes : papillaire, à cellules claires, à petites cellules, basaloïde.

Le carcinome à grandes cellules est considéré comme un diagnostic d'élimination (5 à 20% des CBNPC). Il est constitué de cellules de grande taille, sans différenciation malpighienne, glandulaire ou neuro-endocrine. Plusieurs variantes ont été décrites : neuroendocrine à grandes cellules, carcinome basaloïde, carcinome *lymphoepithelioma-like*.

Les autres types histologiques de CBNPC regroupent les carcinomes adénosquameux et les carcinomes sarcomatoïdes. Les carcinomes adénosquameux sont rares (moins de 2%). Il s'agit de carcinomes épidermoïdes avec au moins 10% de contingent glandulaire, ou bien d'un

adénocarcinome avec au moins 10% de contingent malpighien. Les carcinomes sarcomatoïdes représentent également moins de 2% des cancers bronchiques. Il s'agit d'un sous-groupe hétérogène, constitué des carcinomes pléiomorphes, carcinomes à cellules fusiformes, carcinomes à cellules géantes, carcinosarcomes et des blastomes pulmonaires. Ces tumeurs sont particulièrement agressives et de mauvais pronostic.

Le cancer bronchique à petites cellules représente environ 10 à 15% de l'ensemble des cancers bronchiques. Il est fortement associé au tabagisme, a une croissance très rapide, et une fréquente dissémination métastatique d'emblée. Sur le plan histo-pathologique, le CBPC est caractérisé par des cellules pauvres en cytoplasme, avec une chromatine d'apparence granuleuse, une activité mitotique élevée et de grandes plages de nécrose. Ce type tumoral est particulièrement chimiosensible, mais avec une rechute fréquente rapide à l'issue du traitement.

4. Stadification TNM

La stadification TNM est une étape majeure dans la prise en charge d'un cancer bronchique. Elle a un intérêt pronostic et thérapeutique, guidant les choix des stratégies thérapeutiques. La classification TNM repose actuellement sur la 7e édition de 2009 (Goldstraw 2007). Le tableau 1 décrit cette classification, et le tableau 2 le regroupement en stade et leur corrélation pronostique.

Le descripteur T est basé sur la taille de la tumeur (moins de 2 cm, entre 2 et 3 cm, entre 3 et 7 cm, plus de 7 cm), sur l'envahissement des structures de voisinage (grosses bronches ou carène, paroi, diaphragme, plèvre, péricarde, nerf phrénique ou récurrent, médiastin, gros

vaisseaux, trachée, œsophage, vertèbre), et sur la présence de nodule dans un même lobe ou dans un lobe distinct homolatéral.

Le descripteur N est basé sur la présence ou non d'adénopathie tumorale hilaire ou médiastinale, homo-ou controlatérale.

Le descripteur M est basé sur la présence de métastases pleuro-pulmonaires (poumon controlatéral, épanchement pleural ou péricardique) ou à distance.

Tableau 1 : Classification TNM des cancers bronchiques (9ième édition)

T – Tumeur primitive

TX : Tumeur ne peut être évaluée ou est démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie

T0 : Pas d'évidence de tumeur primitive

Tis : Carcinome in situ

T1 : Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronchique lobaire (c-à-d pas la bronche souche)

T1a : Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension

T1b : Tumeur de plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension

T2 : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes :

• atteinte de la bronche de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène

• invasion de la plèvre viscérale

• présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilaire sans atteindre l'ensemble du poumon.

T2a : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension

T2b : Tumeur de plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension

* les tumeurs avec ces caractéristiques sont classées T2a si leur dimension est de 5 cm ou moins

T3 : Tumeur de plus de 7 cm ; ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleural ou pariétal ou le péricarde ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la caréna sans l'envahir ; ou associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe

T4 : Tumeur de tout taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint

N – Ganglions lymphatiques régionaux

NX : les ganglions ne peuvent pas être évalués

N0 : pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale

N1 : métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct

N2 : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou sous-carénaires

N3 : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou controlatéraux

M – Métastases à distance

MX : les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées

M0 : absence de métastase à distance

M1 : métastase à distance

M1a : Nodule(s) tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin

M1b : métastase à distance

Tableau 2 : Regroupement par stades TNM et corrélation au pronostic

Stade	T	N	M	Survie à 5 ans cTNM	Survie à 5 ans pTNM
IA	T1a, b	N0	M0	50 %	73 %
IB	T2a	N0	M0	43 %	58 %
IIA	T1a, b	N1	M0	36 %	46 %
	T2a	N1	M0		
	T2b	N0	M0		
IIB	T2b	N1	M0	25 %	36 %
	T3	N0	M0		
IIIA	T1, T2	N2	M0	19 %	24 %
	T3	N1, N2	M0		
	T4	N0, N1	M0		
IIIB	T4	N2	M	7 %	9 %
	Tout T	N3	M0	3 %	
IV	Tout T	Tout N	M1	2 %	

cTNM : classification TNM clinico-radiologique ; pTNM : classification TNM basée sur l'analyse anatomo-pathologique de la pièce opératoire

5. Principaux oncogènes et anomalies moléculaires des CBNPC

L'analyse génétique de plus de 10 000 CBNPC dans l'étude Biomarqueurs France a permis de déterminer qu'environ la moitié des CBNPC était porteur d'une signature moléculaire oncogénique identifiable (Figure 1) (Barlesi 2013a). Cette proportion est d'environ 65% chez les patients non-fumeurs (Figure 2A). Dans la population générale, comme chez les patients fumeurs (Figure 2B), l'anomalie moléculaire la plus fréquente était la présence d'une mutation de *Kras*. Chez les non-fumeurs, l'anomalie la plus fréquente était la présence d'une mutation de l'*EGFR*.

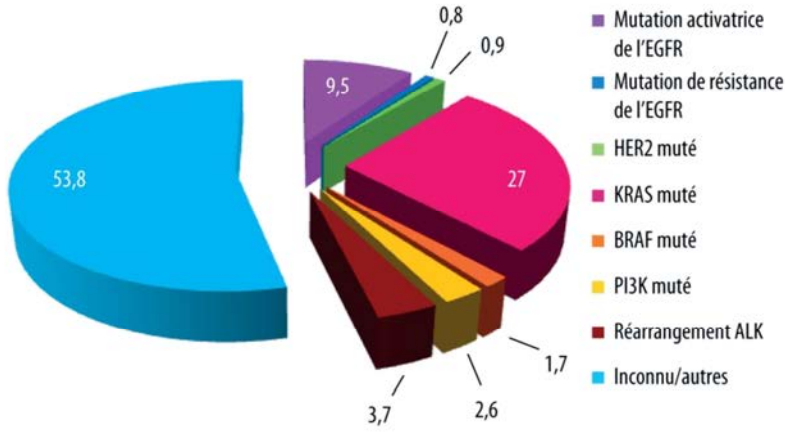


Figure 1 : Fréquence des différents types d'anomalies moléculaires dans le CBNPC. (d'après Barlesi 2013a)

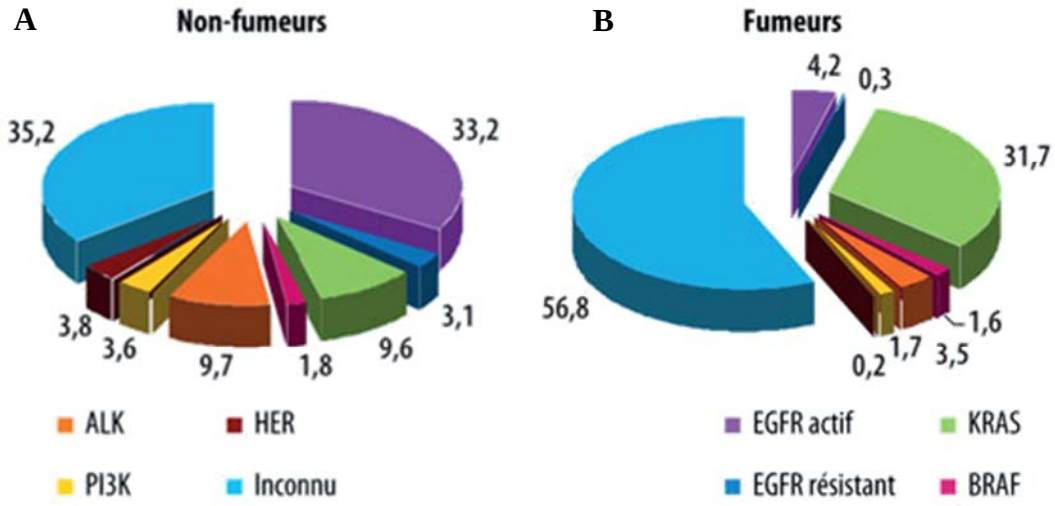


Figure 2 : Fréquence des différents types d'anomalies moléculaires dans le CBNPC, en fonction du statut tabagique. A : patient non-fumeur. B : patient fumeur. (d'après Barlesi 2013a)

5.1. Mutations de *Kras*

Les protéines Ras sont des protéines membranaires intervenant dans la transduction des signaux de croissance cellulaire reçus suite à l'activation des récepteurs tyrosines kinases membranaires (notamment EGFR, PDGFR, IGFR), et activant en aval la voie Raf – Mek – Erk, et la production de signaux cellulaires de prolifération. Les mutations de *Kras* sont fréquentes (environ 25% des CBNPC) (Barlesi 2013a). Elles concernent le codon 12 de *Kras*, ou plus rarement les codons 13 et 61. Elles entrainent une activation constitutive de Ras, indépendante des signaux d'amont. Il n'existe pas actuellement de thérapies ciblées en cas de mutation. La présence de mutation de *Kras* est plus fréquente chez le patient fumeur (Figure 2B) (Barlesi 2013a), et est associée à un mauvais pronostic (Mascaux 2005). Elle est également associée à une absence de réponse aux ITK de l'EGFR (Eberhard 20005, Pao 2005). Son caractère prédictif de résistance à la chimiothérapie cytotoxique est encore débattu (Loriot 2009, Mellema 2013). Il est actuellement admis que les mutations de *Kras* sont exclusives des mutations d'*EGFR* et de la translocation *ALK*.

5.2. Mutations de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR, Her1, ErbB1)

L'EGFR (Her1, ErbB1) est un récepteur membranaire à domaine tyrosine kinase, dont le ligand est l'EGF. Après fixation du ligand, EGFR forme un hétéro-dimère, le plus souvent avec Her2 (ErbB2), et s'ensuit une activation du domaine tyrosine kinase intracellulaire avec activation des voies Ras, PI3kinase (PI3K), STATs et PLCγ, qui entraine la production de signaux de prolifération et de survie cellulaire au sein de la cellule tumorale. La présence d'une mutation somatique du gène de l'*EGFR* au sein du chromosome 7 concerne 10 à 15% des CBNPC (Sharma 2007). Elle prédomine dans les carcinomes non-épidermoïdes, et notamment dans les adénocarcinomes. Elle est plus souvent présente chez la femme, en cas de

tabagisme peu important ou nul, et chez les asiatiques (Sharma 2007). Ainsi, la fréquence des mutations de l'*EGFR* est de plus de 30% chez le non-fumeur (Figure 2A) (Barlesi 2013a). Dans les CBNPC, les mutations d'EGFR touchent le domaine tyrosine kinase du récepteur, entrainant ainsi une auto-activation permanente de l'EGFR, indépendante de la fixation du ligand. Cette activation induit une activation permanente des voies d'aval (Sharma 2007). Les mutations d'*EGFR* les plus fréquentes sont présentes dans l'exon 19 (45% des cas), avec la délétion Del E746-A750, ou dans l'exon 21 (40 à 45% des cas), avec la substitution L858R. Toutes ces mutations sont associées à une sensibilité accrues aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR, comme l'erlotinib ou le gefitinib (Sharma 2007, Mok 2009). D'autres types de mutations sont possibles, comme les mutations des exons 18 ou 20 (avec notamment la substitution T790M), avec des réponses hétérogènes aux ITK de l'EGFR (sensibilité pour les mutations au sein de l'exon 18, résistance pour les mutations au sein de l'exon 20) (Beau-Faller 2014). En outre, la présence de mutations de l'*EGFR* serait associée à un meilleur pronostic (Eberhard 2005, Sharma 2007). Il est actuellement admis que les mutations d'*EGFR* sont exclusives des mutations de *Kras* et de la translocation *ALK*.

5.3. Translocation d'*ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*)

ALK est un récepteur membranaire à domaine tyrosine kinase. La translocation d'*ALK* est un événement rare (environ 5% des CBNPC) (Shaw 2009, Kwak 2010, Barlesi 2013a). On la retrouve de manière préférentielle chez les patients jeunes, non-fumeurs (Figure 2A) et dans les adénocarcinomes (Shaw 2009). Ces adénocarcinomes avec translocation d'*ALK* sont le plus souvent d'architecture solide ou acinaire, avec des massifs cribiformes et des cellules « en bague à chaton », et exprimant TTF1 (*Thyroid Transcription Factor 1*) (Shaw 2009). Elle résulte le plus souvent d'une inversion au sein du chromosome 2, induisant alors la formation

d'un gène de fusion et l'activation constitutive de la protéine ALK, avec stimulation des voies de signalisation d'aval (PI3K, STAT3, JAK2) (Soda 2007). Les réarrangements *ALK* impliquent l'exon 20 qui code pour la région tyrosine kinase d'ALK. Le gène partenaire du réarrangement est dans la très grande majorité des cas le gène *EML4* (*Echinoderm Microtubule associated protein Like 4*). D'autres partenaires ont été décrits, comme les gènes *TGF* (*TRK-fused gene*), *KIF5B* (*Kinesin Family member 5B*) et *KLC1* (*Kinesin Light Chain 1*). La présence d'une translocation d'*ALK* rend la tumeur particulièrement sensible à certaines thérapies ciblées, comme le crizotinib (Kwak 2010). Il est actuellement admis que la translocation *ALK* est exclusive des mutations d'*EGFR* et des mutations de *Kras*.

5.4. Mutations d'*HER2* (ErbB2)

HER2 est le partenaire de dimérisation privilégié d'EGFR. On retrouve une mutation d'*HER2* dans environ 2% des CBNPC, de manière préférentielle chez la femme, chez le patient non-fumeur et dans les adénocarcinomes (Barlesi 2013a). La plupart des mutations concerne l'exon 20 (chromosome 17), avec dans ce cas, de manière similaire aux mutations d'*EGFR*, une activation constitutive du domaine tyrosine kinase du récepteur et une activation des voies de signalisation d'aval (PI3K, Ras). La sensibilité de la tumeur porteuse d'une mutation d'*HER2* aux thérapies anti-HER2 est en cours d'exploration actuellement.

5.5. Mutations de *Braf*

Braf appartient à la famille des protéines Raf kinases, qui sont impliquée dans la voie de signalisation Ras – Raf – Mek – Erk. L'existence d'une mutation de *Braf* induit une activation de la protéine Braf et donc la phosphorylation de Mek, indépendamment de l'activation des

protéines d'amont. Les mutations de *Braf* ne concernent qu'environ 2% des CBNPC (Barlesi 2013a), et se rencontrent préférentiellement dans les adénocarcinomes. Elles sont majoritairement du type V600E (plus de 50% des cas de mutations). Les autres types de mutations de *Braf* décrites dans le CBNPC sont les G466V, G469A, L597V, Y472C. La majorité des mutations de *Braf* rendent la tumeur sensible aux inhibiteurs de Braf (comme le dabrafenib ou le vemurafenib).

5.6. Autres anomalies moléculaires dans le CBNPC

Outre les anomalies moléculaires les plus fréquentes décrites ci-dessus, d'autres signatures oncogéniques ont été décrites dans le CBNPC de manière beaucoup plus rare. Par exemple, des translocations de *Ros1*, des mutations de *PI3K*, une amplification de *Met*, ou des mutations de *Nras* ont été rapportées dans moins de 1 à 1% des cas pour chaque anomalie (Barlesi 2013a). Le développement de thérapies ciblées correspondant à ces signatures moléculaires est en cours, comme le crizotinib en cas de translocation *Ros1* ou d'amplification de *Met*.

6. Stratégie thérapeutique des CBNPC

6.1. Stade I et II (CBNPC résécable)

Le traitement de référence des CBNPC de stade I et II est la chirurgie d'exérèse carcinologique. Le geste optimal sera une lobectomie, quand cela est possible, couplée à un curage ganglionnaire médiastinal. La survie à 5 ans en cas de résection complète est de 70%.

En cas de contre-indication chirurgicale, le plus souvent du fait de comorbidités, des techniques alternatives à la chirurgie existent, comme la radiothérapie conformationnelle, la radiothérapie stéréotaxique ou la radiofréquence. La radiothérapie conformationnelle permet de délivrer de fortes doses de radiothérapie sur la cible tumorale par l'intermédiaire de multiples faisceaux d'irradiation, ce qui permet de limiter la toxicité sur les organes de voisinage. Cette radiothérapie peut être couplée à des techniques de détection des mouvements respiratoires (*gating*). La radiothérapie stéréotaxique consiste en l'administration de très fortes doses de radiothérapie sur la cible tumorale de manière très précise, grâce à de nouvelles technologies d'irradiation (type CyberKnife™). La radiofréquence consiste à administrer, grâce à un sonde placée dans la cible tumorale sous contrôle scannographique, des micro-ondes ou de la chaleur. Ces techniques sont encore en cours d'évaluation, et même si le taux de contrôle de la maladie semble intéressant, des études sont nécessaires pour évaluer le bénéfice à long terme. Ces différentes techniques alternatives sont réservées aux CBNPC de stade I.

Une chimiothérapie post-opératoire (adjuvante) est préconisée en cas de CBNPC de stade II ou avec découverte post-opératoire d'un envahissement médiastinal (pIIIa). Celle-ci sera constituée d'un doublet à base de sel de platine, et administrée pour 4 cures. L'intérêt de cette chimiothérapie adjuvante est la destruction des micro-métastases. Le bénéfice est significatif mais modeste, avec un bénéfice de survie de 4% à 5 ans. Dans le cas des CBNPC pN2 opérés, une radiothérapie médiastinale adjuvante pourra également être discutée. Des essais sont en cours pour évaluer ces stratégies.

6.2. Stade III (CBNPC localement avancé)

Le traitement de référence des CBNPC de stade III est l'association de chimiothérapie et de radiothérapie thoracique (radiochimiothérapie). Celle-ci sera faite de manière préférentielle selon un schéma concomitant (Aupérin 2010). La radiothérapie est administrée en conformationnelle.

Dans certains cas, une chirurgie pourra être discutée. C'est le cas notamment des tumeurs T4N0 ou N1, où une chirurgie à visée carcinologique pourra être réalisée dans un centre de chirurgie thoracique habitué à prendre en charge de telle tumeur. Par ailleurs, les CBNPC avec un envahissement médiastinal homolatéral uni-site (IIIaN2) peuvent être amenées à recevoir un traitement multimodal (traitement d'induction par chimiothérapie ou radio-chimiothérapie, chirurgie, radiothérapie adjuvante) après discussion pluridisciplinaire.

6.3. Stade IV (CBNPC métastatique)

La prise en charge des CBNPC métastatiques a considérablement évoluée depuis quelques années. Le démembrement moléculaire des adénocarcinomes a permis de découvrir des thérapies ciblées efficaces en cas d'addiction oncogénique correspondante. Ainsi, la première étape de prise en charge des CBNPC de stade IV, et notamment des non-épidermoïdes pour lesquels la majorité des anomalies moléculaires accessibles à un traitement ciblé ont été décrites, est la recherche d'une signature moléculaire sensible à une thérapie ciblée. Les anomalies moléculaires recherchées en pratique courante sont actuellement les mutations d'*EGFR*, les mutations de *Kras*, la translocation d'*ALK*, les mutations de *Braf*, les mutations d'*HER2*, les mutations de *PI3K*.

6.3.1. En l'absence de mutation d'EGFR ou si impossibilité de rechercher la mutation

En l'absence de mutation d'*EGFR* ou d'impossibilité de rechercher la mutation, le traitement de référence est une chimiothérapie à base de sel de platine, si l'état général le permet. La chimiothérapie améliore en effet la qualité de vie des patients et leur survie. Une méta-analyse publiée en 2008, regroupant 16 études randomisées comparant chimiothérapie et soins de support à soins de support seuls a ainsi montré un bénéfice net de la chimiothérapie en terme de survie (HR = 0,77; IC95% 0,71 – 0,83; p<0,0001). Une autre méta-analyse a également montré qu'il était préférable d'administrer un doublet de chimiothérapie plutôt qu'une monothérapie, que ce soit en terme de réponse tumorale (odds ratio OR = 0,42 ; IC95% 0,37 – 0,47; p<0,001) ou de la survie à 1 an (OR = 0,80; IC95% 0,70 – 0,91; p<0,001) (Delbaldo 2004). Par ailleurs, un triplet de chimiothérapie ne fait pas mieux qu'un doublet sur la survie (OR = 1,01 ; IC95% 0,85 – 1,21; p = 0,88). Ce doublet devra, en l'absence de contre-indication, comporter un sel de platine. En 2005, d'Addarion et al. (2005) ont montré dans une méta-analyse, la supériorité d'une chimiothérapie à base de platine en terme de réponse (OR = 1,62 ; IC95% 1,46 – 1,8 ; p<0,0001) et de survie sur une association sans sel de platine. La survie à un an était augmentée de 5% avec la chimiothérapie à base de platine (34% vs 29%; OR = 1,21 ; IC95% 1,9 – 1,35 ; p = 0,0003). La question du choix du sel de platine (cisplatine ou carboplatine) a été posée par une autre méta-analyse (Ardizzoni 2007). Il existait dans cette étude une supériorité du cisplatine en terme de réponse tumorale (OR = 1,37 ; IC95% 1,16 – 1,61 ; p<0,001), et une tendance non significative en faveur du cisplatine pour la survie (OR = 1,07 ; IC95% 0,99 – 1,15 ; p = 0,10). Par contre, l'analyse de sous-groupe dans cette étude montrait que le bénéfice de survie du cisplatine devenait significatif en cas d'association avec des chimiothérapies de 3ième génération (vinorelbine, gemcitabine, taxanes). Des études ultérieures ont confirmé l'impact en termes de réponse et de survie des

produits de 3e génération par rapport aux produits de 1ière ou 2ième génération (Le Chevalier 2005, Baggstrom 2007, Douillard 2007). Le choix entre les chimiothérapies de 3ième génération est surtout lié au patient et à ses comorbidités. En effet, plusieurs essais de phase III ont comparé les différentes associations possibles (cisplatine/docetaxel, carboplatine/paclitaxel, cisplatine/gemcitabine, cisplatine/vinorelbine), et ont montré des taux de réponse et de survie équivalent (Kelly 2001, Schiller 2002; Scagliotti 2002, Fossella 2003).

En 2008, Scagliotti et al. ont montré l'intérêt de l'histologie dans le choix du traitement (Scagliotti 2008). En effet, une phase III randomisé entre un doublet cisplatine/gemcitabine et un doublet cisplatine/pemetrexed n'a pas montré de différence de survie chez des patients avec CBNPC de stade IV. En revanche, le doublet cisplatine/pemetrexed était supérieur dans les CBNPC non-épidermoïdes, avec une survie globale (médiane) de 11,8 mois (versus 10,4 mois avec cisplatine/gemcitabine) (HR pour le décès = 0,81 ; IC95% 0,70 - 0,94). A l'inverse, ce même doublet était délétère dans les carcinomes épidermoïdes, avec une survie globale (médiane) de 9,4 mois (versus 10,8 mois avec cisplatine/gemcitabine) (HR pour le décès = 1,23 ; IC95% 1,00 – 1,51). Actuellement, la prescription de pemetrexed est donc restreinte aux CBNPC non-épidermoïdes.

Il est possible d'ajouter à la chimiothérapie à base de platine une thérapie anti-angiogénique, le bevacizumab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal anti-VEGF, dont l'efficacité a été démontrée en termes de réponse et de survie. Ainsi, une méta-analyse récente à partir de 4 essais de phase II-III a montré un bénéfice de l'ajout du bevacizumab pour la survie sans progression (SSP) (HR = 0,72 ; IC95% 0,66 – 0,79 ; p<0.001) et la survie globale (HR = 0,90; IC95% 0,81 – 0,99 ; p = 0,03) (Soria 2013). Les principales contre-indications à l'utilisation du bevacizumab sont : l'histologie épidermoïde, les formes proximales ou au contact des gros vaisseaux, les antécédents d'hémoptysies, l'association à la radiothérapie, la présence d'une

maladie cardiovasculaire sévère et instable. Le bevacizumab est ensuite poursuivi en maintenance jusqu'à progression tumorale ou toxicité.

6.3.2. En cas de mutation activatrice d'EGFR

En cas de mutation activatrice d'*EGFR*, un traitement de première ligne par ITK de l'EGFR peut être proposé (erlotinib, gefitinib, afatinib). En effet, Mok et al. ont mené un essai de phase III randomisé de non-infériorité comparant une chimiothérapie par carboplatine/paclitaxel à un traitement par gefitinib en première ligne chez une population de CBNPC de stade IV enrichie en facteurs prédisposant pour la mutation d'*EGFR* (population asiatique, non-fumeuse, adénocarcinome) (Mok 2009). Dans le sous-groupe des patients avec mutation d'*EGFR*, la SSP était plus longue dans le bras gefitinib que dans le bras chimiothérapie (HR = 0,48; IC95% 0,36 – 0,64; p<0,001), tandis que pour les patients sans mutation, la SSP était plus longue dans le bras chimiothérapie (HR avec le gefitinib = 2,85; IC95% 2,05 - 3.98; p<0,001). De nombreux essais de phase III ont validé l'efficacité du gefitinib en première ligne de traitement dans une population de patients avec mutation d'*EGFR* (Mitsudomi 2010, Maemondo 2010), tout comme l'erlotinib (Zhou 2011, Rossell 2012) et l'afatinib (Sequist 2013, Wu 2014). A la progression tumorale, une chimiothérapie à base de sel de platine pourra être prescrite, si l'état général du patient le permet.

6.3.3. Traitement de maintenance

La prescription d'un traitement de maintenance après la chimiothérapie de 1^{ière} ligne est basée sur le fait que le nombre de cycles administré en 1^{ière} ligne est limité par la toxicité du sel de platine. Le concept de maintenance est réservée aux tumeurs contrôlées à l'issue de la

chimiothérapie de 1ière ligne (réponse ou stabilité), et regroupe deux stratégies : l'introduction d'une 2ième ligne précoce (switch maintenance), ou la poursuite du produit de chimiothérapie associé au platine, jusqu'à progression ou toxicité limitante (maintenance vraie). Les principaux résultats des différents essais de phase III sur la maintenance dans le CBNPC sont présentés dans le tableau 3. Les seuls essais ayant montré un bénéfice de survie globale avec un traitement de maintenance sont ceux ayant utilisé le pemetrexed, que ce soit en 2ième ligne précoce (Ciuleanu 2009) ou en continuation après cisplatine/pemetrexed (Paz-Ares 2013), et l'erlotinib en 2ième ligne précoce (Cappuzzo 2010). En cas d'utilisation du bevacizumab en association avec le doublet à base de platine, une chimiothérapie de maintenance par bevacvizumab pourra être utilisée.

Tableau 3 : Résultats des principaux essais de phase III de maintenance

Nom de l'étude	patients (n)	bras de maintenance	SSP (mois)	HR	valeur du p	SG (mois)	HR	valeur du p	Référence
Maintenance de continuation									
CECOG	352	gemcitabine	3,6		<0,001	13		0,195	Brodowicz 2006
		soins de support	2,0			11			
Belani	255	gemcitabine	3,9			8,0	0,97	0,84	Treat 2010
		soins de support	3,8			9,3			
IFCT-GFPC 0502	309	gemcitabine	3,8	0,56	<0,001	12,1	0,89	0,387	Perol 2012
		observation	1,9			10,8			
PARAMOUNT	539	pemetrexed	4,4	0,60	<0,001	13,9	0,78	0,0195	Paz-Ares 2013
		soins de support	2,8			11,0			
2ième ligne précoce									
Fidias	309	docetaxel	5,7		0,0001	12,3		0,0853	Fidias 2009
		docetaxel (retardée)	2,7			9,7			
JMEN	663	pemetrexed	4,3	0,50	<0,0001	13,4	0,779	0,012	Ciuleanu 2009
		placebo	2,6			10,6			
SATURN	889	erlotinib	3,0	0,71	<0,0001	12,0	0,81	0,0088	Cappuzzo 2010
		placebo	2,8			11,0			
IFCT-GFPC 0502	310	erlotinib	2,9	0,69	0,003	11,4	0,87	0,3043	Perol 2012
		observation	1,9			10,8			
Maintenance par 2 médicaments									
ATLAS	768	bevacizumab + erlotinib	4,8	0,72	0,0012	15,9	0,90	0,2686	Johnson 2013
		bevacizumab	3,7			13,9			
AVAPERL	253	bevacizumab +pemetrexed	7,4	0,57	<0,001	17,1	0,87	0,29	Barlesi 2013b
		bevacizumab	3,7			13,2			Barlesi 2014
POINTBREAK*	939	bevacizumab +pemetrexed	12,6	1,00	0,949	6,0	0,83	0,012	Patel 2013
		bevacizumab	13,4			5,6			

* l'essai POINTBREAK a randomisé les patients entre un bras carboplatine – pemetrexed – bevacizumab (maintenance par bevacizumab – pemetrexed) et un bras carboplatine – paclitaxel – bevacizumab (maintenance par bevacizumab). HR : hazard ratio. SSP : survie sans progression. SG : survie globale.

6.4. Populations particulières : patients âgés et patients avec altération de l'état général

Les sujets âgés ont été dans la grande majorité des cas exclus des essais de phase III dans le CBNPC. Outre la problématique du seuil de l'âge définissant un sujet âgé (dans la plupart des essais la limite est de 70 ans), ces patients étaient donc souvent traités par monothérapie (Gridelli 2001, Gridelli 2003a, Kudoh 2006). L'essai IFCT-0501 a comparé une monothérapie (gemcitabine ou vinorelbine) à un doublet par carboplatine /paclitaxel hebdomadaire (Quoix 2011). La SSP dans cet essai était doublée avec le doublet (6,1 mois versus 3 mois ; p<0,0001), et la survie globale passait de 6,2 mois à 10,3 mois (p<0,0001). Cette étude a permis de définir un nouveau standard thérapeutique chez le sujet âgé avec CBNPC (carboplatine /paclitaxel hebdomadaire), si l'état général le permet.

Les patients avec une altération de l'état général, ambulatoire plus de 50% la journée et nécessitant une aide occasionnelle (PS (Performance status) à 2) sont plus exposés que les patients avec un PS à 0 (pas d'altération de l'état général) ou 1 (fatigue modérée) à développer des toxicités plus sévères de la chimiothérapie (Sweeney 2001). Par ailleurs, leur survie est globalement plus mauvaise quel que soit l'âge du patient (Hesketh 2007). Les recommandations actuelles sont donc de traiter ces patients par une monothérapie ou un doublet de type carboplatine/paclitaxel hebdomadaire, mieux toléré que les autres doublets. Un essai de phase III randomisé a comparé un doublet par carboplatine/pemetrexed à une monothérapie par pemetrexed chez des patients PS 2 avec CBNPC de stade avancé (Zukin 2013). La réponse était supérieure avec le doublet (23,8% vs 10,3% avec la monothérapie, p=0,032), tout comme la SSP (5,8 mois vs 2,8 mois, p<0,001) et la survie globale (9,3 mois vs 5,3 mois, p=0,001). Ce bénéfice se faisait au prix d'une surtoxicité (15,6% d'anémie grade 3-4, 7,8% de neutropénie grade 3-4, 4 décès toxiques). Cette association n'a cependant pas l'AMM en France actuellement pour ces patients.

Enfin, les patients avec une altération majeure de l'état général (ambulatoire moins de 50% de la journée (PS 3) ou alités en permanence (PS 4)) sont orientés vers des soins de confort exclusifs, sauf en cas de mutation activatrice de l'*EGFR* où il peut y avoir un intérêt à la prescription d'un ITK de l'EGFR (Inoue 2009).

6.5. Chimiothérapie de 2ième et 3ième ligne

Lors de la progression thérapeutique, si l'état général le permet, il est possible de prescrire une chimiothérapie de 2ième ou 3ième ligne. En 2ième ligne, les produits validés suite à des essais de phase II-III, sont l'erlotinib (quel que soit le statut mutationnel de l'*EGFR*), le docetaxel et le pemetrexed (pour les CBNPC non-épidermoïdes) (Shepherd 2000, Hanna 2004, Shepherd 2005). Le taux de réponse est compris entre 7% et 9%, avec une survie globale entre 7,5 et 9 mois, améliorée par rapport aux soins de confort seuls. En 3ième ligne, seul l'erlotinib a été validé, avec une survie globale de 6,7 mois (versus 4,7 mois pour le placebo, $p<0,001$).

7. Principaux produits de chimiothérapie utilisés dans le traitement des CBNPC

7.1. Cisplatine (cis-diaminedichloroplatine(II)) et carboplatine (paraplatine)

Les sels de platine utilisés en oncologie thoracique (cisplatine et carboplatine) sont des agents alkylants (Figure 3). Ils induisent la formation de ponts au niveau des brins d'ADN (« adduits »), et empêchent ainsi la transcription et la réplication de l'ADN, et donc la mort cellulaire (Figure 4). Le cisplatine entraîne la formation d'adduits exclusivement au niveau des bases puriques (A ou G), et se fixent essentiellement par leur atome de chlore au niveau de l'azote 7 des guanines. Les adduits peuvent se former en intra-brin (même brin d'ADN) ou en inter-brin (à cheval sur les 2 brins d'ADN). Comme nous l'avons vu ci-dessus, les sels de

platine sont les produits-clés dans la chimiothérapie des cancers bronchiques, que ce soit en traitement adjuvant (stades II), en association à la radiothérapie (stades III), ou dans le traitement des stades IV.

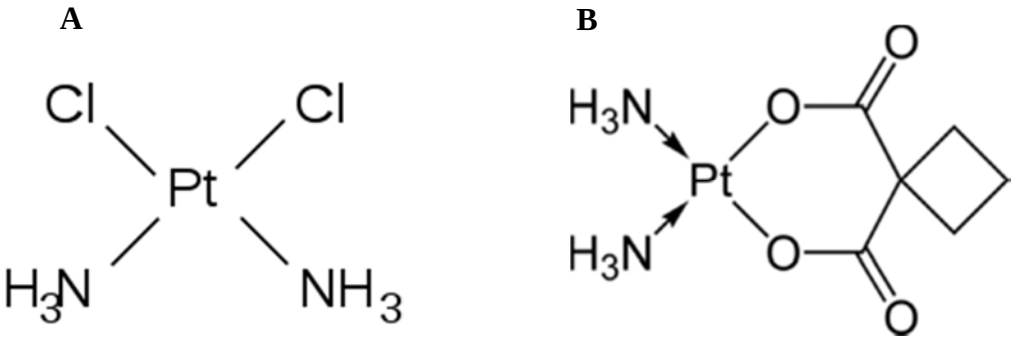


Figure 3 : Composition moléculaire du cisplatine (A) et du carboplatine (B)

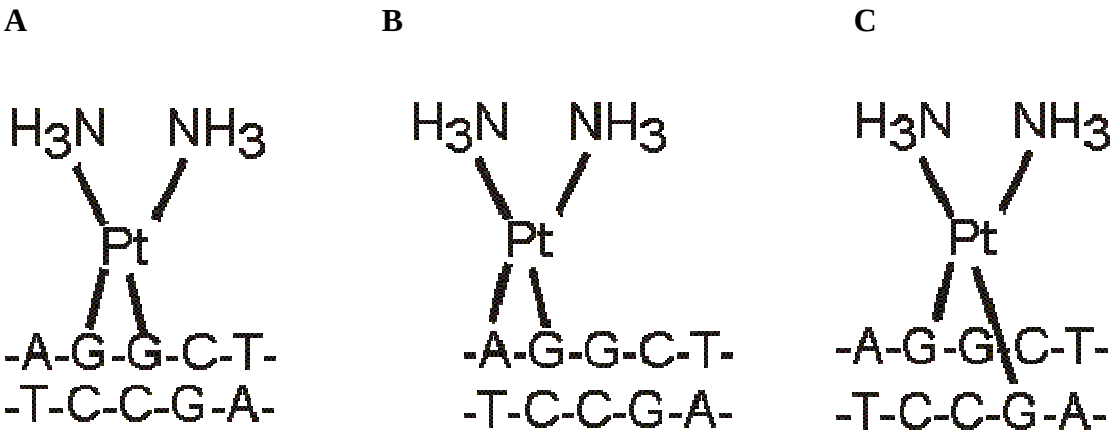


Figure 4 : Mode d'action du cisplatine : formation d'adduits intra-brin (A et B) ou inter-brin (C)

7.2. Anti-métabolites

Les anti-métabolites sont des agents anti-cancéreux qui inhibent directement ou indirectement la synthèse des nucléotides. Les anti-métabolites utilisés en oncologie thoracique sont la gemcitabine et le pemetrexed (Figure 5). La gemcitabine (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine)

inhibe la synthèse de la pyrimidine, qui intervient dans la synthèse des bases azotés de l'ADN et de l'ARN (cytosine, thymine, uracile). Le pemetrexed est un composé proche de l'acide folique. Il inhibe plusieurs enzymes intervenant dans la synthèse des purines (composant l'adénine et la guanine) et des pyrimidines : la thymidilate synthase, la dihydrofolate réductase et la glycamine ribonuclétideformyltransférase.

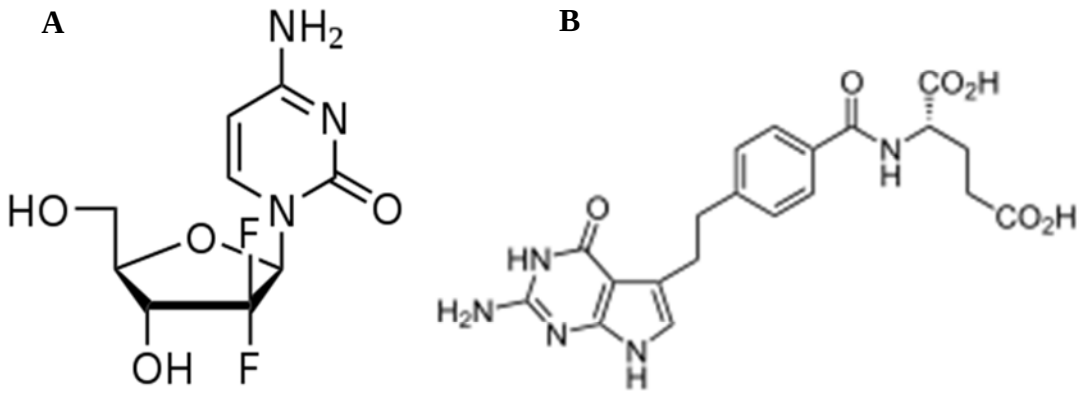
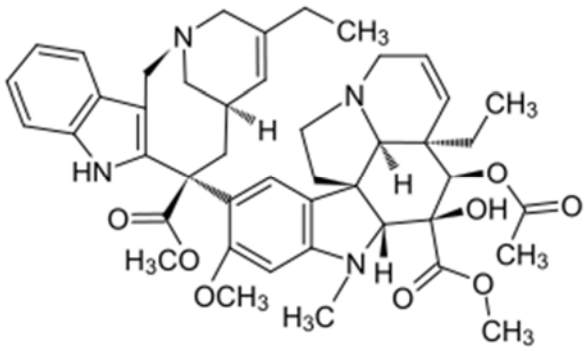


Figure 5 : Composition moléculaire de la gemcitabine (A) et du pemetrexed (B)

7.3. Inhibiteurs du fuseau

Les poisons du fuseau sont des produits qui bloquent la synthèse des microtubules, éléments indispensables à la division cellulaire, comme les vinca-alcaloïdes (vinorelbine), ou bien en empêchant la dépolymérisation de la tubuline (taxanes : docetaxel, paclitaxel), ce qui entraîne une inhibition de la migration des chromosomes vers les pôles du noyau lors de la mitose (Figure 6).

A



B **C**

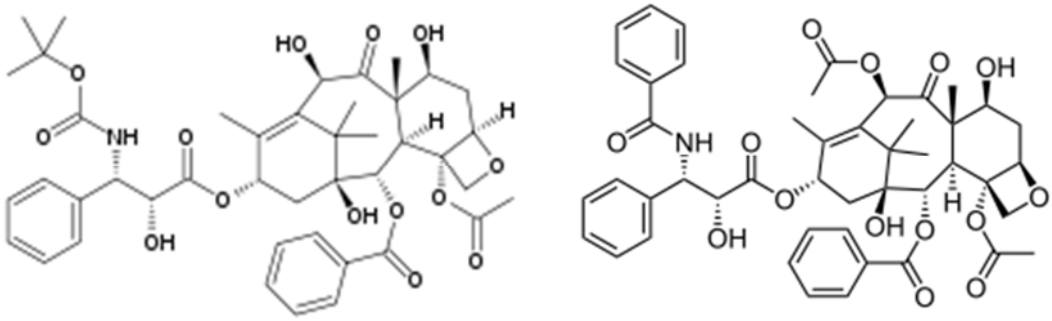


Figure 6 : Composition moléculaire de la vinorelbine (A), du docetaxel (B) et du paclitaxel (C)

8. Facteurs impliqués dans la résistance aux sels de platine

La chimiorésistance est un problème fondamental dans la prise en charge du CBNPC de stade IV. Environ un quart des patients aura une progression d'emblée sous chimiothérapie de 1^{ière} ligne (patients chimioréfractaires) (Depierre 1994, Crino 1999, Kelly 2001, Rosell 2002, Scagliotti 2002, Schiller 2002, Smit 2003, Gridelli 2003b, Fossella 2003, Georgoulias 2004). La description et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la chimiorésistance sont des enjeux importants pour améliorer la prise en charge des patients.

De manière générale, la description et l'étude des biomarqueurs liés à la résistance à la chimiothérapie ont été faites dans les stades précoces susceptibles de recevoir un traitement adjuvant. En effet, la disponibilité de tissu tumoral en quantité suffisante pour effectuer les tests d'expression (immunohistochimie (IHC) ou RT-PCR) est supérieure dans les CBNPC opérés que dans les stades métastatiques où le plus souvent ne sont disponibles que des biopsies de petite taille. De même, le nombre de patients ou de tumeurs testés est souvent faible (moins de 100) dans les séries de CBNPC métastatiques, ce qui rend l'interprétation des résultats délicate. Enfin, les tests effectués sont différents d'une étude à l'autre (étude de l'expression génique par RT-PCR ou de la protéine par IHC), induisant une comparaison difficile entre les études. Les principaux résultats des études sur ces biomarqueurs sont présentés dans le Tableau 4. D'autres biomarqueurs ont été développés, comme la thymidilate synthase pour le pemetrexed ou la beta-tubuline pour les taxanes, dans la prédiction de réponse à d'autres produits de chimiothérapie que les sels de platine, et ne seront donc pas développés ici.

Tableau 4 : Différents biomarqueurs étudiés dans la prédiction de la chimiorésistance aux sels de platine.

Biomarqueurs	**Méthode d'analyse**	**Rôle pronostique**	**Rôle prédictif**
ERCC1	IHC* ou RT-PCR	probable	probable (stades localisés)
BRCA1	IHC ou RT-PCR	probable	incertain
MSH2	IHC	incertain	incertain
ABC transporteurs			
P-glycoprotéine	IHC	incertain	incertain
MRP	IHC	probable	incertain
BCRP	IHC	incertain	incertain
GSTP1	IHC ou RT-PCR	incertain	probable
p53 (mutations)	IHC	incertain	probable (stade avancé)
XPD (polymorphisme)		incertain	incertain
Kras (mutations)		probable	incertain
TEM	IHC	incertain	probable

*l'utilisation de l'IHC pour ERCC1 n'est plus recommandée actuellement (Friboulet 2013a).
TEM : transition épithélio-mésenchymateuse.

8.1. ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementary group 1*)

ERCC1 est une protéine intervenant dans le système NER (*Nucleotide-Excision Repair*) de réparation de l'ADN. Le système NER permet la réparation de l'ADN en cas de dommages importants de l'ADN (« bulky adducts ») qui entrainent des anomalies au niveau de la conformation de la double hélice de l'ADN. Ce système est non spécifique, et entre en jeu lors de dommages liés au rayonnement ultra-violet (UV) ou secondaires à l'utilisation de produits formants des adduits, comme les sels de platine. Lorsque le système NER est activé, il se produit une incision au niveau de l'ADN de chaque côté de la lésion, une réparation de la séquence excisée, puis une fermeture du brin d'ADN. ERCC1, qui forme un hétéro-dimère

avec une autre protéine (XPF, *Xeroderma Pigmentosum group F*), est une endonucléase qui incise le brin d'ADN à la jonction du côté 5' par rapport à la lésion.

Dans les stades précoces de CBNPC, Olaussen et al. (2006) ont montré que l'expression d'ERCC1 était associée à une résistance à la chimiothérapie adjuvante à base de cisplatine. L'expression d'ERCC1 était effectuée par étude en IHC sur 761 prélèvements tumoraux de CBNPC de stade I à III, traités ou non par chimiothérapie adjuvante. Quarante-quatre pourcent des patients avaient une surexpression d'ERCC1. Dans le groupe des patients ne surexprimant pas ERCC1, la survie était supérieure chez les patients traités par chimiothérapie adjuvante que chez les patients non traités (HR pour le décès = 0,65 ; IC50% 0,50 – 0,86 ; p=0,002). Dans le groupe des patients surexprimant ERCC1, il n'y avait pas de bénéfice de survie avec la chimiothérapie adjuvante (HR = 1,14 ; IC95% 8,84 – 1,55 : p=0,40), mais un bénéfice chez les patients non traités (HR = 0,66 ; IC95% 0,49 – 0,90 ; p=0,009). Une étude récente sur les patients de la même cohorte (étude IALT, n=769) d'IHC sur des *tissu microarrays* (TMA) a montré des résultats sensiblement différents (Pierceall 2012). En effet, aucun effet pronostique ou prédictif d'ERCC1 n'a été mis en évidence pour les adénocarcinomes. Pour les carcinomes épidermoïdes, un impact pronostique et prédictif a été montré sur la survie sans maladie à 5 ans (respectivement : HR=0,66 ; IC95% 0,45-0,96 ; et HR=2,02 ; IC95% 1,19-3,43), mais pas sur la survie globale à 5 ans. Les différences entre ces résultats et ceux de l'étude d'Olaussen et al. peuvent être expliqué par la différence de technique utilisée (lames versus TMA, lecture manuelle versus automatisée), mais aussi possiblement par un problème d'anticorps. En effet, l'utilisation de l'IHC pour ERCC1 a été récemment remise en question. Une étude récente a montré que l'étude d'ERCC1 par IHC ne permettait pas de détecter tous les isoformes d'ERCC1 (Friboulet 2013a). Les auteurs ont testé 16 anticorps anti-ERCC1 différents commercialisés, et aucun des 4 isoformes d'ERCC1 n'était reconnu par ceux-ci. De plus, seul un des 4 isoformes (ERCC1-202) produisait une

protéine capable de réparer les lésions d'ADN (Friboulet 2013a, 2013b). L'utilisation de l'IHC ERCC1 n'est donc pas recommandée en pratique actuellement.

On notera enfin que notre équipe a mené une étude de phase II (essai TASTE IFCT-0801) qui a évalué une stratégie thérapeutique post-opératoire individualisée chez les patients opérés d'un CBNPC non épidermoïde de stade II – IIIA non N2 (Wislez 2014). Cette étude a démontré la faisabilité de la recherche des mutations d'EGFR et de l'expression d'ERCC1 par IHC et de l'adaptation du traitement adjuvant dans un délai de 8 semaines suivant la chirurgie. Du fait des problèmes de robustesse de l'anticorps ERCC1, l'étude n'a pas été poursuivie en phase III.

Dans les stades avancés, plusieurs études ont étudié l'intérêt d'ERCC1 comme facteur prédictif de survie chez les patients traités par chimiothérapie à base de platine. Lord et al. (2002) ont analysé l'expression d'ERCC1 par RT-PCR sur 56 prélèvements de CBNPC de stade IIIb – IV traités par cisplatine/gemcitabine. L'expression d'ERCC1 dans cette étude était corrélée à une survie plus courte (61,6 semaines en cas de faible expression, versus 20,4 semaines en cas de forte expression). Cet impact était confirmé par une analyse multi-variée (HR = 0,32 ; IC95% 0,14 – 0,71 ; p=0,005). Par contre, l'expression d'ERCC1 n'était pas corrélée à la réponse à la chimiothérapie (taux de réponse : 52% en cas d'expression faible, versus 36,4% en cas de forte expression ; p=0,38). Lee et al. (2009) ont également étudié l'expression d'ERCC1 par IHC sur 50 prélèvements de CBNPC de stade IIIb – IV traités par chimiothérapie à base de platine. Une forte expression d'ERCC1 était associée à un mauvais pronostic (en analyse multi-variée : HR = 3,156 ; IC95% 1,54 – 6,46 ; p=0,002). L'expression d'ERCC1 n'était pas corrélée à la réponse à la chimiothérapie (39% versus 32%, p=0,768). Plus récemment, Joerger et al. (2011) ont analysé l'expression d'ERCC1 par RT-PCR sur 45 prélèvements de CBNPC de stade IIIb – IV traités par platine/gemcitabine. Ils ont retrouvé l'impact pronostique sur la survie d'ERCC1 chez ces patients traités par chimiothérapie (HR

pour la survie en cas d'expression faible = 0,26 ; IC95% 0,08 – 0,83 ; p=0,02). L'expression d'ERCC1 était également corrélée à la réponse à la chimiothérapie (taux de réponse : 21% en cas de forte expression, versus 57% en cas de faible expression ; p=0,02), mais pas à la SSP (HR = 0,71 ; IC95% 0,38 – 1,34 ; p=0,29). Papadaki et al. (2012) ont étudié l'expression d'ERCC1 par RT-PCR sur 100 CBNPC métastatiques traités en 2ième ligne par chimiothérapie à base de platine. Une faible expression d'ERCC1 était associée avec une meilleure réponse à la chimiothérapie (p=0,011), une meilleure SSP (p=0,029), et une meilleure survie (p=0,001). Enfin, Lee et al. (2013) ont analysé l'expression d'ERCC1 par IHC sur 41 prélèvements d'adénocarcinomes bronchiques de stade IIIb – IV traités par cisplatine /pemetrexed. Ils ont ainsi montré qu'une faible expression d'ERCC1 était associée à une SSP plus longue qu'en cas de forte expression (analyse univariée : médiane 6,4 mois versus 3,8 mois respectivement, p=0,004 ; analyse multivariée : HR = 0,57 ; IC95% 0,25 – 1,30). Une faible expression était corrélée à une survie globale plus longue en uni- et multi-variée (HR = 0,59 ; IC95% 0,15 – 0,80).

Au total, l'expression d'ERCC1 est clairement associée à la survie (facteur pronostique) et à la réponse à la chimiothérapie à base de platine (facteur prédictif) dans les CBNPC localisés traités par chimiothérapie adjuvante. Par contre, dans les formes avancées, si l'impact sur la survie semble bien démontré (facteur pronostique), l'impact sur la réponse et la SSP est encore à démontrer.

8.2. BRCA1 (*Breast Cancer 1*)

BRCA1 est un gène suppresseur de tumeur. Il intervient dans la réparation de l'ADN en collaboration avec la protéine RAD51. Taron et al. (2004) ont étudié l'expression de BRCA1 par RT-PCR sur 55 prélèvements de CBNPC opérés et ayant reçu une chimiothérapie

préopératoire par cisplatine/gemcitabine. Une faible expression de BRCA1 était associée à une meilleure survie : la médiane n'était pas atteinte pour le groupe de patients avec le plus faible niveau d'expression, versus 12,7 mois pour ceux avec le plus haut niveau d'expression (p=0,01) (HR=0,22 ; IC95% 0,06 – 0,77 ; p=0,018). Par contre, le taux de réponse n'était pas statistiquement différent, malgré une tendance à une meilleure réponse en cas de faible niveau d'expression par rapport à la forte expression (66,7%, versus 58,3%). Une étude récente n'a pas retrouvé l'impact prédictif de BRCA1 pour la chimiothérapie adjuvante à base de platine sur une cohorte de 769 patients issu de l'essai IALT de chimiothérapie adjuvante (Pierceall 2012). Un essai de phase III a testé la personnalisation du traitement adjuvant en fonction de l'expression de BRCA1 (Sanchez 2012). En cas de faible niveau d'expression, les patients recevaient un doublet par cisplatine/gemcitabine, en cas d'expression intermédiaire un doublet par cisplatine/docetaxel, en cas de forte expression une monothérapie par docetaxel. Quatre-vingt trois patients de la phase pilote ont été éligibles, dont 53% avec une faible expression et 13,3% une forte expression. La SSP et la survie globale ne différaient pas entre les 3 groupes de patients (p=0.58).

Dans les stades métastatiques, Rosell et al. (2009) ont mené une étude de phase II dans laquelle 123 CBNPC non-épidermoïdes étaient traités en fonction de leur statut EGFR (erlotinib si mutation, sinon chimiothérapie cytotoxique). Dans ce dernier cas, le doublet de chimiothérapie était adapté en fonction du niveau d'expression de BRCA1 évalué par RT-PCR, selon le schéma décrit ci-dessus (Sanchez 2012). Le taux de réponse était de 21,1% (faible expression), 40% (expression intermédiaire) et 39,4% (forte expression). La médiane de survie globale était de 11 mois pour les patients avec une faible expression, 9 mois pour les patients avec une expression intermédiaire, et 11 mois pour les patients avec forte expression de BRCA1. Le taux de survie à 2 ans était de 41,2%, 15,6% et 0%, respectivement, et donc supérieur en cas de faible expression de BRCA1. Un essai de phase III est en cours de

recrutement pour évaluer l'intérêt pronostique et/ou prédictif de BRCA1 et de RAP80 (protéine nucléaire interagissant avec BRCA1) dans le CBNPC de stade avancé (essai BREC, NCT00617656).

Au total, il est difficile de conclure à un impact prédictif de BRCA1, car dans ces études il n'y avait pas de comparaison de la survie en fonction du statut BRCA1 chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie adjuvante. Il semble exister un rôle pronostique, notamment dans les stades avancés (Rossell 2009).

8.3. MSH2 (*Muts Homolog 2*)

MSH2 est une enzyme intervenant dans la voie MMR (*mismatch repair*) de réparation de l'ADN. La voie MMR est mise en jeu lors de la réparation des mésappariements (hétéroduplexes) des bases d'ADN lors des erreurs de duplication. Elle agit sous forme d'hétérodimères, et se fixe au niveau des sites lésés. S'ensuit alors une succession de mécanismes de réparation (excision des bases mésappariées par les nucléases, resynthèse du brin lésé et ligature des brins). Des anomalies génétiques de *MSH2* sont présentes dans près de 90% des formes héréditaires du cancer colique (syndrome HPCC). Le rôle pronostique et prédictif de MSH2 dans le CBNPC a été étudié sur la cohorte de patients de l'essai IALT de chimiothérapie adjuvante (n=769) (Pierceall 2012). L'expression de MSH2 a été étudiée par IHC. MSH2 n'avait aucun rôle pronostique ou prédictif pour les adénocarcinomes. Pour les carcinomes épidermoïdes, l'impact pronostique de MSH2 était retrouvé en analyse univariée, avec pour la survie sans maladie à 5 ans un HR de 0,67 (IC95% 0,47-0,96 ; p=0,03), mais pas en analyse multivariée (HR=0,76 ; IC95% 0,53-1,09 ; p=0,14). MSH2 n'avait aucun impact pronostique sur la survie globale à 5 ans. Concernant le rôle prédictif, MSH2 avait un impact significatif sur la survie sans maladie à 5 ans en analyse uni- et multivariée (HR=1,72 ;

IC95% 1,03-2,87 ; p=0,04), mais pas sur la survie globale à 5 ans (HR=1,37 ; IC95% 0,82-2,30 ; p=0,24). D'autres études n'ont trouvé aucun impact de MSH2 sur la survie globale ou la survie sans maladie dans les CBNPC de stade précoce (Cooper 2008, Kouso 2008, Xie 2014). Au total, le rôle pronostique et prédictif de MSH2 apparaît incertain dans les CBNPC de stade précoce, et reste largement sous-étudié dans les stades avancés.

8.4. ABC transporteurs

Les transporteurs ABC (*ATP-Binding cassette*) sont des transporteurs transmembranaires impliqués dans l'efflux cellulaire d'un certain nombre de substrats, dont plusieurs agents de chimiothérapie, comme les anthracyclines, les vinca-alcaloïdes, les taxanes, la mitoxantrone, les inhibiteurs de topoisomérase I (Tan 2000). Leur implication dans la chimiorésistance a été évoquée dans de nombreuses études cliniques, notamment concernant la P-glycoprotéine, MRP et ABCG2, mais avec des résultats souvent divergents, comme nous allons le développer ci-dessous.

8.4.1. P-glycoprotéine (P-gp, MDR1)

La P-gp, codée par le gène *MDR1*, est le premier transporteur ABC à avoir été décrit. Plusieurs études ont cherché une corrélation entre l'expression de la P-gp et la réponse ou la survie sous chimiothérapie dans les CBNPC. Ainsi, Yeh et al. ont étudié prospectivement l'expression de la P-gp par IHC et la réponse à la chimiothérapie par cisplatine/paclitaxel chez 50 patients de stade IIIb-IV (Yeh 2003). Sur 22 patients ne répondant pas à la chimiothérapie, 15 (68%) avaient une expression de P-gp, tandis que les patients (n=28) ayant répondu à la chimiothérapie n'avait pas d'expression de P-gp ($p<0,05$). On note cependant des résultats

divergents selon les études, avec par exemple une absence totale de relation avec la réponse à la chimiothérapie, la SSP ou la survie globale dans l'étude de Yoh et al. (Yoh 2004) sur 72 prélèvements de CBNPC évalués en IHC. La présence d'un polymorphisme au niveau C3435T de *MDR1,* qui induit des modifications fonctionnelles de la protéine (Hoffmeyer 2000), pourrait également être associée à une moindre sensibilité à la chimiothérapie à base de platine (Wei 2012).

8.4.2. MRP1, MRP2, MRP3 (ABCC1, ABCC2, ABCC3)

MRP1 est surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales ainsi que dans de nombreuses tumeurs solides (Cole 1992, Loe 1996). Son rôle dans la chimiorésistance a été décrit dans le cancer bronchique (Ota 1995). Plusieurs gènes homologues de *MRP1* ont depuis été découverts, comme *MRP2* et *MRP3* (Allikmets 1996, Kool 1997). L'expression de MRP1, évaluée par RT-PCR, est associée à une moins bonne réponse histologique et à une SSP plus courte chez des patients avec CBNPC de stade IIIaN2 ayant reçu une chimiothérapie préopératoire à base de platine (Li 2009). Cependant, aucun impact prédictif n'a été mis en évidence pour l'expression de MRP1 et MRP2 chez 782 patients traités par chimiothérapie adjuvante (Filipits 2007). Du point de vue pronostique, MRP2 était par contre associée à une survie globale plus courte (HR pour le décès = 1,37 ; IC95% 1,09 – 1,72 ; p = 0,007). Les données concernant un rôle prédictif de MRP restent donc divergentes dans les CBNPC de stade précoce.

8.4.3. ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP)

Plusieurs études se sont intéressées au rôle prédictif et pronostique d'ABCG2 dans le CBNPC. Yoh et al. (2004) ont étudié l'expression en IHC de plusieurs transporteurs ABC, dont ABCG2, dans 72 prélèvements de CBNPC de stade IIIb–IV traités par chimiothérapie à base de cisplatine. Seule l'expression d'ABCG2 avait un impact prédictif, avec un taux de réponse de 24% versus 44% (ABCG2 positif et ABCG2 négatif, respectivement ; p=0,08) et une SSP de 2,8 mois versus 5,1 mois (ABCG2 positif et ABCG2 négatif, respectivement ; p=0,0003 ; HR = 2,85 ; IC95% 1,48 – 5,50). Dans une autre étude (Ota 2009) sur 156 CBNPC métastatiques traités par chimiothérapie à base de platine, l'expression d'ABCG2 n'était cependant associée ni au taux de réponse à la chimiothérapie ni à la SSP. Là encore, le rôle prédictif d'ABCG2 n'est pas confirmé.

8.5. Gluthatione-s-transferase-pi (GSTP1)

GSTP1 appartient à la famille des Gluthatione-S-transférase (GSTs). Les GSTs représentent une famille d'enzymes intervenant dans la détoxification cellulaire, par catalisation de composés hydrophobiques et électrophiliques comportant une gluthatione réduite, comme les produits comportant du platine. La surexpression de GSTP1, en IHC ou RT-PCR, à été corrélée à une moins bonne réponse à la chimiothérapie à base de cisplatine dans plusieurs études (Bai 1996, Arai 1997, Nakanishi 1999). Plusieurs études se sont également intéressées à l'impact du polymorphisme de *GSTP1* sur la réponse à la chimiothérapie à base de cisplatine dans le CBNPC, avec des résultats contradictoires. Le polymorphisme Ile105Val (342A>G), le plus connu, agit sur l'activité catalytique et la stabilité de la protéine, ainsi que sur la capacité de conjugaison à plusieurs substrats, dont les sels de platine (Allan 2001). Certaines études ont pu montrer une corrélation entre le polymorphisme 342A>G et la

résistance à la chimiothérapie (Ke 2012), d'autres aucun impact (Booton 2006, Kalikaki 2009, Ada 2010). D'autres études ont montré une association entre ce polymorphisme et une sensibilité à la chimiothérapie (Sun 2010). En conclusion, le rôle prédictif de GSTP1 est probable, mais celui de son polymorphisme n'est pas prouvé.

8.6. p53

La protéine p53 est un facteur de transcription clé qui intervient en situation de stress cellulaire. En présence de lésions de l'ADN, p53 est capable de stopper la cellule en phase G1 pour entamer les processus de réparation cellulaire. Environ deux-tiers des CBNPC présentent une mutation de *p53* (Kishimoto 1992, Fouquet 2004), avec une corrélation à l'intoxication tabagique (Hainaut 2001). Ces mutations se situent dans la majorité des cas au niveau du domaine de liaison des promoteurs des gènes cibles, et induisent une chimiorésistance par inhibition de l'apoptose (Brown 1999). Dans les CBNPC de stade avancé, la présence d'une mutation de *p53* étudiée par IHC est ainsi associée à une chimiorésistance (Kandioler-Eckersberger 1999, Nakanishi 1999, Gregorc 2003, Miyatake 2003), avec un odds ratio pour la réponse tumorale de 0,25 (IC95% 0,12 – 0,52) dans la revue de Sekine et al. (2006). A l'inverse, dans les CBNPC opérés et recevant de la chimiothérapie adjuvante, la présence de mutation de *p53* étudiée par IHC ne semble pas jouer de rôle prédictif (Tsao 2007). En conclusion, p53 a peut-être un rôle prédictif dans les CBNPC de stade avancé.

8.7. XPD (ERCC2, *Excision Repair Cross-Complementary group 2*)

La protéine XPD est une hélicase (5'→3') qui intervient dans le système NER mis en jeu lors de la réparation des lésions d'ADN. Une fois le site du dommage reconnu, XPD est recrutée

et déroule les doubles brins d'ADN autour de la lésion (Schaeffer 1993), avant la mise en jeu des endonucléases (cf ci-dessus). La présence de polymorphisme de XPD a été décrite comme étant de mauvais pronostic chez les patients traités par cisplatine pour un CBNPC (Gurubhagavatula 2004, de las Peñas 2006). Cependant, une méta-analyse récente reprenant 12 études du polymorphisme de XPD n'a pas montré de corrélation avec la réponse à une chimiothérapie à base de sel de platine dans les CBNPC de stade avancé (Wei 2011).

8.8. Kras

La présence de mutations de *Kras*, comme nous l'avons vu ci-dessus, est un événement fréquent dans les CBNPC. Sa présence est associée à une non-réponse aux ITK de l'EGFR (Eberhard 2005, Pao 2005). Concernant la réponse à la chimiothérapie, les résultats des études sont divergents, la plupart des études ne retrouvant pas d'effet (Tsai 1993, Rodenhuis 1997, Kalikaki 2010, Mellema 2013). Une revue de la littérature a ainsi montré une absence de lien entre la mutation de *Kras* et la réponse à la chimiothérapie cytotoxique pour les patients ayant un CBNPC (Loriot 2009).

8.9. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus cellulaire qui permet à une cellule épithéliale d'acquérir un phénotype mésenchymateux. Au niveau cellulaire, la TEM est caractérisée par une perte de la polarité apico-basale ce la cellule, une perte de l'ancrage cellulaire, et une augmentation de la migration cellulaire. On distingue 3 formes de TEM.

La TEM de type 1 se rencontre de manière physiologique dans les premiers stades du développement, au moment de l'implantation de l'embryon, de l'embryogénèse et de

l'organogenèse. (Aplin 1998). La TEM de type 2 est associée à la régénération tissulaire et aux processus fibrosants. (Kim 2006). La TEM de type 3 concerne les cancers et serait associée à la capacité des cellules cancéreuses de migrer de la tumeur primitive dans la circulation générale, de se fixer au niveau des sites métastatiques et d'y proliférer. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont pu montrer que les cellules carcinomateuses exprimaient des marqueurs mésenchymateux (vimentine, desmine…). Ces cellules sont plus souvent observées en bordure de tumeur, renforçant l'hypothèse d'un rôle supposé dans la migration tumorale et la formation de métastases (Brabletz 2001, Thiery 2002, Fidler 2008, Yang 2008). Après le stade d'extravasation, la cellule tumorale subit un phénomène inverse de transition mésenchymo-épithéliale (TME), avec recouvrement des caractéristiques cellulaires initiales, prolifération cellulaire et formation d'un nouveau clone (Zeisberg 2005, Jechlinger 2002).

La TEM est caractérisée par la perte des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine) (Kalluri 2009). Au niveau des voies d'activation cellulaire, il y a une activation de la voie Notch, avec expression notamment des protéines de type « en doigt de zinc » (*Zinc-finger domain protein*) Snails (Snail1, Snail2, Snail3) ou ZEB (*Zinc finger E-box-binding homeobox*, ZEB1, ZEB2). Le TGFβ joue également un rôle, via son récepteur TGFβR. L'activation en aval des facteurs Smad et Nf-κB. SNAI1, ZEB1 et ZEB2, ainsi que TWIST2, vont être responsables de l'inhibition de la transcription du gène *CDH1*, codant pour l'E-cadhérine (Kalluri 2009).

Le rôle de la TEM dans la chimiorésistance est débattu. Plusieurs travaux ont montré une association entre TEM et résistance à la chimiothérapie dans les CBNPC. Ainsi, l'inhibition de Snail sur une lignée d'adénocarcinome bronchique résistante au cisplatine, induit une sensibilisation au cisplatine, parallèlement à l'inhibition de la TEM, de la migration et de l'invasion cellulaire (Wang 2014). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* et *in vivo*

sur un modèle d'adénocarcinome bronchique résistant au docetaxel, via l'inhibition de ZEB1 (Ren 2013).

8.10. Synthèse sur les facteurs de résistance à la chimiothérapie à base de sels de platine dans le CBNPC

Au total, de nombreux facteurs ont été décrits comme prédictifs de résistance à la chimiothérapie par sel de platine. Cependant, les résultats sont variables d'une étude à l'autre, en fonction des indications (chimiothérapie péri-opératoire ou chimiothérapie des CBNPC de stade avancé), du type histologique étudié, des techniques utilisées, avec des études monocentriques, ayant inclus pour la plupart un petit nombre de patients, de manière rétrospective. Il est probable qu'il n'existe pas un acteur de résistance à la chimiothérapie au sein d'une même tumeur, mais de multiples, qui interagissent entre eux. Par ailleurs, de nombreux autres facteurs peuvent influencer la sensibilité à la chimiothérapie, et n'ont été que peu ou pas exploré, comme l'impact du microenvironnement tumoral, de l'hypoxie, des facteurs pharmacogénomiques, ou enfin le rôle des cellules souches cancéreuses (CSC). Le rôle des CSC dans la chimiorésistance a été évoqué dans plusieurs études, dont le CBNPC (Perona 2011). Plusieurs voies d'activation cellulaire sont activées de manière préférentielle au sein des CSC, comme les voies Sonic Hedgehog (Shh), Wnt (*Wingless Integration site*) et Notch.

9. Voie Shh

9.1. Protéine Shh

La voie de signalisation Hedgehog fait intervenir 3 types de protéines : Indian, Desert et Sonic Hedgehog. Chez les mammifères, la protéine Shh est celle qui intervient de manière préférentielle. Son gène, situé en 7q36, produit une pré-protéine de 45kDa, qui va subir dans les conditions physiologiques un certain nombre de modifications post-transcriptionnelles (Lee 1994). Cette pré-protéine contient notamment en son sein un site d'auto-clivage, qui va permettre le clivage protéique en un résidu N-terminal (Shh-N) de 20kDa et un résidu C-terminal (Shh-C) de 25kDa (Lee 1994). La protéine Shh-C possède une activité cholestérol-transférase, qui va permettre l'adjonction de cholestérol à la partie C-terminale de Shh-N (Porter 1996, Pepinsky 1998). Secondairement, une nouvelle modification lipidique se produit avec ajout de résidus palmitoyl à la protéine Shh-N (palmitoylation). Toutes ces modifications lipidiques vont permettre à la protéine Shh de s'ancrer à la membrane cellulaire, avant d'être sécrétée dans l'espace extracellulaire (Robbins 2007). En outre, la forme palmitoylée de Shh-N serait environ 30 fois plus active que sa forme non palmitoylée (Wendler 2006). Toutes les fonctions physiologiques durant le développement sont liées à la forme Shh-N. La protéine Shh-C n'a pas de fonctions biologiques connues à l'état physiologique en dehors de son activité cholestérol-transférase, et est également sécrétée dans l'espace extracellulaire.

9.2. Activation de la voie Shh

Le récepteur membranaire de Shh est Patched (Ptch), dont il existe 2 isoformes (Ptch1 et Ptch2). Ptch comprend 12 domaines transmembranaires. En l'absence de ligand (figure 7A), Ptch inhibe la migration à la membrane de la protéine Smoothened (Smo), en la maintenant à

l'état inactif à l'intérieur de la cellule. Les facteurs de transcriptions Gli (Gli1, Gli2 et Gli3) sont alors liés à la protéine SUFU (*Suppressor of fused homolog*) et restent inactifs dans le cytoplasme (Kogerman 1999). Gli3 est également phosphorylé par la PKA (*Protéine kinase A*) et va ainsi produire une protéine inhibitrice GLIR qui a une action de répression de la transcription des gènes cibles de Shh.

Lorsque Shh se fixe à son récepteur Ptch (figure 7B), il y a levée de l'inhibition de Smo qui va alors migrer à la membrane. Les facteurs de transcription Gli se dissocient ensuite de SUFU pour migrer dans le noyau et activer la transcription des gènes cibles. On note qu'une fois que Shh est lié à Ptch, il y a une internalisation du complexe Shh-Ptch dans la cellule avant sa dégradation dans le lysosome (Torroja 2004, Beckett 2008). Aucune différence en terme de gènes cibles n'a été mise en évidence entre Gli1, Gli2 et Gli3.

Certains auteurs ont soulevé la possibilité d'une activation de Gli indépendante de la fixation de Shh sur son récepteur Ptch (activation « non-canonique » de Gli) (Lauth 2007, Mimeault 2010). Ainsi, l'activation de Ras, du TGFβ ou d'EGFR pourrait également activer Gli1 et Gli2 et la transcription des gènes cibles.

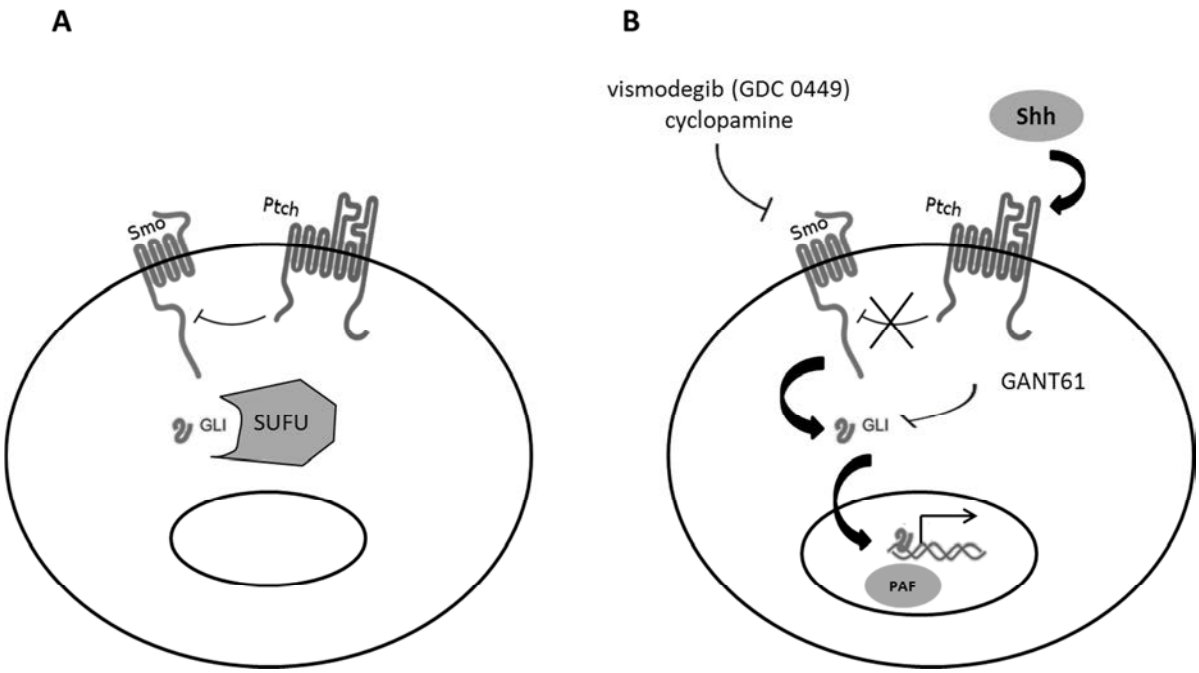


Figure 7 : Voie Shh. A : en l'absence de fixation de Shh sur Ptch, Ptch exerce une action inhibitrice sur Smo. Gli est associé à SUFU dans le cytoplasme et est inactif. B : en cas de fixation de Shh sur Ptch, il y a levée de l'inhibition de Smo et activation de Gli qui va passer dans le noyau et activer la transcription des gènes cibles, à l'aide du complexe hPAF.

9.3. Co-facteurs nucléaires de Gli : rôle du complexe PAF (*RNA Polymerase II-Associated Factor*)

Le complexe humain PAF (*human RNA Polymerase II-Associated Factor*) est composé de 5 sous-unités différentes : hPAF1 (ou hpAF1C, également appelé PD2 (*Pancreatic Differenciation 2*)), parafibromine, hLeo1, hCtr9 et hSki8 (Chaudhary 2007). Les rôles de ce complexe sont variés : il intervient lors de l'initiation de la transcription et l'élongation, et comme régulateur du cycle cellulaire. Il semble que le complexe PAF soit directement sollicité lors de l'activation de la voie Shh. En effet, une des unités du complexe (la parafibromine), est capable de se lier à Gli1, Gli2 et Gli3, et va ainsi permettre la transcription des gènes cibles (Mosimann 2009). PAF serait aussi mis en jeu lors de l'activation d'une autre

voie liée aux CSC, la voie Wnt (Mosimann 2006). De manière intéressante, le complexe PAF jouerait un rôle direct lors de l'oncogenèse. L'unité hPAF1 a été identifiée en 1991 (Batra 1991), mais son rôle dans l'oncogenèse n'a été objectivé que récemment. Moniaux et al. (2006) ont montré que hPAF1 était surexprimé au sein des cellules tumorales pancréatiques peu différenciées de la lignée Panc1. De plus, l'induction d'une surexpression de hPAF1 au sein de fibroblastes (NIH3T3) entraînait l'acquisition d'un phénotype tumoral, avec notamment formation de tumeur *in vivo* (xénogreffes). hPAF1 est surexprimé au sein des cellules souches embryonnaires (Ponnusamy 2009). La surexpression de hPAF1 dans les cellules Panc1 est liée à une amplification du locus 19q31.1. La mise en évidence d'une amplification de ce locus a été mise en évidence dans d'autres types tumoraux, comme le glioblastome (Huntsman 1999) ou le carcinome ovarien (Tang 2002). Son rôle éventuel dans le CBNPC est jusqu'à présent inconnu.

9.4. Rôle du cilium primaire à l'état physiologique

Le cilium primaire est une expansion de la membrane cellulaire vers le milieu extracellulaire. Il est directement lié au centriole qui produit un axonème, véritable colonne vertébrale du cilium (Satir 2007). Le cilium a des propriétés importantes à l'état physiologique dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, dont la voie Shh. En effet, à l'état inactif, il existe une accumulation de SUFU couplé aux protéines Gli, tandis que Smo reste à distance du cilium (Haycraft 2005). A l'inverse, quand Shh se fixe à Ptch, il y a une accumulation de Smo dans le cilium qui va pouvoir être activé à la membrane cellulaire (Corbit 2005). Son activation va entraîner une libération de Gli du complexe SUFU-Gli et la transcription des gènes cibles, comme nous l'avons vu ci-dessus.

9.5. Phénomènes de rétrocontrôle négatif

A l'état physiologique, plusieurs phénomènes de rétrocontrôle négatif sont mis en jeu lors de l'activation de la voie Shh. Parmi ceux-ci, la protéine HHIP (*Hedgehog Interacting Protein*) est une protéine qui va se lier à Shh au niveau de la membrane cellulaire et ainsi entrer en compétition avec Ptch (Chuang 1999). La liaison de Ptch avec son ligand Shh va également exercer un phénomène de contrôle négatif par phénomène d'endocytose (Torroja 2004, Beckett 2008). Enfin, les protéines ZIC sont des facteurs de transcription, qui interagissent avec les protéines Gli via leur domaine à doigt de zinc (Koyabu 2001), et ont une activité activatrice ou inhibitrice de Gli en fonction du type de cellule et des conditions (Mizugishi 2001).

9.6. Voie Shh dans le développement embryonnaire

La voie Shh est capitale durant le développement embryonnaire (McMahon 2003). Son activité est cependant dépendante du site de l'organisme où la voie est activée. Ainsi, chez le mammifère, Shh agit comme un morphogène au niveau du développement des membres, déterminant l'identité et le nombre des doigts. Il agit également comme morphogène pour le développement du système nerveux central au niveau de la crête neural, avec un effet inducteur dans l'axe dorso-ventral. Son action dans le développement pulmonaire est plus complexe. En effet, le développement de l'axe bronchique se fait par ramification. La mise en place de l'arbre aérien se fait entre la 4ième et la 16ième semaine, par ramification dichotomique à partir du bourgeon épithélial original. Plusieurs facteurs sont inducteurs de ce bourgeonnement, et sont produits par le mésenchyme à destination des cellules épithéliales. Il s'agit principalement du FGF-10 (*Fibroblast Growth Factor-10*), qui va se fixer à son récepteur FGFR2 (*FGF Receptor-2*) au niveau épithélial. Plusieurs facteurs interviennent

comme régulateur de ce bourgeonnement épithélial. Certains sont externes à l'épithélium, comme le TGFβ (*Transforming Growth Factor* β), ou ont une action interne à l'épithélium, comme Sprouty2 ou Wnt, mais les principaux sont sécrétés par l'épithélium à destination du mésenchyme, comme Shh ou BMP4 (*Bone Morphogenic Protein 4*). Ainsi, Shh réprime fortement l'expression de FGF-10 dans le mésenchyme (Figure 8). L'apparition de nouveaux foyers sécréteurs de FGF-10 provoque le bourgeonnement dichotomique. Shh agit donc comme régulateur spatial de FGF-10 durant le développement de l'arbre bronchique.

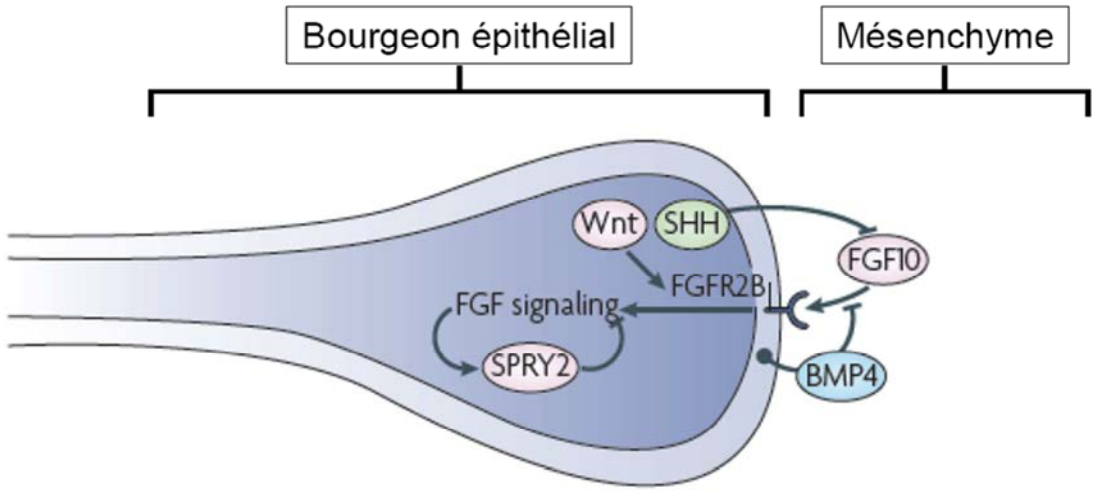


Figure 8 : Interactions épithélium - mésenchyme lors du bourgeonnement et de la ramification bronchique au cours du développement, et rôle de Shh. La croissance épithéliale est stimulée par la sécrétion de FGF-10 par le mésenchyme. Des facteurs régulateurs vont intervenir, comme Shh, Sprouty (Spry2), TGFβ, Wnt et BMP4. Shh va ainsi être sécrétée par l'épithélium dans le mésenchyme et va inhiber FGF-10. La balance Shh-FGF-10 va permettre la ramification et la dichotomie bronchique. D'après Affolter et al. (2009).

9.7. Voie Shh et cancer

La voie Shh est réactivée dans un certain nombre de cancers solides. Plusieurs mécanismes ont été décrits. La voie Shh peut ainsi être activée via la présence de mutations somatiques au niveau des différents effecteurs de cette voie. Ainsi, le syndrome de Gorlin, qui induit la

formation de carcinomes baso-cellulaire multiples, de rhabdomyosarcomes et de médulloblastomes, est caractérisé par la présence de mutations constitutionnelles inactivatrices de *Ptch*, qui induit donc une activation continue de Smo (Hahn 1996, Johnson 1996). Des mutations de *SUFU* ont également été décrites dans les médulloblastomes sporadiques (Raffel 1997). Dans les formes sporadiques de carcinomes baso-cellulaires, il existe une mutation de la voie Shh (mutation inactivatrice de *Ptch* ou mutation activatrice de *Smo*) dans environ 70% des cas (Tang 2007). L'importance de l'activation de la voie Shh dans les carcinomes baso-cellulaires a permis le développement et la mise sur le marché d'un inhibiteur de Smo (vismodegib, Erivedge® (Genentech, USA)) dans cette indication.

Dans de nombreux autres cancers, une activation de la voie Shh a été décrite sans mise en évidence de mutation de la voie Shh. Il s'agit d'une activation auto- et/ou juxtracrine. Un tel mécanisme d'activation a été mis en évidence dans les cancers du sein, du pancréas et de la prostate (Karhadkar 2004, Kubo 2004, Thayer 2003), mais également dans les CBPC. L'étude de l'expression de Shh et Gli1 par immunohistochimie et Western Blot sur des prélèvements tumoraux et des lignées cellulaires de CBPC a mis en évidence une surexpression de ces protéines par les cellules tumorales (Watkins 2003). L'inhibition de la voie Shh par la cyclopamine (inhibiteur de Smo, Figure 1B) inhibait la croissance tumorale des cellules de CBPC *in vitro* et *in vivo* sur des xénogreffes. Ces résultats ont été confirmés sur des modèles murins transgéniques, porteuses d'une délétion de *Rb1* (*retinoblastoma 1*) et de *TRP53* (*transformation related protein 53*) (Park 2011). La délétion de Smo dans ces modèles, ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie Shh, inhibaient la croissance tumorale. Ces résultats ont conduits à la mise en place par l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) d'un essai clinique de phase II testant l'intérêt de l'ajout du vismodegib à une chimiothérapie par cisplatine et etoposide (CE) dans les CBPC disséminé, en première ligne de traitement (essai ECOG-1508). Aucune différence en terme de SSP (médiane 4,4 mois

(CE) versus 4,6 mois (CE + vismodegib)) ni de survie globale (médiane 9,1 mois (CE) versus 9,8 mois (CE + vismodegib)) n'a été mise en évidence entre les deux groupes de patients (Belani 2013). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats négatifs, comme l'absence de sélection d'un phénotype de patients particuliers (l'inhibition de la voie Shh n'est-elle bénéfique que pour les patients chimiorésistants ?), l'absence de biomarqueur permettant d'identifier les patients susceptibles de bénéficier du vismodegib, ou encore le modèle de traitement concomitant (chimiothérapie et vismodegib) utilisé dans cet essai.

La voie Shh est également réactivée dans le CBNPC. Yuan et al. (2007) ont montré une activation de la voie Shh dans un certain nombre de lignées cellulaires de CBNPC. Ils ont analysés l'expression de Gli1 par IHC sur un panel de 120 échantillons de cancers bronchiques (tissue microarray). Ils ont ainsi mis en évidence une positivité dans 87% des adénocarcinomes et 93% des carcinomes épidermoïdes. Une autre étude par IHC des différents composants de la voie Shh sur 80 pièces chirurgicales de CBNPC (stade I à III) a montré une expression de Shh (97,5%), Ptch1 (78,7%), Smo (72,5%), Gli1 (98,7%) et Gli2 (87,5%) (Gialmanidis 2009). L'expression était présente uniquement dans les cellules tumorales. Les tissus normaux péri-tumoraux étaient négatifs. Dans une autre étude de 248 CBNPC de stade précoce, l'expression des différents composants de la voie Shh n'était pas corrélée à la survie sans récidive ou à la survie globale (Raz 2012). Ces résultats confirment que la voie Shh est activée dans les CBNPC.

L'hypothèse d'un rôle pro-tumoral de la voie Shh dans les CBNPC a été confirmée par une étude récente (Huang 2014). Les auteurs ont analysé l'expression de la voie Shh, par PCR sur 2 cohortes différentes de patients ayant un carcinome épidermoïde bronchique (n=178 et n=56), ainsi que sur 4 lignées de carcinome épidermoïde bronchique (H520, H2170, H226, et SK-MES-1). La voie Shh était activée dans les prélèvements de ces 2 cohortes. *In vitro*, l'inhibition de la voie Shh, notamment l'inhibition de Gli2 par siRNA ou par une molécule

inhibitrice (GANT61), diminuait la prolifération et activait l'apoptose. L'utilisation de GANT61 *in vivo* sur des modèles de xénogreffes montrait également une activité anti-tumorale.

9.8. Gènes cibles de l'activation de Shh dans le cancer

Les gènes activés par les facteurs de transcription Gli dans la voie Shh sont très différents en fonction du contexte et du type de cellule concerné (Katoh 2009). La plupart des gènes sont impliqués dans la prolifération (comme *Myc*), la survie cellulaire, la TEM et le phénotype de CSC (comme *CD44, CD133*). Il existe également des gènes cibles de Gli qui vont exercer un rétrocontrôle négatif de la voie Shh. Le tableau 5 résume, de manière non exhaustive, les principaux gènes cibles de l'activation de la voie Shh.

Tableau 5 : Principaux gènes cibles de la voie Shh. D'après Katoh (2009)

	Gène
TEM	*FOXC2*
	SNAI1
	TWIST2
	ZEB1
	ZEB2
CSC	*JAG2*
	FST
	GREM1
	BMP4
	WNT2B
	WNT5A
	PDGFRA
	BMI1
	LGR5
	CD44
	CD133
rétrocontrôle positif de la voie Shh	*GLI1*
rétrocontrôle négatif de la voie Shh	*PTCH1*
	PTCH2
	HHIP1
prolifération cellulaire	*MYCN*
	CCND1
	CCND2
	CCNE
	FOXM1
	CCNB1
	CDC25B
survie cellulaire	*BCL2*
	CFLAR
autres	*FOXF1*
	FOXL1
	PRDM1
	PTHLH

9.9. Voie Shh, CSC et chimiorésistance

9.9.1. Généralités sur les CSC

Les CSC sont les cellules tumorales initiatrices du cancer et interviendraient dès les premières étapes de la carcinogenèse. Elles représentent une très faible proportion des cellules tumorales de la tumeur. Elles sont très indifférenciées, avec un fort potentiel d'oncogenèse et une grande capacité de prolifération et de différenciation. Ces CSC partagent de nombreuses similitudes avec les cellules souches normales de l'organisme, en termes d'auto-renouvèlement, de production de lignées cellulaires « filles », de phénotypes membranaires et de voies de signalisation intracellulaires. On ignore actuellement si les CSC dérivent des cellules souches normales de l'organisme. Les CSC peuvent être définies par 3 propriétés essentielles : l'auto-renouvèlement, la production de lignées « filles » différenciées, et la capacité oncogénique *in vivo*, mesurée par la formation de xénogreffes. L'activation de plusieurs gènes spécifiques a été mise en évidence au sein des CSC, comme *Sox2*, *NANOG* ou *OCT4/POU5F1*. La présence de CSC a été prouvée dans de nombreuses tumeurs solides, dont le cancer bronchique. Ainsi, dès 1982, Carney et al. ont montré à partir de CBNPC et de CBPC que certaines cellules, représentant moins de 2% de l'ensemble des cellules tumorales, étaient capables de former de nouvelles colonies de cellules tumorales. Ces colonies étaient capables de former des tumeurs *in vivo*, similaires à la tumeur initiale, après injection intracrânienne dans des souris immunodéprimées (Carney 1982).

9.9.2. Marqueurs de CSC

De nombreuses techniques ont été décrites pour isoler les CSC. Il peut s'agir de l'identification de marqueurs membranaires, de l'analyse de la capacité d'efflux, de l'analyse

de capacités métaboliques particulières, ou de sélection des cellules résistantes à la chimiothérapie.

L'identification de marqueurs membranaires est la méthode la plus utilisée. Dans le CBNPC, il s'agit du CD133, CD44 et de ABCG2. Le CD133 est un récepteur transmembranaire dont la fonction n'est actuellement pas connue. Il est le marqueur le plus décrit comme marqueur de CSC, toute tumeur solide confondue. Dans le CBNPC, Tirino et al. (2009) ont montré que les cellules CD133 isolées par tri cellulaire à partir de tumeurs pulmonaires opérées représentaient environ 6% de l'ensemble des cellules dans la tumeur, et étaient capables de croissance en forme de sphéroïdes en milieu d'agarose, et avaient un fort pouvoir oncogénique *in vivo* sur les souris *NOD/SCID*. De manière analogue, Eramo et al. (2008) ont eux estimé la proportion de cellules CD133+, par cytométrie de flux, entre 0,32% et 3,5% à partir de prélèvements de CBNPC de stade précoce. Une fois isolées par tri cellulaire, ces cellules CD133+ étaient capables de former des sphéroïdes en culture, elles-mêmes capables de se différencier en cellules tumorales filles, avec perte secondaire de l'expression de CD133 lors de la différenciation. Ces sphéroïdes de cellules avaient également un pouvoir oncogénique *in vivo* sur souris *SCID*, avec reproduction de la tumeur initiale. CD44 est également une protéine membranaire, impliquée dans des fonctions d'adhésion, de migration et d'interaction avec la matrice extracellulaire (Fasano 1997). CD44 interagit notamment avec EGFR et cMET (Orian-Rousseau 2002, Bourguignon 2007). Son rôle de marqueur de CSC a déjà été démontré dans le cancer colorectal (Du 2008) et le CBPC (Gutova 2007). Dans le CBNPC, les cellules CD44+ isolées par tri cellulaire à partir de lignées de CBNPC ont des niveaux élevés d'expression de gènes impliqués dans le phénotype de CSC, comme *NANOG, OCT4/POU5F1, Sox2*, tandis que ces gènes ne sont pas exprimés dans les cellules CD44- (Leung 2010). ABCG2 (BCRP) est une protéine transmembranaire, membre de la famille ABC. Outre son rôle évoqué dans la chimiorésistance, ABCG2 a été décrit comme marqueur

de CSC, dans le cancer hépatique, colorectal (Haraguchi 2006) et le neuroblastome (Hirschmann-Jax 2004). Dans le CBNPC, les CSC ont pu être isolées *in vitro* à partir de lignées cellulaires (H460, H23, HTB-58, A549, H441, et H2170), et présentaient un niveau élevé d'ABCG2 (Ho 2007, Sung 2008).

Une autre propriété utilisée pour isoler les cellules souches et les CSC est la capacité d'efflux du Hoechst 33342, qui identifie une « side population », c'est-à-dire les cellules négatives pour le marqueur H33342 en cytométrie de flux. En 1996, Goodell et al. ont montré à partir de lignées de cellules hématopoïétiques que certaines cellules avaient la capacité de rejeter le marqueur Hoechst 33342 du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Ces cellules avaient des caractéristiques de cellules souches : elles étaient résistantes à l'irradiation et capables de créer un nouveau clone de cellules après xénogreffes (Goodell 1996). L'efflux du Hoechst 33342 semble lié au transporteur MDR, car l'utilisation de son inhibiteur, le verapamil, bloquait l'efflux du Hoechst 33342. Dans le CBNPC, l'utilisation du Hoechst 33342 a également été validée comme marqueur potentiel de CSC (Ho 2007, Sung 2008).

Il est possible d'utiliser certaines propriétés métaboliques pour isoler les cellules souches et les CSC. L'ALDH (*Aldehyde Dehydrogenase*) est un groupe d'enzymes responsables de l'oxydation des aldéhydes. Leur activité est augmentée dans les cellules souches et les CSC. Dans les cellules souches hématopoïétiques, la suractivité d'ALDH est impliquée dans le métabolisme alcoolique, le métabolisme de la vitamine A, la résistance à certains agents de chimiothérapie (cyclophosphamide…) et la différenciation précoce des cellules souches (Kastan 1990, Yoshida 1992, Storms 1999). L'activité ALDH a aussi été utilisée comme marqueur des CSC dans les leucémies, les cancers du sein, du foie, du pancréas, et du colon

(Chang 1998, Pearce 2005, Balicki 2007, Feldmann 2007, Ginestier 2007, Ma 2008). Dans le CBNPC, les cellules ALDH1 positives isolées de lignées cellulaires présentaient des caractéristiques de CSC, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Jiang 2009, Liang 2012). Une technique spécifique a été commercialisée pour être utilisée en cytométrie de flux pour marquer les cellules à fortes activité ALDH (ALDEFLUOR™) (Moreb 2007). Cette technique a été validée pour l'isolation des CSC, notamment dans le CBNPC (Jiang 2009, Liang 2012).

9.9.3. Limites de l'utilisation des marqueurs actuels pour la détection des CSC

Comme nous l'avons vu, de nombreux marqueurs de CSC ont été décrits pour la caractérisation et l'isolement des CSC, notamment dans le CBNPC. Cependant, plusieurs études ont soulevé la faible spécificité de la plupart de ces marqueurs. Ainsi, Meng et al. (2009) ont montré que le CD133, largement utilisé dans la littérature, était peu spécifique pour isoler les CSC *in vitro* à partir des lignées de CBNPC. En effet, un certain nombre de cellules CD133- présentaient des caractéristiques de CSC (formation de colonies, auto-renouvellement, prolifération, différenciation et résistance à la chimiothérapie). De plus, des analyses par PCR et par cytométrie de flux sur plusieurs lignées de CBPC et CBNPC ont montré que le CD133 était un marqueur plus spécifique dans le CBPC que dans le CBNPC (Cui 2011). Enfin, l'activité ALDH pose aussi des problèmes de spécificité, celle-ci pouvant également être augmentée au sein des pneumocytes chez le fumeur (Patel 2008).

Certains auteurs ont suggéré l'utilisation concomittante en cytométrie de flux de plusieurs marqueurs pour isoler les CSC afin d'augmenter la spécificité de la méthode. Ainsi, le CD133 a été utilisé avec d'autres marqueurs, comme ABCG2, l'*epithelial-specific antigen* (ESA) et

le *chemokine receptor 4* (CCR4). Les cellules CD133+ESA+ ont un plus fort pouvoir oncogénique dans des modèles de xénogreffes, et ont un niveau d'expression d'ABCG2 supérieur à celui des cellules CD133+ (Bertolini 2009). Par ailleurs, seules les cellules CD133+ABCG2+ et les cellules CD133+CCR4+ survivaient après traitement par cisplatine de xénogreffes de cellules issues de culture primaire de CBNPC (Bertolini 2009). Cependant, l'utilisation de 2 ou 3 marqueurs en cytométrie de flux complexifie la méthodologie, et impose l'utilisation de multiples lasers avec des règles strictes de compensation, pouvant augmenter ainsi le risque de faux-positifs ou de faux-négatifs. La mise en évidence de nouveaux marqueurs robustes et simples d'utilisation est donc indispensable.

9.9.4. Voie Shh et CSC

Plusieurs travaux ont montré une relation étroite entre la voie Shh et les CSC. En effet, comme nous l'avons évoqué ci-dessus, Shh est une des voies de signalisation préférentiellement activée au sein des CSC, tout comme les voies Wnt et Notch. Ainsi, Li et al. (2007) ont isolé à partir de cultures primaires d'adénocarcinomes pancréatiques des cellules ayant des caractéristiques phénotypiques de CSC : cellules CD44(+)CD24(+)ESA(+). Ces cellules ne représentaient que 0,2 à 0,8% de l'ensemble des cellules, et avaient un potentiel d'oncogenèse 100 fois supérieur à celui des autres cellules tumorales, évalué par la formation de xénogreffes. Ces cellules avaient une surexpression de la voie Shh par rapport aux autres cellules tumorales. L'inhibition de la voie Shh dans des lignées cellulaires de cancer bronchique par vismodegib entraînait une diminution de la population de CSC (Tian 2012a). Sur des modèles de lignées cellulaires (HCC et H1339), environ 0,5% des cellules ont la capacité d'efflux du Hoechst 333242. Après traitement par le vismodegib, ce taux diminuait de manière significative (Tian 2012a). Des résultats similaires ont été retrouvés dans des

modèles de glioblastomes PTEN-dépendants (Xu 2008). Enfin, Lemjabbar-Alaoui et al. (2006) ont étudié un modèle de carcinogenèse bronchique induite par la fumée de cigarettes. Ils ont soumis pendant 8 jours des cellules bronchiques humaines en culture primaire, à la fumée de tabac. Ils ont constaté qu'à l'issue de cette exposition, les cellules bronchiques avaient acquis un phénotype tumoral, avec augmentation de leur prolifération, capacité de croissance en agarose, et capacité de former des xénogreffes sur les souris *nude*. Ils ont pu mettre en évidence l'apparition d'une activation des voies de signalisation Wnt et Shh dans ces cellules. L'inhibition de la voie Shh prévenait l'apparition du phénotype tumoral des cellules exposées à la fumée. Ces résultats soulignent le rôle majeur probable de la voie Shh dans l'oncogenèse des CBNPC.

9.9.5. CSC et chimiorésistance

De nombreux travaux ont soulevé le rôle des CSC dans la chimiorésistance des CBNPC. La sélection *in vitro* des cellules tumorales sous chimiothérapie a été utilisée comme moyen de sélection des CSC (Li 2008). L'expression de CD133+ dans le CBNPC était corrélée aux marqueurs de chimiorésistance, comme la glutathione S-transferase (cf chapitre 8.4) (Salnikov 2010). L'administration de cisplatine, d'etoposide et de paclitaxel sur des CSC de CBNPC cultivées en sphères n'a aucune activité cytotoxique sur ces CSC (Eramo 2008). De même, les cellules CD44+ isolées par tri cellulaire à partir de lignées de CBNPC (H1650 et H1299) sont beaucoup plus résistantes au cisplatine que les cellules CD44- ou les cellules non triées des mêmes lignées (Lung 2010). Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules ADLH1+ traitées par du cisplatine, gemcitabine, daunorubicine, doxorubicine, vinorelbine et docetaxel (Jiang 2009), ainsi qu'avec les cellules avec efflux du Hoechst 33342 traitées par methotrexate et doxorubicine (Sung 2008).

Plusieurs études ont suggéré une relation entre l'activation de la voie Shh et la chimiorésistance. Il a ainsi été montré une corrélation entre l'activation de la voie Shh dans les cellules cancéreuses et l'expression de transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance comme MDR1 et ABCG2, évaluée en Western Blot (Sims-Mourtada 2007). De plus, Tian et al. (2012b) ont montré que le vismodegib inhibait de façon significative la prolifération tumorale *in vitro* des lignées cellulaires de CBNPC et de CBPC résistantes au cisplatine. L'inhibition de la voie Shh par vismodegib ou par siARN sensibilise également au traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR. Ahmad et al. (2013) ont ainsi utilisé une lignée A549 rendue résistante au cisplatine et à l'erlotinib via un traitement par TGFβ qui permet l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux (A549M). Les IC50 du cisplatine et de l'erlotinib étaient significativement plus basses avec un pré-traitement par vismodegib ou siARN anti-Shh. Par ailleurs, l'administration de vismodegib entraînait la diminution de l'expression de marqueurs de CSC, comme *Sox2* ou *NANOG*.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse actuellement admise que, *in vivo*, les CSC sont sélectionnées lors de l'administration d'une chimiothérapie cytotoxique, du fait de leur capacité de chimiorésistance. Elles seraient ainsi responsables de la progression tumorale ou de la rechute, car capables de recréer un clone tumoral (Figure 9). La description des voies de signalisation cellulaires des CSC et la recherche de traitements ciblés de ces cellules représentent des enjeux majeurs en oncologie, et dans le CBNPC en particulier.

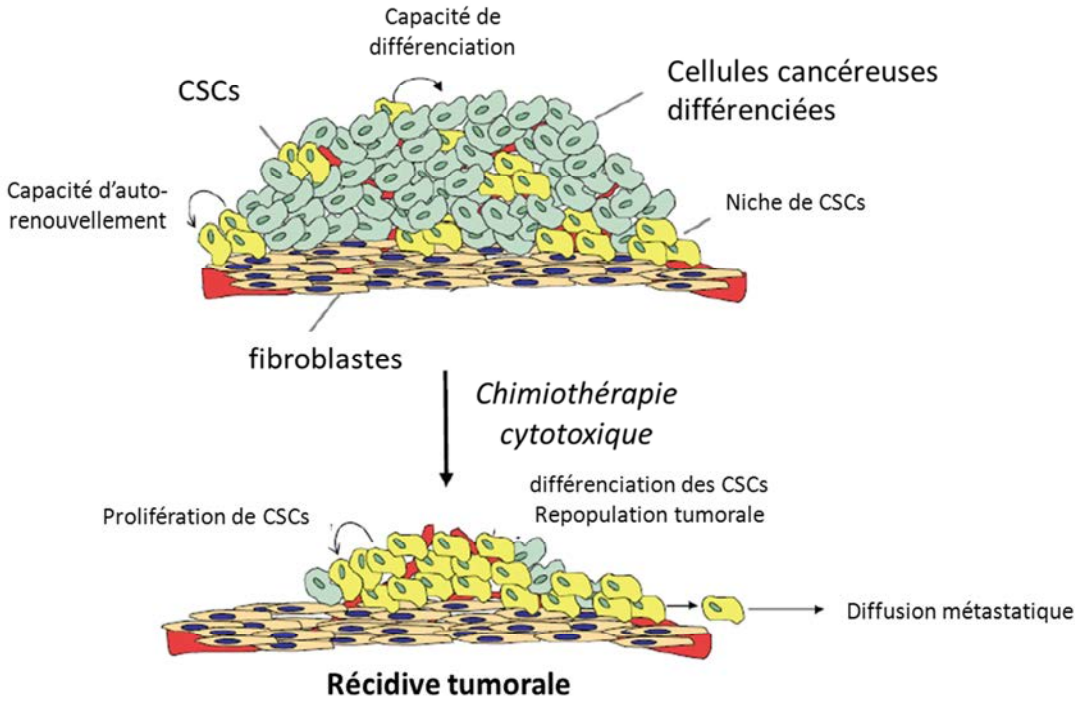


Figure 9 : Hypothèse de résistance tumorale à la chimiothérapie médiée par les CSC. Le cancer est hétérogène avec présence en son sein de cellules tumorales plus ou moins différenciées et de CSC. Tandis que les cellules tumorales différenciées sont chimiosensibles, les CSC sont chimiorésistantes et responsables de la progression tumorale au décours de la chimiothérapie cytotoxique.

9.10. Voie Shh et c-Myc

La famille des oncogènes *Myc* code pour des phosphoprotéines intervenant dans la croissance cellulaire et l'oncogenèse. Elle regroupe les protéines N-Myc, C-Myc et L-Myc, qui ont un motif hélice-boucle-hélice, et agissent comme facteurs de transcription. Une surexpression et une amplification de Myc a été décrite dans plusieurs cancers, dont le CBNPC, à partir de lignées cellulaires et des prélèvements tumoraux (Nesbit 1999, Broers 1993). Myc intervient dans la prolifération cellulaire en régulant l'expression d'un certain nombre de régulateurs du cycle cellulaire. Ainsi, Myc stimule la transition G1/S en régulant l'activité des cyclines (cyclines D et cycline E), des kinases cycline-dépendante (cdk2, cdk4, cdk6), des inhibiteurs

de cdk (p15, p16, p21, p27) et du facteur de transcription E2F (*p-Rb-binding transcription factor*) (Zajac-Kaye 2001). Myc fait partie des facteurs de transcription activés au sein des CSC (Mimeault 2013).

Il existe une interaction étroite entre la voie Shh et Myc. En effet, l'activation de la voie Shh entraîne une activation de Myc (Kenney 2003, Hallikas 2006). L'inhibition de Gli par le composé GANT-61 supprime *in vitro* et *in vivo* la croissance de CSC, avec répression de l'expression de facteurs tels que C-Myc, *NANOG*, *OCT4*, *Sox2* (Fu 2013).

OBJECTIFS DE LA THESE

Le cancer bronchique reste la première cause de décès par cancer malgré des progrès récents dans le démantèlement moléculaire et le développement de thérapies ciblées. La majorité des CBNPC reste traitée en première ligne par une chimiothérapie cytotoxique à base de sel de platine. Environ un quart des patients sont considérés comme chimiorefractaires. Une meilleure compréhension des facteurs associés à la chimiorésistance, et plus particulièrement au caractère chimiorefractaire, est donc fondamentale afin de développer des traitements capables de contrer ces mécanismes.

Les objectifs de cette thèse sont de déterminer les facteurs impliqués dans la chimiorésistance à base de sels de platine dans les CBNPC. Nous avons commencé par déterminer le phénotype des CBNPC chimiorefractaires et chercher une implication des anomalies moléculaires dépistées en routine dans le CBNPC (mutations d'*EGFR*, mutations de *Kras* et translocation d'*ALK*). Par la suite, nous nous sommes intéressés au rôle de la voie Shh dans la chimiorésistance. Nous avons ainsi étudié l'activation de la voie Shh dans le CBNPC et cherché une corrélation avec le caractère chimiorefractaire. Nous avons également étudié l'association entre la voie Shh et la TEM. Nous avons aussi utilisé un autre modèle de cancer thoracique chimiorefractaire, le mésothéliome pleural malin. Enfin, l'impact sur la prolifération tumorale et sur la survie de l'activation des CSC et de la voie Shh a été exploré, via l'étude de hPAF1C et c-Myc.

III. RESUME DES ARTICLES ET MANUSCRITS

1. Etude des caractéristiques cliniques et moléculaires des patients ayant un CBNPC de stade avancé et réfractaires à la chimiothérapie à base de platine

1.1. Article 1

Giroux Leprieur E, Antoine M, Vieira T, Duruisseaux M, Poulot V, Rabbe N, Belmont L, Gounant V, Lavolé A, Milleron B, Lacave R, Cadranel J, Wislez M. Clinical and molecular features in patients with advanced non-small cell lung carcinoma refractory to first-line platinum-based chemotherapy. **Lung Cancer**, Volume 79, n°2, Février 2013, pages 167-172.

1.2. Présentation de l'article et commentaires

La majorité des patients ayant un CBNPC de stade avancé est traitée en première ligne par une chimiothérapie à base de platine. Entre un quart de ces patients a une progression tumorale d'emblée sous ce traitement. Les patients sont alors considérés comme réfractaires à la chimiothérapie. Une cohorte de 178 patients ayant un CBNPC de stade avancé a été traitée entre 2003 et 2006 dans le service de Pneumologie de l'Hôpital Tenon (AP-HP) par une chimiothérapie à base de platine, en première ligne. Nous avons comparé les caractéristiques cliniques, tumorales et moléculaires des patients réfractaires à celles des patients contrôlés. Les anomalies moléculaires étudiées étaient celles dépistées en routine en 2011 : mutations d'*EGFR* et de *Kras*, translocation d'*ALK*. Le taux de patients réfractaires était de 25,6% (n=46). La survie globale des patients réfractaires était de 5 mois (IQR 3,2-9,9) versus 15,4

mois (IQR 9,9-22,5) pour les patients contrôlés (n=132) (p<0,001). Les caractéristiques cliniques étaient similaires entre les deux groupes. La seule différence concernait les sous-types histologiques, avec 10,9% de carcinome sarcomatoïde chez les patients réfractaires, versus 1,5% chez les patients contrôlés (p=0,057). Il n'y avait pas de différence en termes d'anomalies moléculaires entre les deux groupes. En analyse multivariée, seul le sous-type histologique sarcomatoïde était significativement associé au caractère réfractaire (OR=7,50, IC95% 1,02-55,45 ; p=0,048).

Cette étude a permis de souligner le caractère péjoratif des carcinomes sarcomatoïdes en termes de réponse à la chimiothérapie. Ce type histologique est rare (moins de 5% des CBNPC), et comprend différents sous-types : carcinome pléomorphe, carcinome à cellules fusiformes, carcinome à cellules géantes, carcinosarcome, blastome pulmonaire. Peu de séries ont été publiées dans la littérature, la plupart correspondant à des séries chirurgicales. Néanmmoins, toutes soulignent la faible sensibilité de ces tumeurs à la chimiothérapie, avec des taux de progression sous chimiothérapie de 1^{ière} ligne compris entre 40 et 100% (Bae 2007, Kaira 2010, Ito 2010). Dans un second travail, notre groupe a montré à partir de 97 patients ayant un carcinome sarcomatoïde de stade avancé (Vieira 2013) que 69% d'entre eux étaient réfractaires à la chimiothérapie. La SSP était de 2 mois et la survie globale de 6,3 mois.

Les recherches de mutations d'EGFR, de Kras ou de translocation d'ALK ne suffisaient pas pour identifier les patients réfractaires à la chimiothérapie. L'exploration d'autres marqueurs moléculaires est en cours (Master 2 Vincent Fallet, Thèse d'Université Thibault Vieira).

Lung Cancer 79 (2013) 167–172

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan

Clinical and molecular features in patients with advanced non-small-cell lung carcinoma refractory to first-line platinum-based chemotherapy

E. Giroux Leprieur[a,b], M. Antoine[a,c], T. Vieira[a,d], M. Duruisseaux[a], V. Poulot[a,e], N. Rabbe[a], L. Belmont[d], V. Gounant[d], A. Lavolé[d], B. Milleron[d], R. Lacave[a,e], J. Cadranel[a,d], M. Wislez[a,d,*]

[a] Equipe de Recherche 2, "Interactions des cellules tumorales et leur environnement et résistance aux agents anticancéreux", GRC Université Paris 6 Pierre et Marie Curie Theranoscan, Hôpital Tenon – AHHP, 4 rue de la Chine, 75970 Paris, France
[b] Service de Pneumologie, Hôpital Ambroise Paré – AHHP, Université Versailles - Saint Quentin en Yvelines, 9 avenue Charles de Gaulle, 92100 Boulogne-Billancourt, France
[c] Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Tenon – AHHP, Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine, 75970 Paris, France
[d] Service de Pneumologie, Hôpital Tenon – AHHP, Université Paris 6 Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine, 75970 Paris, France
[e] Service d'Histologie – Biologie Tumorale, Plateforme de génomique des tumeurs solides, Hôpital Tenon – AHHP, Université Pierre et Marie Curie, 4 rue de la Chine, 75970 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 July 2012
Received in revised form
18 September 2012
Accepted 16 October 2012

Keywords:
Non-small-cell lung cancer
Early progressive disease
Refractory patients
Platinum-based chemotherapy
Sarcomatoid carcinoma
EGFR mutations
KRAS mutations
ALK translocation

ABSTRACT

Most of the cases of non-small-cell lung cancer (NSCLC) are diagnosed at an advanced stage and are treated with platinum-doublet chemotherapy. However, some patients are refractory to this treatment. The aim of this study was to identify the clinical and molecular characteristics of patients with refractory disease. All consecutive patients between 2003 and 2006, who received a platinum-doublet chemotherapy as first-line treatment for stage IIIb-IV NSCLC, were included. Refractory patients were defined as early progressive disease (PD) at the first evaluation of chemotherapy according to WHO criteria. The clinical, histo-pathological, and molecular characteristics (EGFR: exon 19, 20, 21 and KRAS: exon 2 by PCR sequencing; ALK by immunohistochemistry) and survival of refractory patients with initial PD (r-patients) and controlled disease (c-patients) were compared by univariate analyses. Factors that differed between the two groups (p-value <0.25 in univariate analyses) were entered into multivariate analysis. In this study, 178 patients were included. The first tumor assessment was carried out after a median of three cycles (range 1–4). Forty-six (25.8%) patients were refractory. Clinical presentation was similar between r- and c-patients. The sarcomatoid histological subtype was more common in r-patients than c-patients (10.9% vs. 1.5%, respectively; $p = 0.057$). The proportion of EGFR (5.2% vs. 9.6%, $p = 0.224$) and KRAS mutations (11.1% vs. 5.7%, $p = 0.357$), and the expression of ALK (6.3% vs. 2.5%, $p = 0.327$) did not differ significantly between the two groups. In multivariate analysis, sarcomatoid histological subtype was the only factor associated with early PD (OR = 7.50; 95%CI: 1.02–55.45; $p = 0.048$). r-Patients had significantly shorter survival than c-patients (median 5 months (IQR 3.2–9.9) vs. 15.4 months (IQR 9.9–22.5), respectively; $p < 0.0001$). In conclusion, patients with early PD under platinum-doublet chemotherapy had shorter survival than c-patients. Sarcomatoid histological subtype was the only independent factor associated with early PD.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is usually diagnosed at an advanced stage, and has a poor prognosis. Apart from the characterization of EGFR mutations and ALK translocation in a small proportion of patients with advanced NSCLC (~10% [1] and 4% [2] in Caucasians, respectively) who are eligible for first-line targeted therapies, most other patients receive a platinum-based doublet chemotherapy as the first-line treatment [3]. The standard treatment is 4–6 cycles of platinum-based chemotherapy, followed or not by maintenance therapy. A second-line therapy is given if there is progression, defined as tumor growth of >20% (RECIST [4]) or 25% (WHO criteria [5]), or as the appearance of a new lesion.

Some patients develop progressive disease observed immediately, at the first-tumor evaluation, after 2 or 3 cycles of chemotherapy. They are termed refractory patients. Most of the main randomized phase III trials that have assessed platinum-based doublet chemotherapy as a first-line treatment reported that 15–30% of NSCLC patients are refractory [6–15]. Mechanisms of resistance to cisplatin have been extensively studied [16]. Cisplatin is an alkylating agent that induces inter-strand adducts on DNA, and thus decreases cellular-transcription activity [17]. Some proteins involved in the DNA-repair system like ERCC1 (excision repair

* Corresponding author at: Service de Pneumologie, 4 rue de la Chine, Hôpital Tenon 75970 Paris, France. Tel.: +33 156016204; fax: +33 156016991.
E-mail address: marie.wislez@tnn.aphp.fr (M. Wislez).

0169-5002/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.10.010

cross-complementing group 1) or BRCA1 have been described as mechanisms of resistance to cisplatin based on in vitro and in vivo studies [18–21]. However, in clinical situations, because of the limited amount of material from metastatic NSCLC tumors, most biomarker studies have been performed on surgical samples taken from patients with localized disease. Furthermore, these biomarkers still need to be identified and validated for routine use, and studies are still on-going (IFCT 0801 trial NCT00775385, SCAT trial NCT00478699).

The aim of this study was to identify the markers associated with refractory disease in a cohort of metastatic patients treated with first-line combined cisplatin-based chemotherapy. We studied all clinical pathological and molecular markers that we routinely assessed in NSCLC at the time of diagnosis in order to identify the characteristics of patients who are refractory to combined cisplatin-based chemotherapy.

2. Patients and methods

2.1. Patients

We retrospectively reviewed all consecutive patients treated in our department with a platinum-based doublet chemotherapy as the first-line therapy for non-irradiable IIIb-IV NSCLC, according to the 6th IASLC TNM edition [22]. The inclusion period ran from January 2003 to December 2006. Demographic, histological, and treatment data were recorded (E.GL.). All patients were evaluated for tumor response after two or three cycles of treatment by clinical examination, chest X-ray, and chest and upper abdomen CT scan, by dedicated radiologists specialized in thoracic oncology. At that time, patients were classified as having early progressive disease (refractory patients) (r-patients) or as early controlled disease (c-patients, i.e., complete or partial response, or stable disease) according to WHO criteria [5].

2.2. Tumor samples

All tumor samples (n = 178) were collected and centrally reviewed by a pathologist specialized in thoracic malignancies (M.A). The pathologist was blind to patients' clinical outcome. All diagnostics of sarcomatoid carcinomas were double checked to insure the final diagnosis, with precision of the histological subtype (pleomorphic carcinomas, spindle cell carcinoma, giant cell carcinoma, carcinosarcoma, or pulmonary blastoma). Diagnosis of NSCLC was obtained from bronchial or percutaneous biopsies (n = 120), surgical biopsies (n = 40), or cytological samples (bronchial aspiration, n = 6; metastasis puncture, n = 6; transthoracic puncture, n = 6). The histological type and histological subtype of adenocarcinomas were determined according to the latest IASLC WHO classification [23]. The proportion of tumor cells was recorded. Diastase-resistant Periodic acid Schiff (PAS) staining was performed on all the adenocarcinoma samples to define them as mucinous or non-mucinous. Adenocarcinoma was defined as mucosecretant when ≥5% of tumor cells were diastase resistant PAS positive [24].

2.3. EGFR and KRAS mutations

EGFR (exons 19, 20, 21) and KRAS (exon 2) mutations were searched by direct sequencing [25]. DNA extraction was made with the QIAmp DNA mini-kit (Qiagen®, Netherlands) from paraffin-embedded tissue, according to the manufacturer's instructions. All mutations were confirmed by a second PCR analysis. DNA samples were tested twice for amplification to definitively conclude them as being non-amplifiable.

2.4. ALK translocation

The ALK-fusion transcript was searched by immunohistochemistry (IHC) on 4 μM slides from paraffin-embedded tissue, using a monoclonal mouse antibody (5A4) (Abcam®, UK) on a benchmark system (Ventana Medical System®, USA), according to the manufacturer's instructions [26]. Staining was quantified as the percentage of positive cells (0–100%) with an intensity of 0 (no staining) to 3 (strong staining). A 10% positivity of cells with an intensity ≥2 was considered as positive staining, as reported by Yi et al. [27].

2.5. Statistical analyses

Comparisons of categorical variables between p- and c-patients were performed using the chi-squared test, whereas comparisons between continuous variables were made using the Mann–Whitney test (univariate analyses). Results of the chi-squared test were confirmed with a Fisher test if there were ≥20% of theoretical effective less than 5 in the comparison. Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD) for normal distributions, or median + interquartile range (IQR) for non-normal distributions. Overall survival was evaluated using the Kaplan–Meyer method (log-rank test), and was expressed as median ± IQR. The censoring date was the 12/27/2010. Multivariate analysis of progression under platinum-based doublet chemotherapy was performed using a logistical regression model. All variables with a p-value ≤0.25 in univariate analyses were included in the multivariate analysis. Statistical analyses were carried out using XIstat 2011 software (Addinsoft®, France).

3. Results

3.1. r-Patients had a shorter overall survival compared to c-patients

Between 2003 and 2006, 256 consecutive patients were diagnosed with stage IIIb or IV NSCLC. Eleven patients were not treated because of their poor performance status (PS 3 or 4). Of the 245 treated patients, 178 received a platinum-based doublet chemotherapy as the first-line treatment and were included in the analysis (Fig. 1). Platinum was associated with gemcitabine (52.2%), paclitaxel (32.6%), or docetaxel (11.8%). Pemetrexed and bevacizumab were not available at this time in France for utilisation in first-line treatment. Of the 178 analyzed patients, 11 patients (6.2%) were lost to follow-up and were censored. The first tumor evaluation was performed after two or three cycles (IQR 3–3, range: 1–4). Forty-six patients (25.8%) had early tumor progression and were classified as refractory patients (r-patients). The other patients had controlled disease (c-patients, n = 132). r-Patients had shorter overall survival compared to c-patients (Fig. 2), i.e., a median of 5 months (IQR 3.2–9.9) vs. 15.4 months (IQR 9.9–22.5), respectively (p < 0.0001).

3.2. r-Patients had similar demographic and clinical characteristics as c-patients

Demographic and clinical data are shown in Table 1. No differences were observed regarding age, gender, race, smoking status, stage, PS, or number or localizations of metastatic sites between the two groups. The type of drugs delivered with platinum did not differ between the two groups (Table 1 Supplementary data). There was also no difference concerning the type of drugs delivered for the second- or third-line therapy (Table 1 Supplementary data). Fewer r-patients received second-line therapy compared to c-patients (60.9% vs. 75.8%, respectively, p = 0.08), and also fewer third and subsequent lines of therapy (28.2% vs. 47%, respectively, p = 0.04).

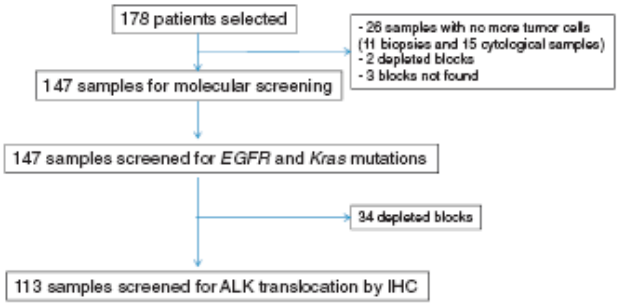


Fig. 1. Flow-chart.

Table 1
Clinical data of patients treated with first-line platinum-based chemotherapy according to tumor response at first evaluation (n = 178).

	r-Patients (n = 46) n (%)	c-Patients (n = 132) n (%)	p Value*
Age (median, range), years	59 (42–85)	59.1 (25–82)	0.697
Gender			0.589
Male	29 (63)	89 (67.4)	
Female	17 (37)	43 (32.6)	
Race			0.314
Caucasian	42 (91.4)	115 (87.1)	
Asiatic	2 (4.3)	3 (2.3)	
North African	2 (4.3)	14 (10.6)	
Tobacco			0.492
Former smoker	15 (32.3)	39 (29.5)	
Ever smoker	26 (56.5)	71 (53.8)	
Never smoker	4 (8.7)	21 (15.6)	
Stage			0.561
IV	40 (87)	110 (83.3)	
IIIb	6 (13)	22 (16.7)	
PS			0.142
0–1	40 (87)	118 (89.4)	
2	2 (4.3)	11 (8.3)	
>2	4 (8.7)	3 (2.3)	
Number of metastatic sites			0.227
0	6 (13)	22 (16.7)	
1	17 (37)	63 (47.7)	
>1	23 (50)	47 (35.6)	
Location of metastatic site			
CNS	12 (26)	25 (18.9)	0.304
Adrenal	12 (26)	24 (18.2)	0.205
Bone	19 (41.3)	40 (30.3)	0.624
Liver	10 (21.7)	21 (15.9)	0.369
Sub-cutaneous	2 (4.3)	3 (2.3)	0.463
Pleural	10 (21.7)	28 (21.2)	0.940
Pericardial	3 (6.5)	5 (3.8)	0.441

r-patients: patients with progression at first evaluation; c-patients: patients with controlled disease at first evaluation; PS: performance status; CNS: central nervous system.
* p value by Mann–Whitney or chi-squared test (as described in Section 2).

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.10.010.

3.3. r-Patients had more sarcomatoid histological subtype than c-patients

Histological data are shown in Table 2. More r-patients than c-patients (10.9% vs. 1.5%, p = 0.057) had a sarcomatoid subtype of NSCLC. There were four pleomorphic carcinomas and one carcinosarcoma among the 46 r-patients, whereas there were only two pleomorphic carcinomas among the 132 c-patients. In the subgroup of adenocarcinomas, no difference was observed concerning histological subtype (p = 0.674) or mucosecretion (p = 0.213) between the two groups (Table 2).

3.4. r-Patients had the same rates of oncogenic abnormalities as c-patients

Sequencing PCR for EGFR and KRAS mutations was performed on 147 samples (82.6%) (Fig. 1). The rates of EGFR mutations and KRAS mutations were similar for p- and c-patients (5.2% vs. 9.6%, p = 0.224; and 11.1% vs. 5.7%, p = 0.357, respectively) (Table 3). All the EGFR and KRAS mutations were found in adenocarcinomas, except for one EGFR mutation (exon 19 deletion) in a large cell carcinoma. No mutation was observed in the subgroup of sarcomatoid carcinomas.

IHC analysis for ALK was performed on 113 samples (63.5%) (Fig. 1). The number of positive scores were similar in p- and c-patients (6.3% vs. 2.5%, respectively, p = 0.357) (Table 3). No positive ALK expression was observed in sarcomatoid carcinomas.

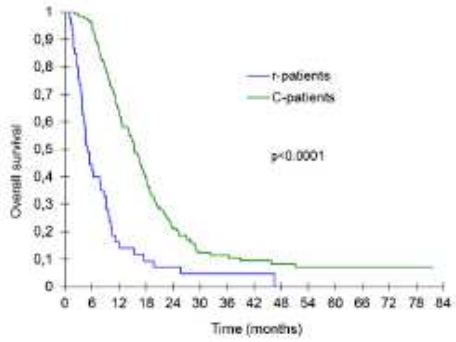


Fig. 2. Overall survival of the 178 patients treated with a first-line platinum-based chemotherapy, according to the first-tumor evaluation, evaluated by Kaplan–Meyer method. r-Patients: patients with progression; c-patients: patients with controlled disease. *p*-Value calculated with the log-rank test.

Table 2
Histological data of patients treated with first-line platinum-based chemotherapy according to tumor response at first evaluation (*n* = 178).

	r-Patients (*n* = 46) n (%)	c-Patients (*n* = 132) n (%)	*p* Value[c]
Histology			0.057
Adenocarcinoma	28 (60.9)	76 (57.6)	
Large cell	2 (4.3)	8 (6.1)	
Squamous	7 (15.2)	27 (20.5)	
Sarcomatoid	5 (10.9)	2 (1.5)	
Other[a]	4 (8.7)	19 (14.3)	
Adenocarcinoma			0.674
Solid	8 (28.6)	13 (17.1)	
Acinar	11 (39.2)	26 (34.2)	
Papillary	0	3 (4)	
Invasive mucinous	1 (3.6)	2 (2.6)	
Colloid Adenocarcinoma	0	1 (1.3)	
Unable to classify	8 (28.6)	31 (40.8)	
PAS diastase[b]			0.213
Positive	18 (64.3)	36 (47.4)	
Negative	7 (25)	21 (27.6)	
Not available	3 (10.7)	19 (25)	

r-patients: patients with progression at first evaluation; c-patients: patients with controlled disease at first evaluation.

[a] Other: adenosquamous (*n* = 3), adenocarcinoma and large-cell carcinomas with neuro-endocrine compounds (*n* = 1), undifferentiated neuro-endocrine carcinoma (*n* = 1), NOS (not-otherwise specified, *n* = 18).

[b] PAS diastase staining was only done for adenocarcinomas.

[c] *p*-Value by chi-squared test (as described in Section 2).

3.5. Sarcomatoid histological subtype was an independent predictive factor for progression under first-line platinum doublet therapy

Multivariate analysis on progression under the platinum-doublet given when tumors were first assessed, which included all variables with a p-value <0.25 in univariate analyses, showed a significant association with sarcomatoid histological subtype, with an OR of 7.50 (CI95% 1.02–55.45; p = 0.048). The ORs for the other variables were not significant (Table 4).

4. Discussion

Of the 178 consecutive patients treated for advanced NSCLC with a first-line platinum-based chemotherapy, 25.8% had early PD at the first tumor assessment. A similar proportion of r-patients has been reported in phase III trials in this setting [6–15]. We show that this population of patients is characterized by worse prognosis with shorter survival, lower access to second and subsequent-lines of therapy, and a greater proportion of sarcomatoid histological subtypes. Sarcomatoid histological subtype was the only independent factor for early progression in multivariate analysis.

Sarcomatoid carcinoma is a rare tumor, and includes different histological subtypes, such as pleomorphic carcinoma, spindle cell carcinoma, giant cell carcinoma, carcinosarcoma, and pulmonary blastoma [28]. Most publications address surgical series, and few data have been published on advanced stages and responses to chemotherapy. In addition, these series are always retrospective, with a small number of patients (5–27 patients) [29–32]. Rates of progression under chemotherapy are reported to be high but heterogeneous, ranging from 40 to 100% [29–31]. We reported a series of 111 patients with sarcomatoid lung cancers of which 51 were treated with a platinum-based doublet as the first-line therapy. In this study, 68% had an early PD [33].

Much effort has been made to discover the predictive biomarkers for response to cisplatin-based chemotherapy. The impact of KRAS mutations is still controversial. Most clinical data concerning KRAS mutations and sensitivity to chemotherapy were from studies performed on early stages of this disease [34]. In advanced NSCLC, the negative predictive value of KRAS mutations has been demonstrated for the response to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [35,36], but not for systemic chemotherapy [37,38]. In our study, we observed a low rate of KRAS mutations (7.2%), but a trend toward a higher rate in r-patients versus c-patients (11.1% vs. 5.7%, *p* = 0.357). These low rates could be because our inclusion period was some time ago (i.e., 2003–2006). It is now admitted that sequencing PCR on paraffin-embedded samples, when aged >3 years old, is less efficient [39]. Sequencing PCR is also less efficient than alternative techniques used to detect KRAS mutations [39]. Lastly, the small numbers of patients of our cohort may have contributed to this negative result. In vitro, the NCI-H82 cell line with insertion of the v-Ha-ras gene did not have a lower response to cisplatin [40,41]. In contrast, the murine embryonic fibroblast cells (NIH 3T3) transfected with the c-Ha-ras gene developed cisplatin resistance [42]. In another work, 20 NSCLC cell lines treated in vitro with different drugs, including cisplatin, did not have different IC50 values according to the status of Ras (KRAS and NRAS) [43].

The presence of EGFR mutations is reported to be associated with a higher response to EGFR TKIs, but perhaps also to platinum-based chemotherapy [4]. Here, we observed a trend toward a higher rate of EGFR mutations in c- vs. r-patients (9.6% vs. 5.2%, *p* = 0.224). This negative result is also perhaps due to the inclusion period and the sample size. The phase III IPASS study showed high response rates to chemotherapy in patients with EGFR mutations compared to those with the EGFR wild type (47.3% vs. 23.5%) [44]. However, other randomized phase III trials, which compared EGFR TKIs to chemotherapy in Asiatic patients with EGFR mutations, showed 30 and 35% response rates to first-line cisplatin-based chemotherapy [45–47] whereas it was only 14.9% in Caucasian patients [48]. Thus, the predictive value of EGFR mutations on cisplatin sensitivity is still unclear, and the independent impact of Asiatic type needs to be further explored.

We performed routine analysis of ALK by immunohistochemistry [27]. Clinicopathological data suggest that ALK-positive tumors have a very low response to EGFR TKIs, and a similar response to cytotoxic chemotherapy compared to ALK-negative patients [49,50]. We observed the expression of the ALK fusion protein by IHC in 3.5% of tumors with no impact on the response to platinum-based chemotherapy.

Table 3
EGFR, KRAS, and ALK status of patients treated with first-line platinum-based chemotherapy according to tumor response at first evaluation ($n = 147$ for EGFR and KRAS; $n = 113$ for ALK).

	r-patients ($n = 41$) n (%)		c-patients ($n = 106$) n (%)		p value*
	Amplified in PCR	Mutation**	Amplified in PCR	Mutation**	
EGFR					
Global mutation rate		2 (5.2)		7 (9.6)	0.224
Exon 19	39 (95.1)	2 (5.2)	89 (84.0)	3 (3.4)	0.637
Exon 20[a]	25 (61.0)	0	63 (59.4)	2 (3.2)	0.367
Exon 21	29 (70.7)	0	67 (63.2)	2 (3)	0.347
KRAS					
Exon 2	27 (65.9)	3 (11.1)	70 (66.0)	4 (5.7)	0.357
	r-patients ($n = 32$) n (%)			c-patients ($n = 81$) n (%)	p value*
ALK IHC score					0.327
Negative	30 (93.7)			79 (97.5)	
Positive	2 (6.3)			2 (2.5)	

r-patients: patients with progression at first evaluation; c-patients: patients with controlled disease at first evaluation.
[a] T790M mutation.
* p-Value by the chi-squared test (as described in Section 2).
** Percentages of mutations are expressed according to the number of amplified samples.

Table 4
Multivariate analyses of progression at first evaluation (logistic regression).

	p value	Odds ratio	CI 95%
Sarcomatoid sub-type	0.048	7.50	1.02–55.45
PS = 3	0.236	3.38	0.45–25.28
PAS diastase positive	0.318	1.66	0.61–4.50
EGFR mutations	0.551	0.77	0.33–1.82
Adrenal metastasis	0.614	1.32	0.45–3.84
>1 metastatic site	0.693	1.20	0.49–2.91

Most promising biomarkers have been associated with platinum resistance, such as those involved in DNA repair (ERCC1 or BRCA1) [18–21] or in the efflux of chemotherapy (genes of multidrug resistance) [51]. However, these markers are not yet validated for routine use.

Except for histology, we did not find any routinely performed clinical or molecular factors that predicted early PD. However, our patients were treated with different platinum combinations. The majority received gemcitabine associated with cisplatin or carboplatin (52.2%), 44.4% received a taxan (pacitaxel or docetaxel), and 3.4% another (Table 1 Supplementary data). The various drugs combined with platinum could have biased the determination of the predictive factors for early PD. This underlines the strong predictive value of the sarcomatoid subtype in early PD and also suggests that this histological subtype is refractory to cisplatin and also to third-generation associated drugs. Better therapeutic strategies are needed for these particular tumors. EGFR and ALK do not seem to be good candidates for target therapies in these patients since EGFR mutations and ALK translocations are rare or even absent events [52–54]. The main feature distinguishing sarcomatoid carcinomas from other subtypes of NSCLC is epithelial-mesenchymal transition (EMT) [55]. Several receptors and signaling pathways are involved in EMT, and among them, some may be drug targetable. Met is one of them and its amplification and its overexpression have been reported in sarcomatoid carcinomas [53,personal data]. For all these reasons, targeting Met might be a good therapeutic option in these patients.

In conclusion, 26% of patients with advanced NSCLC had early PD under a platinum-based chemotherapy. These patients had shorter overall survival and received fewer lines of treatment. The only factor that correlated independently with progression was the sarcomatoid histological subtype. No molecular event performed routinely was associated with this particular phenotype. Additional studies are needed to target other molecular signatures, notably in sarcomatoid carcinomas.

Conflict of interest statement

E.G.L., M.D., and T.V. received Grants from the Fonds de Dotation de Recherche en Santé Respiratoire 2011–2012 and from the Legs Poix 2011–2012 (MD, TV).

Acknowledgments

We thank Dr Jérôme Lambert (Biostatistics Department, Hopital Saint Louis, University Paris 7, France) for his kind help with the statistical analyses.

References

[1] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:169–81.
[2] Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2010;363:1693–703.
[3] Socinski MA, Crowell R, Hensing TE, Langer CJ, Lilenbaum R, Sandler AB, et al. Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest 2007;132:277S–89S.
[4] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 2009;45:228–47.
[5] Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. Cancer 1981;47:207–14.
[6] Depierre A, Chastang C, Quoix E, Lebeau B, Blanchon F, Paillot N, et al. Vinorelbine versus vinorelbine plus cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a randomized trial. Ann Oncol 1994;5:37–42.
[7] Crinò L, Scagliotti GV, Ricci S, De Marinis F, Rinaldi M, Gridelli C, et al. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase III study of the Italian Lung Cancer Project. J Clin Oncol 1999;17:3522–30.
[8] Kelly K, Crowley J, Bunn Jr PA, Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. J Clin Oncol 2001;19:3210–8.
[9] Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC, Keppler U, Macha HN, Pirker R, et al. Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a cooperative multinational trial. Ann Oncol 2002;13:1539–49.
[10] Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crinò L, Gridelli C, Ricci S, et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2002;20:4285–91.
[11] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2002;346:92–8.

[12] Smit EF, van Meerbeeck JPAM, Lianes P, Debruyne C, Legrand C, Schramel F, et al. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group-EORTC 08975. J Clin Oncol 2003;21:3909–17.
[13] Gridelli C, Gallo C, Shepherd FA, Illiano A, Piantedosi F, Robbiati SF, et al. Gemcitabine plus vinorelbine compared with cisplatin plus vinorelbine or cisplatin plus gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol 2003;21:3025–34.
[14] Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, Pluzanska A, Gorbounova V, Kaukel E, et al. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. J Clin Oncol 2003;21:3016–24.
[15] Georgoulias V, Ardavanis A, Agelidou A, Agelidou M, Chandrinos V, Tsaroucha E, et al. Docetaxel versus docetaxel plus cisplatin as front-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter phase III trial. J Clin Oncol 2004;22:2602–9.
[16] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene 2012;31:1869–83.
[17] Munchausen LL. The chemical and biological effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II), an antitumor agent, on DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1974;71:4519–22.
[18] Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N Engl J Med 2006;355:983–91.
[19] Joerger M, deJong D, Burylo A, Burgers JA, Baas P, Huitema ADR, et al. Tubuline, BRCA1, ERCC1, Abraxas, RAP80 mRNA expression, p53/p21 immunohistochemistry and clinical outcome in patients with advanced non small-cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy. Lung Cancer 2011;74:310–7.
[20] Lee HW, Choi Y-W, Han JH, Kim JH, Jung JH, Jeong SH, et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. Lung Cancer 2009;65:377–82.
[21] Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). Cancer Res 1998;58:1120–3.
[22] Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. Chest 1997;111:1710–7.
[23] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 2011;6:244–85.
[24] Wislez M, Antoine M, Baudrin L, Poulot V, Neuville A, Pradere M, et al. Non-mucinous and mucinous subtypes of adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features differ by biomarker expression and in the response to gefitinib. Lung Cancer 2010;68:185–91.
[25] Taron M, Ichinose Y, Rosell R, Mok T, Massuti B, Zamora L, et al. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. Clin Cancer Res 2005;11:5878–85.
[26] Jokoji R, Yamasaki T, Minami S, Komuta K, Sakamaki Y, Takeuchi K, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. J Clin Pathol 2010;63:1066–70.
[27] Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry M-C, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. J Thorac Oncol 2011;6:459–65.
[28] Travis WD, Brambilla E, Muller-Herbelink HK, Harris CC, editors. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
[29] Bae H-M, Min HS, Lee S-H, Kim D-W, Chung DH, Lee J-S, et al. Palliative chemotherapy for pulmonary pleomorphic carcinoma. Lung Cancer 2007;58:112–5.
[30] Kaira K, Horie Y, Ayabe E, Murakami H, Takahashi T, Tsuya A, et al. Pulmonary pleomorphic carcinoma: a clinicopathological study including EGFR mutation analysis. J Thorac Oncol 2010;5:460–5.
[31] Ito K, Oizumi S, Fukumoto S, Harada M, Ishida T, Fujita Y, et al. Clinical characteristics of pleomorphic carcinoma of the lung. Lung Cancer 2010;68:204–10.
[32] Pelosi G, Scarpa A, Manzotti M, Veronesi G, Spaggiari L, Fraggetta F, et al. K-ras gene mutational analysis supports a monoclonal origin of biphasic pleomorphic carcinoma of the lung. Mod Pathol 2004;17:538–46.
[33] Vieira T, Cazes A, Bonnette P, Zeimoura L, Monnet I, De Cremoux H, et al. Is conventional chemotherapy effective in advanced sarcomatoid lung cancers? J Clin Oncol 2012;30 [abstr e18102].
[34] Tsao M-S, Aviel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2007;25:5240–7.
[35] Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. Br J Cancer 2005;92:131–9.
[36] Mao C, Qiu L-X, Liao R-Y, Du F-B, Ding H, Yang W-C, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. Lung Cancer 2010;69:272–8.
[37] Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. J Clin Oncol 2005;23:5900–9.
[38] Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, Slebos RJ, Mooi WJ, van't Veer L, et al. Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. J Clin Oncol 1997;15:285–91.
[39] Beau-Faller M, Degeorges A, Rolland E, Mounawar M, Antoine M, Poulot V, et al. Cross-validation study for epidermal growth factor receptor and KRAS mutation detection in 74 blinded non-small cell lung carcinoma samples: a total of 5550 exons sequenced by 15 molecular French laboratories (evaluation of the EGFR mutation status for the administration of EGFR-TKIs in non-small cell lung carcinoma [ERMETIC] project-part 1). J Thorac Oncol 2011;6:1006–15.
[40] Mabry M, Nakagawa T, Nelkin BD, McDowell E, Gesell M, Eggleston JC, et al. v-Ha-ras oncogene insertion: a model for tumor progression of human small cell lung cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:6523–7.
[41] Kaufmann SH, Kalemkerian GP, Jasti R, Mabry M. Effect of v-rasH on sensitivity of NCI-H82 human small cell lung cancer cells to cisplatin, etoposide, and camptothecin. Biochem Pharmacol 1995;50:1987–93.
[42] Isonishi S, Hom DK, Thiebaut FB, Mann SC, Andrews PA, Basu A, et al. Expression of the c-Ha-ras oncogene in mouse NIH 3T3 cells induces resistance to cisplatin. Cancer Res 1991;51:5903–9.
[43] Tsai CM, Chang KT, Perng RP, Mitsudomi T, Chen MH, Kadoyama C, et al. Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. J Natl Cancer Inst 1993;85:897–901.
[44] Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med 2009;361:947–57.
[45] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2010;11:121–8.
[46] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N Engl J Med 2010;362:2380–8.
[47] Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Feng J, Liu X-Q, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol 2011;12:735–42.
[48] Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2012;13:239–46.
[49] Koh Y, Kim D-W, Kim TM, Lee S-H, Jeon YK, Chung DH, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of patients with anaplastic lymphoma kinase-positive advanced pulmonary adenocarcinoma: suggestion for an effective screening strategy for these tumors. J Thorac Oncol 2011;6:905–12.
[50] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. J Clin Oncol 2009;27:4247–53.
[51] Modok S, Mellor HR, Callaghan R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. Curr Opin Pharmacol 2006;6:350–4.
[52] Italiano A, Cortot AB, Ilie M, Martel-Planche G, Fabas T, Pop D, et al. EGFR and KRAS status of primary sarcomatoid carcinomas of the lung: implications for anti-EGFR treatment of a rare lung malignancy. Int J Cancer 2009;125:2479–82.
[53] Lee S, Kim Y, Sun J-M, Choi YL, Kim JG, Shim Y-M, et al. Molecular profiles of EGFR, K-ras, c-met, and FGFR in pulmonary pleomorphic carcinoma, a rare lung malignancy. J Cancer Res Clin Oncol 2011;137:1203–11.
[54] Pelosi G, Gasparini P, Cavazza A, Rossi G, Graziano P, Barbareschi M, et al. Multiparametric molecular characterization of pulmonary sarcomatoid carcinoma reveals a nonrandom amplification of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene. Lung Cancer 2012;77:507–14.
[55] Blaukovitsch M, Halbwedl I, Kothmaier H, Gogg-Kammerer M, Popper HH. Sarcomatoid carcinomas of the lung—are these histogenetically heterogeneous tumors? Virchows Arch 2006;449:455–61.

2. Rôle de la voie Shh dans les cancers thoraciques

2.1. Article 2 : revue de la littérature

Giroux Leprieur E, Antoine M, Vieira T, Rozensztajn N, Rabbe N, Ruppert AM, Cadranel J, Wislez M. Rôle de la voie Sonic Hedgehog dans les cancers thoraciques. **Soumis à la Revue des Maladies Respiratoires**.

La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) est physiologiquement activée durant l'embryogenèse et le développement. Elle est aussi réactivée dans plusieurs cancers solides, dont les cancers thoraciques, comme le CBPC, le CBNPC et le mésothéliome pleural malin (MPM). Cette voie est intimement liée aux CSC, et semble jouer un rôle important dans la prolifération tumorale et la chimiorésistance de ces cancers. Cette revue décrit le mode d'activation de la voie Shh dans les cancers thoraciques, son rôle dans les CBPC, les CBNPC et les MPM, à partir de modèles *in vitro* et *in vivo*. Les données de la littérature montrent que l'inhibition de la voie Shh a une action anti-tumorale et permet une sensibilisation à la chimiothérapie. Ces résultats incitent à développer des thérapies ciblant la voie Shh dans la prise en charge thérapeutique des cancers thoraciques.

Rubrique : Revue générale

Rôle de la voie Sonic Hedgehog dans les cancers thoraciques

Etienne Giroux Leprieur[1,2], Martine Antoine[1], Thibault Vieira[1], Nathalie Rozensztajn[3], Anne-Marie Ruppert[1,3], Nathalie Rabbe[1], Jacques Cadranel[1,3], Marie Wislez[1,3]

1- Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, GRC n°04, Theranoscan, F-75252, Paris, France
2- AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, 92100 Boulogne-Billancourt, France
3- AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, F-75970, Paris, France

Soutiens : Fonds de Recherche en Santé Respiratoire (EGL)

Titre court : Rôle de la voie Shh dans les cancers thoraciques

Auteur correspondant : Marie Wislez, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, AP-HP, 75970, Paris, France. Tel: +33156016838. Fax: +33156017248. E-mail: marie.wislez@tnn.aphp.fr

Conflit d’intérêt :

Au cours des 5 dernières années, EGL a perçu des financements pour travaux de recherche de la part du Fond de Recherche en Santé Respiratoire.

Résumé

Introduction : La voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) est une voie physiologiquement activée durant l'embryogenèse et le développement. Elle est réactivée dans plusieurs cancers solides.

Etat des connaissances : La voie Shh est réactivée dans les cancers thoraciques, comme le cancer bronchique à petites cellules (CBPC), le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) et le mésothéliome pleural malin (MPM). Cette voie est intimement liée aux cellules souches cancéreuses, et semble jouer un rôle important dans la prolifération tumorale, l'agressivité et la chimiorésistance de ces cancers. Cette revue décrit le mode d'activation de la voie Shh dans les cancers thoraciques, et son rôle dans les CBPC, les CBNPC et les MPM, à partir de modèles *in vitro* et *in vivo*. Les données de la littérature montrent que l'inhibition de la voie Shh a une action anti-tumorale et permet une sensibilisation à la chimiothérapie.

Perspectives : Ces résultats incitent à développer des thérapies ciblant la voie Shh dans la prise en charge thérapeutique des cancers thoraciques.

Mots-clés : cancer bronchique à petites cellules, cancer bronchique non à petites cellules, mésothéliome, Sonic Hedgehog, chimiorésistance

Role of the Sonic Hedgehog pathway in thoracic cancers

Abstract

Introduction: Sonic Hedgehog (Shh) pathway is physiologically activated during embryogenesis and development. It is also activated in several solid cancers.

State of the art: Shh pathway is reactivated in thoracic cancers, as small cell lung carcinoma (SCLC), non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and malignant pleural mesothelioma (MPM). Shh pathway is associated with cancer stem cells, and seems to have a crucial role in tumor proliferation, aggressiveness and chemoresistance in these cancers. This review describes the activation mode of Shh pathway in thoracic cancers, and its role in SCLC, NSCLC and MPM, using *in vitro* and *in vivo* models. Notably, data from literature show that inhibition of Shh pathway has an antitumor action, and sensibilizes to chemotherapy.

Perspectives: These results incite to develop targeted therapies against Shh pathway in the treatment of thoracic cancers.

Key words: small cell lung carcinoma, non-small cell lung carcinoma, mesothelioma, Sonic Hedgehog, chemoresistance

1. Introduction

La voie de signalisation Sonic Hedgehog(Shh) est une voie physiologiquement activée durant l'embryogenèse et le développement [1]. Elle joue ainsi un rôle majeur dans le développement cérébral, des membres, et l'organogénèse pulmonaire. Elle est aussi réactivée dans un certain nombre de cancers solides, comme certains cancers cutanés [2-4], les médulloblastomes [5], les cancers pancréatiques, prostatiques, du sein [6-8], mais également dans les cancers thoraciques, que ce soit le cancer à petites cellules (CBPC) [9], le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) [10-12] et le mésothéliome pleural malin (MPM) [13]. Son activation serait liée à la maintenance des cellules souches cancéreuses, et interviendrait probablement dès les premières étapes de la carcinogenèse [14,15]. De plus, elle serait associée à la résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie dans certains modèles de cancers. Le développement de traitements ciblés de cette voie pourrait être ainsi prometteur, notamment pour certains types de cancers réputés chimiorésistants.

Nous proposons, dans cette revue, de détailler les mécanismes d'activation de la voie Shh à l'état physiologique, et ses mécanismes de réactivation en oncologie, en détaillant plus particulièrement les données de la littérature concernant les cancers thoraciques (CBPC, CBNPC et MPM).

2. La voie Shh

11.1. La protéine Shh

La voie de signalisation Hedgehog fait intervenir 3 types de protéines : Indian, Desert et Sonic Hedghehog. Chez les mammifères, la protéine Sonic Hedgehog est celle qui intervient de manière préférentielle. Son gène, situé en 7q36, produit une pré-protéine de 45kDa, qui va subir dans les conditions physiologiques un certain nombre de modifications post-transcriptionnelles[16]. Cette pré-protéine contient notamment en son sein un site d'auto-clivage, qui va permettre le clivage protéique en un résidu N-terminal (Shh-N) de 20kDa et un résidu C-terminal (Shh-C) de 25kDa [16]. La protéine Shh-C possède une activité cholestérol-transférase, qui va permettre l'adjonction de cholestérol à la partie C-terminale de Shh-N [17,18]. Secondairement, une nouvelle modification lipidique se produit avec ajout de résidus palmitoyl à la protéine Shh-N (palmitoylation). Toutes ces modifications lipidiques vont permettre à la protéine Shh de s'ancrer à la membrane cellulaire, avant d'être sécrétée dans l'espace extracellulaire [19]. En outre, la forme palmitoylée de Shh-N serait environ 30 fois plus active que sa forme non palmitoylée [20]. Toutes les fonctions physiologiques durant le développement sont liées à la forme Shh-N. La protéine Shh-C n'a pas de fonctions biologiques connues à l'état physiologique en dehors de son activité cholestérol-transférase, et est également sécrétée dans l'espace extracellulaire.

11.2. Activation de la voie Shh

Le récepteur membranaire de Shh est Patched (Ptch), dont il existe 2 isoformes (Ptch1 et Ptch2). Ptch comprend 12 domaines transmembranaires. En l'absence de ligand (figure 1A), Ptch inhibe la migration à la membrane de la protéine Smoothened (Smo), en la maintenant à l'état inactif à l'intérieur de la cellule. Les facteurs de transcriptions Gli (Gli1, Gli2 et Gli3) sont alors liés à la protéine SUFU (*Suppressor of fused homolog*) et restent inactifs dans le cytoplasme [21]. Gli3 est également phosphorylé par la PKA (*Protéine kinase A*) et va ainsi produire une protéine inhibitrice GLIR qui a une action de répression de la transcription des gènes cibles de Shh.

Lorsque Shh se fixe à son récepteur Ptch (figure 1B), il y a levée de l'inhibition de Smo qui va alors migrer à la membrane. Les facteurs de transcription Gli se dissocient ensuite de SUFU pour migrer dans le noyau et activer la transcription des gènes cibles. On note qu'une fois que Shh est lié à Ptch, il y a une internalisation du complexe Shh-Ptch dans la cellule avant sa dégradation dans le lysosome [22].

11.3. Phénomènes de rétrocontrôle négatif

A l'état physiologique, plusieurs phénomènes de rétrocontrôle négatif sont mis en jeu lors de l'activation de la voie Shh. Parmi ceux-ci, la protéine HHIP (*Hedhegog Interacting Protein*) est une protéine qui va se lier à Shh au niveau de la membrane cellulaire et ainsi entrer en compétition avec Ptch [23]. La liaison de Ptch avec son ligand Shh va également exercer un phénomène de contrôle négatif par phénomène d'endocytose [22]. Enfin, les protéines ZIC sont des facteurs de transcription, qui interagissent avec les protéines Gli via leur domaine à

doigt de zinc[24], et ont une activité activatrice ou inhibitrice de Gli en fonction du type de cellule et des conditions[25].

Points forts à retenir :

- La protéine Shh se fixe à son récepteur membranaire Ptch, avec activation d'une autre protéine membranaire Smo, et activation des facteurs de transcription Gli.
- Des phénomènes de rétrocontrôle négatifs régulent à l'état physiologique la voie Shh

12. Voie Shh dans le développement

La voie Shh est capitale durant le développement embryonnaire [1]. Son activité est cependant dépendante du site de l'organisme où la voie est activée. Ainsi, chez le mammifère, Shh agit comme un morphogène au niveau du développement des membres, déterminant l'identité et le nombre des doigts. Il agit également comme morphogène pour le développement du système nerveux central au niveau de la crête neural, avec un effet inducteur dans l'axe dorso-ventral. Son action dans le développement pulmonaire est plus complexe. En effet, le développement de l'axe bronchique se fait par ramification. La mise en place de l'arbre aérien se fait entre la 4e et la 16e semaine, par ramification dichotomique à partir du bourgeon épithélial original. Plusieurs facteurs sont inducteurs de ce bourgeonnement, et sont produits par le mésenchyme à destination des cellules épithéliales. Il s'agit principalement du FGF-10 (*Fibroblast Growth Factor-10*), qui va se fixer à son récepteur FGFR2 (*FGF Receptor-2*) au niveau épithélial. Plusieurs facteurs interviennent comme régulateur de ce bourgeonnement épithélial. Certains sont externes à l'épithélium,

comme le TGFβ (*Transforming Growth Factor* β), ou ont une action interne à l'épithélium, comme Sprouty2 ou Wnt (*Wingless Integration site*), mais les principaux sont sécrétés par l'épithélium à destination du mésenchyme, comme Shh ou BMP4 (*Bone Morphogenic Protein 4*). Ainsi, Shh réprime fortement l'expression de FGF-10 dans le mésenchyme (Figure 2). L'apparition de nouveaux foyers sécréteurs de FGF-10 provoque le bourgeonnement dichotomique. Shh agit donc comme régulateur spatial de FGF-10 durant le développement de l'arbre bronchique.

Points forts à retenir :

- La voie Shh joue un rôle majeur pendant l'embryogenèse et le développement
- Lors du développement pulmonaire et la bronchogenèse, la protéine Shh est sécrétée par l'épithélium et agit au niveau du mésenchyme
- Shh joue un rôle de régulateur du bourgeonnement épithélial en réprimant l'expression de FGF-10 dans le mésenchyme

13. Voie Shh et cancer

13.1. Généralités

13.1.1. Principaux mécanismes d'activation de Shh dans les cancers solides

La voie Shh est réactivée dans un certain nombre de cancers solides. Plusieurs mécanismes ont été décrits. La voie Shh peut ainsi être activée via la présence de mutations somatiques au niveau des différents effecteurs de cette voie. Ainsi, le syndrome de Gorlin, qui induit la formation de carcinomes baso-cellulaire multiples, de rhabdomyosarcomes et de médulloblastomes, est caractérisé par la présence de mutation constitutionnelle inactivatrice de *Ptch*, qui induit donc une activation continue de Smo [2,3]. Des mutations de *SUFU* ont également été décrites dans les médulloblastomes sporadiques [5]. Dans les formes sporadiques de carcinomes baso-cellulaires, il existe une mutation de la voie Shh (mutation inactivatrice de *Ptch* ou mutation activatrice de *Smo*)dans environ 70% des cas [4]. L'importance de l'activation de la voie Shh dans ce type de cancer a permis le développement et la mise sur le marché d'un inhibiteur de Smo (vismodegib, Erivedge® (Genentech, USA)) dans le traitement des carcinomes baso-cellulaires [26].

Dans de nombreux autres cancers, une activation de la voie Shh a été décrite sans mise en évidence de mutation de la voie Shh. Il s'agit alors d'un mécanisme d'activation par voie auto- et paracrine, via la sécrétion de la protéine Shh. Un tel mécanisme d'activation a été décrit dans les cancers du sein, du pancréas et de la prostate [6-8].

13.1.2. Gènes cibles de l'activation de Shh dans le cancer

Les gènes activés par les facteurs de transcription Gli sont très différents en fonction du contexte et du type de cellule concerné [27]. La plupart des gènes sont impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et le phénotype de cellule souche cancéreuse (CSC). Il existe également des gènes cibles de Gli qui vont exercer un rétrocontrôle négatif de la voie Shh. Le tableau 1 résume les principaux gènes cibles de l'activation de la voie Shh.

13.2. Voie Shh et CSC

Plusieurs travaux ont montré une relation étroite entre la voie Shh et les CSC. En effet, Shh est une des voies de signalisation préférentiellement activée au sein des CSC, tout comme les voies Wnt et Notch. Plusieurs marqueurs de CSC ont été développés pour caractériser et isoler ces cellules, comme des marqueurs membranaires (CD133, CD44, BCRP) [28].La capacité d'efflux du Hoechst 33342 (« side population » (SP)), c'est-à-dire le transport actif du Hoechst 33342 du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, via notamment des transporteurs ABC, a également été utilisée comme marqueur de CSC [29]. Plus récemment, de nombreux travaux ont validé l'activité ALDH (*Aldehyde Dehydrogenase*) comme marqueur de CSC, notamment dans le CBNPC [30,31]. ALDH est un groupe d'enzymes responsables de l'oxydation des aldéhydes. Leur activité semble augmentée dans les cellules souches. Ainsi, leur suractivité est impliquée dans le métabolisme alcoolique, le métabolisme de la vitamine A, la résistance à certains agents de chimiothérapie (cyclophosphamide…) et la différenciation précoce des cellules souches [32].

La relation entre les CSC et la voie Shh a été bien documentée dans la littérature. Ainsi, Li et al. [14]ont isolé au sein de cultures primaires d'adénocarcinomes pancréatiques des cellules ayant un phénotype de CSC (CD44(+)CD24(+)ESA(+)). Ces cellules avaient un potentiel d'oncogenèse 100 fois supérieur aux autres cellules, mesuré par la formation de xénogreffes sur souris immunodéprimés. Ces cellules avaient une surexpression de la voie Shh par rapport aux autres cellules tumorales. Dans un autre travail portant sur des lignées cellulaires de cancer bronchique (HCC et H1339), l'inhibition de la voie Shh par vismodegib entraînait une diminution de la population de CSC [33] mesurée la capacité d'efflux du Hoechst 33342 (cellules SP+) par analyse en cytométrie de flux. Le taux de cellules SP+ passait de 0,45% (HCC) et 0,75% (H13339) à 0,24% (HCC) et 0,18% (H1339) après traitement par le vismodegib [33]. Des résultats similaires ont été mis en évidence dans des modèles de glioblastomes PTEN-dépendants[34] ou dans les cancers de vessie [35]. Enfin, Lemjabbar-Alaoui et al. [15]ont étudié un modèle de carcinogenèse bronchique induite par la fumée de cigarette dans lequel des cellules bronchiques humaines issues de cultures primaires, étaient exposées pendant 8 jours à la fumée de tabac. A l'issue de cette exposition, les cellules bronchiques avaient acquis un phénotype tumoral, avec augmentation de leur prolifération, de leur capacité de croissance en agarose, et de leur capacité de former des xénogreffes tumorales sur souris immunodéprimées. Il existait une activation des voies de signalisation Wnt et Shh dans ces cellules. L'inhibition de la voie Shh prévenait l'apparition du phénotype tumoral des cellules exposées à la fumée. Ces résultats soulignent le rôle majeur probable de la voie Shh dans l'oncogenèse des CBNPC.

13.3. Activation de la voie Shh dans le CBPC

Watkins et al. [9]ont pu montrer que la voie Shh était activée dans les CBPC, avec un mécanisme d'activation auto- et juxtacrine. En effet, l'étude de l'expression de Shh et Gli1 par imunohistochimie et Western Blot sur des prélèvements humains et des lignées cellulaires de CBPC a mis en évidence une surexpression de ces protéines par les cellules tumorales. L'inhibition de la voie Shh par la cyclopamine (inhibiteur de Smo, Figure 1B) inhibait la croissance tumorale des cellules de CBPC *in vitro* et *in vivo* sur des xénogreffes. Ces résultats ont été confirmés sur des modèles murins transgéniques, porteuses d'une délétion de *Rb1*(*retinoblastoma 1*) et de *TRP53* (*transformation relatedprotein 53*) [36]. La délétion de Smo dans ces modèles, ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie Shh, inhibaient la croissance tumorale. Ces résultats ont conduits à la mise en place par l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) d'un essai clinique de phase II testant l'intérêt de l'ajout du vismodegib à une chimiothérapie par cisplatine et etoposide(CE) dans les CBPC disséminé, en première ligne de traitement (essai ECOG-1508).Les résultats sont décevants. Aucune différence en terme de survie sans progression (médiane 4,4 mois (CE) versus 4,6 mois (CE + vismodegib)) ni de survie globale (médiane 9,1 mois (CE) versus 9,8 mois (CE + vismodegib)) n'a été mise en évidence entre les patients ayant reçu une chimiothérapie par CE seule et ceux traités par CE + vismodegib [37]. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats négatifs, comme l'absence de sélection d'un phénotype de patients particuliers (l'inhibition de la voie Shh n'est-elle bénéfique que pour les patients chimiorésistants ?), l'absence de biomarqueur permettant d'identifier les patients susceptibles de bénéficier du vismodegib, ou encore le modèle de traitement concomitant (chimiothérapie et vismodegib) utilisé dans cet essai.

13.4. Activation de la voie Shh dans le CBNPC

La voie Shh est également réactivée dans le CBNPC. Yuan et al. [10] ont montré une activation de la voie Shh dans un certain nombre de lignées cellulaires de CBNPC. Ils ont également analysés l'expression de Gli1 par immunohistochimie sur un panel de 120 échantillons de cancers bronchiques (tissue microarray). Ils ont ainsi mis en évidence une positivité dans 87% des adénocarcinomes et 93% des carcinomes épidermoïdes. Une autre étude par analyse immunohistochimique des différents composés de la voie Shh sur 80 pièces chirurgicales de CBNPC (stade I à III) a également montré une expression de Shh (97,5%), Ptch1 (78,7%), Smo (72,5%), Gli1 (98,7%) et Gli2 (87,5%) [11]. L'expression était présente uniquement dans les cellules tumorales. Les tissus normaux péri-tumoraux étaient négatifs. Dans une autre étude de 248 CBNPC de stade précoce, l'expression des différents composés de la voie Shh n'était pas corrélée à la survie sans récidive ou à la survie globale [12].

L'hypothèse d'un rôle protumoral de la voie Shh dans les CBNPC a été confirmée dans une étude récente [38]. Les auteurs ont analysé l'expression de la voie Shh, par PCR sur 2 cohortes différentes de patients ayant un carcinome épidermoïde bronchique (n=178 et n=56), ainsi que sur 4 lignées de carcinome épidermoïde bronchique (H520, H2170, H226, et SK-MES-1). La voie Shh était activée dans les prélèvements de ces 2 cohortes. *In vitro*, l'inhibition de la voie Shh, notamment l'inhibition de Gli2 par siRNA ou par une molécule inhibitrice (GANT61), diminuait la prolifération et activait l'apoptose. L'utilisation de GANT61 *in vivo* sur des modèles de xénogreffes montrait également une activité anti-tumorale.

Concernant le rôle de la voie Shh dans la chimiorésistance, il a été montré une corrélation entre l'activation de la voie Shh dans les cellules cancéreuses et l'expression de transporteurs

ABC (*ATP-binding cassette*) impliqués dans la chimiorésistance, comme MDR1 et ABCG2 [39]. L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules tumorales (transition épithélio-mésenchymateuse), connu comme facteur de chimiorésistance, a également été montrée comme étant associée à l'activation de la voie Shh. Ainsi, il existe une corrélation inverse entre l'expression de Gli et celle des marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine [40]. Plusieurs études ont testé l'association Shh et chimiorésistance *in vitro* et *in vivo*. Tian et al. [41] ont montré que, sur des lignées cellulaires de cancer bronchique résistantes au cisplatine, le vismodegib inhibait de façon significative la prolifération tumorale *in vitro*. L'inhibition de la voie Shh par vismodegib ou par siRNA sensibilise également aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR. Ahmad et al. [42] ont utilisé la lignée A549, rendue résistante au cisplatine et à l'erlotinib via un traitement par TGFβ qui permet l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux (A549M). Les IC50 du cisplatine et de l'erlotinib étaient significativement plus basses avec un pré-traitement par vismodegib ou siRNA anti-Shh. L'administration de vismodegib entraînait la diminution de l'expression de marqueurs de CSC, comme Sox2 ou Nanog.

13.5. Activation de la voie Shh dans le MPM

De manière analogue, une surexpression des protéines de la voie Shh a été mise en évidence dans le MPM, tandis que le tissu pleural normal ne les exprime pas [13]. Par ailleurs, sur des modèles de cultures primaires de MPM, l'inhibition de Smo entraîne une diminution significative de la croissance tumorale via l'inhibition de Gli1.Enfin, l'inhibition de Smo a également une action anti-tumorale *in vivo* sur des modèles de xénogreffes animales. Des résultats similaires ont été obtenus par l'inhibition directe de Gli par siRNA ou l'utilisation

d’une petite molécule inhibitrice de Gli (Gli-I) [43] ou de GANT61[44]. Par ailleurs, de manière intéressante, l’inhibition de Gli permet une potentialisation de l’action cytotoxique de la chimiothérapie *in vitro*. La molécule Gli-I a un effet cytotoxique synergique avec le pemetrexed sur des lignées de MPM[43].

Points forts à retenir :

- La voie Shh est réactivée dans les cancers thoraciques, que ce soit le CBPC, le CBNPC et le mésothéliome pleural
- La voie Shh semble liée aux cellules souches cancéreuses
- Elle jouerait un rôle dans la prolifération tumorale, mais aussi dans la chimiorésistance et la TEM
- L’inhibition de la voie Shh a une activité antitumorale in vitro et in vivo

14. Conclusion

Outre son rôle bien connu lors de l’embryogenèse, la voie Shh joue également un rôle protumoral dans un certain nombre de cancers solides, comme les cancers thoraciques. Elle est réactivée dans les CBPC, les CBNPC et les MPM, par un mécanisme d’activation auto- et juxtracrine, sans qu’actuellement aucune des mutations somatiques connues n’aient été mise en évidence. La voie Shh, intimement liée aux CSCs et à la carcinogenèse, est également corrélée à la résistance aux traitements anticancéreux, comme la chimiothérapie cytotoxique, et possiblement aux thérapies ciblées comme les ITK de l’EGFR. L’inhibition de la voie Shh

représente donc une approche prometteuse dans la prise en charge des cancers thoraciques, et des essais thérapeutiques sont nécessaires dans le CBNPC et le MPM.

Points forts généraux :

- La voie Shh joue un rôle majeur lors de l'embryogenèse, notamment durant le développement pulmonaire
- Cette voie est réactivée dans les cancers thoraciques (CBPC, CBNPC, mésothéliome pleurale)
- Elle joue un rôle dans la prolifération tumorale, est associée à la TEM et à la chimiorésistance
- L'inhibition de la voie Shh permet une sensibilisation à la chimiothérapie *in vitro*
- L'inhibition de la voie Shh a une action antitumorale *in vitro et in vivo*
- La recherche clinique sur l'effet de l'inhibition de la voie Shh dans la prise en charge des cancers thoraciques doit être encouragée

Bibliographie

1- McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003;53:1-114.

2- Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996;85:841-51.

3- Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996;272:1668-71.

4- Tang JY, So PL, Epstein EH Jr. Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;224:257-64.

5- Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, et al. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* 1997;57:842-5.

6- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004;431:707-12.

7- Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, et al. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:6071-4.

8- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-6.

9- Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003;422:313-7.

10- Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, et al. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2007;26:1046-55.

11- Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, Varakis J, Kourea H, Papadaki H. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2009;66:64-74.

12- Raz G, Allen KE, Kingsley C, Cherni I, Arora S, Watanabe A, et al. Hedgehog signaling pathway molecules and ALDH1A1 expression in early-stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012;76:191-6.

13- Shi Y, Moura U, Opitz I, Soltermann A, Rehrauer H, Thies S, et al. Role of hedgehog signaling in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2012;18:4646-56.

14- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-7.

15- Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V, Sidhu SS, Mengistab A, Finkbeiner W, Gallup M, et al. Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer. *PLoS One* 2006;1:e93.

16- Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 1994;266:1528-37.

17- Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, et al. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J BiolChem* 1998;273:14037-45.

18- Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 1996;274:255-9.

19- Robbins DJ, Hebrok M. Hedgehogs: la dolce vita. Workshop on Hedgehog-Gli Signaling in Cancer and Stem Cells. *EMBO Rep* 2007;8:451-5.

20- Wendler F, Franch-Marro X, Vincent JP. How does cholesterol affect the way Hedgehog works? *Development* 2006;133:3055-61.

21- Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, et al. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* 1999;1:312-9.

22- Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I. Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* 2004;131:2395-408.

23- Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 1999;397:617-21.

24- Koyabu Y, Nakata K, Mizugishi K, Aruga J, Mikoshiba K. Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins. *J Biol Chem* 2001;276:6889-92.

25- Mizugishi K, Aruga J, Nakata K, Mikoshiba K. Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. *J Biol Chem* 2001;276:2180-8.

26- Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012;366:2171-9.

27- Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med* 2009;9:873-86.

28- Rivera C, Rivera S, Loriot Y, Vozenin MC, Deutsch E. Lung cancer stem cell: new insights on experimental models and preclinical data. *J Oncol* 2011;2011:549181.

29- Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4827-33.

30- Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 2009;7:330-8.

31- Liang D, Shi Y. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. *Med Oncol* 2012;29:633-9.

32- Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9118-23.

33- Tian F, Mysliwietz J, Ellwart J, Gamarra F, Huber RM, Bergner A. Effects of the Hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 on lung cancer cell lines are mediated by side populations. *Clin Exp Med* 2012;12:25-30.

34- Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS. Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas. *Stem Cells* 2008;26:3018-26.

35- Shin K, Lee J, Guo N, Kim J, Lim A, Qu L, et al. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* 2011;472:110-4.

36- Park KS, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, et al. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nat Med* 2011;17:1504-8.

37- Belani CK, Dahlberg SE, Rudin CM, Fleisher M, Chen HX, Takebe N, et al. Three-arm randomized phase II study of cisplatin and etoposide (CE) versus CE with either vismodegib (V) or cixutumumab (Cx) for patients with extensive stage-small cell lung cancer (ES-SCLC) (ECOG 1508). *J Clin Oncol* 2013;31 suppl:abstr 7508.

38- Huang L, Walter V, Hayes DN, Onaitis M. Hedgehog-GLI Signaling Inhibition Suppresses Tumor Growth in Squamous Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:1566-75.

39- Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J, Chao KS. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene* 2007;26:5674-9.

40- Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Tseng HHK, Jin JQ, et al. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2014;33:34.

41- Tian F, Schrödl K, Kiefl R, Huber RM, Bergner A. The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 alters intracellular Ca2+ homeostasis and inhibits cell growth in cisplatin-resistant lung cancer cells. *Anticancer Res* 2012;32:89-94.

42- Ahmad A, Maitah MY, Ginnebaugh KR, Li Y, Bao B, Gadgeel SM, et al. Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMT-regulating miRNAs. *J Hematol Oncol* 2013;6:77.

43- Li H, Lui N, Cheng T, Tseng HH, Yue D, Giroux Leprieur E, et al. Gli as a novel therapeutic target in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 2013;8:e57346.

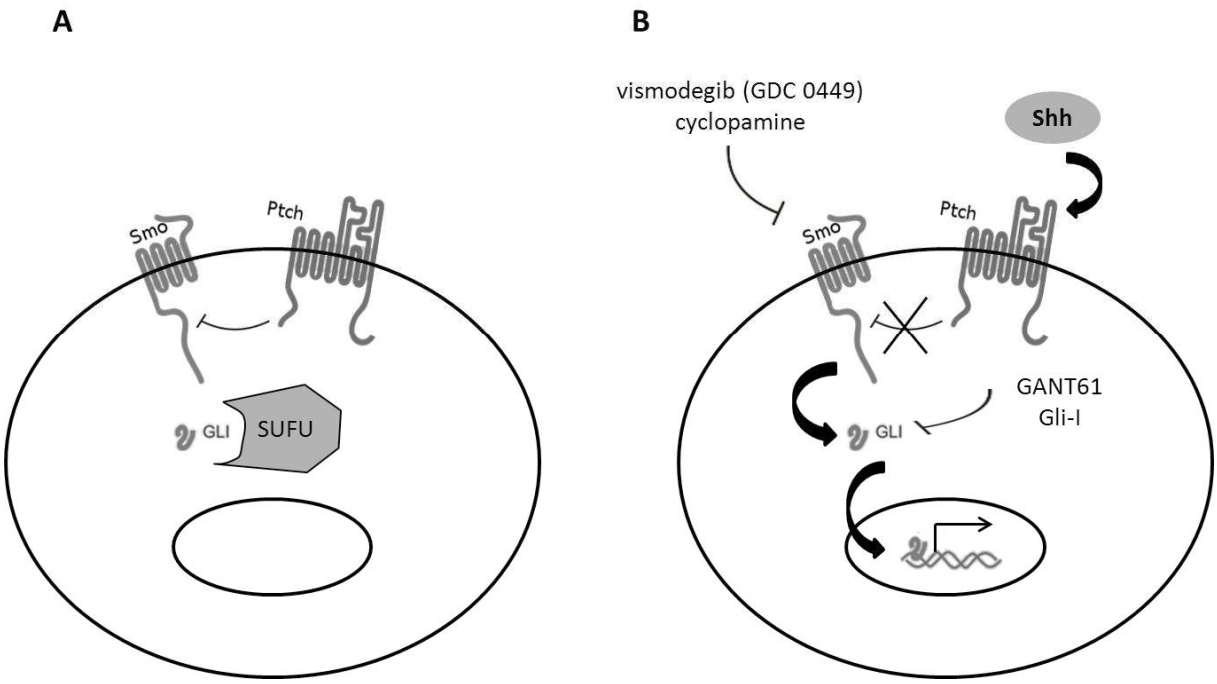
44- You M, Varona-Santos J, Singh S, Robbins DJ, Savaraj N, Nguyen DM. Targeting of the Hedgehog signal transduction pathway suppresses survival of malignant pleural mesothelioma cells in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;147:508-16.

45- Affolter M, Zeller R, Caussinus E. Tissue remodelling through branching morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:831-42.

Tableau 1 : Principaux gènes cibles de la voie Shh. D'après Katoh[27]

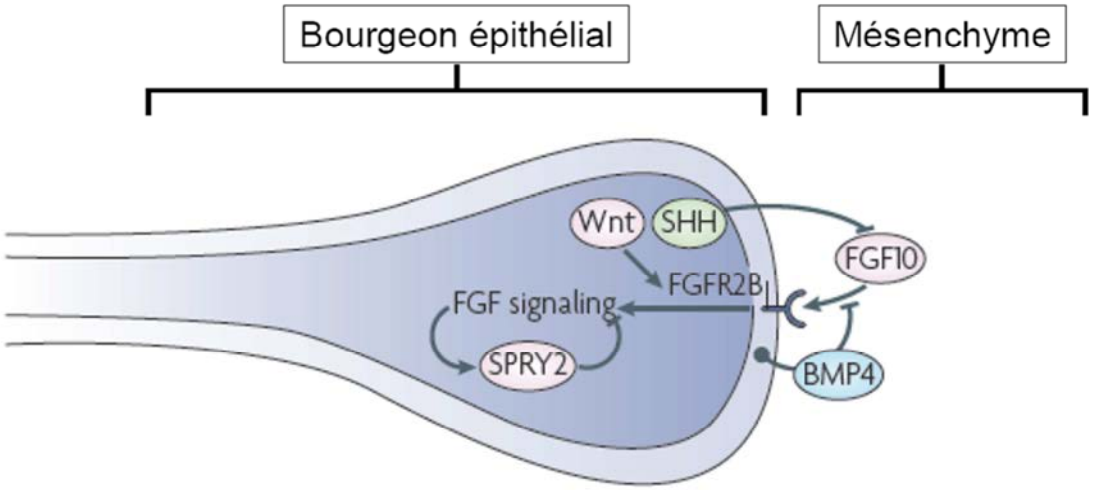
	Gène
TEM	*FOXC2*
	SNAI1
	TWIST2
	ZEB1
	ZEB2
CSC	*JAG2*
	FST
	GREM1
	BMP4
	WNT2B
	WNT5A
	PDGFRA
	BMI1
	LGR5
	CD44
	CD133
rétrocontrôle positif de la voie Shh	*GLI1*
rétrocontrôle négatif de la voie Shh	*PTCH1*
	PTCH2
	HHIP1
prolifération cellulaire	*MYCN*
	CCND1
	CCND2
	CCNE
	FOXM1
	CCNB1
	CDC25B
survie cellulaire	*BCL2*
	CFLAR
autres	*FOXF1*
	FOXL1
	PRDM1
	PTHLH

Figure 1 : Voie de signalisation Shh.



A : en l'absence de fixation de Shh sur Ptch, Ptch exerce une action inhibitrice sur Smo. Gli est associé à SUFU dans le cytoplasme et est inactif. **B :** en cas de fixation de Shh sur Ptch, il y a levée de l'inhibition de Smo et activation de Gli qui va passer dans le noyau et activer la transcription des gènes cibles. Plusieurs inhibiteurs de la vois Shh existent : inhibiteurs de Smo (vismodegib, cyclopamine) et inhibiteurs de Gli (GANT61, petite molécule inhibitrice de Gli (Gli-I)).

Figure 2 : Interactions épithélium - mésenchyme lors du bourgeonnement et de la ramification bronchique au cours du développement, et rôle de Shh.



La croissance épithéliale est stimulée par la sécrétion de FGF-10 par le mésenchyme. Des facteurs régulateurs vont intervenir, comme Shh, Sprouty (Spry2), TGFβ, Wnt et BMP4. Shh va ainsi être sécrétée par l'épithélium dans le mésenchyme et va inhiber FGF-10. La balance Shh-FGF-10 va permettre la ramification et la dichotomie bronchique. D'après Affolter et al. [45].

3. Etude du rôle de l'activation de la voie Shh dans la résistance à la chimiothérapie à base de sel de platine dans les CBNPC de stade avancé

3.1. Article 3

Giroux Leprieur E*, Vieira T*, Antoine M, Rozensztajn N, Rabbe N, Schlick L, Cadranel J, Wislez M. Sonic Hedgehog pathway activation is associated with resistance to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung carcinoma. **En cours d'écriture**.

* EGL et TV ont également participé à la réalisation de ce manuscrit

3.2. Présentation de l'article et commentaires

Nous avons cherché à établir un lien entre l'activation de la voie Shh, décrite comme réactivée dans les CBNPC, et la chimiorésistance. A partir de la cohorte de 178 patients ayant un CBNPC de stade avancé et traités entre 2003 et 2006 dans le service de Pneumologie de l'Hôpital Tenon par une chimiothérapie à base de platine en 1^{ière} ligne, nous avons sélectionnés les patients ayant un prélèvement chirurgical diagnostique (n=36). L'activation de la voie Shh a été étudiée à travers l'expression de Gli1 et Gli2 par IHC et par Western Blot. Sur les 36 patients sélectionnés, 12 étaient réfractaires à la chimiothérapie (33,3%) et 24 contrôlés. L'immunomarquage en IHC a été fait avec les anticorps sc-20687 (Gli1, Santa Cruz) et ab-26056 (Gli2, Abcam). L'expression de Gli a été cotée sur l'intensité du marquage nucléaire : 0 (pas de marquage) à 3 (marquage très intense). Le score était considéré comme positif si ≥25% des cellules avaient un marquage avec une intensité ≥ 2 (Wang 2012). L'ensemble des prélèvements a été relu et le score quantifié par un anatomo-pathologiste spécialisé (Dr Martine Antoine, Hôpital Tenon). L'expression de Gli1 et Gli2 n'était retrouvée que dans les cellules tumorales et non dans le tissu normal péri-tumoral.

L’expression était hétérogène au sein de la tumeur. Le pourcentage médian de cellules tumorales exprimant Gli1 et Gli2 était respectivement de 80% (IQR 50-90%) et 40% (IQR 12,5-45%) au sein de chaque tumeur. Concernant l’expression de Gli1, 11 patients avaient un score positif (31,4%), et 24 un score négatif (68,6%) (1 prélèvement tumoral n’était pas exploitable). Concernant l’expression de Gli2, 7 patients avaient un score positif (19,4%), et 29 un score négatif (80,6%). Il n’a pas été mis en évidence de différence en termes d’expression de Gli1 entre les patients réfractaires et les contrôlés (score positif 41,7% versus 26,1%, respectivement ; p=0,35). Par contre, l’expression de GLI2 était plus souvent positive chez les patients réfractaires que les contrôlés (41,7% versus 8,3%, respectivement ; p=0,02). La positivité du score Gli2 était plus fréquente dans les stades IV que dans les stades IIIb, ce qui soulève l’hypothèse de son association avec l’agressivité de la maladie. Elle n’était pas associée à un type histologique particulier. La positivité du score Gli2 était associée à la survie sans progression, avec une médiane de 2,1 mois (IQR 1,8-5,2) en cas de score positif, versus 6,7 mois (IQR 4,2-12,1) en cas de score négatif (p=0,03). Elle était également associée à la survie globale, avec une médiane de 8 mois (IQR 4,5-9,7) en cas de score positif, versus 18 mois (IQR 11,2-27,0) en cas de score négatif (p=0,002). Ces résultats d’IHC doivent être confirmés par les Western Blot (résultats en cours). En analyse multivariée sur la SSP, les seuls facteurs indépendants retrouvés étaient le sous-type histologique sarcomatoïde (HR=14,29 ; IC95% 2,30-83,33 ; p=0,004), et le score Gli2 positif (HR = 2,64 ; IC95% 1,05-6,63 ; p=0,04). En analyse multivariée sur la survie globale, seule le score Gli2 positif était significatif (HR=4.36 ; IC95% 1,67-11,36 ; p=0,003). Pour s’assurer du réel impact de l’expression de Gli2 sur la SSP et la survie globale, indépendamment du seuil choisi de positivité du score IHC, nous avons également étudié le score d’intensité de marquage Gli2 (de 0 à 3) comme variable continue en analyse multivariée. L’expression de Gli2 restait alors

indépendamment corrélée à la SSP (HR=1,75 ; IC95% 1,15-2,69 ; p=0,01), et le seul facteur indépendant sur la survie globale (HR=1,81 ; IC95% 1,18-2,77 ; p=0,007).

Nous avons ensuite utilisées des lignées cellulaires de CBNPC (H322 et A549) et des cultures primaires issues de patients ayant un carcinome sarcomatoïde (n=4) pour étudier le rôle de la voie Shh dans la chimiorésistance. Nous avons traité ces différentes lignées par du cisplatine, du vismodegib (inhibiteur de Smo) et par la combinaison des 2 médicaments. Les lignées de carcinome sarcomatoïde apparaissaient comme les plus résistantes au cisplatine (IC50 entre 67µM et plus de 500µM, versus 27µM et 56µM pour H322 et A549). Le vismodegib seul n'avait pas d'action cytotoxique significative; l'association vismodegib et cisplatine avait un effet synergique, surtout pour les lignées les plus résistantes au cisplatine, comme le montre le calcul du score de synergie (méthode de Chou-Talalay (Chou 2010) ; Combinational Index (CI) : CI<1: effet synergique; CI=1 : effet additif ; CI>1 : effet antagoniste). Il existait une corrélation très forte entre l'IC50 pour le cisplatine et le CI.

Cette étude confirme le rôle de la voie Shh dans la résistance à la chimiothérapie à base de sel de platine dans le CBNPC. La forte expression de Gli2 semble être associée à la résistance à la chimiothérapie à base de sels de platine, et l'inhibition de la voie Shh pourrait sensibiliser aux sels de platine les CBNPC les plus chimiorésistants.

Sonic Hedgehog pathway activation is associated with resistance to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung carcinoma

Giroux Leprieur E[1,2*], Vieira T[1,3*], Antoine M[1,4], Rozensztajn N[3], Rabbe N[1], Schlick L[1], Cadranel J[1,3], Wislez M[1,3].

1- Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, GRC n°04, Theranoscan, F-75252, Paris, France
2- AP-HP, Hôpital Ambroise Paré, Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, Université Versailles Saint Quentin en Yvelines, 92100 Boulogne-Billancourt, France
3- AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, F-75970, Paris, France
4- AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'anatomie pathologique, F-75970, Paris, France

*These authors contributed equally

Corresponding author: Pr Marie Wislez. AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, F-75970, Paris, France. Tel: +33156016838. Fax: +33156017248. E-mail: marie.wislez@tnn.aphp.fr

Introduction

Despite great progress in oncogenic driver identification, most of advanced non-small cell lung cancers (NSCLC) are treated with first-line cytotoxic platinum-based chemotherapy. According to main randomized phase III trials, around 25% to 30% of patients have early progression under chemotherapy, and are called refractory patients (r-patients) [1-10]. We have already described clinical, histopathological and molecular characteristics of r-patients [11]. The only factor independently correlated to early progression was the sarcomatoid subtype. Many predictive factors of resistance to platinum-based chemotherapy have been extensively studied so far in NSCLC. ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementary group 1*) is a protein involved in DNA repair. Its predictive role of adjuvant chemotherapy benefit in early stage NSCLC has been demonstrated [12], although its impact in chemoresistance in advanced stage is more controversial [13-17]. Besides, a recent study has shown that the antibody used for ERCC1 expression in immunohistochemistry (IHC) is not reliable, and so ERCC1 expression testing in IHC in not recommended anymore [18]. A recent phase II trial has demonstrated the feasibility of a personalized adjuvant treatment, according to EGFR and ERCC1 status [19]. Because of lack of reliability of the ERCC1 antibody, preplanned phase III trial was canceled. BRCA1 (*Breast Cancer 1*) is another protein involved in DNA repair. Its prognostic role on survival for NSCLC treated with chemotherapy is likely, but its impact on chemoresistance prediction in advanced stage NSCLC is still under evaluation [20-23]. Other predictive markers (MSH2, ABC transporters) have failed to clearly demonstrate a predictive role of chemoresistance in advanced stage NSCLC [22,24-27]. There is an urgent need of validation of new predictive markers.

The role of cancer stem cells (CSC) has been evocated [28]. CSC are a small undifferenciated tumor cells contingent, that are chemoresistant and responsible of cancer relapse and metastatic spreading. Some specific pathways are overexpressed in CSC, as Sonic Hedgehog (Shh) pathway. Overexpression of Shh pathway has been proved in small-cell lung cancer (SCLC) and in NSCLC, through an auto-and paracrine activation [29-33]. The final downstream factor in the Shh pathway is Gli protein family (mainly Gli1 and Gli2), responsible of gene transcription. Several studies have suggested a role of Shh pathway in chemoresistance. In this study, we proposed to study the role of Shh pathway activation in advanced NSCLC refractory to first-line platinum-based chemotherapy.

Patients and methods

Patients and tumors samples

We retrospectively reviewed all consecutive patients treated in our department with a platinum-based doublet chemotherapy as the first-line therapy for non-irradiable IIIb-IV NSCLC, according to the 6th IASLC TNM edition. We selected patients with surgical samples, in order to have enough material for biomarker analysis (Tumorothèque des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien (HUEP), AP-HP, Hôpital Tenon). The inclusion period ran from January 2003 to December 2006. Demographic, histological, and treatment data were recorded. All patients were evaluated for tumor response after three cycles of treatment by clinical examination, chest X-ray, and chest and upper abdomen CT scan, by dedicated radiologists specialized in thoracic oncology. At that time, patients were classified as having early progressive disease(r-patients) or as controlled disease (c-patients, i.e., complete or partial response, or stable disease) according to WHO criteria. All tumor samples were collected and centrally reviewed by a pathologist specialized in thoracic malignancies (M.A). The pathologist was blind to patients' clinical outcome. The histological type was determined according to the latest IASLC WHO classification [34].

Immunohistochemistry (IHC)

We used anti- rabbit Gli 1 antibody (sc-20687, 1:75, Santa Cruz) and anti-rabbit Gli 2 antibody (ab-26056, 1:200, Abcam, UK) for IHC, according to standard protocol. IHC nuclear intensity staining were scored from 0 (no staining) to 3 (strong nuclear staining). Score was considered as positive if ≥25% of tumor cells had a staining

intensity ≥2 [35]. All the IHC staining results have been validated by a pathologist specialized in thoracic malignancies (M.A).

Molecular biomarkers

EGFR (exons 19, 20, 21) and *KRAS* (exon 2) mutations were searched by direct sequencing. DNA extraction was made with the QIAmp DNA mini-kit (Qiagen, Netherlands) from paraffin-embedded tissue, according to the manufacturer's instructions. All mutations were confirmed by a second PCR analysis. DNA samples were tested twice for amplification to definitively conclude them as being non-amplifiable.

The *ALK*-fusion transcript was searched by IHC on 4µM slides from paraffin-embedded tissue, using a monoclonal mouse antibody (5A4) (Abcam, UK) on a Benchmark system (Ventana Medical System, USA), according to the manufacturer's instructions [36]. Staining was quantified as the percentage of positive cells (0–100%) with an intensity of 0 (no staining) to 3 (strong staining). A 10% positivity of cells with an intensity ≥2 was considered as positive staining, as reported by Yi et al. [37].

Cultures and MTT assays

Primary cultures were obtained from tumors from 4 patients with sarcomatoid carcinoma, and cultured in a mix of Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Lonza Group Ltd., Switzerland) and Bronchial Epithelial cell Basal Medium (BEBM, Lonza) (2:1), with supplementation with 10% fetal bovine serum (FBS) and Bronchial Epithelial cell growth Medium (BEGM, Lonza). A549 and H322 cell lines were

obtained from ATCC and cultured in RPMI culture medium, supplemented with 10% FBS. At 100% confluence, cells were trypsinized and seemed in 96-wells plates (5000cells/well) with RPMI + 10% SVF. At d1, cells were treated by cisplatin (Sigma Aldrich, USA), vismodegib (SelleckChem, USA) or cisplatin and vismodegib, at 20µM concentration for each drug, according to dose effect observed in preliminary studies. Negative controls used diluent alone (NaCl solution or DMSO). At d2, WST-1 proliferation assay (Roche, Germany) was added in each well, and optic density was read 2 hours later (450nm) on spectrophotometer. Density was normalized according to control (DMSO or NaCl solution). Experiments were conducted in quadruplicate, and repeated 3 times each.

Statistical analyses

Comparisons of categorical variables between r- and c-patients were performed using the chi-squared test, whereas comparisons between continuous variables were made using the Mann–Whitney test. Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD) for normal distributions, or median + interquartile range (IQR) for non-normal distributions. Progression-free survival and overall survival were evaluated using the Kaplan–Meyer method (log-rank test), and were expressed as median ± IQR. The censoring date was the 07/02/2014. Multivariate analysis was performed using a logistical regression model, and included all variables with a p-value<0.25 in univariate comparison between r- and c-patients. The combinational effects of treatments were quantified using the Chou-Talalay Method to obtain the Combinational Index (CI), where CI <1, = 1, >1 represent synergism, additive effect, and antagonism respectively [38]. Correlation between IC50 of cisplatin and the

combinational index was performed with Spearman test. P-values <0.05 were considered as significant. Statistical analyses were carried out using Xlstat 2014 software (Addinsoft®, France).

Results

r-patients have higher Gli2 expression than c-patients

Between 2003 and 2006, 256 consecutive patients were diagnosed with stage IIIb or IV NSCLC. Eleven patients were not treated because of their poor performance status (PS 3 or 4). Of the 245 treated patients, 178 received platinum-based doublet chemotherapy as the first-line treatment. Data on this cohort have been previously published [11]. Of these 178 patients, 36 had surgical pathological samples available for analysis. Demographic data are summarized in Table 1. R-patients were more often women (66.7% in r-patients vs 20.8% in c-patients, p=0.01). Gli1 and Gli2 were expressed in tumor cells; there was no expression in normal lung tissue. IHC for Gli1 showed that 11 samples had a positive Gli1 score (31.4%), and 24 samples had a negative score (68.6%) (1 sample was not contributive). Among positive samples, median percentage of positive tumor cells for Gli1 was 80% (IQR 50-90%). IHC for Gli2 showed that 7 samples had a positive Gli2 score (19.4%) and 29 samples had a negative score (80.6%) (Figure 1A-C). Among positive samples, median percentage of positive tumor cells for Gli2 was 40% (IQR 12,5-45%). Gli1 positive score was not different between r-patients and c-patients (41.7% vs 26.1%, respectively; p=0.35) (Figure 1D). Gli2 positive score was more frequent in r-patients than in c-patients (41.7% vs 8.3%, respectively; p=0.02) (Figure 1E). Characteristics of Gli2-positive patients are summarized in Table 2. Gli2-positive score was also more frequent in stage IV than in IIIb patients: of the 7 Gli2-positive samples, 6 (85.7%) were stage IV and 1 (14.3%) was stage IIIb, whereas of the 29 Gli2-negative samples, 12 (41.4%) were stage IV and 17 (58.6%) were stage IIIb (p=0.04). No difference was observed concerning histological subtypes for Gli2 staining.

Patients with Gli2-positive tumors had shorter PFS and shorter OS compared to c-patients

Gli1-positive score had no incidence on PFS or OS (Figure 2A and B). Gli2-positive score was associated with shorter PFS and shorter OS (Figure 2C and D). Patients with Gli2-positive score had a median PFS of 2.1 months (IQR 1.8-5.2), whereas patients with Gli2-negative score had median PFS of 6.7 months (IQR 4.2-12.1) (p=0.03). Patients with Gli2-positive score had a median OS of 8.01 months (IQR 4.5-9.7), whereas patients with Gli2-negative score had a median OS of 18.0 months (IQR 11.2-27.0). In multivariate analysis on PFS (Table 3), significant variables were sarcomatoid histological subtype (HR=14.29; IC95% 2.30-83.33; p=0.004) and Gli2-positive score (HR=2.64; IC95% 1.05-6.63; p=0.04). In multivariate analysis on OS (Table 4), the only significant variable was Gli2-positive score (HR=4.36; IC95% 1.67-11.36; p=0.003). In order to confirm the prognostic and predictive impact of Gli2 expression, independently of positivity cut-off, we analyzed the staining intensity as a continuous variable in multivariate analysis. Gli2 expression was still an independent factor of SSP (HR=1.75; IC95% 1.15-2.69; p=0.01) and OS (HR=1.81; IC95% 1.18-2.77; p=0.007).

Inhibition of Shh pathway sensitizes chemoresistant CBNPC cells in vitro

We used CBNPC cell lines (H322 and AA549) as well as 4 different primary cell cultures of sarcomatoid carcinomas, developed from r-patients, and treated *in vitro* by cisplatin. As expected, H322 and A549 cell lines were more chemosensitive (IC50 of 27µM and 56µM, respectively), than the 4 sarcomatoid primary cell cultures (IC50 of

67µM, 75µM, 100µM and 500µM). Inhibition of Shh pathway, using a Smo inhibitor (vismodegib), induced minimal cytotoxic effect on the 6 different cell types. As shown in the Figure 3A, concomitant treatment with cisplatin and vismodegib induced synergic cytotoxic effect in the 3 most resistant sarcomatoid primary cultures, as shown by the combinational index (CI) <1, and had no synergistic effect in the most chemosensitive sarcomatoid primary culture (with IC50 for cisplatin similar to IC50 of A549) and the 2 NSCLC cell lines. There was also a significant correlation between IC50 of cisplatin and the CI, suggesting that the benefit of vismodegib is larger in the most chemoresistant cells (Figure 3B).

Discussion

We found Shh pathway was activated in advanced NSCLC, with expression of Gli1 and Gli2 in the majority of tumor cells. Moreover, Gli2-positive score is associated with chemoresistance. R-patients had more often a Gli2-positive score compared to c-patients, and it was an independent factor of poor PFS and OS in multivariate analysis. In vitro studies confirmed that inhibition of Shh pathway had a synergistic effect with cisplatin on proliferation inhibition, especially in the most chemoresistant cells.

Shh pathway is physiologically expressed during the development. It has been shown to be overexpressed in many solid tumors, as CBNPC [31-33]. Shh pathway seems to have an oncogenic role in NSCLC. Huang et al. have shown an activation of the Shh pathway in NSCLC, both *in vitro* and *in vivo* [39]. Several studies have shown a correlation between Shh activation and chemoresistance. Shh activation is associated with ABC transporters expression, as MDR1 or ABCG2, involved in chemoresistance through efflux of drugs [40]. Inhibition of Shh pathway with vismodegib inhibited cell proliferation in cisplatin-resistant lung cancer cells [41]. Same results have been shown with EGFR tyrosine kinase inhibitors [42]. Interestingly, we found that Gli-2 positive samples were more often stage IV, suggesting the role of Shh pathway activation in tumor dissemination. Yue et al. have demonstrated in lung squamous carcinomas a correlation between Shh activation, evaluated through Gli expression, and epithelial-mesenchymal transition (EMT), known to be involved in metastatic spreading and chemoresistance [43]. Equivalent results were obtained in another chemoresistant thoracic malignancy that is pleural mesothelioma [44].

We found in our study that Gli2 has an impact on prognosis in advanced NSCLC. Previous studies have suggested a prognostic role of Gli1 expression in early stage NSCLC. Gli1 expression in IHC was inversely correlated with disease-free survival in early stage squamous cell carcinoma [43], but Gli2 was not tested in this study. Little is known about transcriptional activity differences between Gli1 and Gli2. Both have the same promoter fixation site [45]. However, the first mediator activated after Shh fixation on its receptor seems to be Gli2. Gli1 is expressed secondarily and induced by Gli2 [46]. Activation of Shh pathway prompted first Gli2 activation that induced gene transcription, including *Gli1* transcription [47]. However, these studies have been conducted in developmental steps or in normal tissues. We do not know clearly yet if there are some distinctions in Gli1 and Gli2 activities in solid tumors. The majority of studies in NSCLC have used Gli1, and not Gli2, as Shh pathway surrogate marker. Because we found an impact of Gli2 and not of Gli1 on SSP or OS, some differences may exist between these 2 proteins in NSCLC, and further studies are needed.

Our study has several limitations. First, this is a retrospective study, on a small number of patients. Besides, we studied only samples from surgical procedures. Further experiments are needed to validate Gli2 IHC score and its prognosis impact in a larger prospective validation cohort, including small size biopsies.

In conclusion, activation of Shh pathway seems to have a critical role in term of chemoresistance. The benefit of Shh pathway inhibition is larger in chemoresistant CBNPC. The evaluation of targeted Shh therapies in NSCLC should be performed in clinical studies, particularly in r-patients.

References

1. Depierre A, Chastang C, Quoix E, Lebeau B, Blanchon F, Paillot N, Lemarie E, Milleron B, Moro D, Clavier J, Herman D, Tuchais E, Jacoulet P, Brechot JM, Cordier JF, Solal-Celigny P, Badri N, Besenval M. Vinorelbine versus vinorelbine plus cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a randomized trial. Ann Oncol 1994;5:37–42.
2. Crinò L, Scagliotti GV, Ricci S, De Marinis F, Rinaldi M, Gridelli C, Ceribelli A, Bianco R, Marangolo M, Di Costanzo F, Sassi M, Barni S, Ravaioli A, Adamo V, Portalone L, Cruciani G, Masotti A, Ferrara G, Gozzelino F, Tonato M. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase III study of the Italian Lung Cancer Project. J Clin Oncol 1999;17:3522–30.
3. Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr, Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, Ramsey SD, Wozniak AJ, Weiss GR, Moore DF, Israel VK, Livingston RB, Gandara DR. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non—small cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. J ClinOncol 2001;19:3210-8.
4. Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC, Keppler U, Macha HN, Pirker R, Berthet P, Breau JL, Lianes P, Nicholson M, Ardizzoni A, Chemaissani A, Bogaerts J, Gallant G. Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a cooperative multinational trial. Ann Oncol 2002;13:1539–49.
5. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crinò L, Gridelli C, Ricci S, Matano E, Boni C, Marangolo M, Failla G, Altavilla G, Adamo V, Ceribelli A, Clerici M, Di Costanzo F, Frontini L, Tonato M. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2002;20:4285-91.
6. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2002;346:92-8.
7. Smit EF, van Meerbeeck JPAM, Lianes P, Debruyne C, Legrand C, Schramel F, Smit H, Gaafar R, Biesma B, Manegold C, Neymark N, Giaccone G. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group-EORTC 08975. J Clin Oncol 2003;21:3909–17.
8. Gridelli C, Gallo C, Shepherd FA, Illiano A, Piantedosi F, Robbiati SF, Manzione L, Barbera S, Frontini L, Veltri E, Findlay B, Cigolari S, Myers R, Ianniello GP, Gebbia V, Gasparini G, Fava S, Hirsh V, Bezjak A, Seymour L, Perrone F. Gemcitabine plus vinorelbine compared with cisplatin plus vinorelbine or cisplatin plus gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol 2003b:3025–34.
9. Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, Pluzanska A, Gorbounova V, Kaukel E, Mattson KV, Ramlau R, Szczesna A, Fidias P, Millward M, Belani CP. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum

combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. J Clin Oncol 2003;21:3016-24.
10. Georgoulias V, Ardavanis A, Agelidou A, Agelidou M, Chandrinos V, Tsaroucha E, Toumbis M, Kouroussis C, Syrigos K, Polyzos A, Samaras N, Papakotoulas P, Christofilakis C, Ziras N, Alegakis A. Docetaxel versus docetaxel plus cisplatin as front-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter phase III trial. J Clin Oncol 2004;22:2602–9.
11. Giroux Leprieur E, Antoine M, Vieira T, Duruisseaux M, Poulot V, Rabbe N, Belmont L, Gounant V, Lavolé A, Milleron B, Lacave R, Cadranel J, Wislez M. Clinical and molecular features in patients with advanced non-small cell lung carcinoma refractory to first-line platinum-based chemotherapy. Lung Cancer, Volume 79, n°2, Février 2013, pages 167-172.
12. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC; IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. NEngl J Med 2006;355:983-91.
13. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, Cardenal F, Sánchez JM, Gumerlock PH, Tarón M, Sánchez JJ, Danenberg KD, Danenberg PV, Rosell R. Low ERCC1 expression correlateswithprolongedsurvivalaftercisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2002;8:2286-91.
14. Lee HW, Choi YW, Han JH, Kim JH, Jung JH, Jeong SH, Kang SY, Choi JH, Oh YT, Park KJ, Hwang SC, Sheen SS. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. Lung Cancer 2009;65:377-82.
15. Joerger M, deJong D, Burylo A, Burgers JA, Baas P, Huitema AD, Beijnen JH, Schellens JH. Tubulin, BRCA1, ERCC1, Abraxas, RAP80 mRNA expression, p53/p21 immunohistochemistry and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy. Lung Cancer.2011;74:310-7.
16. Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G, Lagoudaki E, Trypaki M, Tryfonidis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulias V, Souglakos J. ERCC1 and BRAC1 mRNA expression levels in the primary tumor could predict the effectiveness of the second-line cisplatin-based chemotherapy in pretreated patients with metastatic non-small cell lung cancer. J ThoracOncol 2012;7:663-71.
17. Lee SH, Noh KB, Lee JS, Lee EJ, Min KH, Hur GY, Lee SH, Lee SY, Kim JH, Lee SY, Shin C, Shim JJ, Kim CH, Kang KH, In KH. Thymidylate synthase and ERCC1 as predictive markers in patients with pulmonary adenocarcinoma treated with pemetrexed and cisplatin. Lung Cancer 2013;81:102-8.
18. Friboulet L, Olaussen KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, Kratzke R, Douillard JY, Seymour L, Pirker R, Filipits M, André F, Solary E, Ponsonnailles F, Robin A, Stoclin A, Dorvault N, Commo F, Adam J, Vanhecke E, Saulnier P, Thomale J, Le Chevalier T, Dunant A, Rousseau V, Le Teuff G, Brambilla E, Soria JC. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2013a;368:1101-10.

19. Wislez M, Barlesi F, Besse B, Mazières J, Merle P, Cadranel J, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, Gautier-Felizot L, Goupil F, Renault A, Quoix E, Souquet PJ, Madroszyck A, Corre R, Pérol D, Morin F, Zalcman G, Soria JC. Customized adjuvant phase II trial in patients with non-small-cell lung cancer: IFCT-0801 TASTE. J Clin Oncol 2014;32:1256-61.
20. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, Queralt C, Majo J, Sanchez JM, Sanchez JJ, Maestre J. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. Hum Mol Genet 2004;13:2443-9.
21. Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, Cobo M, Moran T, Chaib I, Provencio M, Domine M, Sala MA, Jimenez U, Diz P, Barneto I, Macias JA, de Las Peñas R, Catot S, Isla D, Sanchez JM, Ibeas R, Lopez-Vivanco G, Oramas J, Mendez P, Reguart N, Blanco R, Taron M. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. PLoS One 2009;4:e5133.
22. Pierceall WE, Olaussen KA, Rousseau V, Brambilla E, Sprott KM, Andre F, Pignon JP, Le Chevalier T, Pirker R, Jiang C, Filipits M, Chen Y, Kutok JL, Weaver DT, Ward BE, Soria JC. Cisplatin benefit is predicted by immunohistochemical analysis of DNA repair proteins in squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma: theranostic modeling by NSCLC constituent histological subclasses. Ann Oncol 2012;23:2245-52.
23. Sanchez JM, Cobo M, Arrabal R, Massuti B, Rodriguez Paniagua JM, Moran T, Astudillo J, Jimenez U, Pun YW, Bujanda DA, Freixenet J, Gonzalez-Larriba JL, Hernando-Trancho F, Gómez-Codina J, Penalver JC, Banaclocha NM, Lopez-Vivanco G, Pac J, Taron M, Rosell R. Pilot SCAT trial: Spanish customized adjuvant chemotherapy (CT) based on BRCA1 mRNA expression levels (l) in resected stage II-IIIA non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p). J Clin Oncol 2012:30(suppl):abstr7011.
24. Xie KJ, He HE, Sun AJ, Liu XB, Sun LP, Dong XJ. Expression of ERCC1, MSH2 and PARP1 in non-small cell lung cancer and prognostic value in patients treated with platinum-based chemotherapy. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:2591-6.
25. Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, Nishiwaki Y, Kodama T, Suga M, Ochiai A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2004;10:1691-7.
26. Filipits M, Haddad V, Schmid K, Huynh A, Dunant A, André F, Brambilla E, Stahel R, Pignon JP, Soria JC, Popper HH, Le Chevalier T, Pirker R. Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. Clin Cancer Res 2007;13:3892-8.
27. Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojika M, Murata Y, Yamazaki M, Nishiwaki Y, Eguchi K, Ochiai A. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. Lung Cancer 2009;64:98-104.
28. Perona R, López-Ayllón BD, de Castro Carpeño J, Belda-Iniesta C. A role for cancer stem cells in drug resistance and metastasis in non-small-cell lung cancer. Clin TranslOncol 2011;13:289-93.

29. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. Nature 2003;422:313-7.
30. Park KS, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, Bernard K, Conklin JF, Szczepny A, Yuan J, Guo R, Ospina B, Falzon J, Bennett S, Brown TJ, Markovic A, Devereux WL, Ocasio CA, Chen JK, Stearns T, Thomas RK, Dorsch M, Buonamici S, Watkins DN, Peacock CD, Sage J. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. Nat Med 2011;17:1504-8.
31. Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, Memoli VA, Dmitrovsky E, Robbins DJ. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. Oncogene 2007;26:1046-55.
32. Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, Varakis J, Kourea H, Papadaki H. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas. Lung Cancer 2009;66:64-74.
33. Raz G, Allen KE, Kingsley C, Cherni I, Arora S, Watanabe A, Lorenzo CD, Edwards V DK, Sridhar S, Hostetter G, Weiss GJ. Hedgehog signaling pathway molecules and ALDH1A1 expression in early-stage non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2012;76:191-6.
34. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 2011;6:244-85.
35. Wang YF, Chang CJ, Lin CP, Chang SY, Chu PY, Tai SK, Li WY, Chao KS, Chen YJ. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. Head Neck 2012;34:1556-61.
36. Jokoji R, Yamasaki T, Minami S, Komuta K, Sakamaki Y, Takeuchi K, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. J Clin Pathol 2010;63:1066–70.
37. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry MC, Erickson-Johnson MR, Caron BL, Li Y, Tang H, Stoddard S, Wampfler J, Kulig K, Yang P. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. J ThoracOncol. 2011 Mar;6(3):459-65.
38. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res 2010;70:440-6.
39. Huang L, Walter V, Hayes DN, Onaitis M. Hedgehog-GLI Signaling Inhibition Suppresses Tumor Growth in Squamous Lung Cancer. Clin Cancer Res 2014;20:1566-75.
40. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J, Chao KS. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. Oncogene 2007;26:5674-9.

41. Tian F, Schrödl K, Kiefl R, Huber RM, Bergner A. The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 alters intracellular Ca2+ homeostasis and inhibits cell growth in cisplatin-resistant lung cancer cells. AnticancerRes 2012b;32:89-94.
42. Ahmad A, Maitah MY, Ginnebaugh KR, Li Y, Bao B, Gadgeel SM, Sarkar FH. Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMT-regulating miRNAs. J HematolOncol 2013;6:77.
43. Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Tseng HH, Jin JQ, Luh TM, Giroux Leprieur E, Mo M, Zheng Q, Shi H, Zhang H, Hao X, Wang C, Jablons DM, He B. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, Volume 33, n°1, Avril 2014, page 34.
44. Li H, Lui N, Cheng T, Tseng HH, Yue D, Giroux Leprieur E, Do HT, Sheng Q, Jin JQ, Luh TW, Jablons DM, He B.Gli as a Novel Therapeutic Target in Malignant Pleural Mesothelioma. PlosOne, Volume 8, n° 3, 2013, page e57346.
45. Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgard R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. Gene 2004;330:101-14.
46. Ikram MS, Neill GW, Regl G, Eichberger T, Frischauf AM, Aberger F, Quinn A, Philpott M. Gli2 is expressed in normal human epidermidis and BCC and induces Gli1 expression by binding to its promoter. J Invest Dermatol 2004;122:1503-29.
47. Lipinski RJ, Gipp JJ, Zhang J, Doles JD, Bushman W. Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling. ExpCellRes 2006;312:1925-38.

Table1: Demographic, pathological and molecular characteristics of patients

	Total (n=36)	r-patients (n=12)	c-patients (n=24)	p-value
Age (mean ±SD)	53.4 (±10.2)	53.4 (±8.1)	54.8 (±11.3)	0.718
Gender (men)	23 (63.9)	4 (33.3)	19 (79.2)	0.007
Stage (IV)	23 (63.9)	9 (75.0)	14 (58.3)	0.326
Tobacco status (N/FS/CS)	3/9/23 (8.6/25.7/65.7)	1/3/7 (9.1/27.3/63.6)	2/5/16 (8.3/25.0/66.7)	0.934
Histology				0.214
Adenocarcinoma	24 (66.7)	7 (58.3)	17 (70.8)	
squamous cell carcinoma	4 (11.1)	2 (16.7)	3 (12.5)	
large cell carcinoma	4 (11.2)	1 (9.1)	2 (8.3)	
sarcomatoid carcinoma	2 (5.6)	2 (16.7)	0 (0.0)	
Other	2 (5.6)	0 (0.0)	2 (8.4)	
Drug associated with platinum				0.482
gemcitabine	21 (58.3)	6 (50.0)	15 (62.5)	
taxan	12 (33.3)	4 (33.3)	8 (33.3)	
etoposide	2 (5.6)	1 (9.1)	1 (4.2)	
ifosamide - etoposide	1 (2.8)	1 (9.1)	0 (0.0)	
Molecular abnormalities*				
Kras mutation	2 (6.9)	2 (20.0)	0 (0.0)	0.212
EGFR mutation	4 (15.4)	1 (11.1)	3 (17.6)	0.895
ALK translocation	2 (5.9)	1 (8.3)	1 (4.5)	0.754

r-patients: refractory patients; c-patients controlled patients; N: never smoker; FS: former smoker; CS: current smoker. *percentages are expressed according to amplified samples.

Table2: Comparison of Gli2-positive tumors and Gli2-negative tumors

	GLI2 pos (n=7)	Gli2 neg (n=29)	p-value
Age (mean ±SD)	50.6 (±5.6)	55.2 (±11.0)	0.289
Gender(men)	3 (42.9)	20 (69.0)	0.197
Tobacco status (N/FS/CS)	0/2/5	3/8/18	0.669
Stage IV	6 (85.7)	12 (41.4)	0.035
Histology			0.335
adenocarcinoma	3 (42.9)	19 (65.5)	
squamous cell carcinoma	2 (28.6)	4 (13.8)	
large cell carcinoma	2 (28.6)	2 (6.8)	
sarcomatoid carcinoma	0 (0.0)	2 (6.9)	
other	0 (0.0)	2 (6.9)	
Drug associatedwithplatinum			0.238
gemcitabine	2 (28.6)	19 (65.5)	
taxan	4 (57.1)	8 (27.6)	
etoposide	1 (14.3)	1 (3.4)	
ifosamide - etoposide	0 (0.0)	1 (3.4)	
Molecularabnormalities			
Kras mutation	1 (14.3)	1 (5.6)	0.922
EGFR mutation	0 (0.0)	4 (19.0)	0.710
ALK translocation	1 (14.3)	1 (3.6)	0.856

N: never smoker; FS: former smoker; CS: current smoker

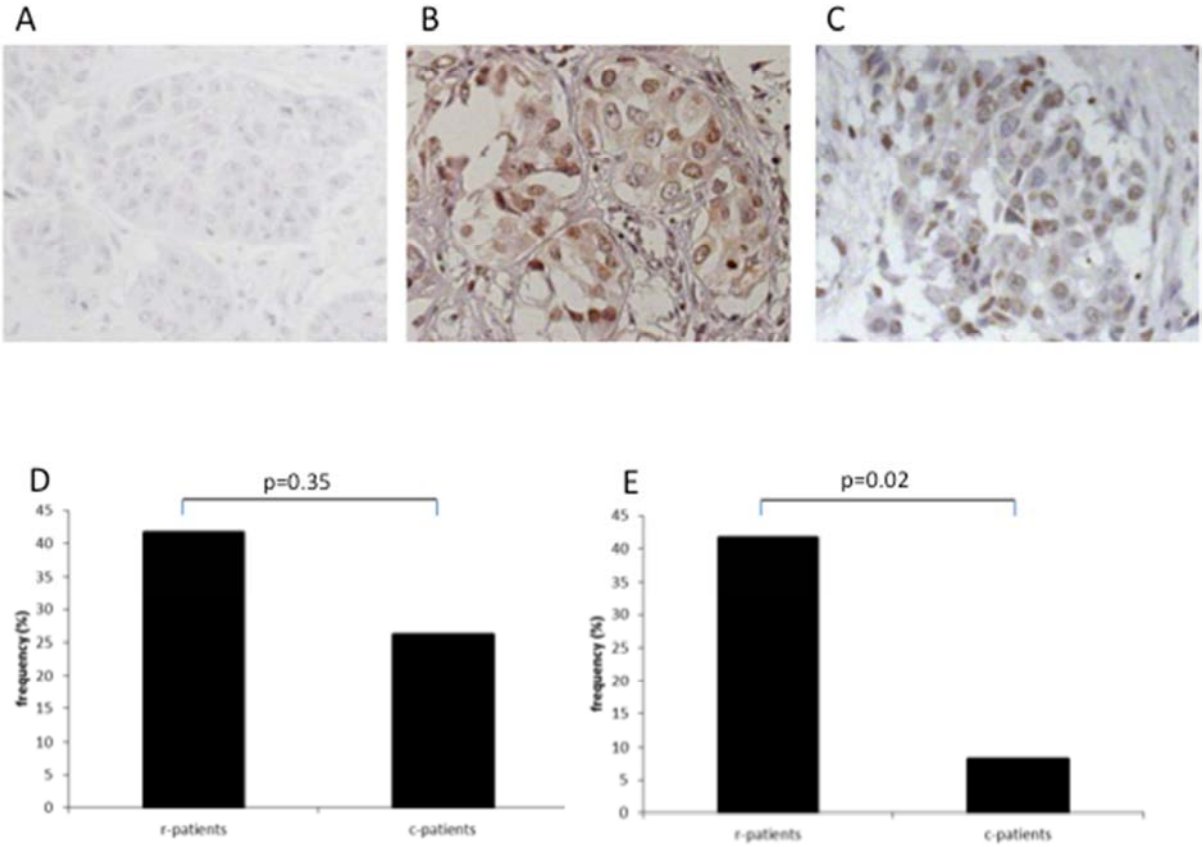
Table 3: Multivariate analysis on PFS

Variable	p-value	HR	IC25%	IC95%
sarcomatoidsubtype	0.004	14.286	2.298	83.333
Gli2-positive score	0.038	2.642	1.054	6.627
Kras mutation	0.266	2.879	0.447	18.526
gender	0.849	1,086	0.467	2.525

Table 4: Multivariate analysis on OS

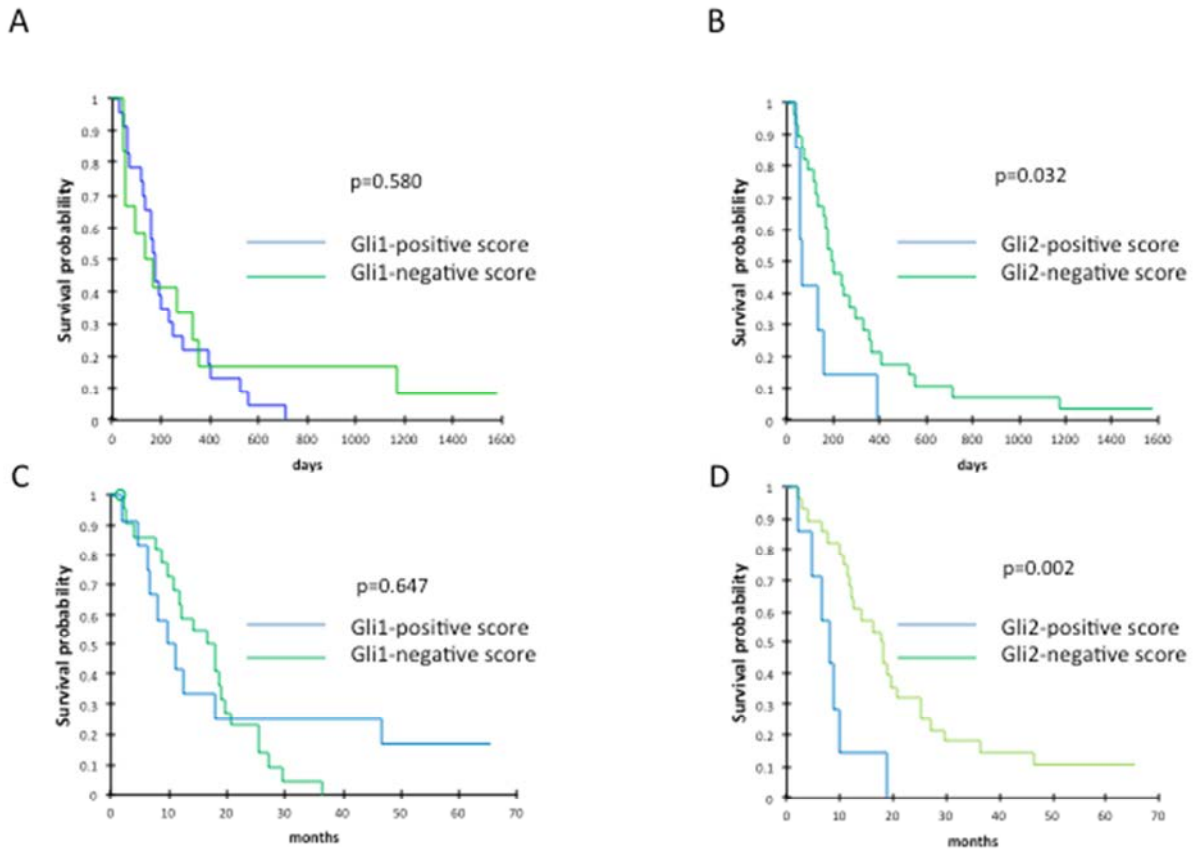
Variable	p-value	HR	IC25%	IC95%
Gli2-positive score	0.003	4.359	1.672	11.363
gender	0.230	0.582	0.240	1.408
Kras mutation	0.443	2.001	0.340	11.760
Sarcomatoid subtype	0.640	1.675	0.193	14.493

Figure 1: R-patients have more often Gli2-positive score tumors than c-patients.



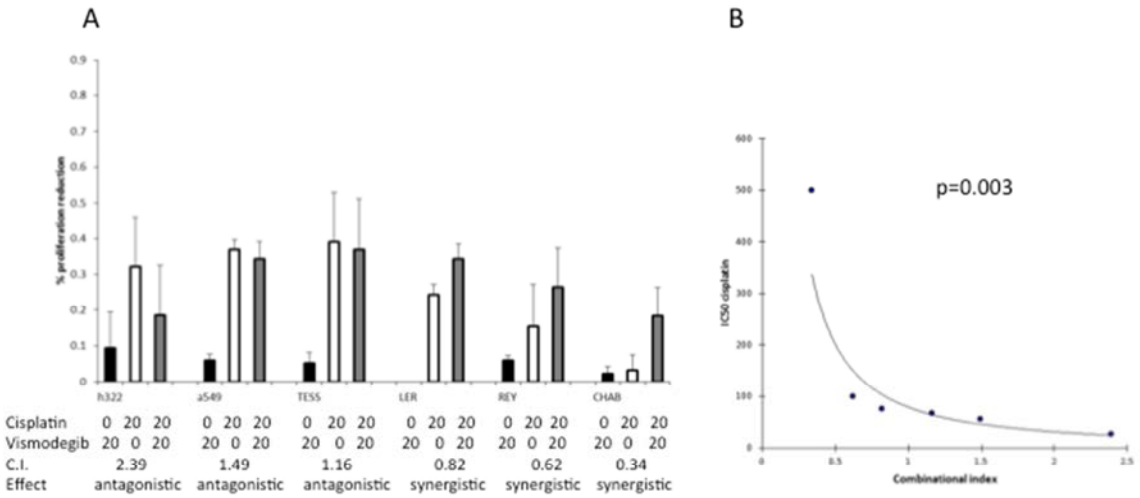
A: example of a Gli2-negative tumor (x200). **B and C:** examples of Gli2- positive tumors (x200). **D:** proportion of r-patients and c-patients with Gli1-positive score. **E:** proportion of r-patients and c-patients with Gli2-positive score.

Figure 2: Gli2-positive score is associated with shorter PFS and shorter OS.



A-B: PFS. **C-D:** OS. **A and C:** Gli1 score. **B and D:** Gli2 score. P-values were calculated with log-rank test.

Figure 3: Synergistic effects of vismodegib with cisplatin.



A: cells were treated with vismodegib, cisplatin and combination (cisplatin + vismodegib) at the concentrations indicated in the figure. Cell proliferation was measured by WST-1 assay at d2 of drug treatment. The combinational effects were further quantified by the Chou-Talalay Method to obtain the Combinational Index (CI), where CI <1, =1, >1 represent synergism, additive effect, and antagonism respectively. **B:** correlation between IC50 of cisplatin of the different cell lines and the CI. P-value was calculated with Spearman test.

4. Etude de l'interaction entre l'activation de la voie Shh et la TEM dans les carcinomes épidermoïdes bronchiques

4.1. Article 4

Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Tseng HH, Jin JQ, Luh TM, Giroux Leprieur E, Mo M, Zheng Q, Shi H, Zhang H, Hao X, Wang C, Jablons DM, He B. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, Volume 33, n°1, Avril 2014, page 34.

4.2. Présentation de l'article et commentaires

La TEM correspond à l'acquisition par la cellule tumorale d'un phénotype mésenchymateux. Ce phénotype va permettre à la cellule tumorale d'obtenir des capacités de migration, de formation de métastases à distance, et de résistance à la chimiothérapie (Brabletz 2001, Thiery 2002, Fidler 2008, Yang 2008). Plusieurs travaux ont ainsi pu montrer un lien direct entre TEM et résistance à la chimiothérapie dans les cancers bronchiques (Ren 2013, Canadas 2014, Wang 2014). De plus, la TEM semble jouer un rôle important dans les carcinomes sarcomatoïdes, résistants à la chimiothérapie (Vieira 2012). Nous avons évalué la corrélation entre l'activation de la voie Shh et la TEM dans les carcinomes épidermoïdes bronchiques. Nous avons montré que la voie Shh était activée dans le carcinome épidermoïde, par l'analyse en IHC (Shh, Ptch1 et Gli1) de 177 prélèvements chirurgicaux de patients opérés pour carcinome épidermoïde de stade précoce (cohorte A). Ensuite nous avons montré qu'il existait une corrélation inverse entre le niveau d'expression de Gli1 (côté de 0 à 3 en fonction de l'intensité du marquage nucléaire) et celui d'E-cadhérine, qui est un marqueur épithélial, à la

fois sur les prélèvements de la cohorte A, sur une seconde cohorte de carcinomes épidermoïdes (cohorte B, n=14), et sur des lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes bronchiques (H17063, H1869, H2170, SK-MES-1). L'expression de Gli1 était statistiquement associée à la survie sans récidive et la survie sans métastases (test de Kappa, p=0,033). L'inhibition *in vitro* de la voie Shh par vismodegib ou petite molécule inhibitrice de Gli (Bosco-Clement 2014) entraînait une inhibition de la migration cellulaire des différentes lignées et une expression d'E-cadhérine. La stimulation de la voie Shh par traitement par protéine Shh recombinante entraînait une stimulation de la migration cellulaire et une inhibition de l'expression d'E-cadhérine.

Ces résultats démontrent donc une corrélation entre l'activation de la voie Shh et la TEM dans les carcinomes épidermoïdes bronchiques. Cette étude confirme également le lien entre la TEM, la récidive tumorale et la dissémination métastatique (Maitah 2011).

Yue et al. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2014, 33:34
http://www.jeccr.com/content/33/1/34

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research

RESEARCH Open Access

Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas

Dongsheng Yue[1,2,3†], Hui Li[3†], Juanjuan Che[4†], Yi Zhang[5], Hsin-Hui K Tseng[3], Joy Q Jin[3], Thomas M Luh[3], Etienne Giroux-Leprieur[3], Minli Mo[6], Qingfeng Zheng[3,7], Huaiyin Shi[8], Hua Zhang[1,2], Xishan Hao[1,2*], Changli Wang[1,2], David M Jablons[3] and Biao He[3*]

Abstract

Background: Squamous cell carcinomas (SCC) account for approximately 30% of non-small cell lung cancer. Investigation of the mechanism of invasion and metastasis of lung SCC will be of great help for the development of meaningful targeted therapeutics. This study is intended to understand whether the activation of Hedgehog (Hh) pathway is involved in lung SCC, and whether activated Hh signaling regulates metastasis through epithelial-mesenchymal transition (EMT) in lung SCC.

Methods: Two cohorts of patients with lung SCC were studied. Protein expression was examined by immunohistochemistry, Western blot, or immunofluorescence. Protein expression levels in tissue specimens were scored and correlations were analyzed. Vismodegib and a Gli inhibitor were used to inhibit Shh/Gli activity, and recombinant Shh proteins were used to stimulate the Hh pathway in lung SCC cell lines. Cell migration assay was performed *in vitro*.

Results: Shh/Gli pathway components were aberrantly expressed in lung SCC tissue samples. Gli1 expression was reversely associated with the expression of EMT markers E-Cadherin and β-Catenin in lung SCC specimens. Inhibition of the Shh/Gli pathway suppressed migration and up-regulated E-Cadherin expression in lung SCC cells. Stimulation of the pathway increased migration and down-regulated E-Cadherin expression in lung SCC cells.

Conclusions: Our results suggested that the Shh/Gli pathway may be critical for lung SCC recurrence, metastasis and resistance to chemotherapy. Inhibition of the Shh/Gli pathway activity/function is a potential therapeutic strategy for the treatment of lung SCC patients.

Keywords: Sonic Hedgehog, Gli, EMT, Lung squamous cell carcinoma

Background

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide. 85% of lung cancer is non-small cell lung cancer (NSCLC), with adenocarcinoma (AD) and squamous cell carcinoma (SCC) as the two major pathological subtypes [1]. Lung SCC is closely associated with tobacco smoking, and it accounts 35% of NSCLC, causing an estimated 400,000 deaths per year worldwide [2]. While recent improvements in targeted therapies such as the EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI), bevacizumab and ALK inhibitors have significantly benefited patients with AD, the effectiveness of these treatments are unfortunately disappointing for lung SCC [3]. Lung SCC patients suffer from poor prognosis with significant rates of reoccurrence and metastasis, largely due to the differences in genetic profiles [4]. Recent studies identified potentially actionable genetic abnormalities in lung SCC, such as phosphoinositide 3-kinase (PIK3CA) amplification, fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification, and discoidin domain receptor 2 (DDR2) mutation. However, significant efforts are still needed to help in the investigation of the

* Correspondence: yuedongsheng_cg@163.com; biao.he@ucsfmedctr.org
†Equal contributors
[1]Department of Lung Cancer, Lung Cancer Center, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China
[3]Department of Surgery, Thoracic Oncology Program, Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, CA 94115, USA
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Yue et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

biological characteristics of lung SCC in order to decipher and the mechanism underlying the invasion and metastasis of lung SCC.

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) was originally characterized during embryonic development. The concept that EMT being a critical event in the invasion, progression and metastasis of epithelial cancers is well established [5,6]. The molecular basis of EMT involves multiple changes in expression, distribution, and/or function of proteins, i.e. E-cadherin, and the process of EMT is regulated by many molecular events including multiple signaling pathways in various cancers [5]. Furthermore, acquisition of the features of the EMT has been associated with poor prognosis and chemo-resistance, which may allow for recurrence and metastasis to occur after treatment with a standard chemotherapeutic treatment [7-10]. The mechanistic study of EMT regulation could contribute to our understanding of recurrence and metastasis in cancer.

Activation of Hedgehog (Hh) signaling has been implicated in tumorigenesis and metastasis in various cancer types [11-23]. Hh signaling is orchestrated by two transmembrane receptors, Patched (Ptch) and Smoothened (Smo). In the canonical Hh pathway, in the absence of the Hh ligand, Ptch inhibits Smo, causing cleavage of Gli to the N-terminal repressor form. Once Hh binds to Ptch, the inhibitory effect on Smo is released, causing active full-length Gli to transport into the nucleus and activate transcription of Hh target genes in a context- and cell-type specific manner. Moreover, several studies have revealed "non-canonical Gli activation" in many cancer cell types by which Gli is activated independent of Hh/Smo regulation [12,14]. It needs to be elucidated if the canonical Hh pathway or the non-canonical Gli activation is involved in lung SCC, and if Gli activation contributes to the regulation of metastasis.

Studies of EMT regulation by Hh pathway have recently emerged in literature; data, however, is rare and controversial. While Alexaki et al. [24] and Inaguma et al. [25] suggested that Gli-factor facilitates cancer cell migration and invasion through E-Cadherin in melanoma and pancreatic cancers, Joost et al. [26] proposed that inhibition of Gli promoted EMT in pancreatic cancers. Our study intends to extend the research to lung SCC to help us better understand the regulation of EMT by Hh signaling.

We reported the activation of Hh signaling in two cohorts of patient samples, and revealed the reverse association between Gli1 expression and the expression of EMT markers. Inhibition of the Shh/Gli pathway suppressed migration and up-regulated E-Cadherin expression in lung SCC cells. Stimulation of the pathway increased migration and down-regulated E-Cadherin expression in lung SCC cells.

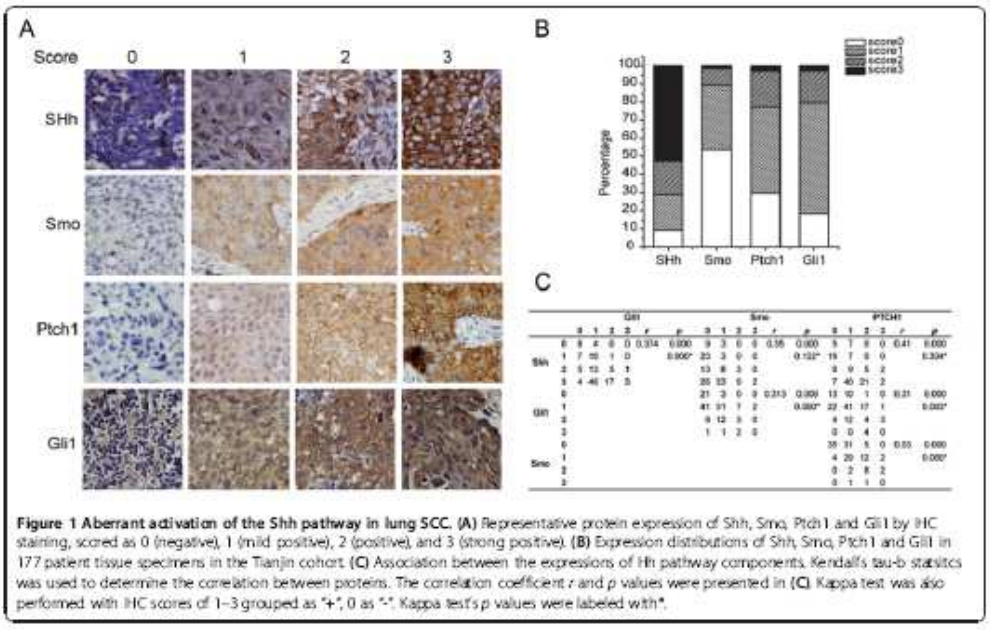


Figure 1 Aberrant activation of the Shh pathway in lung SCC. **(A)** Representative protein expression of Shh, Smo, Ptch1 and Gli1 by IHC staining, scored as 0 (negative), 1 (mild positive), 2 (positive), and 3 (strong positive). **(B)** Expression distributions of Shh, Smo, Ptch1 and Gli1 in 177 patient tissue specimens in the Tianjin cohort. **(C)** Association between the expressions of Hh pathway components. Kendall's tau-b statistics was used to determine the correlation between proteins. The correlation coefficient *r* and *p* values were presented in (C). Kappa test was also performed with IHC scores of 1–3 grouped as "+", 0 as "-". Kappa test's *p* values were labeled with *.

Materials and methods

Tissue specimens

Tissue specimens of the UCSF cohort were collected from 14 patients who underwent surgical resection for lung SCC at the Thoracic Oncology Program at UCSF. Tissue specimens of the Tianjin cohort were collected from 177 patients who underwent surgical resection for lung SCC at the Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital. Samples were fixed in formalin and embedded in paraffin to make tissue slides. The study with UCSF patient tissues was approved by the Committee on Human Research (CHR approval number: H8714-11647-10) at the University of California, San Francisco (UCSF), and that with Tianjin cohort was approved by the Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital. Written, informed consent was obtained from each patient before specimen collection.

Immunohistochemistry (IHC), immunofluorescence (IF) and Western blot

Immunohistochemistry, immunofluorescence and western blot were performed following standard procedures. Antibodies applied to detect protein expressions in IHC and IF were Gli1 (sc-20687 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at 1:100, Shh (ab 50515 Abcam, Cambridge, MA) at 1:100, Smo (ab 72130 Abcam) at 1:200, Ptch1 (Santa Cruz that Biotechnology,) and E-Cadherin (EMD Millipore) Smo (Sigma, St. Louis, MO) at 1:100, E-cadherin (sc-7870, Santa Cruz Biotechnology) at 1:100, and β-catenin (BD Biosciences, San Jose, California) at 1:400. Antibodies used in Western blot were Gli (C68H3, Abcam) at 1:1000, E-Cad (HECD-1 MED Milliopore, Darmstadt, Germany) at 1:1000 and Actin (A5441, Sigma) at 1:5000. Total protein extraction was performed with M-PER Mammalian Protein Extraction Solution (Thermo Scientific, Waltham, MA), and 40ug of proteins were analyzed in Western blot.

Cell culture, drug treatment and migration assay

Human lung SCC cell lines H2170, H1703, H1869 and SK-MES-1 were purchased from the Cell Culture Core Facility at Harvard University (Boston, MA, USA). The cell lines were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Cells were seeded one day before treatment with Gli-I and vismodegib (Selleck) at different concentrations and Shh recombinant proteins (eBioscience) for 30 hours, with vehicle (DMSO) as controls. Cells were subjected to the following analyses of immunofluorescence and migration assay. In migration assays, four wounds were made in each condition, and cell migration was presented by the average of distance differences between 30 hr and 0 hr. All experiments have been conducted for more than three times, and representative results were included in the text.

Statistical analysis

Kappa test was used to evaluate the association between the expressions of Hh pathway components and EMT markers, and between Gli1 and recurrence/metastasis. IHC scores of 1–3 were grouped as positive "+" , and 0 was grouped as negative "-" for dichotomized analysis. Non-parametric Kendall's tau-b statistics was used to determine the correlation between IHC staining of Hh components. Two-sided student's t-test was performed for migration assays. A p value <0.05 was indicated as *, 0.01 as **, and 0.001 as *** in corresponding figures. Data analysis was performed using SPSS 17.0 software.

Results and discussion

Aberrant activation of the Shh pathway in lung SCC

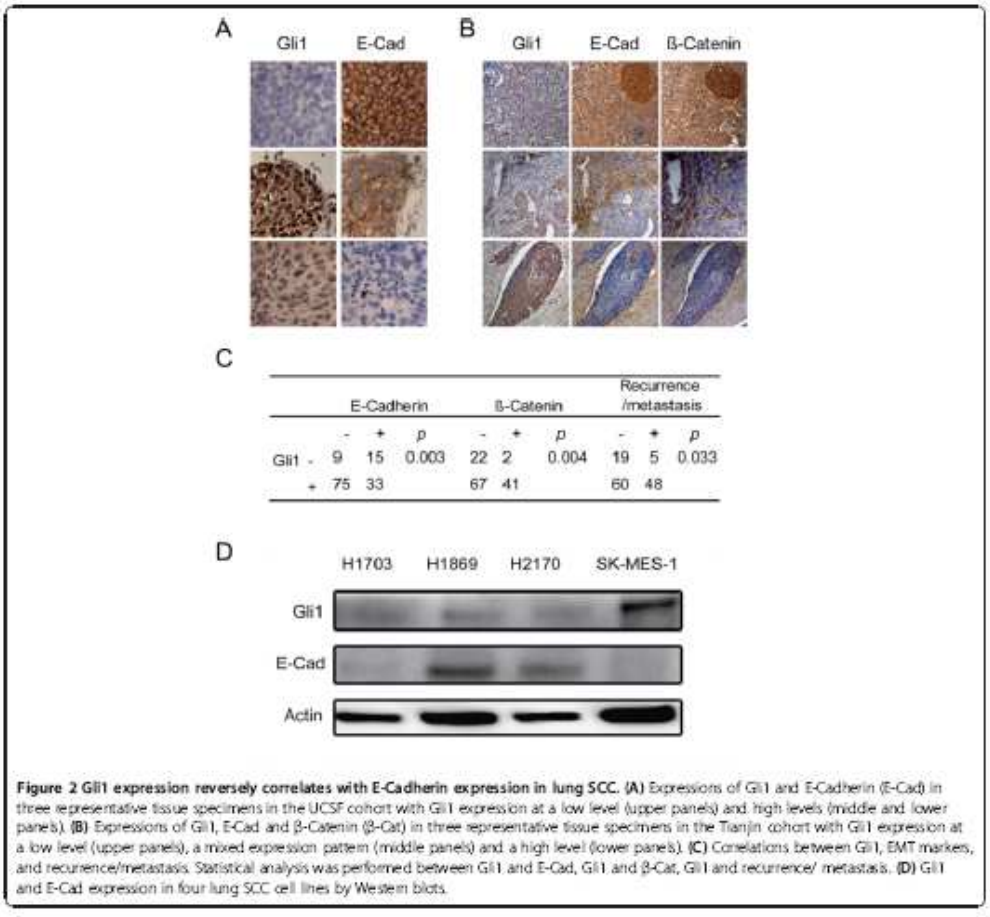
We first investigated the protein expression of key Shh pathway components in lung SCC tissue samples.

Table 1 Characteristics of the lung SCC patients (Tianjin cohort)

Characteristics	No	Percent
Age (Years)		
<60	71	40.1%
≥60	106	59.9%
Gender		
Male	151	85.3%
Female	26	14.7%
Smoking history		
Never	29	16.4%
Smoker	148	83.6%
Surgical Procedure		
Lobectomy	143	80.8%
Pneumonectomy	30	16.9%
Extend	4	2.3%
T stage		
T1	45	25.4%
T2	107	60.5%
T3	25	14.1%
N stage		
N0	126	71.2%
N1	16	9.0%
N2	35	19.8%
TNM Stage		
I	91	51.4%
II	48	27.1%
IIIA	38	21.5%

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens were collected from 177 lung SCC patients who underwent surgical resection at the Lung Cancer Center at Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital. The protein expressions of Shh, Smo, Ptch1 and Gli1 were characterized by immunohistochemistry (IHC), and scored on a scale of 0–3 (negative, mild positive, positive, and strong positive). Representative samples in each score category were summarized in Figure 1A. More than 90% of the lung SCC tissue samples examined were positive for the signal molecule Shh, while 53% and 61% were positive for downstream components and transcriptional targets Ptch1 and Gli1 respectively (Figure 1B). Previous studies have demonstrated limited expressions of Shh components in normal lung tissues at the mRNA and protein levels in NSCLC [27,28], therefore the expression of key Shh signaling components indicates the activation of Shh pathway. No significant association was found between expressions of Shh, Smo, Ptch1 and Gli1 and patients' characteristics (sex, age, tumor size, or degree of tumor differentiation) (Table 1) ($P > 0.05$, data note shown).

Next we analyzed the association between expressions of key components in the Shh pathway. Kendall's tau-b correlation tests yielded significant correlations between every two factors ($p = 0.000$), while Kappa's test suggested strong positive association between SHh and Gli1 ($p = 0.000$) (Figure 1C), suggesting the canonical Shh pathway is activated in lung SCC. These data are consistent



		E-Cadherin			ß-Catenin			Recurrence /metastasis		
		-	+	p	-	+	p	-	+	p
Gli1	-	9	15	0.003	22	2	0.004	19	5	0.033
	+	75	33		67	41		60	48	

Figure 2 Gli1 expression reversely correlates with E-Cadherin expression in lung SCC. (A) Expressions of Gli1 and E-Cadherin (E-Cad) in three representative tissue specimens in the UCSF cohort with Gli1 expression at a low level (upper panels) and high levels (middle and lower panels). **(B)** Expressions of Gli1, E-Cad and β-Catenin (β-Cat) in three representative tissue specimens in the Tianjin cohort with Gli1 expression at a low level (upper panels), a mixed expression pattern (middle panels) and a high level (lower panels). **(C)** Correlations between Gli1, EMT markers, and recurrence/metastasis. Statistical analysis was performed between Gli1 and E-Cad, Gli1 and β-Cat, Gli1 and recurrence/ metastasis. **(D)** Gli1 and E-Cad expression in four lung SCC cell lines by Western blots.

with previous reports that the upstream Shh signaling has correlations with downstream targets in NSCLC [29,30]. Taken together, our results suggest that aberrant activation of the Shh pathway plays an important role in lung SCC.

Gli expression reversely correlates with EMT markers

E-Cadherin is a well-established EMT biomarker, and its expression has been suggested to be associated with cancer recurrence and metastasis [5]. The expression of β-Catenin also serves as a biomarker for EMT [31]. To investigate whether the Shh/Gli signaling plays a role in EMT regulation in lung SCC, we first examined 14 lung SCC patients who underwent surgical resection for lung SCC at the Thoracic Oncology Program at UCSF. Eight of fourteen samples showed reverse correlation between E-Cadherin and Gli1 expressions (three representative samples were shown in Figure 2A). To confirm the reverse correlation between EMT markers and Gli1 expressions in lung SCC, we further analyzed E-Cadherin and β-Catenin expressions and correlated with Gli1 expression in the Tianjin cohort. Our results revealed strong reverse correlations between Gli1 and E-Cadherin ($p = 0.003$), as well as Gli1 and β-Catenin ($p = 0.004$) (Figures 2B and C). We also observed reverse correlation between Gli1 and E-Cadherin expression at different areas within one sample in multiple cases due to the heterogeneity of tumor cells (Figure 2), further supporting the reverse correlation between Gli1 and EMT marker expressions. Moreover, our analysis revealed that Gli1 significantly correlated with recurrence and metastasis of lung SCC in the Tianjin cohort ($p = 0.033$; Figure 2C). Consistent with the tissue expression analysis, we observed that Gli1 expression reversely correlated with E-Cadherin expression in four human lung SCC cell lines, H1703, H1869, H2170 and SK-MES-1 (Figure 2D). Taken together, our results indicate the essential role of Gli1, a downstream effector

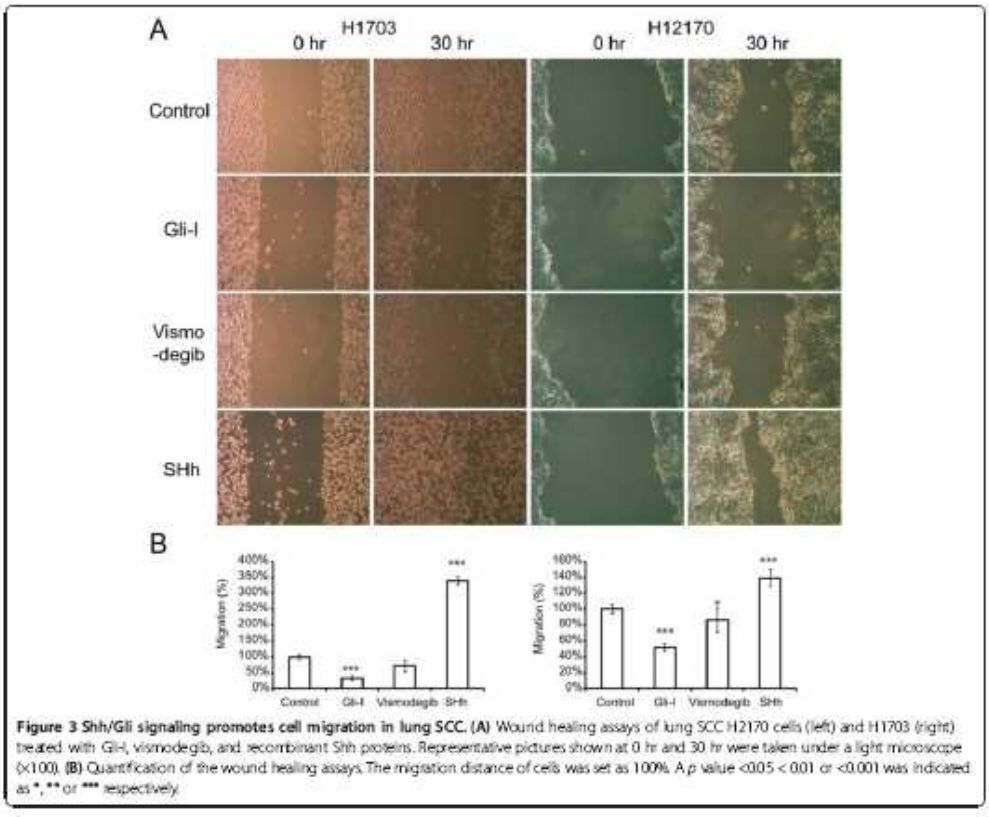


Figure 3 Shh/Gli signaling promotes cell migration in lung SCC. (A) Wound healing assays of lung SCC H2170 cells (left) and H1703 (right) treated with Gli-I, vismodegib, and recombinant Shh proteins. Representative pictures shown at 0 hr and 30 hr were taken under a light microscope (×100). **(B)** Quantification of the wound healing assays. The migration distance of cells was set as 100%. A p value <0.05 < 0.01 or <0.001 was indicated as *, ** or *** respectively.

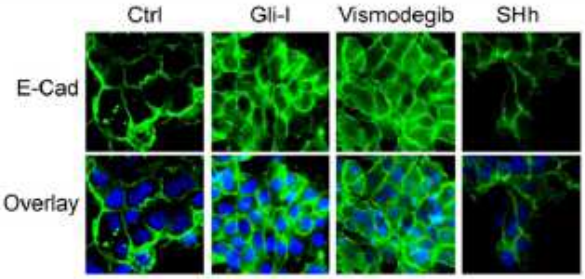


Figure 4 Shh/Gli signaling down-regulates E-Cadherin expression. Immunofluorescent staining of E-Cad (green) in lung SCC H2170 cells treated with Gli-I, vismodegib, and recombinant Shh proteins. DAPI (blue) was used to stain nuclei of those cells.

of Shh pathway, in enhancing EMT, which in turn promotes recurrence and metastasis in lung SCC.

Shh/Gli signaling promotes cell migration by down-regulating E-Cadherin expression

To further understand the role of Shh/Gli in EMT regulation in lung SCC, we manipulated the Shh/Gli signaling pathway in lung SCC cell lines to examine its impact on cell migration and E-Cadherin expression. To inhibit the Shh/Gli activity, we applied two small molecule compounds: Vismodegib and a novel Gli inhibitor. Vismodegib (also known as GDC-0449) is a Smo inhibitor recently approved by the U.S. Food and Drug Administration to treat adult patients with basal cell carcinoma [32-35]. Multiple clinical trials are evaluating the use of vismodegib in other types of cancer, in addition to other candidate drugs that targets Hh signaling [32,36]. The novel Gli inhibitor (Gli-I) developed by our lab specifically inhibits Gli1 and Gli2 transcriptional activity [28]. To stimulate the pathway, we applied recombinant Shh proteins.

We first performed cell migration assay in lung SCC cell lines H1703 and H2170 after the treatments with either Shh/Gli inhibitors or recombinant Shh proteins. Cells treated with Vismodegib and Gli-I exhibited significantly slower migration in 30 hours; on the other hand, cells stimulated by Shh proteins migrated significantly faster (Figure 3). This data strongly suggests that Shh/Gli signaling plays an essential role in regulating the migration of lung SCC cells. Next we examined E-Cadherin expression in these cells by immunofluorescence staining. We observed that E-Cadherin expression was up-regulated in those lung SCC cells treated with Shh/Gli inhibitors and down-regulated in the cells stimulated by Shh proteins (Figure 4). This is consistent with the mobility of lung SCC cells after the different treatments (Figure 3). Therefore, our results indicate that Shh/Gli signaling may promote cell migration by down-regulating E-Cadherin expression in lung SCC.

Conclusions

Our study provides evidence for aberrant activation of Shh/Gli pathway and a strong association between expressions of Gli proteins and EMT markers in human lung SCC, as well as the implication of activated Shh/Gli pathway in cell migration and EMT process. Our findings suggest that the Shh/Gli pathway may be a critical component in lung SCC recurrence, metastasis and resistance to chemotherapy. Inhibition of the Shh/Gli pathway activity/function is a potential therapeutic strategy for the treatment of lung SCC patients.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DY carried out IHC staining, data analysis, and drafting of the manuscript. HL carried out IF staining, Western blotting, data analysis and drafting of the manuscript. JC, YZ, MM, QZ, and HZ carried out IHC staining and data analysis. HS carried out statistical analysis. HT, JJ, TL, and BG-L carried out the cell cultures and cell-based assays. DMJ participated in the study design and helped to draft the manuscript. CW, XH and BH conceived of the study, and participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by NIH/NCI R01CA125030, and the Eileen D. Ludwig Endowed for Thoracic Oncology Research (to B He); The Bonnie J. Addario Lung Cancer Foundation, the Kazan, McClain, Abrams, Fernandez, Lyons, Greenwood, Harley & Oberman Foundation, the Ziegelman Family Foundation, and the Barbara Isackson Lung Cancer Research Fund (to DM Jablons); Tianjin Municipal Science and Technology Commission (12JCYBJC17800) and the Key Program for Anti-cancer Research of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (12ZCDZSY15400) (to CL Wang).

Author details

[1]Department of Lung Cancer, Lung Cancer Center, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China. [2]Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, National Clinical Research Center of Cancer, Tianjin 300060, China. [3]Department of Surgery, Thoracic Oncology Program, Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, CA 94115, USA. [4]Department of Oncology, Beijing Friendship Hospital of Capital Medical University, Beijing 100050, China. [5]Department of Thoracic Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China. [6]School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 10084, China. [7]Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry

of Education), Thoracic Surgery II, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China. [2]Department of pathology, Chinese PLA General Hospital, Fu-xing Road #28, Beijing 100853, China.

Received: 21 February 2014 Accepted: 15 April 2014
Published: 24 April 2014

References

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2014, 64:9–29.
2. Travis WD: Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2012, 32:669.
3. Drilon A, Rekhtman N, Ladanyi M, Paik P: Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *Lancet Oncol* 2012, 13:E418–E426.
4. Little AG, Gay EG, Gaspar LE, Stewart AK: National survey of non-small cell lung cancer in the United States: Epidemiology, pathology and patterns of care. *Lung Cancer* 2007, 57:253–260.
5. de Craene B, Berx G: Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013, 13:97–110.
6. Hong KO, Kim JH, Hong JS, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD: Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009, 28:28–38.
7. Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, Weder W, Moch H, Kristiansen G: Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008, 14:7430–7437.
8. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ: Direct regulation of TWIST by HIF-1 alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008, 10:295–305.
9. Vendrell JA, Thollet A, Nguyen NT, Ghayad SE, Vinot S, Bieche I, Grisard E, Josserand V, Coll JL, Roux P, Corbo L, Treilleux I, Rimokh R, Cohen PA: ZNF217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial-mesenchymal transition and invasion. *Cancer Res* 2012, 72:3593–3606.
10. van den Broeck A, Vankelecom H, van Eijsden R, Govaere O, Topal B: Molecular markers associated with outcome and metastasis in human pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2012, 31:68–77.
11. Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R: Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:8455–8460.
12. Lauth M, Toftgard R: Non-canonical activation of GLI transcription factors. *Cell Cycle* 2007, 6:2458–2463.
13. Lauth M, Toftgard R: The Hedgehog pathway as a drug target in cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2007, 8:457–461.
14. Mimeault M, Batra SK: Frequent deregulations in the Hedgehog signaling network and cross-talks with the epidermal growth factor receptor pathway involved in cancer progression and targeted therapies. *Pharmacol Rev* 2010, 62:497–524.
15. Stanton BZ, Peng LF: Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mole Biosyst* 2010, 6:44–54.
16. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Unden AB: Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* 2006, 208:17–25.
17. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B: Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Cytogenet Cell Genet* 1987, 46:639–639.
18. Chi SM, Huang SH, Li CX, Zhang XL, He NG, Bhutani MS, Jones D, Castro CY, Logrono R, Haque A, Zwischenberger J, Tyring SK, Zhang H, Xie J: Activation of the hedgehog pathway in a subset of lung cancers. *Cancer Lett* 2006, 244:53–60.
19. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ: Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 2006, 24:1924–1931.
20. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M: Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003, 425:851–856.
21. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D: Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002, 31:306–310.
22. Li H, Lui N, Cheng T, Tseng HHK, Yue DS, Giroux-Leprieur E, Do HT, Sheng Q, Jin JQ, Luh TW, Jablons DM, He B: Gli as a novel therapeutic target in malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 2013, 8:e57346.
23. Long B, Zhu HL, Zhu CX, Liu T, Meng WT: Activation of the hedgehog pathway in chronic myelogeneous leukemia patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2011, 30:8–12.
24. Alexaki VI, Javelaud D, van Kempen LCL, Mohammad KS, Dennler S, Luciani F, Hoek KS, Juárez P, Goydos JS, Fournier PJ, Sibon C, Bertolotto C, Verrecchia F, Saule S, Delmas V, Ballotti R, Larue L, Saiag P, Guise TA, Mauviel A: Gli2-mediated melanoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2010, 102:1148–1159.
25. Inaguma S, Kasai K, Hashimoto M, Ikeda H: GLI1 modulates EMT in pancreatic cancer-letter. *Cancer Res* 2012, 72:3702–3703.
26. Joost S, Almada LL, Rohnalter V, Holz PS, Vrabel AM, Fernandez-Barrena MG, McWilliams RR, Krause M, Fernandez-Zapico ME, Lauth M: GLI1 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2012, 72:88–99.
27. Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, Memoli VA, Dmitrovsky E, Robbins DJ: Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2007, 26:1046–1055.
28. Bosco-Clement G, Zhang F, Chen Z, Zhou HM, Li H, Mikami I, Hirata T, Yagui-Beltran A, Lui N, Do HT, Cheng T, Tseng HH, Choi H, Fang LT, Kim IJ, Yue D, Wang C, Zheng Q, Fujii N, Mann M, Jablons DM, He B: Targeting Gli transcription activation by small molecule suppresses tumor growth. *Oncogene* 2013, 33:2087–2097.
29. Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, Varakis J, Kourea H, Papadaki H: Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 2009, 6 6664–74.
30. Raz G, Allen KE, Kingsley C, Cherni I, Arora S, Watanabe A, Lorenzo CD, Edwards VDK, Sridhar S, Hostetter G, Weiss GJ: Hedgehog signaling pathway molecules and ALDH1A1 expression in early-stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012, 76:191–196.
31. Azmi AS: Unveiling the role of nuclear transport in epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Cancer Drug Targets* 2013, 13:906–914.
32. Ng JMY, Curran T: The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:493–501.
33. LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Chang I, Darbonne WC, Graham RA, Zerivitz KL, Low JA, Von Hoff DD: Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clin Cancer Res* 2011, 17:2502–2511.
34. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, Solomon JA, Yoo S, Arron ST, Friedlander PA, Marmur E, Rudin CM, Chang AL, Low JA, Mackey HM, Yauch RL, Graham RA, Reddy JC, Hauschild A: Efficacy and safety of Vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2012, 366:2171–2179.
35. Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P: Vismodegib. *Nat Rev Drug Discov* 2012, 11:437–438.
36. Agarwal V, Lind MJ, Cawkwell L: Targeted epidermal growth factor receptor therapy in malignant pleural mesothelioma: Where do we stand? *Cancer Treat Rev* 2011, 37:533–542.

doi:10.1186/1756-9966-33-34
Cite this article as: Yue *et al.*: Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2014 33:34.

5. Activation de la voie Shh et chimiorésistance : exemple du mésothéliome pleural malin (MPM)

5.1. Article 5

Li H, Lui N, Cheng T, Tseng HH, Yue D, Giroux Leprieur E, Do HT, Sheng Q, Jin JQ, Luh TW, Jablons DM, He B. Gli as a Novel Therapeutic Target in Malignant Pleural Mesothelioma. **PlosOne**, Volume 8, n° 3, 2013, page e57346.

5.2. Présentation de l'article et commentaires

Le MPM est une tumeur maligne primitive de la plèvre, réputée chimiorésistante (Campbell 2013). La chimiothérapie de 1^{ière} ligne standard est l'association cisplatine et pemetrexed, et la survie médiane est de l'ordre de 12 mois (Vogelzang 2003). Actuellement, aucune signature moléculaire d'addiction oncogénique n'a pu être mise en évidence (Campbell 2013). Certains travaux ont suggéré une activation de la voie Shh dans le MPM. Ainsi, une surexpression des protéines de la voie Shh a été mise en évidence dans le tissu pleural tumoral et pas dans le tissu pleural normal (Shi 2012). Sur des modèles de cultures primaires de MPM, l'inhibition de Smo entraîne une diminution significative de la croissance cellulaire tumorale via l'inhibition de Gli. Enfin, l'inhibition de Smo a également une action anti-tumorale *in vivo* sur des modèles de xénogreffes animales (Shi 2012).

Dans ce travail, nous avons étudié l'activation de la voie Shh dans le MPM par IHC et RT-PCR, et testé l'impact de l'inhibition de cette voie, via l'inhibition de Gli1 et Gli2, sur la croissance tumorale et la sensibilité à la chimiothérapie *in vitro*. L'inhibition de Gli1 et Gli2 a été réalisée par siARN, vismodegib, et par utilisation d'une petite molécule inhibitrice de Gli

(Gli-I (Bosco-Clement 2014)). L'expression de Gli1 et Gli2 en IHC a été cotée de 0 à 3 en fonction de l'intensité du marquage nucléaire, et a été étudiée 46 prélèvements chirurgicaux de MPM. Les anticorps utilisés ainsi que les scores d'expression étaient les mêmes que ceux de l'article N° XXX. Soixante pourcent et 80% des prélèvements avaient un marquage ≥2 pour Gli1 et Gli2, respectivement. Moins de 10% n'exprimaient pas du tout Gli1 ou Gli2 (marquage à 0). En RT-PCR, le niveau d'expression de Gli2 était 2,4 fois plus important dans le tissu tumoral que dans le tissu pleural normal, tandis que le niveau d'expression de Gli1 était sensiblement le même dans le tissu tumoral et le tissu normal. Les niveaux d'expression de Ptch1 et Ptch2 étaient 2,8 et 3,4 fois plus élevés dans le tissu tumoral que dans le tissu normal, respectivement. L'inhibition de Gli1 et de Gli2 entraînait une réduction importante de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de xénogreffes de lignées de MPM. L'ajout d'un inhibiteur de la voie Shh, vismodegib ou Gli-I, au pemetrexed avait un effet synergique sur l'effet cytotoxique. Par ailleurs, le double blocage de Smo (par vismodegib) et de Gli (par Gli-I) était plus efficace que chaque traitement utilisé seul sur la croissance tumorale. On notera enfin que l'inhibition directe de Gli semblait plus efficace que l'inhibition de Smo sur l'inhibition de la prolifération cellulaire. Cette différence d'activité pourrait être due à la présence d'une activation non-canonique de Gli (indépendante de Smo), comme cela a été évoqué dans la littérature (Lauth 2007, Mimeault 2010).

Nos résultats ont été confirmés par ceux d'une autre équipe (You 2014). Ces auteurs ont inhibé la voie Shh avec des inhibiteurs de Smo (vismodegib, itraconazole) ou inhibiteur de Gli (GANT61, trioxyde d'arsenic) sur 8 lignées de MPM. Ils ont mesuré la prolifération cellulaire par MTT et l'apoptose par cytométrie en flux (annexine V et iodure de propidium). Ces inhibiteurs entraînaient une diminution de l'expression de Gli1 évaluée par RT-PCR et une inhibition de la prolifération tumorale. L'expression de Gli2 n'a pas été évaluée dans cette

étude. L'itraconazole, le trioxyde d'arsenic et le GANT61 induisaient également une apoptose des cellules tumorales.

Ces résultats suggèrent un rôle de la voie Shh dans la prolifération et la chimiorésistance du MPM.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Gli as a Novel Therapeutic Target in Malignant Pleural Mesothelioma

Hui Li[1], Natalie Lui[1], Tiffany Cheng[1], Hsin-Hui K. Tseng[1], Dongsheng Yue[1,3], Etienne Giroux-Leprieur[1], Hanh T. Do[1], Qing Sheng[1,2], Joy Q. Jin[1], Thomas W. Luh[1], David M. Jablons[1], Biao He[1]*

1 Thoracic Oncology Program, Department of Surgery, University of California San Francisco, San Francisco, California, United States of America, 2 College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, P.R.China, 3 Department of Lung Cancer, Lung Cancer Center, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin, P.R.China

Abstract

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive tumor with poor prognosis. Current treatment is rarely curative, thus novel meaningful therapies are urgently needed. Inhibition of Hedgehog (Hh) signaling at the cell membrane level in several cancers has shown anti-cancer activity in recent clinical studies. Evidence of Hh-independent Gli activation suggests Gli as a more potent therapeutic target. The current study is aimed to evaluate the potential of Gli as a therapeutic target to treat MPM. The expression profiles of Gli factors and other Hh signaling components were characterized in 46 MPM patient tissue samples by RT-PCR and immunohistochemistry. Cultured cell lines were employed to investigate the requirement of Gli activation in tumor cell growth by inhibiting Gli through siRNA or a novel small molecule Gli inhibitor (Gli-I). A xenograft model was used to evaluate Gli-I *in vivo*. In addition, a side by side comparison between Gli and Smoothened (Smo) inhibition was conducted *in vitro* using siRNA and small molecule inhibitors. Our study reported aberrant Gli1 and Gli2 activation in a large majority of tissues. Inhibition of Gli by siRNAs or Gli-I suppressed cell growth dramatically both *in vitro* and *in vivo*. Inhibition of Gli exhibited better cytotoxicity than that of Smo by siRNA and small molecule inhibitors vismodegib and cyclopamine. Combination of Gli-I and pemetrexed, as well as Gli-I and vismodegib demonstrated synergistic effects in suppression of MPM proliferation *in vitro*. In summary, Gli activation plays a critical role in MPM. Inhibition of Gli function holds strong potential to become a novel, clinically effective approach to treat MPM.

Citation: Li H, Lui N, Cheng T, Tseng H-HK, Yue D, et al. (2013) Gli as a Novel Therapeutic Target in Malignant Pleural Mesothelioma. PLoS ONE 8(3): e57346. doi:10.1371/journal.pone.0057346

Editor: Jingwu Xie, Indiana University School of Medicine, United States of America

Received October 8, 2012; **Accepted** January 21, 2013; **Published** March 6, 2013

Copyright: © 2013 Li et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by NIH/NCI grant R01CA125030; the Eileen D. Ludwig Endowed for Thoracic Oncology Research (to BH); NIH/NCI grant R01CA132566; the Bonnie J. Addario Lung Cancer Foundation; the Kazan, McClain, Abrams, Fernandez, Lyons, Greenwood, Harley & Oberman Foundation; Paul and Michelle Zyglidbaum; the Honeywell Foundation; and the Jeffrey and Karen Peterson Family Foundation (to DMJ). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: biao.he@ucsfmedctr.org

Introduction

Malignant pleura mesothelioma (MPM) is an uncommon but inexorably fatal cancer that arises from the surface serosal cells of the pleura and, less frequently, from the peritoneum [1–3]. Treatment of MPM with surgery, chemotherapy, or radiation therapy is rarely curative with a median survival ranging from 10 to17 months [2]. Despite some promising results, long-term survival with currently available treatment is rare [3,4]. Therefore, novel meaningful therapies for MPM are urgently needed.

Currently, in spite of frequent observation of NF-kB, EGFR, and PI3K/AKT signaling deregulation in MPM cells, the molecular mechanism underlying tumorigenesis in MPM is poorly understood [1,5–7]. The Hedgehog (Hh) signaling pathway has been implicated in a wide variety of cancers, including leukemia, lung, brain, skin, head and neck, liver, gastrointestinal, colorectal, pancreatic, prostate, mammary, ovarian and renal carcinomas[8–12]. Therefore, exploring the role of the Hh pathway in MPM and inhibiting its aberrant activation holds great promise to provide novel and effective treatments for MPM patients.

In the quiescent state of the Hh pathway, the twelve-pass transmembrane receptor Patched-1 (Ptch1) restrains the activity of the seven-pass trans-membrane receptor Smoothened (Smo) [10,12]. Binding of Hh ligands to Ptch1 reverses the inhibitory effect on Smo. Activated Smo elicits a complex series of cytoplasmic signal transduction events resulting in activation of the Glioma-associated oncogene (Gli) family of transcription factors. The Gli transcription factors then translate the extra-cellular Hh-stimulus into defined transcriptional programs in a context-dependent and cell-type specific manner [10,12].

The aberrant activation of Hh signaling happens at several levels throughout the pathway, contributing to the development of many aggressive and metastatic cancers [12]. Conventionally, the frequent activation of the Hh pathway in tumors is thought to be mainly due to overexpression of ligands, loss of Ptch or constitutive active mutants of Smo [8,10,12]. Most efforts have been devoted to investigate the inhibition at the cell membrane level, i.e. Smo and Hh inhibitors [12]. The most clinically advanced example is vismodegib (also known as GDC-0449), which was newly approved by the U.S. Food and Drug Administration to treat adult patients with basal cell carcinoma [13–15]. Multiple clinical trials are evaluating the use of vismodegib in other types of cancer, as well as several other candidate drugs that target Hh signaling [12,15].

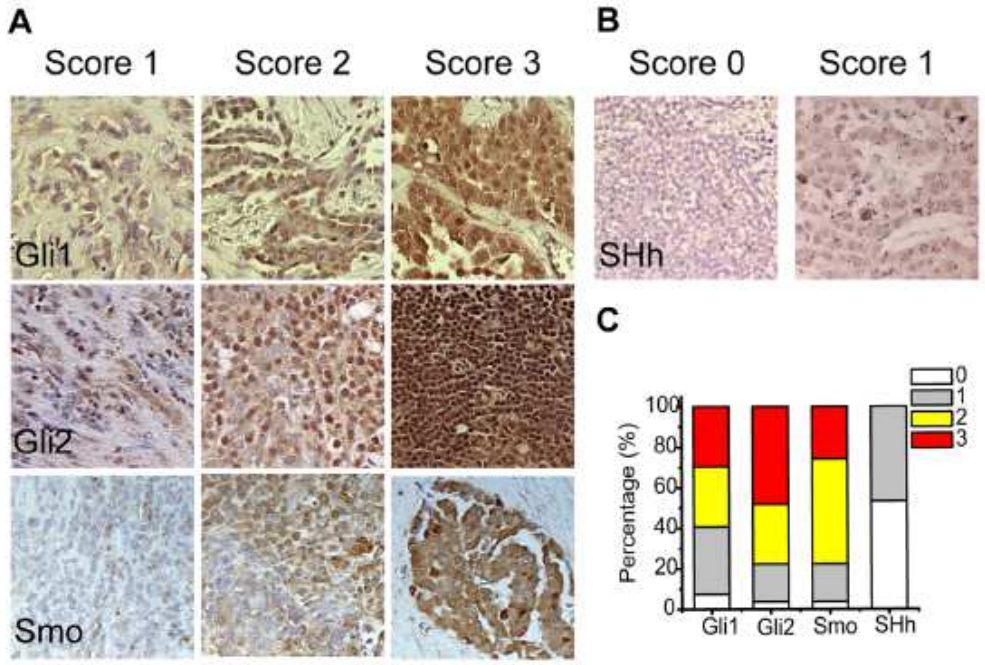


Figure 1. Protein Expression of Gli and SHh Pathway Components in MPM. A, Representative protein expression of Gli1(first row), Gli2(second row) and Smo (third row). Immunohistochemistry staining was scored as 0–3. Representative images of score 1 (first column), 2 (second column), and 3 (third column) were shown. **B**, Representative SHh protein expression. Representative images of score 0 (left panel) and score 1(right panel) were shown. **C**, Expression profiles of Gli1, Gli2, Smo, SHh in MPM tissues. Percentage of score 0–3 of Gli1, Gli2, Smo and SHh was summarized.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g001

Downstream Hh pathway activation has also been documented in tumors of the brain, prostate, muscle and in cell lines derived from pancreatic and lung cancers [9,16–21]. The attributed molecular mechanism includes loss of other Hh pathway factors downstream of Hh/Smo and upstream of Gli, such as Sufu and Ren, and Gli gene amplification and chromosomal translocation. Furthermore, a growing body of evidence has revealed additional mechanisms of Gli activation which are independent of Hh/Smo regulation [22]. The Hh-independent Gli activation is stimulated by cross-talk between components downstream of Hh/Smo and several other oncogenic signaling pathways, such as the transforming growth factor β (TGFβ), epidermal growth factor receptor (EGFR), RAS and AKT/PI3K pathways [8,23–32]. Overall, the concept that Gli proteins serve as an integration point of several signaling cascades, in addition to canonical activation from Hh/Smo, has significant implications for the understanding of tumor development. It strongly argues for the strategy to develop novel therapies that target Gli proteins in order to treat aggressive tumors, such as MPM.

The current study investigated the aberrant activation of Gli proteins in MPM, explored the effectiveness of targeted inhibition by a novel Gli inhibitor (Gli-I) to inhibit MPM cell growth, and compared the efficacy of Smo and Gli inhibitors. Our result strongly suggests that targeting Gli factors holds strong potential to become clinically effective treatment options for MPM patients in the near future.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study with patient tissues was approved by the Committee on Human Research (CHR approval number: H8714-11647-10) at the University of California, San Francisco (UCSF). Written, informed consent was obtained from each patient before specimen collection. Mice study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Office of Ethics and Compliance of UCSF.

Patient Tissues

Tissue specimens were collected from 46 patients who underwent surgical resection for MPM at the Thoracic Oncology Program at UCSF. Samples were frozen immediately and stored in liquid nitrogen until use. Twenty-seven samples were fixed in formalin and embedded in paraffin to make tissue slides.

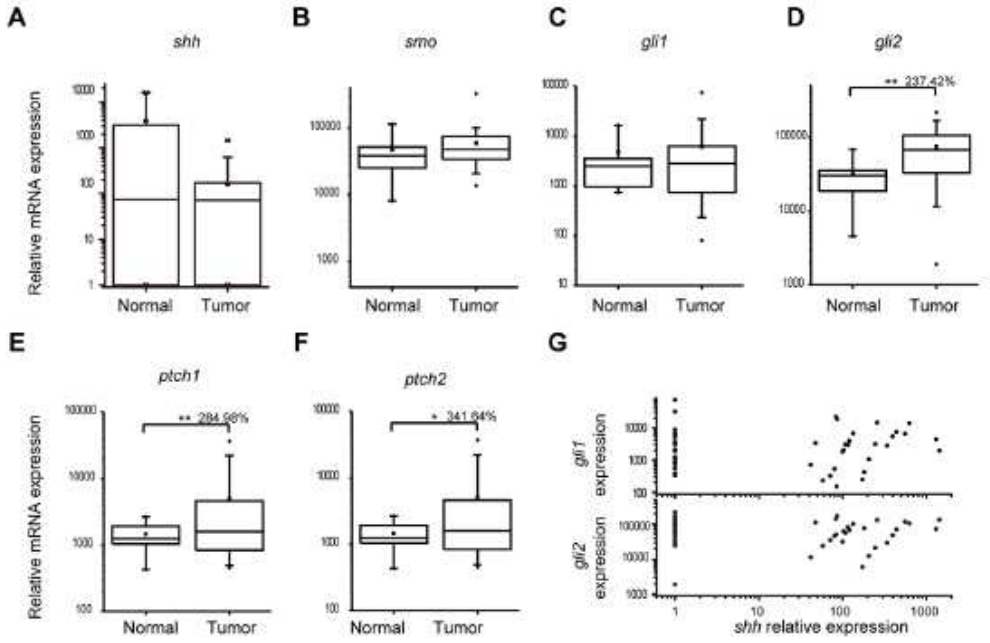


Figure 2. RNA Expression of Gli and SHh Pathway Components in MPM. A–F, Statistic analysis of *shh, smo, gli1, gli2, ptch1* and *patch2* mRNA expression in normal pleura and tumor tissues. A total of 46 tumor tissues was compared with 7 patient normal pleura for its relative mRNA levels of *shh, smo, gli1, gli2, ptch1, ptch2* by quantitative RT-PCR. Two-sided student's *t*-test was performed between normal and tumor tissues. *gli2, ptch1* and *ptch2* showed significant elevation (D–F). A p value <0.05 was indicated as *, <0.01 as **, and <0.001 as ***. The average expression of tumor tissues was labeled in the three genes with the average of normal pleura as 100% (D–F). **G,** Correlation analysis between *shh* and *gli1* (upper) and *gli2* (lower). The expression of *shh* was undetectable in 43% of samples, and thereby shown as the baseline level.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g002

Immunohistochemistry, Immunofluorescence and Western Blot

Immunohistochemistry, immunofluorescence and western blot were performed following standard procedures. Antibodies applied to detect protein expressions were Gli1(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Gli2(Abcam, UK), SHh(Abcam), Smo (Sigma, St. Louis, MO), Ki67(Cell Signaling, Beverly, MA), active Caspase 3 (Cell Signaling) and Actin(Sigma). Total protein extraction was performed with M-PER Mammalian Protein Extraction Solution (Thermo Scientific, Waltham, MA), and 40 ug of proteins were analyzed in western blot.

RNA Extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from tissue or cultured cells using a RNeasy kit (Qiagen, Germany). Genomic DNA contamination was eliminated by DNase I treatment. Reverse transcription was conducted with 250 ng RNA using an iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA). The resulting cDNAs were analyzed with real-time RT-PCR using Gene Expression Assays in a 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) for 40 cycles (96°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute). Gene expression was normalized to 18S expression. We defined the Ct value of negative controls (RT minus controls) as the baseline to calculate relative mRNA expression.

Cell Culture, Drug Treatment

Human mesothelioma cell lines NCI-H28, MS-1, REN, H2052, H2452 and H290 were purchased from the Cell Culture Core Facility at Harvard University (Boston, MA,USA). The cell lines were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Cells were seeded one day before treatment with Gli-I, cyclopamine (Selleck Chemicals) and vismodegib (Selleck) at different concentrations for 30, 48 or 72 hours, with vehicle (DMSO) as controls. Cells were subjected to the following analyses of immunofluorescence, RNA extraction and RT-PCR, TUNEL or proliferation assays.

Proliferation Assays and siRNA Transfection

Cells were treated with Gli-I, cyclopamine or vismodegib or transfected with siRNAs. Cell proliferation was monitored for 4 days with CellTiterGlo assay (Promega). Proliferation assays were performed for at least three times, and representative results were illustrated. Cells were transient transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technology) with siRNAs at a total concentration of 50 nmol/L. In double siRNA treatments, the total siRNA concentration was the same as single siRNA treatments. All siRNAs were purchased from Life Technologies. The efficiency of siRNAs was evaluated by western blot.

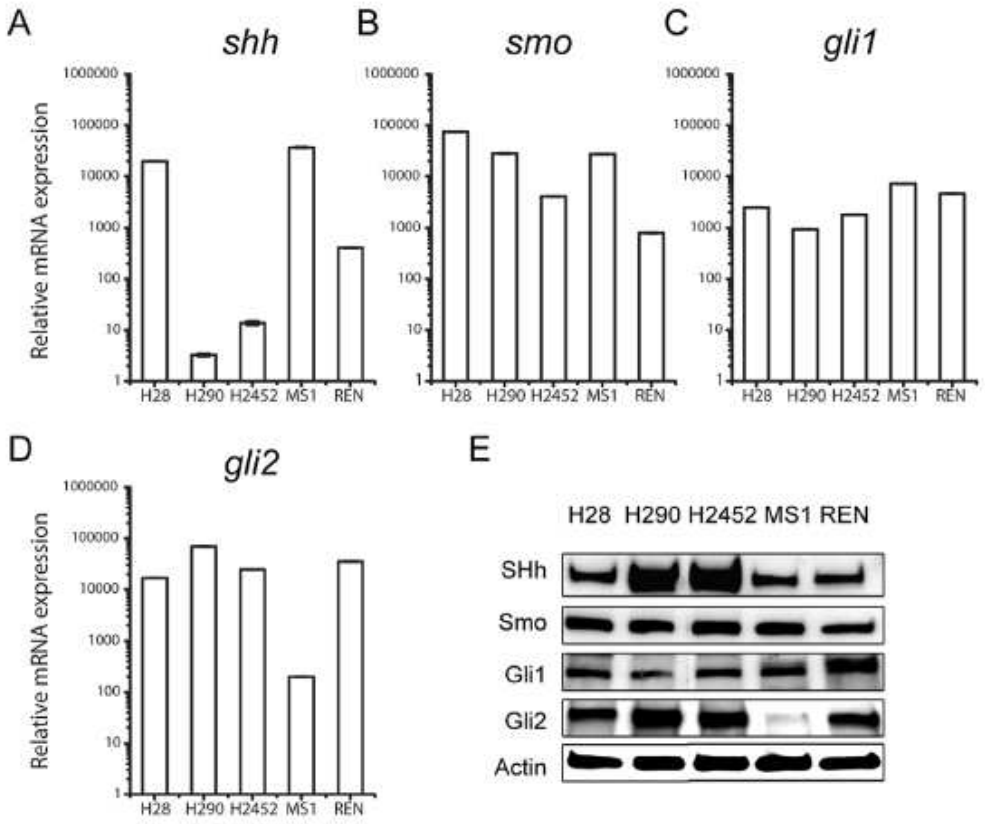


Figure 3. Expression of Gli and SHh Pathway Components in MPM Cell Lines. A–D, Expression of *shh* (A), *smo* (B), *gli1* (C) and *gli2* (D) by quantitative RT-PCR. **E**, Protein expression of SHh, Smo, Gli1 and Gli2.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g003

TUNEL Assay

TUNEL assay was performed using the DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) per standard protocol for both FFPE tissue sections and culture cells. REN, MS1 and H28 were treated with either Gli-I or vismodegib for 40 hr before TUNEL assays. Each experiment was performed for three times.

Mice Study

Nude mice were subcutaneously injected with 10 million MS-1 cells with BD Matrigel Matrix (BD Biosciences, San Jose, CA). Fourteen days after inoculation, mice were randomized to intraperitoneal injections of either Gli-I at 50 mg/kg or vehicle alone for 14 consecutive days followed by another 7-day observation. Tumor volumes were measured from day 10 to day 35 post-inoculation. Tumors and organs were dissected on day 35 to make paraffin blocks for follow-up analyses. All experiments were performed at the UCSF Preclinical Core.

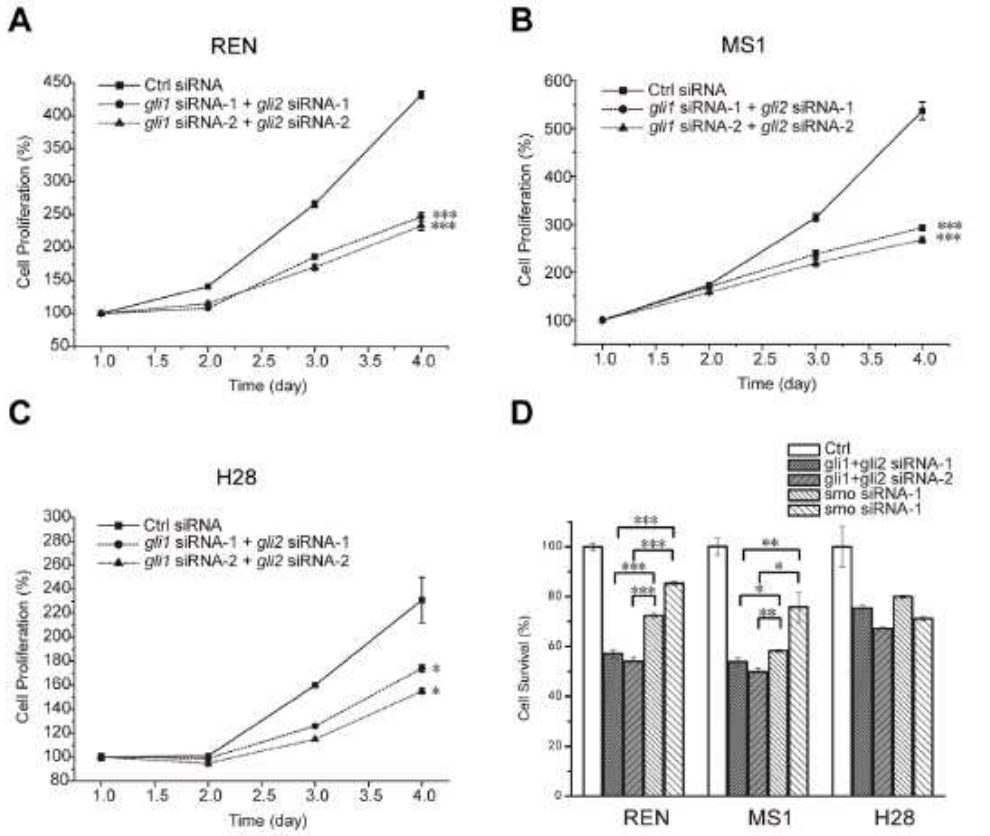
Statistical Analysis and Combination Index Analysis

Two-sided student's t-test was performed for proliferation assays and mRNA expression analysis. A p value <0.05 was indicated as *, 0.01 as **, and 0.001 as *** in corresponding figures. The combinational effects were quantified using the Chou-Talalay Method to obtain the Combinational Index (CI), where CI <1, $=1$, >1 represent synergism, additive effect, and antagonism respectively.

Results

Gli Family of Transcriptional Factors are Expressed in Malignant Pleural Mesothelioma

We first investigated the gene expression of Gli family of transcriptional factors as well as key SHh pathway components in MPM patient tissues. Tissue specimens were collected from 46 patients who underwent surgical resection for MPM at the Thoracic Oncology Program at the University of California, San Francisco. Among all patients, 11 patients were female, and 35 were male, with an average (± standard deviation) age of


A
REN
Ctrl siRNA
gli1 siRNA-1 + gli2 siRNA-1
gli1 siRNA-2 + gli2 siRNA-2
Cell Proliferation (%)
Time (day)
B
MS1
C
H28
D
Ctrl
gli1+gli2 siRNA-1
gli1+gli2 siRNA-2
smo siRNA-1
smo siRNA-1
Cell Survival (%)
REN
MS1
H28

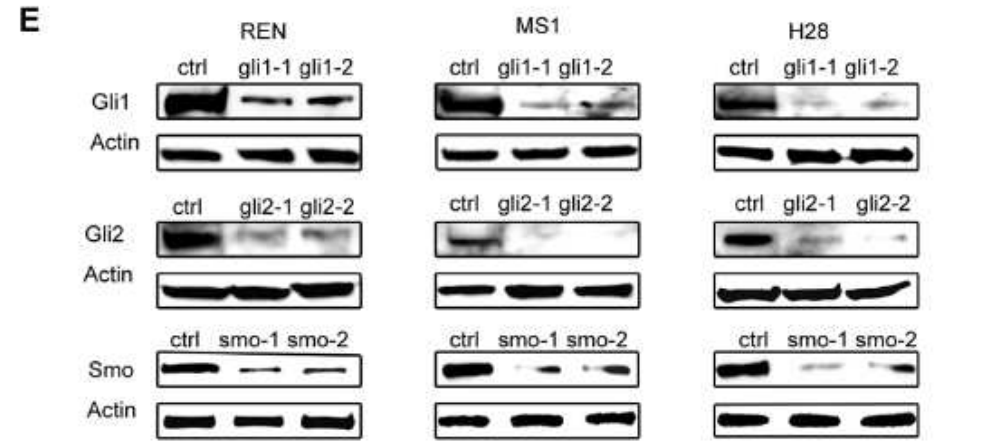

E
REN
MS1
H28
ctrl
gli1-1 gli1-2
Gli1
Actin
gli2-1 gli2-2
Gli2
smo-1 smo-2
Smo

Figure 4. Suppression of Gli1 and Gli2 by siRNA Inhibited Cell Proliferation. A-C, Cell proliferation was significantly reduced by double siRNA treatment targeting *gli1* and *gli2* in three MPM cell lines. Two sets of independent siRNA were applied in each assay. MTS assay was used to measure cell proliferation at 72 hours after siRNA transfection. **D**, Comparison of Smo and Gli inhibition at suppressing cell proliferation at 72 hours after siRNA transfection. Two-sided student's t-test was performed between control siRNA and *gli* siRNA (A-C), between *gli* siRNA and *smo* siRNA in REN and MS1 (D). A p value <0.05 was indicated as *, <0.01 as **, and <0.001 as ***. **E**, The efficiency of siRNA was monitored by western blot at 72 hours after transfection in REN MS1 H28. Each gene was knocked down with two independent siRNAs.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g004

67.2±10.7 years. Histologic analysis showed 39 (85%) epithelioid, 2 (4%) sarcomatous, and 5 (11%) undetermined tumors. There were 5 (11%), 8 (17%), 11 (24%) and 3 (7%) tumors at stage I, II, III and IV respectively, with 19 (41%) undetermined. Tumor samples were collected from all 46 patients, and normal adjacent pleura samples were available from 7 patients. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues were available from 27 patients.

The protein expression of Gli1, Gli2, Smo and SHh were characterized by immunohistochemistry (IHC), and scored on a scale of 0–3 (negative, mild, moderate and strong positive). Representative samples in each category of the four proteins were summarized in Figure 1 A. More than 90% of the samples were positive for Gli1, Gli2 and Smo, and a majority of them had moderate to strong expression (Fig. 1C). In contrast, only 47% of the samples exhibited mild SHh expression (Fig. 1B, C). The expression profiles were further characterized by quantitative RT-PCR (qPCR). The expression of 46 tumor samples was compared with that of 7 normal pleura for *shh*, *smo*, *gli1*, *gli2*, *ptch1* and *ptch2* (Fig. 2A–F). The average expression level of *gli2* was 2.4 fold as high in tumor tissues as in patient normal pleura ($p<0.01$), whereas *gli1* levels were statistically comparable (Fig. 2C, D). Consistently, Gli target genes *ptch1* and *ptch2* were 2.8 ($p<0.01$) and 3.4 ($p<0.05$) fold as high as in tumor tissues respectively (Fig. 2E, F). SHh, Smo, Gli1 and Gli2 were expressed in five tested MPM cell lines (Fig. 3). Strong expression of Gli factors and elevated expression of their target genes in tissues indicated that the aberrant Gli activation may play an active role in MPM.

Interestingly, the expression of Gli factors was poorly correlated with their upstream stimulus SHh. Only 47% of the samples showed mild SHh expression, in contrast to more than 90% for Gli1 and Gli2 (Fig. 1C). At mRNA levels, *shh* was detectable in only 57% of the tumor samples, but also in 3 patient normal controls (Fig. 2A). When *shh* was plotted with *gli1* and *gli2* expression, no correlation was observed (Fig. 2G). No correlation between *smo* and *gli1* or *gli2* was observed either (Fig. S1). The lack of correlation was also confirmed in cultured MPM cells. No correlation was obvious between *shh* and its downstream factors *gli1* and *gli2* (Fig. 3A–D) at mRNA levels or at protein levels (Fig. 3E). Aberrant Gli1 activation and the lack of correlation with the upstream SHh signals in MPM prompted us to investigate the oncogenic role of Gli transcriptional factors.

Downregulation of Gli1 and Gli2 Inhibited Cell Proliferation in Malignant Pleural Mesothelioma Cell Lines

To investigate the tumorigenic function of Gli factors, we down-regulated Gli1 and Gli2 simultaneously to measure cell proliferation in MPM cell lines. We selected three cell lines to represent different expression profiles of key SHh signaling components: H28 had relatively high expression of Smo and SHh and low expression of Gli factors; whereas REN and MS-1 had the opposite expression profiles (Fig. 3). We suspected that H28 might harbor a dominant upstream SHh signaling, whereas REN and MS-1 might not. Suppression of Gli1 and Gli2 by two sets of independent validated siRNAs (Fig. 4E) resulted in significant inhibition of cell proliferation in 72 hours in all three cell lines (Fig. 4A–C), suggesting the tumorigenic role of Gli factors in MPM. Single treatment of *gli1* or *gli2* siRNA did not show significant inhibitory effects of cell proliferation (data not shown), which might be explained by the redundancy of the two transcriptional factors. The application of *gli1* and *gli2* siRNAs resulted in significantly better inhibition of cell survival than *smo* siRNAs in MS1 ($p<0.05$) and REN ($p<0.001$) (Fig. 4D), supporting Gli factors as potent therapeutic targets. Comparable effects were observed in H28 (Fig. 4D), which was consistent with the idea that active upstream SHh signaling presented in the cell line. Overall, the pro-proliferation function strongly suggested Gli factors as potential therapeutic targets.

Targeting Gli1 and Gli2 by a Novel Gli Inhibitor (Gli-I) has Better Effects than Targeting Smo (vismodegib) in Reduction of Cell Viability

Our lab has developed a novel small molecule, the Gli inhibitor (Gli-I), which specifically inhibits Gli1 and Gli2 transcriptional activity, resulting in dramatic cytotoxicity in tumor cells that are Gli activity dependent [33]. We investigated the efficacy of Gli-I, and conducted a side-by-side comparison with two Smo inhibitors, vismodegib and cyclopamine, in MPM cell lines. Efficacy of Gli-I, vismodegib and cyclopamine were determined by cell proliferation assays in five MPM cell lines. The IC_{50} values of Gli-I ranged from 3.75 μM to 13.63 μM upon drug treatment for 72 hours, which were much lower than that of Smo inhibitors vismodegib and cyclopamine (Fig. 5A).

To confirm the cytotoxicity of Gli-I, we measured cell growth after Gli-I treatment. Cell proliferation was dramatically suppressed upon the treatment of Gli-I at concentrations lower than their corresponding IC_{50} values in different cell lines, i.e. 2.5 μM, 5 μM and 10 μM for REN, MS-1 and H28 respectively (Fig. 5B–D, $p<0.001$). In contrast, vismodegib showed no obvious effects when applied at the same concentration as Gli-I (data not shown), and had moderate effects in REN and MS-1 at 10 μM and 20 μM respectively, which were quadruple the concentration of Gli-I in the same assay (Fig. 5B, C). Vismodegib at 20 μM achieved comparable anti-proliferation effects as Gli-I at 10 μM in H28 (Fig. 5D). The comparison confirmed that H28 was sensitive to both Gli and Smo inhibitors, whereas REN and MS-1 was preferentially sensitive to Gli-I, which was consistent with the results of siRNA inhibition (Fig. 4). TUNEL assay was conducted in the cell lines upon 40 hr drug treatment at the same concentration as in the proliferation assay. Gli-I induced intensive apoptosis whereas vismodegib resulted in moderate apoptosis (Fig. 5E), which was consistent with the proliferation assay.

To verify the specificity of Gli-I, protein expression of Gli1 and Gli2 were evaluated by immunofluorescence (IF) upon drug treatment for 48 hours (Fig. 6A). For REN and MS1, the down-regulation of Gli1 and Gli2 was significant by Gli-I, and only moderate by vismodegib; whereas for H28, the down-regulation were at comparable levels by the two compounds. RNA levels were monitored upon 30 hr treatment, and the suppression of *gli1* and *gli2* by Gli-I was more effective than that by vismodegib in all three cell lines (Fig. 6B).

A

	IC_{50} Value (μM)		
	Gli-I	vismodegib	cyclopamine
H28	13.63	20.51	17.36
H290	5.21	9.23	7.73
H2452	9.87	36.5	>20
MS1	5.61	39.21	16.36
REN	3.75	16.8	16.31

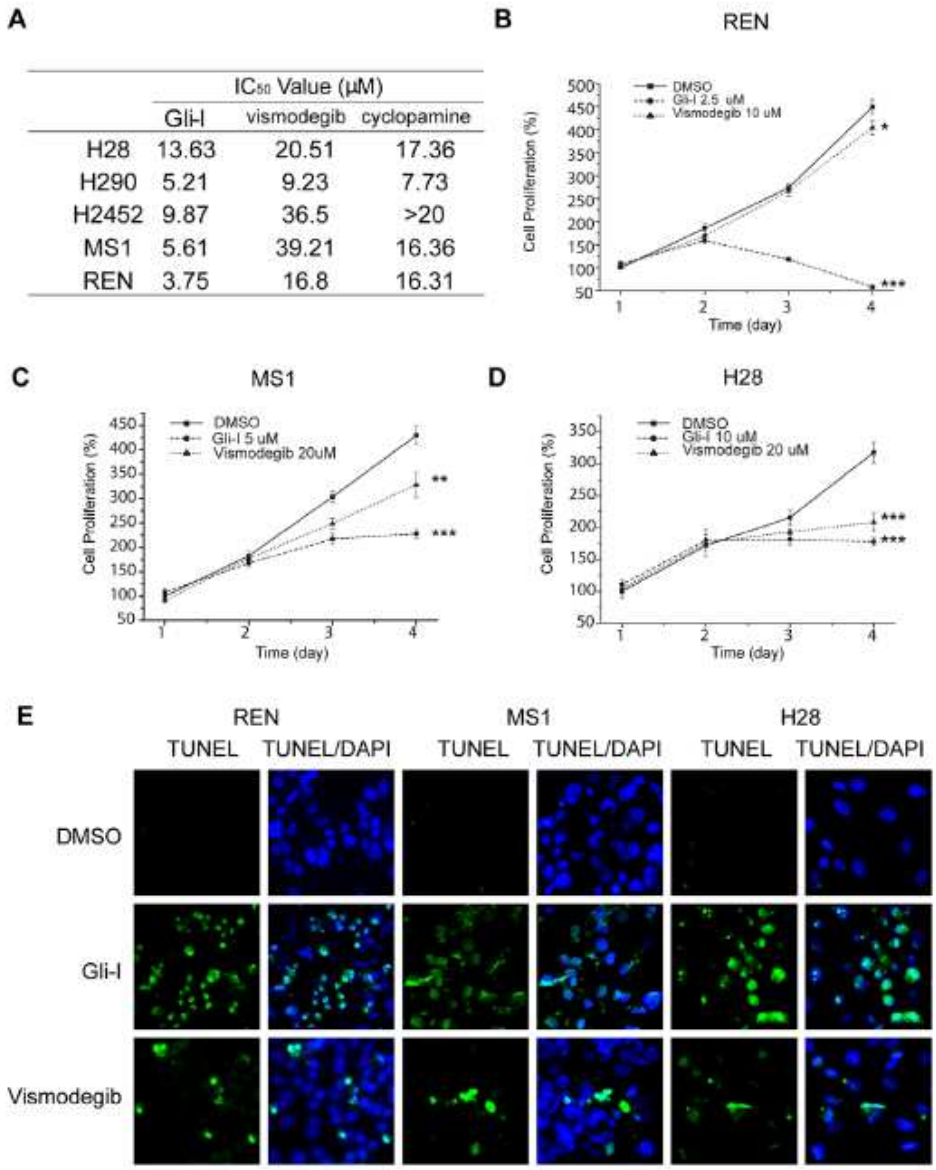


Figure 5. The Gli Inhibitor is More Potent than the Smo Inhibitors to Inhibit MPM Cell Proliferation. A, IC_{50} comparison of Gli-I and the Smo inhibitors. Cells were treated with corresponding compounds at 7 different concentrations for 72 hours to obtain a dose-respond curve in order to determine IC_{50} values. **B–D**, Gli-I achieved a better suppression of cell proliferation than the Smo inhibitor in three MPM cell lines. MTS assay was used to measure cell proliferation at 72 hours upon drug treatment. Two-sided student's t-test was performed between DMSO and drug treated cells. A p value <0.05 was indicated as *, <0.01 as **, and <0.001 as ***. **E**, Apoptosis in Gli-I and vismodegib treated cells. TUNEL assays were performed at 40 hours after drug treatment, with TUNEL in green and DAPI in blue.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g005

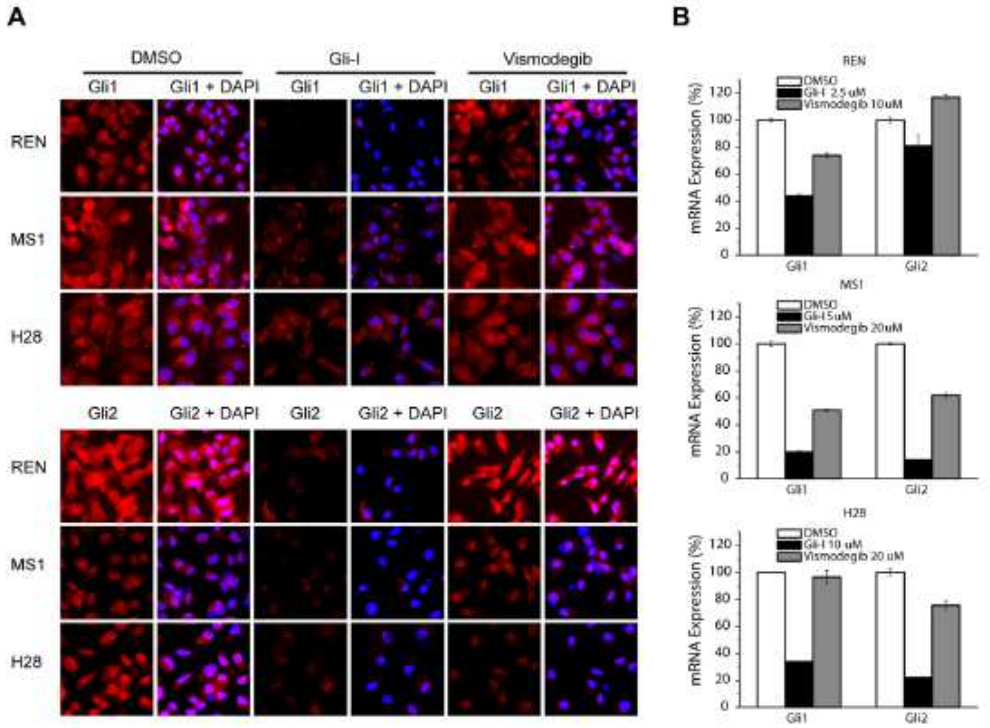


Figure 6. The Gli Inhibitor More Effectively Down-regulated Gli Expression than Vismodegib. A, Immunofluorescence staining of Gli1 and Gli2 upon 48 hr treatment of Gli-I and vismodegib in three MPM cell lines. **B**, *RT-PCR* analysis of *gli1* and *gli2* expression upon 30 hr treatment of Gli-I and vismodegib. The concentrations of both compounds for each cell line were the same in A and B, and were labeled in B.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g006

Overall, the results strongly suggested that our novel compound Gli-I achieved a significant anti-proliferation effect by down-regulating Gli factors *in vitro*, and Gli factors might serve as more effective targets than Smo in treating MPM.

Gli Inhibitor Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Model

To determine whether Gli inhibition represented a potent approach to suppress mesothelioma cell growth and tumorigenesis *in vivo*, the efficacy of Gli-I was examined in a MS-1 xenograft model. Fourteen days after implantation, when most tumors reached 100 mm^3, mice started to receive daily IP injections of Gli-I at 50 mg/kg for 14 days. Gli-I treatment significantly inhibited tumor growth by 51% at the end of the 14-day treatment compared with the control group (Fig. 7A, $p<0.05$). In addition, the xenograft re-growth after treatment withdrawal was monitored for another 7 days. The inhibition of tumor growth was sustained and more substantial (63%) compared with control group (Fig. 7A, $p<0.01$), indicating durable effects of Gli inhibition. No obvious change of body weight was observed during the course, or any noticeable toxicity in major organs from the treated mice (data not shown).

In addition, we examined the resected xenograft tumor specimens after the completion of the *in vivo* experiment (Fig. 7B). Gli1 and Gli2 proteins were down-regulated in Gli-I treated tumors compared with control, consistent with *in vitro* results (Fig. 7B). The decrease of Ki-67 levels confirmed the reduction of proliferation in Gli-I treated tumors (Fig. 7B). Dramatically increased apoptosis was visualized by active caspase 3 staining and TUNEL assays (Fig. 7C). The xenograft study strongly suggested that Gli-I had an extensive anti-tumor efficacy *in vivo* by inhibiting Gli factors.

Gli-I has Synergistic Effects with Vismodegib and Pemetrexed Disodium

To further characterize the anti-tumor efficacy of Gli-I, we examined the combinational treatments of Gli-I plus vismodegib or the chemotherapy drug pemetrexed. We hypothesized that Gli-I might show a synergistic effect with vismodegib, as the latter may further suppress Gli activation in cells with active SHh/Smo signaling. In H28 where SHh-dependent Gli activation exists, the combinational treatment of Gli-I and vismodegib led to a significantly better cytotoxicity than either single treatment (Fig. 8A). The combinational effects were further quantified using the Chou-Talalay Method to obtain the Combinational Index (CI), where $CI<1, =1, >1$ represent synergism, additive effect,

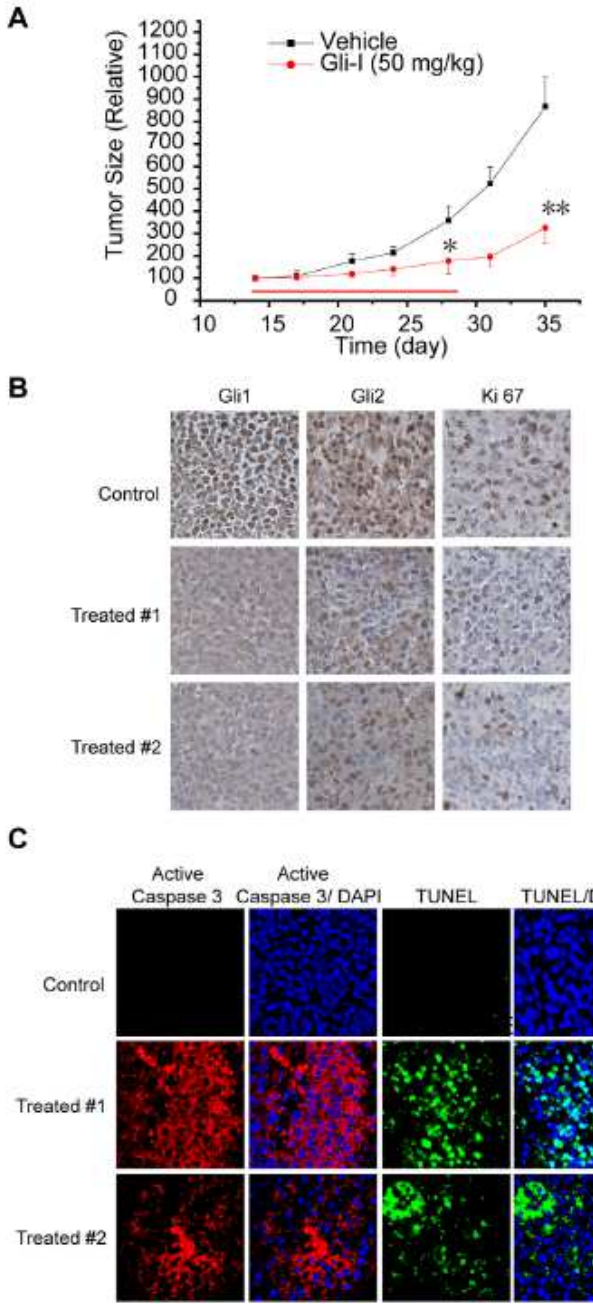

A
Tumor Size (Relative)
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Vehicle
Gli-I (50 mg/kg)
*
**
10
15
20
25
30
35
Time (day)
B
Gli1
Gli2
Ki 67
Control
Treated #1
Treated #2
C
Active Caspase 3
Active Caspase 3/ DAPI
TUNEL
TUNEL/DAPI
Control
Treated #1
Treated #2

Figure 7. The Gli Inhibitor Suppressed Tumor Growth *in vivo* by Inhibiting Gli Proteins. A, MS-1 xenograft tumor growth upon Gli-I treatment. Tumor size was measured every 3–4 days. Red arrow indicated the period of drug treatment. Tumor volume was calculated by using the equation $x^2y/2$ (where x<y), and presented as percentage of its initial volume on day 14. Two-sided student's t-test was performed between control and drug treated mice at day 28 and day 35. A p value <0.05 was indicated as *and <0.01 as **. **B**, Gli1, Gli2 and Ki67 expression in the resected xenograft tumors by IHC. **C**, Apoptotic cells in the resected xenograft tumors by IF. Active Caspase 3 (red) with DAPI (blue) in two left columns, and TUNEL (green) with DAPI in two right columns.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g007

and antagonism respectively. The CI analysis showed synergistic effects at lower dose, and additive effects at higher dose.

We also examined if Gli-I and pemetrexed might show synergistic effects. Gli activation has been suggested to maintain the stem cell population, which contributes to drug resistance and recurrence [34]. Therefore, it is possible that Gli-inhibition might improve the effectiveness of pemetrexed. Pemetrexed is one of the most commonly used first line chemotherapy drugs. Improvement of penetrexed efficacy would be beneficial to MPM patients. We observed a dramatic synergistic effect when Gli-I was applied together with pemetrexed (Fig. 8B).

Both studies suggested the combinational treatments as meaningful approaches to treat MPM, further supporting Gli factors as promising therapeutic targets in MPM.

Discussion

Aberrant Gli activation has been implicated in tumorigenesis in a wide variety of tumors [22]. The current study reported the essential role of the Gli family of transcriptional factors for MPM tumor growth. First, a large majority of MPM tissues had significantly higher expression of Gli and their downstream transcriptional targets (Fig. 1). Secondly, significant suppression of MPM cell proliferation *in vitro* was achieved by inhibiting Gli by siRNAs (Fig. 4). Furthermore, the application of a novel Gli inhibitor (Gli-I), which specifically inhibited Gli factors, led to a dramatic reduction of MPM cell proliferation both *in vitro* and *in vivo* (Fig. 5, 6, 7). All the evidence highlighted Gli as a potent therapeutic target in MPM.

Our results showed that directly targeting Gli1 and Gli2 achieved greater cytotoxicity than targeting Smo in MPM cells. Inhibition of Gli by siRNAs was more effective than that of Smo to suppress cell proliferation (Fig. 4). In addition, Gli-I was more potent to reduce cell growth than two Smo inhibitors, vismodegib and cyclopamine (Fig. 5). Furthermore, Gli-I reduced Gli levels more effectively than vismodegib (Fig. 6). In fact, the reduction of Gli levels by vismodegib was moderate even at a much higher concentration (2–4 fold higher than Gli-I).

What are the possible explanations for the difference in effectiveness of Smo and Gli inhibition? It is possible that inhibition of an upstream factor such as Smo might not effectively translate into the reduction of downstream Gli factors. However, we favored the explanation that the better efficacy was likely due to the Hh-independent Gli activation in MPM. In other words, Smo inhibition had little effect on Hh-independent Gli activation, and thereby was less potent in growth inhibition of cancer cells lacking upstream canonical Hh/Smo signaling. The coexistence of Hh-dependent and-independent Gli activation has been documented by a growing body of evidence in a variety of cancers, and the underlying mechanisms of Hh-independent Gli activation involved multiple signaling pathways, such as TGFβ, EGFR, and RAS and AKT/PI3K pathways [9,22]. It is likely that MPM

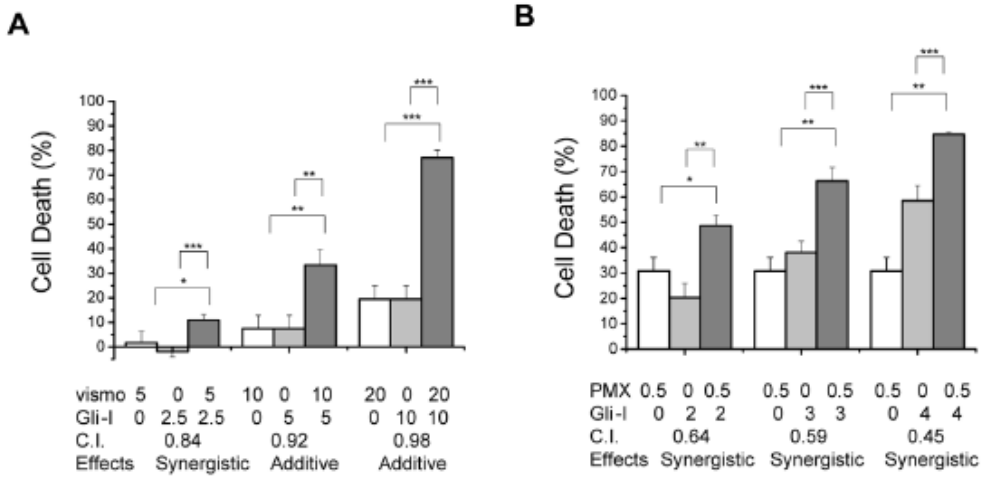


Figure 8. Synergistic Effects of the Gli Inhibitor with Vismodegib and Pemetrexed. A-B, Cells were treated with Gli-I, vismodegib and pemetrexed at the concentration indicated in the figure. Cell survival was measured by MTS assays at 72 hours of drug treatment. The combinational effects were further quantified using the Chou-Talalay Method to obtain the Combinational Index (CI), where CI <1, = 1, >1 represent synergism, additive effect, and antagonism respectively. Two-sided student's t-test was performed between single and double treatment. A p value <0.05 was indicated as *, 0.01 as **, and 0.001 as ***.
doi:10.1371/journal.pone.0057346.g008

employs both Hh-dependent and -independent Gli activation in a context dependent manner. Our findings of elevated Smo and SHh expression in some tissues, as well as suppression of cell proliferation through the inhibition of Smo via siRNA and small molecule inhibitors, suggested that the conventional Hh pathway plays a role in MPM. However, the lack of correlation between SHh and Gli expression in MPM patient tissues and cultured cell lines indicated that the upstream signals from SHh through Smo might not be the only stimuli of aberrant Gli activation. Consistently, we observed differentiated responses to Smo and Gli inhibition in the three MPM cell lines. It is possible that H28, which had a comparable response to Smo and Gli inhibition, relied on the Hh-dependent Gli activation, whereas REN and MS1, which preferentially responded to Gli inhibition, harbored the Hh-independent Gli activation to a significant extent. The molecular mechanism underlying potential non-canonical Gli activation in MPM were currently under investigation in our group, and might further support Gli as a potent therapeutic target to treat MPM.

A very recent publication by Shi *et.al* documented the essential role of Hh signaling in MPM, and suggested Smo inhibition as a therapeutic approach [35]. Our study provided a different perspective to understand the molecular mechanism of MPM, and suggested Gli inhibition as a promising approach to treat MPM patients. We reported different expression profiles of the Hh pathway components, for example, SHh, Gli1 and Gli2. The difference is possibly due to the small patient numbers, and the limited normal pleura samples that were used as the expression baseline. However, we suspected that the existence of the Hh-independent Gli activation might complicate the overall expression profiles and thereby contribute to the different expression profiles reported by the two studies. Moreover, Shi *et.al* documented MPM cell lines that were insensitive to Smo inhibition. It would be interesting to examine if Hh-independent Gli activation plays a role in these cell lines and if these cell lines respond to Gli inhibition.

Moreover, both *in vivo* and *in vitro* studies strongly suggested that the novel Gli inhibitor, Gli-I, held a great potential to be a potent therapeutic agent to suppress tumor growth. Our group has accumulated a large body of evidence suggesting that the small molecule specifically and effectively inhibited Gli1 and Gli2 both *in vivo* and *in vitro*, dramatically suppressed tumor growth in several tumor types, such as lung cancer, melanoma and MPM as reported here, and had a very low toxicity profile *in vivo*. The synergistic effects of Gli-I with other therapeutic compounds also indicated the potential benefits to further develop the novel Gli inhibitor.

In summary, the Gli family of transcriptional factors plays a critical role in MPM. Inhibition of Gli is highly effective at suppressing cell proliferation in MPM cells in contrast to targeting the upstream factor Smo. Our small molecule Gli inhibitor, Gli-I, has a strong potential to become a novel, clinically effective approach to treat MPM.

Supporting Information

Figure S1 Correlation between Smoothened and Gli. Expression of *smo* and *gli1 gli2* was quantified by qPCR. The expression of *smo* was plotted against *gli1* (upper) and *gli2* (lower). (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Byron Hann, Dr. Don Hom, Dr. Donghui Wang and Dr. Paul Phojanakong at the UCSF preclinical core for their contribution to the xenograft experiments. We also thank Dr. B-Jim Kim and Helen Choi for their generous help with patient tissue process.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HL NL BH DMJ. Performed the experiments: HL NL HTD DY TC HKT EGL QS JJ TL DY. Analyzed the data: HL NL BH DMJ. Wrote the paper: HL BH DMJ.

References

1. Crispi S, Cardillo I, Spugnini EP, Citro G, Menegozzo S, et al. (2010) Biological Agents Involved in Malignant Mesothelioma: Relevance as Biomarkers or Therapeutic Targets. Current Cancer Drug Targets 10: 19–26.
2. Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL (2009) Malignant Pleural Mesothelioma. Journal of Clinical Oncology 27: 2081–2090.
3. Carbone M, Ly BH, Dodson RF, Pagano I, Morris PT, et al. (2012) Malignant Mesothelioma: Facts, Myths, and Hypotheses. Journal of Cellular Physiology 227: 44–58.
4. Greillier L, Marco S, Barlesi F (2011) Targeted therapies in malignant pleural mesothelioma: a review of clinical studies. Anti-Cancer Drugs 22: 199–205.
5. Sekido Y (2009) Genomic abnormalities and signal transduction dysregulation in malignant mesothelioma cells. Cancer Science 101: 1–6.
6. Zucali PA, Ceresoli GL, De Vincenzo F, Simonelli M, Lorenzi E, et al. (2011) Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma. Cancer Treatment Reviews 37: 543–558.
7. Carbone M, Yang HN (2012) Molecular Pathways: Targeting Mechanisms of Asbestos and Erionite Carcinogenesis in Mesothelioma. Clinical Cancer Research 18: 598–604.
8. Mimeault M, Batra SK (2010) Frequent Deregulations in the Hedgehog Signaling Network and Cross-Talks with the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Involved in Cancer Progression and Targeted Therapies. Pharmacological Reviews 62: 497–524.
9. Lauth M, Toftgard R (2007) Non-canonical activation of GLI transcription factors - Implications for targeted anti-cancer therapy. Cell Cycle 6: 2458–2463.
10. Lauth M, Toftgard R (2007) The Hedgehog pathway as a drug target in cancer therapy. Current Opinion in Investigational Drugs 8: 457–461.
11. Stanton BZ, Peng LF (2009) Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. Molecular Biosystems 6: 44–54.
12. Ng JMY, Curran T (2011) The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. Nature Reviews Cancer 11: 493–501.
13. LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Tibes R, Weiss GJ, et al. (2011) Phase I Trial of Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib (GDC-0449) in Patients with Refractory, Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors. Clinical Cancer Research 17: 2502–2511.
14. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, et al. (2012) Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. New England Journal of Medicine 366: 2171–2179.
15. Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P (2012) Vismodegib. Nature Reviews Drug Discovery 11: 437–438.
16. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, et al. (2006) Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. Journal of Pathology 208: 17–25.
17. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, et al. (1987) Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. Science 236: 70–73.
18. Chi SM, Huang SH, Li GX, Zhang XL, He NG, et al. (2006) Activation of the hedgehog pathway in a subset of lung cancers. Cancer Letters 244: 53–60.
19. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, et al. (2006) Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. Journal of Clinical Oncology 24: 1924–1931.
20. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, et al. (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature 425: 851–856.
21. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, et al. (2002) Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. Nature Genetics 31: 306–310.
22. Hui CC, Angers S (2011) Gli Proteins in Development and Disease. Annual Review of Cell and Developmental Biology, Vol 27. Palo Alto: Annual Reviews. 513–537.
23. Bigelow RLH, Jen EY, Delehedde M, Chari NS, McDonnell TJ (2005) Sonic hedgehog induces epidermal growth factor dependent matrix infiltration in HaCaT keratinocytes. Journal of Investigative Dermatology 124: 457–465.
24. Dennler S, Andre J, Verrecchia F, Mauviel A (2009) Cloning Of The Human Gli2 Promoter: Transcriptional Activation By Tgf-Beta In Keratinocytes Via

Smad3/beta-Catenin Cooperation. Journal of Investigative Dermatology 129: S85–S85.
25. Javelaud D, Mauviel A (2005) Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. Oncogene 24: 5742–5750.
26. Ji ZY, Mei FC, Xie JW, Cheng XD (2007) Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. Journal of Biological Chemistry 282: 14048–14055.
27. Kasper M, Schnidar H, Neill GW, Hanneder M, Klingler S, et al. (2006) Selective modulation of hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. Molecular and Cellular Biology 26: 6283–6298.
28. Ridho NA, Haines GM, Emerson CP (2006) Protein kinase C-delta and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling. Cancer Research 66: 839–845.
29. Ridho NA, Iu K, Ai XB, Haines GM, Emerson CP (2006) Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 4505–4510.
30. Seto M, Ohta M, Asaoka Y, Ikenoue T, Tada M, et al. (2009) Regulation of the Hedgehog Signaling by the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Gastric Cancer. Molecular Carcinogenesis 48: 703–712.
31. Siegel PM, Massague J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nature Reviews Cancer 3: 807–820.
32. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, et al. (2007) Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 5895–5900.
33. He BNF, Liang Y, Xu Z, Jablons DM (2010)Targeting GLI proteins in human cancer by small molecules. United States patent US 6,885,550.
34. Dodge ME, Lum L (2011) Drugging the Cancer Stem Cell Compartment: Lessons Learned from the Hedgehog and Wnt Signal Transduction Pathways. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol 51, 2011. 289–310.
35. Shi Y, Mouta U, Opitz I, Soltermann A, Rehrauer H, et al. (2012) Role of Hedgehog Signaling in Malignant Pleural Mesothelioma. Clinical Cancer Research 18: 4646–4656.

6. Etude de l'impact des CSC dans la prolifération tumorale et le pronostic dans les CBNPC : exemple du rôle de hPAF1C et de c-Myc

6.1. Article 6

Giroux Leprieur E, Zhi X, Zhang Y, Shi H, Wang L, Du K. Human RNA polymerase II (RNAPII)-associated factor 1 complex (hPAF1C) promotes tumorigenesis by activating c-MYC transcription in NSCLC. **Soumis à Biochemical and Biophysical Research Communications**.

6.2. Présentation de l'article et commentaires

hPAF1C est membre du complexe PAF, qui intervient comme co-facteur de transcription avec Gli, et est impliqué dans la transcription et comme régulateur du cycle cellulaire (Moniaux 2009). hPAF1C est surexprimé par les cellules souches embryonnaires (Ponnusamy 2009), et interviendrait lors de la carcinogenèse (Moniaux 2006). C-Myc est un autre régulateur du cycle cellulaire, activé dans les CSC notamment via Shh, et intervenant également dans la carcinogenèse (cf chapitre I.9.9). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'activation de hPAF1C dans les CBNPC, et son interaction avec c-Myc. Nous avons analysé 183 prélèvements de CBNPC opérés, et montré que la majorité (n=127, 69,4%) exprimait hPAF1C par étude en IHC. La survie globale des patients avec un CBNPC exprimant hPAF1C était plus courte que celle des patients avec un CBNPC n'exprimant pas hPAF1C (p=0,0131). L'expression de hPAF1C était corrélée à l'expression de c-Myc, que ce soit sur les prélèvements tumoraux ou sur les lignées cellulaires (A549, H838, H2170, H1650). L'inhibition de l'expression de hPAF1C par siARN entraînait une inhibition de l'expression

de c-Myc, évaluée par Western Blot. Le rôle de hPAF1C dans la croissance tumorale a été montré par étude de la prolifération et de la formation de colonies cellulaires *in vitro*. L'inhibition de hPAF1C par siARN provoquait une inhibition de la prolifération et de la formation de colonies. L'inhibition conjointe de hPAF1C et de c-Myc était synergique sur l'inhibition de la croissance tumorale.

Ces résultats soulignent l'importance de hPAF1C et de c-Myc, protéines impliquées dans la carcinogenèse et activées au sein des CSC, dans la prolifération et la clonogénicité tumorale. Il s'agit de la première étude dédiée spécifiquement à l'étude de hPAF1C dans le CBNPC. Le fort impact pronostic de hPAF1C incite à étudier de manière plus large son expression et développer des traitements ciblés contre hPAF1C et/ou c-Myc dans les cancers bronchiques.

Human RNA polymerase II (RNAPII)-associated factor 1 complex promotes tumorigenesis by activating c-MYC transcription in non-small cell lung cancer (NSCLC)

Etienne Giroux Leprieur[1,2#], Xiuyi Zhi[3#], Yi Zhang[3], Huaiyin Shi[4], Marie Wislez[1], Lei Wang[5]*, Kaiqi Du[6]*

[1]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, GRC n°04, Theranoscan, F-75252, Paris, France

[2]Thoracic Oncology and Respiratory Diseases Department, Hopital Ambroise Pare-APHP, University Versailles Saint Quentin en Yvelines, 9 avenue Charles de Gaulle, 92100 Boulogne-Billancourt, France

[3]Department of Thoracic Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

[4]Department of pathology, Chinese PLA General Hospital, Fu-xing Road #28, Beijing, 100853, China

[5]Department of Human Anatomy, Hebei Medical University, Hebei, China

[6]Department of Cardiothoracic Surgery, Chinese People's Armed Police Force, Zhejiang Corps Hospital, Jiaxing, Zhejiang Province, China

#These authors contributed equally.

*Corresponding Authors: Kaiqi Du, M.D. (email: kaiqi.du@163.com)
Department of Cardiothoracic Surgery, Chinese People's Armed Police Force, Zhejiang Corps Hospital, Jiaxing, Zhejiang Province, China;
or Lei Wang (email: leiwang@163.com) Department of Human Anatomy, Hebei Medical University, Hebei, China

Abstract

Human RNA polymerase II (RNAPII)-associated factor 1 complex (hPAF1C) plays a crucial role in protein-coding gene transcription. Overexpression of hPAF1C has been implicated in the initiation and progression of various human cancers. However, molecular pathways involved in tumorigenesis through hPAF1C remain to be elucidated. The current study suggested hPAF1C expression as a prognostic biomarker for early stage lung cancer. Patients with low hPAF1C expression levels showed significantly better overall survival. The expression of hPAF1C positively correlated with c-MYC activation. Mechanistic studies indicated that hPAF1C promoted lung cancer proliferation through regulating c-MYC transcription. These results demonstrated the strong prognostic impact of hPAF1C in early-stage NSCLC, and more generally the evidence of cancer stem cells role in proliferation and aggressiveness in NSCLC through activation of proto-oncogenes as c-Myc and hPAF1C.

Key-words: hPAF1C, c-Myc, non-small cell lung cancer, cancer stem cells, tumorogenesis, prognosis,

Introduction

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the leading cause of mortality by cancer in the world. Despites some recent progresses, overall survival remains low, with 15% 5-years survival. There is therefore an urgent need of description of new innovative marker in NSCLC related to cancer initiation, prognosis and response to chemotherapy. NSCLC is characterized by a high proliferation rate, and there is an overexpression of several cell-cycle regulators in NSCLC cells, as c-Myc [1]. C-Myc has been proved to be overexpressed in cancer stem cells (CSCs). CSCs are tumor cells that are responsible for the initiation of cancer during the first stages of carcinogenesis. They represent a very small proportion of all tumor cells within the tumor, with an undifferentiated cell phenotype, an important potential for oncogenesis, a large capacity of proliferation and differentiation. The presence of CSCs has been proven in several solid tumors, including lung cancer [2,3]. However, the molecular mechanisms involved in the early steps of lung tumorogenesis and activated in these CSCs are still largely unknown. Human RNA polymerase II (RNAPII)-associated factor 1 complex (hPAF1C) is described as a key cell cycle regulator [4], and is overexpressed in embryonic and carcinoma stem cells [5]. Its role in cancer development has also been described, especially in pancreatic cancer [6]. In this study, we explored the role of hPAF1C in NSCLC, and its implication in tumorogenesis through the interaction with c-Myc.

Materials and Methods

Patients

Patients with stage I-III NSCLC undergoing surgical resection at the Department of Thoracic Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University and Department of Thoracic Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University (183 patients from 2007 to 2012) were entered into the study (Table 1). Patients receiving neoadjuvant chemotherapy or radiation therapy, or having a second primary cancer diagnosed within 5 years, were excluded from this study. Pathology of each patient was diagnosed by two certified pathologists. TNM staging was performed according to the International System for Staging Lung Cancer pathologic classification system. Information on clinical variables and patient follow-up was extracted from prospectively maintained patient database. The primary endpoint was overall survival (OS) with the time range from 2.7 to 60 months.

Immunohistochemistry (IHC)

Standard protocol was used. Primary antibodies used in the study included rabbit anti-human hPAF1C (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Five micron tissue slides from tumor and adjacent normal lung tissue were de-paraffinized using xylene. Heat-mediated antigen retrieval was performed using citrate buffer (BioGenex Laboratories). Antibody staining was visualized with DAB (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) and hematoxylin counterstain (Fisher Scientific). Representative fields were photographed using a Leica SCN400 slide scanner (Leica, Germany), and examined for positive nuclear staining.

Cell Culture

NSCLC cell lines (A549, H838, H2170 ad H1650) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/ml)/streptomycin (100 μg/ml) at 37℃ in a humid incubator with 5% CO2.

RNA extraction

Total RNA from cell lines was isolated using an extraction kit (RNeasy Mini kit; Qiagen). Total RNA from fresh tumor samples was extracted with TRIzol LS (Tiangen, Beijing, China).

Semi-quantitative RT-PCR

Semi-quantitative RT-PCR was performed in a GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems (ABI)) using SuperScript II one-step RT-PCR with Platinum Taq kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. RT-PCR primers were obtained from Takara (Dalian, China). hPAF1C primer sequences are: forward: 5'-GGAGGAAGAGATGGAGGCTGAA-3' and reverse: 5'-CACTTGCCTCATCTCTGTCACC-3'. C-Myc primer sequences are: forward: 5'-AATGAAAAGGCCCCCAAGGTAGTTATCC-3' and reverse: 5'-GTCGTTTCCGCAACAAGTCCTCTTC-3'. GAPDH primer sequences are: forward: 5'-AACGGGAAGCTTGTCATCAATGGAAA-3' and reverse: 5'-

GCATCAGCAGAGGGGGCAGAG-3'. 300 ng of total RNA was used for each reaction. PCR products were run on 1% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. GAPDH served as an internal control.

Quantitative Real-time RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized from total RNA using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Transcript analysis was done by real-time reverse transcription-PCR using the TaqMan assay. Hybridization probes and primers were purchased from ABI. All samples were run simultaneously in triplicate in a Mx3000P System (Stratagene, La Jolla, CA). Each Ct value was normalized to its housekeeping gene GAPDH level.

Luciferase assay

Cells at a density of 5 × 103 per well were seeded into 24-well plates before transfection. 2.5 μg of an expression construct linking the c-Myc promoter to a luciferase reporter (a generous gift from Professor Hai-meng Zhou at Tsinghua University, Beijing, China) was co-transfected with 0.05 μg pRL-TK vector (Promega), which contains Renilla luciferase as an internal control for the transfection efficiency. Vigofect (Vigorous, Beijing, China) was used to mediate all transfections according to the manufacturer's protocol. The transfected cells were cultured for an additional day before being lysed for luciferase assays. Briefly, cells were lysed in passive lysis buffer and then firefly and Renilla luciferase activities of each well were measured using the Dual-Luciferase Assay system (Promega). Firefly luciferase activities were all normalized to Renilla luciferase activities in the same well and were

expressed relative to the basal activity of the empty pGL3Basic vector, which was set to unity. The data represent the mean values ± SD. All measurements in each experiment were performed in triplicate and at least three independent experiments were repeated to ensure consistency.

RNA Interference

hPAF1C, c-Myc, and control (non-silencing) shRNA were purchased from Origene. The targeted hPAF1C sequences are: 5'-GAACCAGTTTGTGGCTTATTT-3' (siRNA-1) and 5'-GGTGACGGAGTTTACTACAATG-3' (siRNA-2). The targeted c-Myc sequence is: 5'-GGACTATCCTGCTGCCAAGTT-3'. Cells were plated in six-well plates with fresh media without antibiotics for 24 hours before transfection. Transfection was performed using Vigofect (Vigorous, Beijing, China) according to the manufacturer's protocol. Transfected cells were then re-plated in 10 cm dishes for selection with G418 (500 μg/ml; Invitrogen). Stable transfectants were maintained in regular medium with G418 (300 μg/ml) for further analysis.

Proliferation Assay

CellTiter 96 Aqueous Proliferation Assay Kit (Promega) was used to determine cell proliferation according to the manufacturer's protocol. The assays were performed in triplicate after 5×103 cells/well were plated into 96-well plates.

Colony Formation Assay

500 individual cells of each stably transfected line were seeded in 10 cm dishes and cultured in medium with G418 (400 μg/ml) for 10 days. Colonies were then fixed by 10% formalin, stained with 0.5% crystal violet and counted.

Statistical Analysis

The Kaplan-Meier method was used to estimate overall survival (OS). Differences in survival between the high-risk group (positive hPAF1C IHC staining) and low-risk group (negative hPAF1C IHC staining) were analyzed by log-rank test. IHC scores of 1-3 were grouped as positive "+", and 0 was grouped as negative "-" for dichotomized analysis. Kappa test was used to evaluate the association between RNA expressions of hPAF1C and c-Myc. All analyses were done using the SPSS software package, version IBM SPSS Statistics 18.0. All reported p-values were two-sided. A p value of 0.05 or less was considered to be significant.

Results

hPAF1C is expressed in NSCLC and is a prognostic marker in early stage NSCLC

We initially analyzed the expression of hPAF1C among a distribution of 183 early-stage formalin-fixed, paraffin-embedded NSCLC samples. Staging was determined previously using the TNM categorization method and histological analysis, with early-stage categorization given to primary tumors at stages T1b or less severe. To examine the expression of the hPAF1C complex at the protein level, IHC stainings were performed on the NSCLC samples. Protein expressions were characterized using a scoring system of representative tissue areas, ranging from 0-3 (negative, mild, positive, strong positive). Sample demographic data are presented in Table 1, in which we contrast hPAF1C positive and hPAF1C negative IHC stains. Among the 183 samples tested, a majority displayed moderate to strong expression, with 127 (69.4%) showing a representative distribution similar to or greater than the expression levels seen in the given hPAF1C positive IHC stain (Figure 1A). Strong expression of hPAF1C at the protein level indicated that its aberrant elevation was highly prevalent among NSCLC tissue samples.

Additionally, hPAF1C IHC levels were further examined using the Kaplan-Meier statistical analysis to estimate OS for the early-stage NSCLC patients. Among the 183 histological profiles available, the overall survival percentages were plotted in relation to time after tumor development, with patient follow-up times ranged from 2.7 to 60.0 months, with a median period of 45.8 months. The analysis demonstrated a strong association between hPAF1C protein levels with overall survival of the patient ($p=0.131$), showing a significant lowering of prognosis in tissues that had tested as moderately or strongly hPAF1C positive (Figure 1B). As a result, hPAF1C may serve as a prognostic marker for early-stage NSCLC samples, with high levels indicative of a poorer prognosis.

hPAF1C correlates with c-Myc expression and regulates c-Myc transcriptional activity

To examine activity of hPAF1C and c-Myc at the gene level, mRNA expressions were quantified and characterized by RT-PCR in 47 NSCLC surgical samples. Investigation showed a strong positive correlation between hPAF1C and c-Myc expressions (R^2=0.609; $p<0.001$) (Figure 2A), indicating a common trend among NSCLC patient samples. Consistently correlated results were found among NSCLC cell lines with varied expression profiles when hPAF1C and c-Myc Ct values were plotted against each other (R^2=0.923; p=0.037) (Figure 2B).

Western blots were then conducted among the 4 NSCLC cell lines (A549, H838, H1650, H2170) that had also been treated with RT-PCR. These cell lines were selected based on the premise that their hPAF1C expression profiles differed at the RNA level. hPAF1C expression was first evaluated by western blot in these NSCLC cell lines, with data showing high levels in 3 cell lines (A549, H838, H1650), and no expression in 1 cell line (H2170), with GAPDH serving as the internal control (Figure 3A). To examine whether the correlation between hPAF1C and c-Myc carried over at the protein level, we used then a c-Myc promoter-luciferase construct in the 4 NSCLC cell lines. Cells were prepared for a dual-luciferase assay run in triplicates, with the process repeated at least three times. We discovered a high c-Myc activity in the cell lines with high hPAF1C protein quantities (A549, H838, H1650), and no c-Myc luciferase activity in the H2170 cell line with low hPAF1C protein amounts (Figure 2B), with cell lines showing at least a tenfold increase in luciferase activity when compared to the control setting. Thus, expression of hPAF1C factors in conjunction with that of c-Myc at both RNA and protein levels strongly suggest that hPAF1C play an active role in c-Myc transcriptional activity.

Furthermore, to investigate the effects of hPAF1C inhibition, we utilized hPAF1C–targeted siRNAs in order to induce a knockdown in hPAF1C expression. siRNA transfection was conducted according to standard protocol before efficiency was evaluated through western blot. Through western blot testing, we demonstrated that the induced decrease in hPAF1C resulted in clear inhibition of c-Myc expression (Figure 3C). These results highlight a positive correlation between hPAF1C and c-Myc expressions, and that induced hPAF1C changes regulate c-Myc expression.

hPAF1C promotes cell proliferation and colony formation, synergistically with c-Myc

In order to evaluate the impact of hPAF1C on cell proliferation and colony formation, we utilized siRNAs to generate knockdown in hPAF1C expression using standard transfection protocols. Proliferation assays (Promega) were conducted and monitored over a time period of 7 days, revealing that inhibition of hPAF1C led to significantly lowered cell proliferation activities (Figure 4A) among all 3 originally high-level hPAF1C cell lines (A549, H838, H1650) in comparison to the siRNA controls. Using colony formation assays, we observed that inhibition of hPAF1C induced a notable decrease by at least 30% (ranging to over 80%) in the capabilities of the 3 NSCLC cell lines with high hPAF1C activity (A549, H838, H1650) to form colonies (Figure 4B).

Interestingly, data obtained from further cell proliferation assays conducted over a span of 6 days also showed that inhibition of both hPAF1C and c-Myc synergistically caused an inhibition of lung cancer growth. Whereas cell proliferation was partially inhibited with either hPAF1C siRNA or c-Myc siRNA, it was completely inhibited with the use of both hPAF1C and c-Myc siRNAs, as illustrated in Figure 5. These results provide an indication that hPAF1C serves to promote cell proliferation and colony formation through c-MYC

regulation. Furthermore, the combined decrease of hPAF1C and c-MYC activities may produce more noticeable effects in the decrease of NSCLC cell proliferation and colony developments.

Discussion

The current study showed hPAF1C expression is a prognostic biomarker for early stage lung cancer. Patients with low hPAF1C expression levels showed significantly better overall survival. The expression of hPAF1C positively correlated with c-MYC. Mechanistic studies indicated that hPAF1C promoted lung cancer proliferation through regulating c-MYC transcription.

hPAF is comprised of five subunits that include hPAF1C, parafibromin, hLeo1, hCtr9 and hSki8. Physiological functions of hPAF1C include efficient transcription elongation, mRNA quality control and cell-cycle regulation [7]. hPAF1C is amplified and overexpressed in many cancers. Several studies have shown an amplification of hPAF1C gene (19q13 locus) in pancreatic tumor [6]. Besides, *in vitro* amplification of the hPAF1C gene in normal NIH3T3 cell line led to malignant transformation, suggesting a strong oncogenic power of hPAF1C [6]. However, our study is the first, to our knowledge, to describe the role of hPAF1C in NSCLC.

The oncogene Myc family encodes phosphoproteins involved in cell growth and oncogenesis. It includes N-Myc, C-Myc and L-Myc proteins, which have a Helix-loop-Helix motif, and act as transcription factors. Overexpression and amplification of Myc have been described in several cancers, including lung cancer, on cell lines or tumor samples [8,9]. Myc is involved in cell proliferation by regulating the expression of various regulators of the cell cycle [1], and is described to be activated in cancer stem cells [10]. Moreover, there is a close interaction between Shh pathway, known to be a key pathway in CSCs, and Myc. Activation of the Shh pathway causes an activation of Myc [11,12]. In addition, inhibition of Gli by GANT61 compound inhibits *in vitro* and *in vivo* CSCs growth, c-Myc expression, and inhibition of other CSCs markers as NANOG, OCT4 and Sox2 [13].

In conclusion, we demonstrated that hPAF1C is a key prognostic factor in early-stage NSCLC, with a close interaction with c-Myc expression. hPAF1C expression has a strong impact in NSCLC growth *in vitro*. These results highlight the importance of CSCs in NSCLC proliferation, migration and aggressiveness. Development of targeted therapies against hPAF1C and c-Myc could be interesting in NSCLC treatment.

Bibliography

[1] Zajac-Kaye M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. Lung Cancer. 34 Suppl 2 (2001) S43-6.

[2] Carney DN, Gazdar AF, Bunn PA Jr, et al. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients. Stem Cells. 1 (1982) 149-64.

[3] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell. 121 (2005) 823-35.

[4] Moniaux N, Nemos C, Deb S, et al. The human RNA polymerase II-associated factor 1 (hPaf1): a new regulator of cell-cycle progression. PLoS One. 4 (2009) e7077.

[5] Ponnusamy MP, Deb S, Dey P, et al. RNA polymerase II associated factor 1/PD2 maintains self-renewal by its interaction with Oct3/4 in mouse embryonic stem cells. Stem Cells. 27 (2009) 3001-11.

[6] Moniaux N, Nemos C, Schmied BM, et al. The human homologue of the RNA polymerase II-associated factor 1 (hPaf1), localized on the 19q13 amplicon, is associated with tumorigenesis. Oncogene.25 (2006) 3247-57.

[7] Chaudhary K, Deb S, Moniaux N, et al. Human RNA polymerase II-associated factor complex: dysregulation in cancer. Oncogene. 26 (2007) 7499–7507.

[8] Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. Oncogene. 18 (1999) 3004-16.

[9] Broers JL, Viallet J, Jensen SM, et al. Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. Am J Respir Cell Mol Biol. 9 (1993) 33-43.

[10] Mimeault M, Batra SK. Altered gene products involved in the malignant reprogramming of cancer stem/progenitor cells and multitargeted therapies. Mol. Aspects Med. S0098-2997 (2013) 00059-9.

[11] Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. Development.130 (2003) 15-28.

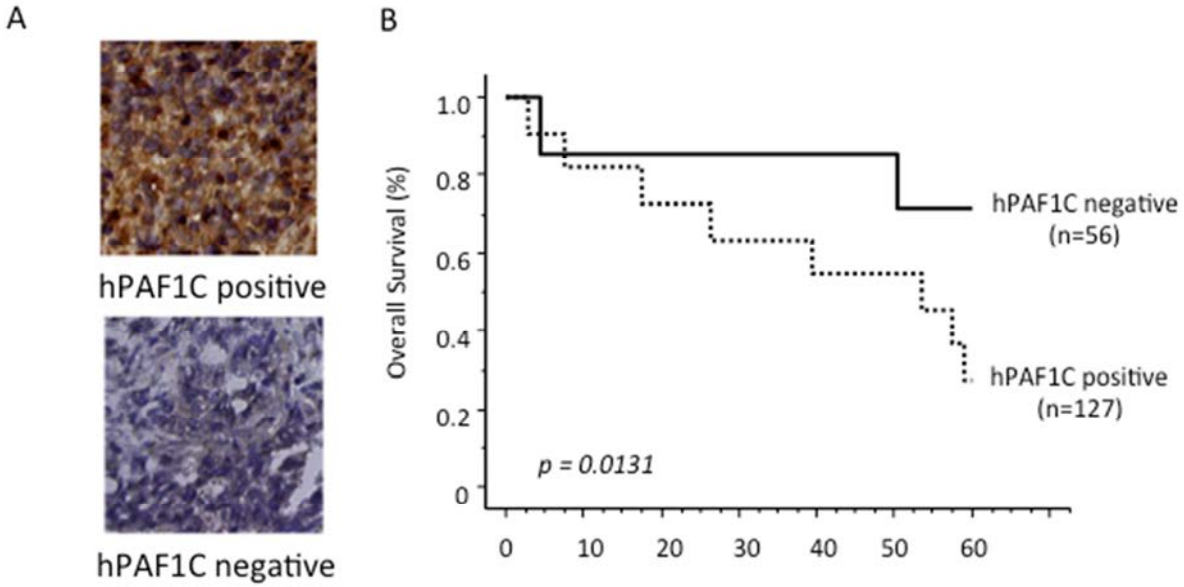
[12] Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, et al. Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. Cell. 124 (2006) 47-59.

[13] Fu J, Rodova M, Roy SK, et al. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft. Cancer Lett. 330 (2013) 22-32.

Table 1. Clinical Characteristics of NSCLC Patients

	NSCLC (N=183)	
Characteristics	Number	%
Age (years)		
<60	69	37.7
≥60	114	62.3
Gender		
Male	106	57.9
Female	77	42.1
Smoking Status		
Never	32	17.5
Past	99	54.1
Current	52	28.4
Tumor Size (cm)		
3 cm or less	102	55.7
over 3 cm	81	44.3
Pathological Stage		
I	99	54.1
II	60	32.8
III	24	13.1
Histology		
Adenocarcinoma	101	55.2
Squamous	57	31.1
Large Cell	25	13.7
Operation Procedure		
Wedge Resection	23	12.6
Lobectomy	136	74.3
Bilobectomy	8	4.4
Pneumonectomy	16	8.7
Vital Status		
Alive	78	42.6
Dead	105	57.4
Follow-up (months)		
Median	45.8 ± 2.2	
Range	2.7 ~ 60.0	

Figure 1. hPAF1C expression as a prognostic marker for early-stage NSCLC patients.



A: representative IHC staining of hPAF1C. **B:** overall survival (OS) according to hPAF1C expression in 183 NSCLC samples.

Figure 2. Positive correlation between hPAF1C and c-MYC mRNA expression in NSCLC tissue samples (A) and in lung cancer cell lines (B), evaluated by RT-PCR.

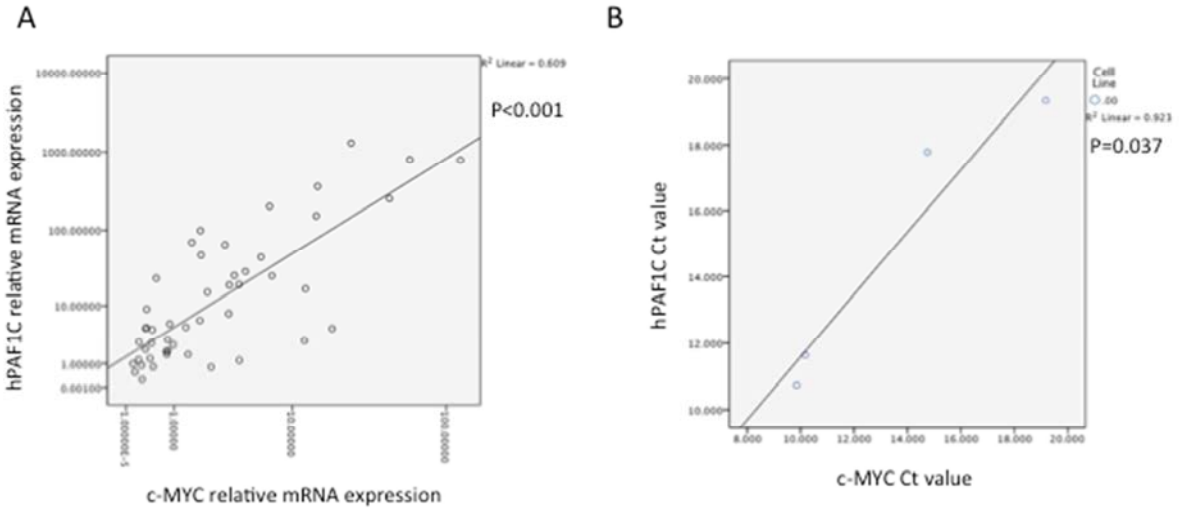
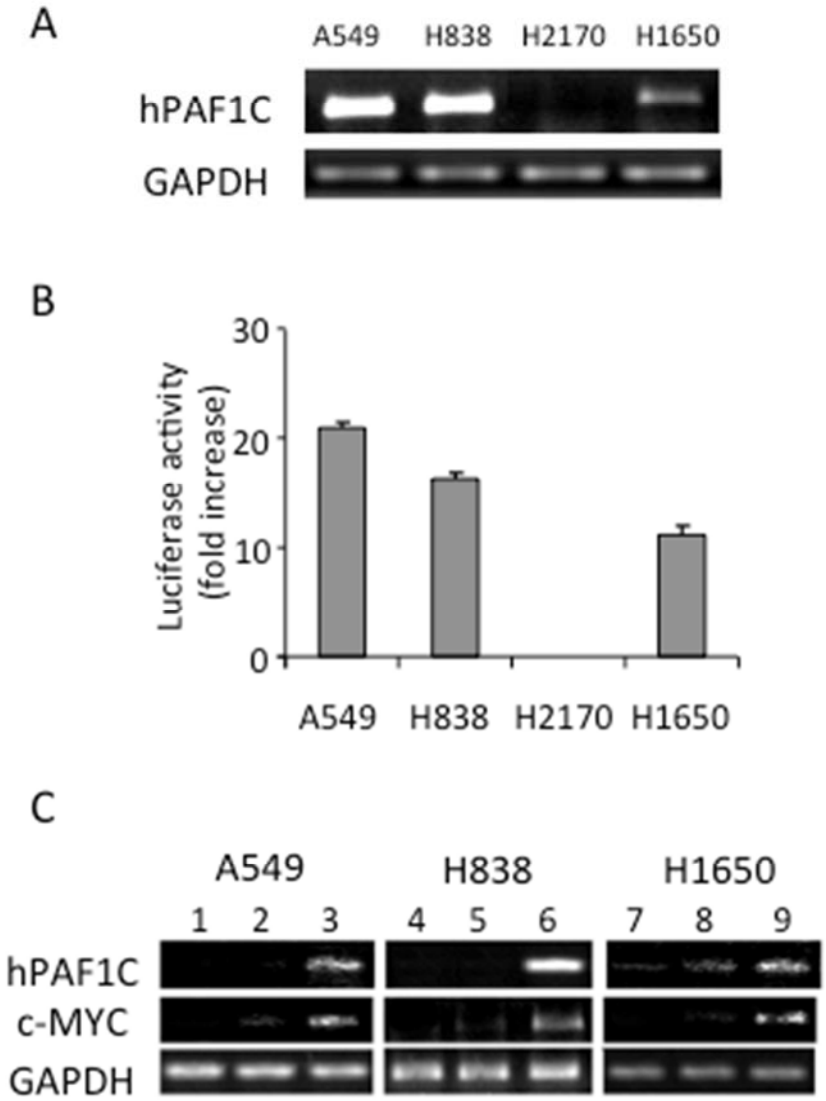


Figure 3. hPAF1C expression regulates transcriptional activity of c-MYC.



A: hPAF1C transcript levels **B:** hPAF1C expression regulates transcriptional activity of c-MYC by using a c-MYC promoter-luciferase construct in lung cancer cell lines. All measured luciferase activities were normalized to pRL-TK vector activity. The data represent means + S.D. **C:** shRNA knock-down of hPAF1C expression causes down-regulation of c-MYC expression in NSCLC cell lines. Lanes 1, 4, 7: siRNA-1; Lanes 2, 5, 8L siRNA-2, Lanes 3, 6, 9: control siRNA.

Figure 4. Knock-down of hPAF1C expression by shRNA inhibits proliferation (A) and colony formation (B) of NSCLC cells.

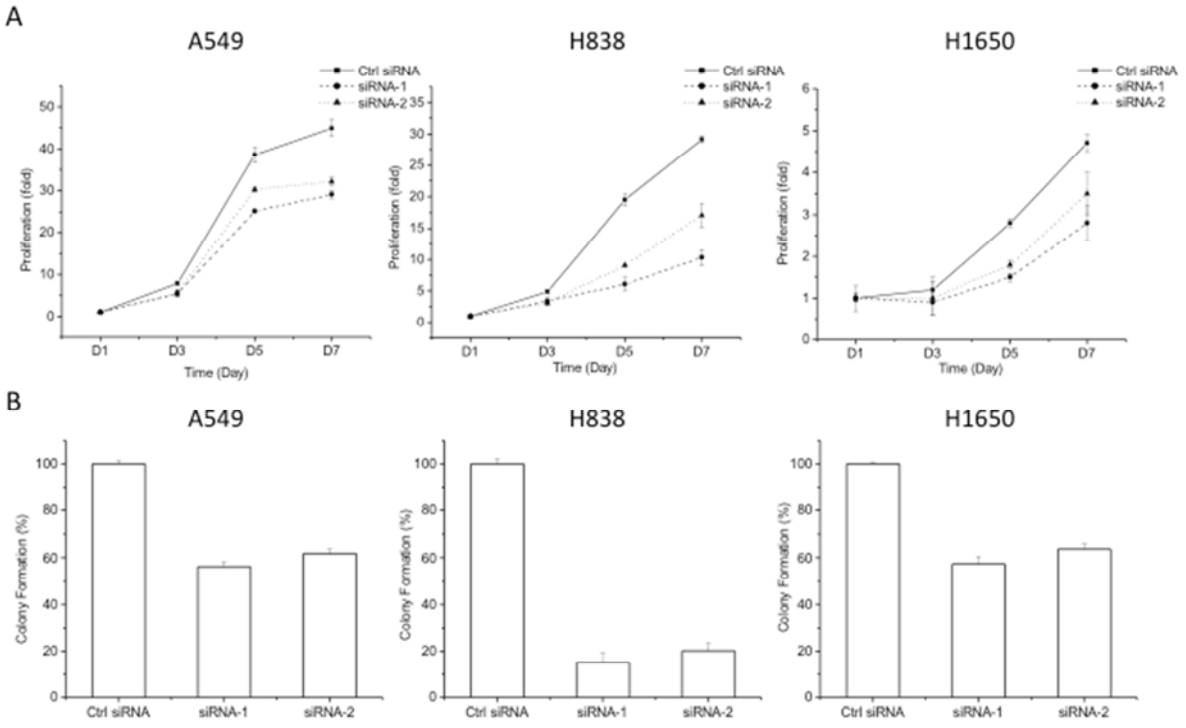
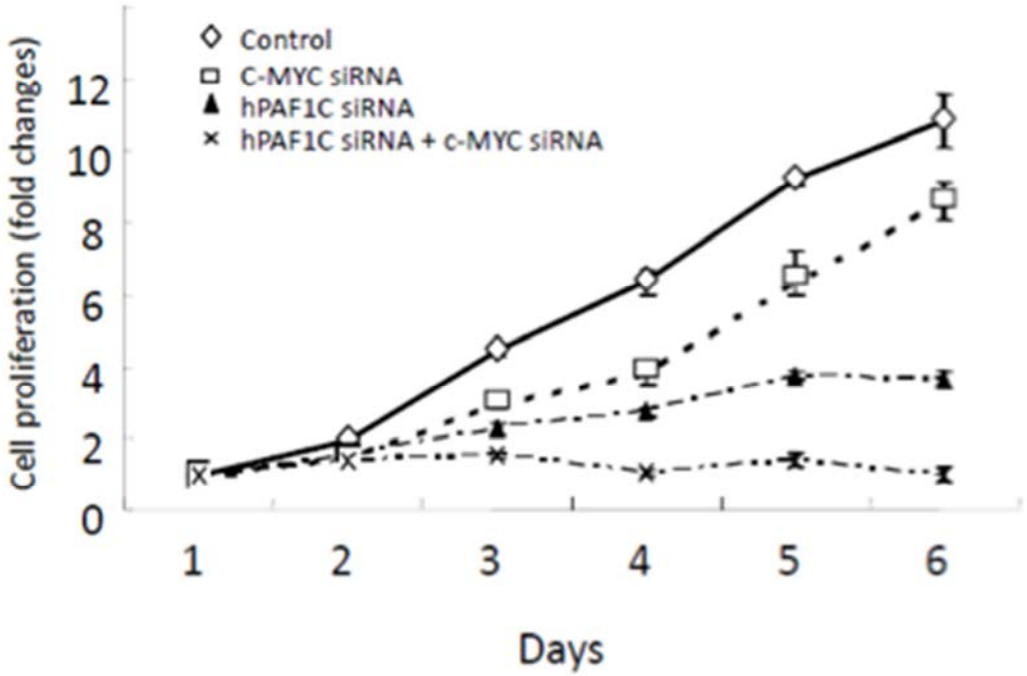


Figure 5. Knock-down of hPAF1C and c-MYC expressions synergistically inhibit growth of NSCLC H838 cells.



IV. DISCUSSION

Ce travail de thèse a tenté une analyse des mécanismes de résistance à la chimiothérapie à base de sel de platine dans le CBNPC, avec en particulier l'étude de l'activation de la voie Shh. Nous avons choisi d'étudier d'abord une cohorte de patients définis comme réfractaires à la chimiothérapie, c'est-à-dire ayant une progression d'emblée sous chimiothérapie à base de platine. Nous avons montré que le sous-type sarcomatoïde était le seul facteur prédictif de chimiorésistance (article n°1). L'étude de l'activation de la voie Shh à travers l'étude de l'expression de Gli1 et Gli2 a permis de mettre en évidence son association à la chimiorésistance. Une forte expression de Gli2 (score Gli2 positif) était associée à la progression sous chimiothérapie à base de sels de platine (article n°3). La SSP et la survie globale étaient plus courtes chez ces patients par rapport à ceux ayant un score de Gli2 négatif. L'inhibition de la voie Shh permettait une sensibilisation des cellules tumorales au cisplatine, notamment pour les lignées les plus chimiorésistantes. Ces résultats ont été confirmés sur un autre modèle de cancer thoracique, le MPM (article n°5). Nous avons ainsi pu montrer l'impact direct de l'activation de la voie Shh dans la prolifération et la croissance tumorale dans ce type de tumeur. L'inhibition de la voie Shh sensibilisait significativement *in vitro* les cellules à la chimiothérapie. L'activation de la voie Shh, étudiée par l'étude en IHC de Gli1, était corrélée à la TEM, concidérée comme un marqueur de chimiorésistance, dans les CBNPC de type épidermoïdes (article n°4). Enfin, l'activation de la voie Shh semble avoir un impact pronostique dans les CBNPC opérés de stade précoce (article n°6). En effet, l'expression de hPAF1, membre du complexe PAF intervenant comme co-facteur de transcription des protéines Gli, était un facteur de mauvais pronostic pour les CBNPC de stade précoce opérés, et était associée à la prolifération tumorale via l'activation de c-Myc.

1. L’activation de la voie Shh a un rôle pronostique et prédictif

Nous avons montré que l’activation de la voie Shh était significativement associée à la chimiorésistance (score Gli2 positif avec un HR à 2,64 pour la SSP en analyse multivariée (IC95% 1,05-6,63) (article n°3). Nous avons aussi testé le score d’intensité du marquage Gli2 comme variable continue en analyse multivariée. Dans ce cas, le score d’intensité Gli2 a aussi un impact indépendant sur la SSP (HR=1,75 ; IC95% 1,15-2,69 ; p=0,01) et sur la survie globale (HR=1,81 ; IC95% 1,18-2,77 ; p=0,007), ce qui valide le rôle pronostique et peut être prédictif de l’expression de Gli2. Le rôle prédictif de Gli2 ne pourra cependant être affirmé qu’après validation de ce score sur une nouvelle cohorte de patients et surtout par l’étude de l’interaction du score de Gli2 entre une population traitée par chimiothérapie et l’autre par placebo. Les limites de notre étude sont le caractere rétrospectif, sa petite taille et l’étude de prélèvements histologiques issus d’exérèse chirurgicale. Le score Gli2 doit donc être validé de façon prospective sur un plus grand nombre de prélèvements, ainsi que sur des prélèvements de petite taille, comme les biopsies bronchiques ou transpariétales.

L’activation de la voie Shh joue aussi un rôle pronostique dans le CBNPC de stade précoce (article n°4). En effet, nous avons montré que l’expression de Gli1 en IHC était corrélée à la survie sans récidive des carcinomes épidermoïdes opérés. L’expression de Gli2 n’a pas été étudiée sur les cohortes de carcinomes épidermoïdes de cette étude. Nos résultats suggèrent donc un rôle pronostique de Gli1 pour les stades précoces, et un rôle pronostique et prédictif de Gli2 pour la progression sous chimiothérapie à base de sels de palatine. La distinction entre le rôle pronostique et prédictif de Gli2 n’est cependant pas possible avec certitude dans notre étude, car tous les patients étaient traités par chimiothérapie.

Très peu d'études se sont intéressées aux possibles différences entre Gli1 et Gli2 en terme d'activité transcriptionnelle. Il semble que Gli1 et Gli2 se fixent au même promoteur (Agren 2004). Le premier médiateur mis en jeu lors de l'activation de la voie Shh ne serait cependant pas Gli1, qui serait synthétisé secondairement, mais Gli2. Gli2 serait notamment capable d'induire directement la transcription du gène *Gli1* (Ikram 2004). En résumé, l'activation première de la voie Shh induirait d'abord l'activation de Gli2, qui entraînerait secondairement la transcription des gènes cibles, incluant Gli1, dont l'activité transcriptionnelle interviendrait dans un 2ième temps (Lipinski 2006). On notera toutefois que ces études concernent pour la plupart l'activation de la voie Shh au cours du développement ou dans les tissus normaux, et non dans le contexte des tumeurs solides. La majorité des études sur le CBNPC ont utilisé Gli1 et non Gli2 comme marqueur de la voie Shh. Il est probable qu'il existe des différences d'action entre ces 2 protéines dans le CBNPC. En effet, nous avons montré que, bien que la majorité des CBNPC exprimait à la fois Gli1 et Gli2, seule l'expression de Gli2 était corrélée à la chimiorésistance. De nouvelles études sont nécessaires pour déterminer les rôles respectifs de Gli1 et Gli2 dans le CBNPC.

La grande majorité des cellules tumorales exprime Gli1 et Gli2 en IHC. Bien que la voie Shh soit fortement liée aux CSC (Peacock 2008, Song 2011, Rodova 2012), les cellules exprimant Gli1 ou Gli2 ne correspondent pas toutes à des CSC, qui ne représentent qu'une très faible proportion des cellules tumorales. Notre hypothèse est que les CSC sont les cellules sources de la production de Shh au sein de la tumeur, qui va avoir une action autocrine et paracrine. L'activation de la voie Shh, évaluée en IHC par l'expression de Gli, serait le reflet de l'activité des CSC au sein du CBNPC.

2. Les CSC jouent un rôle important dans la chimiorésistance des CBNPC

Les données de la littérature, ainsi que les résultats de nos travaux, suggèrent que les voies de signalisation cellulaires connues pour être activées au sein des CSC, comme la voie Shh, l'activation de hPAF1C et de c-Myc, jouent un rôle majeur non seulement dans la carcinogenèse bronchique, mais également dans la prolifération tumorale et la chimiorésistance. Notre hypothèse est que les CSC sécrètent la protéine Shh, qui va avoir une action autocrine et paracrine. L'action autocrine permettrait une auto-activation et le maintien du stock des CSC. L'administration d'une chimiothérapie cytotoxique serait efficace sur la plupart des cellules tumorales, mais pas sur les CSC qui sont chimiorésistantes. Le maintien de ce stock de CSC au cours de la chimiothérapie permettrait le renouvellement rapide du clone tumoral et la progression. L'activité juxtacrine et paracrine permettrait d'autre part l'activation de la voie Shh au sein des autres cellules tumorales, induisant ainsi des signaux de prolifération, de migration cellulaire et de TEM, participant également à la chimiorésistance et la dissémination métastatique. Les résultats de notre travail qui montre la corrélation entre l'activation de la voie Shh et la TEM vont dans ce sens (article n°4). La corrélation entre TEM et CSC a été montré dans un certain nombre d'études, notamment dans le cancer bronchique (Chiou 2010, Giarnieri 2013, Gomez-Casal 2013, Kim 2013, Kumar 2013, Sato 2012, Wang 2014). Ainsi, l'induction de l'expression d'*OCT4* et *NANOG* dans des cellules d'adénocarcinome bronchique induit un phénotype de CSC et de TEM, tandis que l'inhibition de ces mêmes gènes inhibe la TEM, bloque le pouvoir métastasiant et augmente la survie des souris porteuses de xénogreffes (Chiou 2010). Les cellules de CBNPC résistantes *in vitro* à la radiothérapie (Gomez-Casal 2013) ou à la chimiothérapie (Wang 2014) arborent conjointement des marqueurs de CSC et de TEM. De même,

Maitah et al. (2011) ont suggéré une corrélation *in vitro* entre la voie Shh et la TEM, via l'expression de TGFβ.

Les CSC représentent moins de 0,5% des cellules tumorales et semblent jouer un rôle dans la prolifération tumorale et la chimiorésistance. hPAF1C (ou PD2), connu comme régulateur de la transcription, est un gène important au sein des cellules souche embryonnaires et des CSC : il serait en effet responsable du maintien du stock de cellules souches embryonnaires (Ponnusamy 2009). L'inhibition d'hPAF1C induit une diminution de l'expression d'*OCT3*, *OCT4* et de *NANOG*, mais aussi de Shh (Ponnusamy 2009). Le niveau d'expression de hPAF1C est plus élevé dans les CSC que dans les cellules cancéreuses différenciées (Ponnsumay 2009). L'expression de hPAF1C avait un rôle pronostique dans le CBNPC (article n°6), via une interaction avec un autre régulateur du cycle cellulaire, c-Myc. hPAF1C et c-Myc sont liés à l'activation de la voie Shh (Kenney 2003, Hallikas 2006, Mosimann 2009, Ponnusamy 2009). Au total, la voie Shh semble être un élément clé dans l'oncogenèse bronchique, la prolifération tumorale et la chimiorésistance. Le développement d'une stratégie thérapeutique incluant des thérapies ciblant la voie Shh, que ce soit un inhibiteur de Smo ou de Gli, semble logique dans la prise en charge des cancers thoraciques. Il est intéressant de noter que plusieurs études, dont un de nos travaux, suggèrent une efficacité supérieure des inhibiteurs de Gli (comme GANT61 ou Gli-I) par rapport aux inhibiteurs de Smo (comme le vismodegib) en termes d'activité antitumorale et de chimiosensibilisation (article n°5, Huang 2014). Le seul produit ciblant la voie Shh actuellement sur le marché est le vismodegib (Erivedge® (Genentech, USA)), indiqué en monothérapie dans le traitement des carcinomes baso-cellulaires de stade localement avancé et non accessible à un traitement chirurgical ou par radiothérapie, ou de stade métastatique. Nos résultats, en complément de ceux de la

littérature, incitent fortement à développer des essais cliniques spécifiques dans le CBNPC et dans le MPM.

3. Le sous-type histologique sarcomatoïde est associé à la chimiorésistance

Le sous-type histologique carcinome sarcomatoïde est impliqué dans la chimiorésistance, avec un HR pour la progression d'emblée à 7,50 (article n°1) et HR pour la SSP à 11,91 (article n°3). Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature. Notre groupe a ainsi pu montrer sur une cohorte de 97 carcinomes sarcomatoïdes que 69% de ces tumeurs étaient réfractaires à la chimiothérapie, avec une SSP de 2 mois (Vieira 2013). Peu d'études se sont intéressées à l'identification de cible moléculaire accessible à un traitement ciblé dans ce type tumoral. On retiendra l'expression marquée de marqueurs mésenchymateux, comme la vimentine, notamment dans le contingent cellulaire sarcomatoïde de ces tumeurs (Nakajima 1999n Huo 2006, Yoo 2005), ainsi que la surexpression et/ou l'amplification de c-met (Lee 2011, Tsuta 2012, Vieira 2014). Ces résultats ouvrent la voie à de possibles thérapies ciblées pour ces tumeurs rares, jusqu'ici sans traitement spécifique. Plusieurs études sont en cours au laboratoire.

4. Orientations futures pour la recherche sur la voie Shh et CBNPC

Les orientations futures en termes de recherche sur le rôle de la voie Shh dans la chimiorésistance des CBNPC sont multiples. Un premier axe pourrait tester l'impact de la voie Shh dans le modèle de CBNPC chimioréfractaire que sont les carcinomes

sarcomatoïdes. Nos résultats ont montré que l'inhibition de la voie Shh, sur des modèles de culture primaire de carcinome sarcomatoïde, permettait une sensibilisation au cisplatine, avec effet synergique sur la cytotoxicité. L'utilisation de modèles de xénogreffes sur souris *nude* de cellules de carcinome sarcomatoïde issues de cultures primaires permettront de valider ces résultats *in vivo*. Un autre axe de recherche serait la mise en évidence de la source de l'activation de la voie Shh dans les CBNPC. Comme évoqué ci-dessus, notre hypothèse est qu'il s'agit d'une activation auto- et paracrine, avec sécrétion de Shh par les CSC. Nous pourrions ainsi isoler les CSC à partir de lignées cellulaires ou de cultures primaires de CBNPC par tri cellulaire (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), et évaluer l'expression de Shh au sein des CSC et des autres cellules tumorales, et celle des facteurs en aval de la voie (Ptch, Smo, Gli). Ceci pourrait être réalisé par RT-PCR, Western Blot, voire analyse du transcriptome par microarray. Du fait de la faible concentration d'ARN attendue pour les CSC, des techniques plus sensibles comme la PCR digitale (*digital dropplet PCR*) pourrait être utilisées. Enfin, un dernier axe de recherche serait l'étude de l'action de Shh sur le microenvironnement tumoral. En effet, certaines études ont suggéré une action de Shh non seulement sur les cellules tumorales, mais également sur le microenvironnement, et en particulier sur les fibroblastes. Ainsi, Shh sécrétée par les cellules de CBNPC serait capable d'induire la prolifération, la migration, la survie des fibroblastes, et la synthèse de collagène (Bermudez 2013). Shh serait aussi capable de faire sécréter par les fibroblastes des signaux proangiogéniques et prométastasiants, comme le VEGF ou le LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Bermudez 2013). Cette action de Shh sur le stroma serait ainsi le corolaire de l'action de Shh sur le mésenchyme durant le développement, mais de façon dérégulée. Par ailleurs, le rôle potentiel de la voie Shh au niveau des cellules immunes du microenvironnement tumoral reste aujourd'hui inconnu. Shh serait capable d'agir au

niveau des lymphocytes CD4+, avec une induction de la sécrétion de TGFβ (Steward 2002, Furler 2012). L'interaction de Shh avec le microenvironnement inflammatoire tumoral a été évoquée dans le médulloblastome. Wang et al. (2003) ont montré que l'Interferon-gamma (IFNγ), sécrété par les lymphocytes CD4+ et les lymphocytes CD8+, induisait une activation de la voie Shh dans les cellules tumorales. De nouveaux travaux sont nécessaires pour mieux comprendre l'interaction entre l'activation de la voie Shh et le microenvironnement tumoral.

V. CONCLUSION

Malgré des progrès majeurs accomplis dans la prise en charge des formes étendues présentant une addiction oncogénique, la majorité des CBNPC de stade métastatique est traitée par chimiothérapie à base de sels de platine en 1^{ière} ligne de traitement. Le problème de la chimiorésistance est donc une préoccupation majeure. Malgré une littérature très riche sur la recherche de facteurs prédictifs, peu de marqueurs ont été validés dans les formes étendues. Nous avons montré, dans ce travail de thèse, que la voie Shh jouait un rôle probable dans la chimiorésistance des CBNPC. De nombreux travaux sont nécessaires pour valider ces résultats, mieux comprendre le mode d'activation de la voie Shh au sein des CBNPC et déterminer la meilleure stratégie thérapeutique inhibitrice de cette voie, afin d'améliorer la réponse à la chimiothérapie et la survie des patients. Des études sur de plus larges effectifs de patients sont également prévues pour confirmer nos résultats. Des analyses prospectives pour chercher un impact de l'activation de la voie Shh sur la résistance à la radiochimiothérapie est également prévue.

VI. ANNEXE : autres manuscrits

Vieira T, Antoine M, Fallet V, Duruisseaux M, **Giroux Leprieur E**, Poulot V, Rabbe V, Sclick L, Beau-Faller M, Lacave R, Lavole A, Cadranel J, Wislez M. Blood vessel invasion is a major feature and a factor of poor prognosis in sarcomatoid carcinoma of the lung. **Lung Cancer** 2014;85:276-81.

Giroux Leprieur E, Hirata T, Mo M, Chen Z, Okamoto J, Clement G, Li H, Wislez M, Jablons DM, He B. The Homeobox Gene EMX2 is a prognostic and predictive marker in Malignant Pleural Mesothelioma. **Lung Cancer** 2014;85:465-71.

Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Zhang H, Zheng Q, Yang Y, Cheng R, Jin JQ, Luh TW, Yang C, Tseng HHK, **Giroux Leprieur E**, Hao X, Wang C, Jablons DM, He B. EMX2 is a predictive marker for adjuvant chemotherapy in lung squamous cell carcinomas. Soumis à PlosOne.

Lung Cancer 85 (2014) 276–281

Contents lists available at ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan

Blood vessel invasion is a major feature and a factor of poor prognosis in sarcomatoid carcinoma of the lung

Thibault Vieira[a,b], Martine Antoine[a,c], Anne-Marie Ruppert[a,b], Vincent Fallet[a], Michael Duruisseaux[a], Etienne Giroux Leprieur[a], Virginie Poulot[a,d], Nathalie Rabbe[a], Laurene Sclick[a], Michele Beau-Faller[e], Roger Lacave[d], Armelle Lavole[a], Jacques Cadranel[a,b], Marie Wislez[a,b,*]

[a] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, GRC n°04, Theranoscan, F-75252 Paris, France
[b] AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, F-75970 Paris, France
[c] AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'Anatomie pathologique, F-75970 Paris, France
[d] AP-HP, Hôpital Tenon, Plateforme de Génomique des Tumeurs Solides, F-75970 Paris, France
[e] Hôpital de Hautepierre, Laboratoire de Biochimie et de biologie moléculaire, F-67098 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 March 2014
Received in revised form 30 May 2014
Accepted 8 June 2014

Keywords:
Non-small-cell lung carcinoma
Sarcomatoid carcinoma
Biomarker
Blood vessel invasion
Prognosis
Molecular classification

ABSTRACT

Objectives: Pulmonary sarcomatoid carcinomas (SC) are highly disseminated types of non-small-cell lung carcinoma. Their prognosis is poor. New therapeutic targets are needed to improve disease management.
Materials and methods: From 1995 to 2013, clinical and survival data from all consecutive patients with surgically treated SC were collected. Pathological and biomarker analyses were performed: TTF1, P63, c-MET and ALK expression (immunohistochemistry), PAS staining, ALK rearrangement (FISH), and *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA*, and *MET* genes mutations (PCR).
Results: Seventy-seven patients were included. Median age was 61 years (53–69). Histological subtypes were pleomorphic carcinoma (78%), carcinosarcoma (12%), and giant-cell and/or spindle-cell carcinoma (10%). Blood vessel invasion (BVI) was present in 90% of cases. Morphology and immunohistochemistry were indicative of an adenocarcinoma, squamous, and adenosquamous origin in 41.5%, 17% and 11.5%, respectively, 30% remained not-otherwise-specified. *KRAS*, *PIK3CA*, *EGFR*, and *MET* mutations were found in 31%, 8%, 3%, and 3%, respectively. No tumors had *HER2* or *BRAF* mutations, or ALK rearrangement, whereas 34% had a c-MET positive score. Five-year overall survival (OS) was 29% for the whole population. At multivariate analysis, tumor size <50 mm (HR = 1.96 [1.04–3.73], $p = 0.011$), no lymph-node metastasis (HR = 3.25 [1.68–6.31], $p < 0.0001$), no parietal pleural invasion (HR = 1.16 [1.06–1.28], $p = 0.002$), no BVI (HR = 1.22 [1.06–1.40], $p = 0.005$), and no squamous component (HR = 3.17 [1.48–6.79], $p = 0.01$) were associated with longer OS. Biomarkers did not influence OS.
Conclusion: Dedifferentiation in NSCLC could lead to SC and an epithelial subtype component could influence outcome. BVI was present in almost all SCs and was an independent factor of poor prognosis.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In 2004, the World Health Organization classification of non-small-cell lung carcinomas (NSCLC) defined pulmonary sarcomatoid carcinomas (SCs) as a small subgroup of poorly differentiated tumors that contain sarcoma or sarcoma-like elements [1]. Diagnosis is usually based on specific morphological aspects. In some cases, immunohistochemical analysis of the expression of multiple keratin and epithelial membrane antigen are necessary to demonstrate the epithelial differentiation in the sarcomatoid component [1]. Retrospective studies show that these tumors are (i) associated with a poor prognosis whatever the stage at diagnosis, i.e., early [2] or metastatic [3,4], and (ii) resistant to conventional chemotherapy, with two-thirds of patients presenting at first evaluation with a progressive disease under a platinum-based regimen [4]. Improving our knowledge of SCs could improve the management of these patients and lead to the development of specific therapeutic trials.

* Corresponding author at: AP-HP, Hôpital Tenon, Service de Pneumologie, F-75970 Paris, France. Tel.: +33 1 56 01 68 38.
E-mail address: marie.wislez@tnn.aphp.fr (M. Wislez).

http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.06.004
0169-5002/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

In this retrospective study, we collected clinical, pathological, and survival data from a cohort of 77 patients with surgically treated primary pulmonary SCs. We also performed periodic-acid-Schiff (PAS) staining, immunohistochemical analysis for TTF1, P63, c-MET and ALK proteins, Fluorescent in situ hybridization (FISH) for ALK rearrangement and genotyping for *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA*, and *MET* genes.

2. Materials and methods

2.1. Patients

From January 1995 to April 2013, all consecutive patients with pathologically proven primary pulmonary SC based on lung-tumor resections were identified from the archive database at the Department of Pathology (Tumorothèque des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien). Patients with a tumor biopsy taken by mediastinoscopy or pleuroscopy were not included. All tumors were reviewed by an expert lung pathologist (M.A.) and classified according to the 2004 WHO classification.

Clinical characteristics and surgical staging, according to the seventh edition of the TNM classification, were collected [5]. Disease-free survival (DFS) was defined as the time from surgery to relapse or until the endpoint, defined as the 1st April 2013. Overall survival (OS) was defined as the time from surgery to death or until the endpoint. According to national guidelines, each patient signed a research-approval form.

2.2. Histological analyses

For each tumor sample, the following pathological characteristics were collected: histological subtype, presence of an epithelial component, and its subtype (i.e., adenocarcinoma, squamous, or large-cell carcinoma), lymphatic and vascular emboli, visceral and parietal pleural invasion, blood vessel invasion, and necrosis. Vascular or lymphatic emboli were defined by the presence of tumoral cells inside blood or lymphatic vessels distant from the primary tumor. Blood vessel invasion was defined by contiguous tumoral invasion of the blood vessels. The percentage of tumoral necrosis was evaluated. PAS staining was performed. The threshold for positivity was set at 5% of positive cells, as previously described [6].

2.3. Biomarker analyses

Formalin-fixed paraffin-embedded samples were used for immunohistochemistry and molecular analyses. For immunohistochemistry, 3-μm sections were used. TTF1 (clone 8G7G3/1, 1/100, 32 min, Dako®, Les Ulis, France) and P63 (clone 4A4, 1/100, 40 min, Clinisciences®, Nanterre, France) immunohistochemistry were performed on a benchmark system (Ventana Medical System®, USA), as previously described [6]. The threshold for positivity was set at 5% of positive cells with an intensity of ≥1.

The ALK protein was evaluated using a monoclonal mouse antibody (clone 5A4, Abcam®, UK) on a benchmark system [7]. ALK was considered positive when at least 10% of tumor cells with an intensity ≥2 were stained [8]. The H2228 cell line was used as an external positive control. c-MET expression was evaluated using a monoclonal rabbit antibody (clone SP44) (Genentech®, USA) on a benchmark system [9]. Scoring was based on intensity and percentage of positive cells [10]. The internal control was bronchial epithelium staining of moderate intensity. Four categories were defined: score 3+ (≥50% of tumor cells with strong intensity), 2+ (≥50% of tumor cells with moderate intensity), 1+ (≥50% of tumor cells with weak intensity), 0 (no staining or <50% of tumor cells with weak intensity). c-MET positivity was defined as a score ≥2+ [10].

Genotyping analysis of *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *PIK3CA*, and *MET* genes was performed (methods detailed in Supplementary Table 1). The presence of tumor cells was evaluated on hematoxylin-and-eosin-stained sections. For genotyping, DNA was extracted from 3 × 10-μm sections with a QIAmp DNA mini kit® (Qiagen, Hilden, Germany).

ALK FISH was performed using Vysis LSI ALK (Dual Color, Break Apart Rearrangement Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). ALK gene rearrangement was defined as positive when ≥15% of scored tumor cells had split ALK 5′ and 3′ probe signals or had 3′ isolated signals, as described previously [11]. If there were ≤50 tumor nuclei within the scribed area that could be enumerated per sample, the sample was considered uninformative.

Table 1
Characteristics of patients with pulmonary sarcomatoid carcinoma (n = 77).

Characteristics	n (%) or median (Q1–Q3)
Age (years)	61 (53–69)
Gender	
Male	59(77)
Female	18(23)
Tobacco status	
Former/current smoker	74(96)
Never-smoker	3(4)
Localization	
Peripheral	57(74)
Central	14(18)
Both central and peripheral	6(8)
Type of surgery	
Lobectomy	48(62)
Pneumonectomy	28(36)
Wedge	1(2)
Neo-adjuvant chemotherapy	20(26)
Tumor size (mm)	50(35–80)
pT extension	
T1	7(9)
T2	33(43)
T3	32(42)
T4	5(6)
pN extension	
N0	40(52)
N1	25(33)
N2	12(15)
Pathological stage (7th TNM)	
I	16(21)
II	33(43)
III	23(30)
IV	5(6)
Histological subtypes	
Pleomorphic carcinomas	60(78)
Carcinosarcomas	9(12)
Giant-cell carcinomas and or spindle-cell carcinomas	8(10)
Necrosis (%)	40(10–51)
Blood vessel invasion	69(90)
Vascular emboli	8(10)
Lymphatic emboli	9(12)
Pleural extension	
Visceral	41(53)
Parietal	18(23)
Endobronchial extension	20(26)

2.4. Statistical analyses

Categorical variables were compared by Chi-squared or Fisher's exact test. Non-normal continuous variables were expressed as medians (Interquartile). The Mann–Whitney test was used on non-normal continuous variables. For survival analysis (DFS, OS), Cox's model was used for univariate and multivariate analyses. Independent variables with a $p < 0.150$ in univariate analyses were

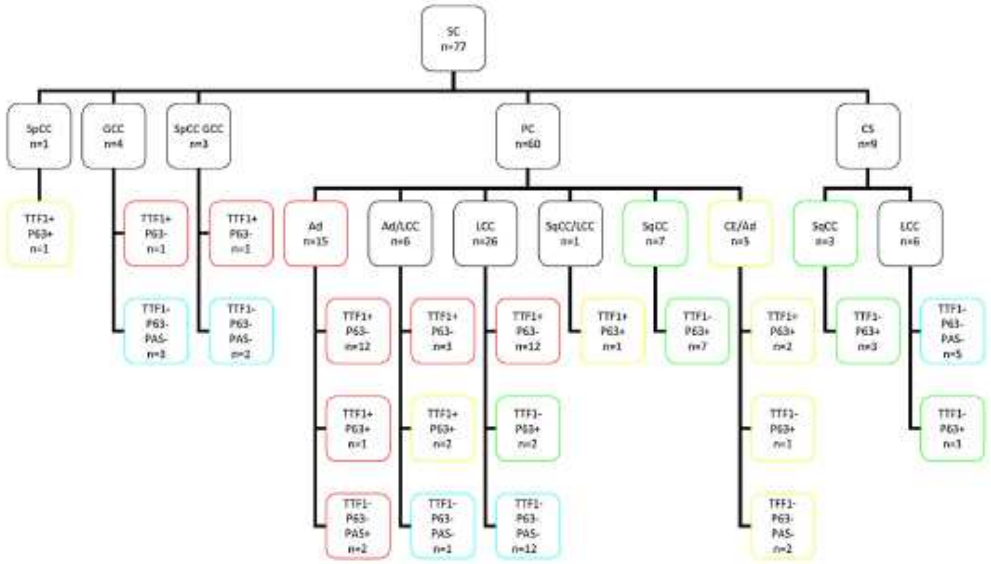


Fig. 1. Study of epithelial origin in sarcomatoid carcinoma according to morphology and immunohistochemistry ($n=77$). SpCC, spindle-cell carcinoma; GCC, giant-cell carcinoma; PC, pleomorphic carcinoma; CS, carcinosarcoma; Ad, adenocarcinoma; SqCC, squamous-cell carcinoma; LCC, large-cell carcinoma. According to morphology and immunohistochemistry, 32 (41.5%), 13 (17%), and 9 (11.5%) of tumors were classified as adenocarcinomas (red frame), squamous-cell carcinomas (green frame), and adenosquamous carcinomas (yellow frame). However, 23 tumors (30%) remained NOS NSCLC (blue frame). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

included in a multivariate analysis, with the final model chosen using a backward stepwise variable selection based on p-value as candidate predictors. Redundant variables were not included in the final model. Results were considered significant if the p value was <0.05. Statistical tests were performed using SPSS 20.0 software (IBM Corporation, New York, NY, USA).

3. Results

3.1. Clinical and pathological characteristics

From 1995 to 2013, 82 consecutive cases of surgically treated SC were identified; among these five were excluded after a pathological review. A median of 26 blocks per case (Q1–Q3, 18–41) was reviewed. Table 1 shows the clinical and pathological characteristics of the study population ($n=77$). Median age was 61 years (Q1–Q3, 53–69). Most patients were males (77%) and smokers (96%). Neo-adjuvant chemotherapy had been performed in 20 patients (26%). A partial response was observed in 11 cases (55%), a stable disease in 8 (40%), and a progressive disease in 1 (5%). The most frequent histological subtype was pleomorphic carcinoma (78%). Most patients had early-stage disease (stages I and II in 64%). Patients with stage IV cancer had a single metastasis (6%: adrenal gland, $n=2$; brain, $n=2$; pleural nodule, $n=1$). Tumors were more often peripheral (74%). Median maximal diameter was 50 mm (range: 35–80). Blood vessel invasion was observed in 90% of cases. Visceral and parietal pleural extension was found in 53% and 23% of cases, respectively.

Morphology and immunohistochemistry (TTF1, P63) were indicative of an adenocarcinoma, squamous and adenosquamous lineage in 41.5%, 17% and 11.5%, respectively, 30% remained not-otherwise-specified (Fig. 1 and Supplementary Figure 1).

3.2. Biomarker analyses

The most frequent molecular abnormality was *KRAS* mutations (31%), including 21 transversions (14 G12C, 4 G12V, 3 G12A) and three G12D transitions (Table 2). All mutations were found in smokers and through all the different histological subtypes. The second most frequent molecular abnormality was a *PIK3CA* mutation (8%), including three E542K and three E545K mutations. All but one, were found in smokers. One E545K mutation was associated with *KRAS* G12C. *PIK3CA* mutations were found in pleomorphic carcinomas and carcinosarcomas. *EGFR* mutations were found in two patients (3%), including one exon-20 insertion (never-smoker patient) and one T790M mutation (smoker). *EGFR* mutations were only found in pleomorphic carcinomas: one with an adenosquamous component and one with a large-cell component. Two deletions (3%) in exon 14 of the *MET* gene were found (one smoker and one never-smoker). No *HER2* or *BRAF* mutation was found. ALK protein was not expressed. No ALK rearrangement was observed by FISH. c-MET score was positive in 26 patients (34%). c-Met overexpression was found in all subtypes except for carcinosarcoma, and was 2.2 times higher in the epithelial than in the sarcomatous component (35.4% vs. 15.9%, $p=0.025$). Among the tumors overexpressing c-Met, 11 had *KRAS* mutations, one *EGFR* T790M, two E545K *PIK3CA*, and one had a *MET* exon-14 deletion. Moreover, all of the 26 patients had tumors with blood vessel invasion ($p=0.046$). Blood vessel invasion was not significantly associated with *KRAS*, *PIK3CA*, or *MET* mutations. No other specific clinical or pathological characteristics were found associated with the biomarkers.

3.3. Survival analyses

At univariate analysis (Table 3), factors associated with longer DFS were stage I rather than stage II or III (HR=4.23

Table 2
Biomarker analyses.

Subtype	TTF1 n(%)		P63 n (%)		KRAS n (%)		PI3KCA n (%)		EGFR n (%)		c-MET n (%)	
	Negative	Positive	Negative	Positive	WT	M	WT	M	WT	M	Negative	Positive
Pleomorphic carcinoma (n = 60)	27(45)	33(55)	44(71)	16(29)	41(68)	19(32)	55(92)	5(8)	58(97)	2(3)	37(62)	23(38)
Epithelial component-based morphology												
Ad (n = 15)	2(13)	13(87)	14(93)	1(7)	10(67)	5(33)	13(87)	2(13)	15(100)	–	5(33)	10(67)
Ad/SqCC (n = 4)	2(50)	2(50)	2(50)	2(50)	3(60)	2(40)	3(60)	2(40)	4(80)	1(20)	4(80)	1(20)
Ad/LCC (n = 5)	8(100)	5(100)	3(60)	2(40)	3(60)	2(40)	5(100)	–	5(100)	–	4(80)	1(20)
SqCC (n = 8)	15(55)	1(100)	–	8(100)	5(71)	2(29)	6(86)	1(14)	7(100)	–	7(100)	–
SqCC/LCC (n = 1)		12(45)	–	1(100)	1(100)	–	1(100)	–	1(100)	–	1(100)	–
LCC (n = 27)			25(93)	2(7)	19(70)	8(30)	27(100)	–	26(96)	1(4)	16(59)	11(41)
Carcinosarcoma (n = 9)	9(100)	–	5(56)	4(44)	8(89)	1(11)	8(89)	1(11)	9(100)	0	9(100)	–
Epithelial component based morphology												
SqCC (n = 3)	3(100)	–	–	3(100)	3(100)	–	3(100)	–	3(100)	–	3(100)	–
LCC (n = 6)	6(100)	–	5(83)	1(17)	5(83)	1(17)	5(83)	1(17)	6(100)	–	6(100)	–
Spindle-cell carcinoma (n = 1)	–	1(100)	–	1(100)	1(100)	–	1(100)	–	1(100)	–	–	1(100)
Giant-cell carcinoma (n = 4)	3(75)	1(25)	4(100)	–	2(50)	2(50)	4(100)	–	4(100)	–	3(75)	1(25)
Giant-cell carcinoma/spindle-cell carcinoma (n = 3)	2(67)	1(33)	3(100)	–	1(67)	2(33)	3(100)	–	3(100)	–	2(67)	1(33)
Total (n = 77)	41(53)	36(47)	56(73)	21(27)	53(69)	24(31)	71(92)	6(8)	75(97)	2(3)	51(66)	26(34)

Ad, adenocarcinoma; SqCC, squamous-cell carcinoma; LCC, large-cell carcinoma.

[1.18–15.18], $p = 0.027$), lobectomy rather than pneumonectomy (HR = 2.81 [1.18–6.72], $p = 0.02$), and absence of lymph-node metastasis (HR = 4.1 [1.48–11.40], $p = 0.007$). At multivariate analysis, absence of lymph-node metastasis (HR = 5.02 [1.75–14.41], $p = 0.003$) and absence of parietal pleural invasion (HR = 1.14 [1.02–1.29], $p = 0.028$) were associated with longer DFS. Biomarkers (*KRAS*, *PIK3CA*, *MET*, *EGFR* mutations, c-MET expression) did not influence DFS.

The 5-year OS was 29% for the overall population: 77% for stage I, 15% for stage II, 10% for stage III, and 0% for stage IV. At univariate analysis (Table 4), factors associated with longer OS were stage I rather than stage II or III (HR = 4.80 [2.13–10.95], $p < 0.0001$), lobectomy rather than pneumonectomy (HR = 2.61 [1.43–4.76], $p = 0.002$), tumor size <50 mm (HR = 2.25 [1.25–4.03], $p = 0.007$), absence of lymph-node metastasis (HR = 2.33 [1.26–4.30], $p = 0.007$), absence of parietal pleural invasion (HR = 1.12 [1.03–1.21], $p = 0.007$), and absence of tumor necrosis <25% (HR = 2.00 [1.03–3.86], $p = 0.04$). According to potential epithelial lineage, the presence of an epithelial component other than squamous was also associated with longer OS (HR = 2.51 [1.24–5.06], $p = 0.01$) (Table 4). At multivariate analysis, tumor size <50 mm (HR = 1.96 [1.04–3.73], $p = 0.011$), absence of lymph-node metastasis (HR = 3.25 [1.68–6.31], $p < 0.0001$), absence of parietal pleural invasion (HR = 1.16 [1.06–1.28], $p = 0.002$), absence of blood vessel invasion (HR = 1.22 [1.06–1.40], $p = 0.005$), and presence of an epithelial component other than squamous (HR = 3.17 [1.48–6.79], $p = 0.005$) were associated with a longer OS. Biomarkers (*KRAS*, *PIK3CA*, *MET*, *EGFR* mutations, c-MET expression) did not influence OS (Table 4).

Table 3
Univariate and multivariate analyses of disease-free survival.[a]

Factor	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (CI 95%)	p*	HR (CI 95%)	p*
Clinical				
Age (<61 vs. ≥61 years)	0.47 (0.20–1.13)	0.091		NS
Gender (female vs. male)	2.00 (0.77–5.1)	0.153		
Tobacco status (smoker/former vs. never)	0.63 (0.84–4.67)	0.647		
Surgery (lobectomy vs. pneumonectomy)	2.81 (1.18–6.72)	0.020		NS
Pathological				
Pleomorphic carcinomas vs. other subtypes	0.81 (0.27–2.43)	0.710		
Stage (I vs. stages II and III)	4.23 (1.18–15.18)	0.027		
Diameter (<5 vs. ≥5 cm)	1.30 (0.57–3.01)	0.532		
Lymph-node metastasis (N0 vs. N+)	4.1 (1.48–11.40)	0.007	5.02 (1.75–14.41)	0.003
Blood vessel invasion (no vs. yes)	1.21 (0.94–1.56)	0.134		NS
Lymphatic emboli (no vs. yes)	1.05 (0.82–1.35)	0.151		
Vascular emboli (no vs. yes)	1.08 (0.94–1.24)	0.255		
Visceral pleural invasion (no vs. yes)	1.02 (0.92–1.13)	0.688		
Parietal pleural invasion (no vs. yes)	1.09 (0.98–1.22)	0.121	1.14 (1.02–1.29)	0.028
Endobronchial extension (no vs. yes)	1.00 (0.89–1.12)	0.931		
Necrosis (<25% vs. ≥25%)	1.32 (0.55–3.18)	0.534		
Other epithelial vs. squamous component	1.840 (0.62–5.50)	0.275		
Molecular				
KRAS mutations (no vs. yes)	0.65 (0.26–1.68)	0.724		
PIK3CA mutations (no vs. yes)	1.8 (0.53–6.22)	0.338		
c-MET overexpression (no vs. yes)	1.04 (0.93–1.16)	0.525		

NS, not significant.
[a] Analyses on 41 patients. 29 missing data, and 7 patients died in the 30 days after surgery were censored. HR: hazard ratio. HR > 1 indicates a longer DFS.
* Cox's model; independent variables with $p < 0.150$ in univariate analyses were included in multivariate analysis; NS variables were retrieved by a step-by-step backward procedure.

Table 4
Univariate and multivariate analyses of overall survival.[a]

Factors	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (CI 95%)	p*	HR (CI 95%)	p*
Clinical				
Age (<61 vs. ≥61 years)	0.83 (0.47–1.47)	0.515		
Gender (female vs. male)	1.14 (0.74–2.68)	0.292		
Tobacco status (smoker/former vs. never)	0.86 (0.20–3.55)	0.831		
Surgery (lobectomy vs. pneumonectomy)	2.61 (1.43–4.76)	0.002		NS
Pathological				
Pleomorphic carcinomas vs. other subtypes	0.93 (0.48–1.79)	0.822		
Stage (I vs. stages II and III)	4.80 (2.13–10.95)	<0.0001		
Diameter (<5 vs. ≥5 cm)	2.25 (1.25–4.03)	0.007	1.96 (1.04–3.73)	0.011
Lymph-node metastasis (N0 vs. N+)	2.33 (1.26–4.30)	0.007	3.25 (1.68–6.31)	<0.0001
Blood vessel invasion (no vs. yes)	1.09 (0.97–1.23)	0.135	1.22 (1.06–1.40)	0.005
Lymphatic emboli (no vs. yes)	1.091 (0.97–1.23)	0.151		
Vascular emboli (no vs. yes)	1.06 (0.96–1.17)	0.267		
Visceral pleural invasion (no vs. yes)	1.07 (0.99–1.15)	0.080		
Parietal pleural invasion (no vs. yes)	1.12 (1.03–1.21)	0.007	1.16 (1.06–1.28)	0.002
Endobronchial extension (no vs. yes)	1.00 (0.92–1.08)	0.977		
Necrosis (<25% vs. ≥25%)	2.00 (1.03–3.86)	0.04		NS
Other epithelial vs. squamous component	2.51 (1.24–5.06)	0.01	3.17 (1.48–6.79)	0.003
Molecular				
KRAS mutations (no vs. yes)	1.12 (0.60–2.08)	0.724		
PIK3CA mutations (no vs. yes)	2.25 (0.793–6.41)	0.127		NS
c-MET overexpression (no vs. yes)	1.05 (0.96–1.14)	0.301		

NS, not significant.
[a] Analysis of 66 patients, 4 missing data, and 7 patients died in the 30 days after surgery were censored. HR: hazard ratio. An HR >1 indicates a longer OS.
* Cox's model; independent variables with $p < 0.150$ in univariate analyses were included in the multivariate analysis; NS variables were retrieved by a step-by-step backward procedure.

4. Discussion

In this cohort of 77 patients with surgically treated lung SC, we found that 90% of patients had blood vessel invasion and 44% had an oncogenic mutation among those performed in routine. The most frequent mutations were *KRAS* (31%) and *PIK3CA* (8%), whereas mutations of *EGFR* (3%) and *MET* (3%) were rare. Moreover, 34% had a positive c-MET score by immunohistochemistry. No ALK translocation was observed.

Most of the patients with SC were smokers, males, and presented large peripheral tumors, as previously reported [12,13]. Neoadjuvant therapy was performed in 26% of patients and was associated with a response in 55%. This rate might be overestimated because of selection bias. The analyses might have underdiagnosed patients with stable or progressive SC who were not eligible for surgery and not included in our study.

Because SCs could be dedifferentiated adenocarcinomas or squamous-cell carcinomas, we tried to demonstrate the potential adenocarcinoma or squamous origin of these tumors using PAS staining, and TTF1 and P63 expression. Thirty-two (41.5%), 13 (17%), and 9 (11.5) SCs could have arisen from adenocarcinoma, squamous, and adenosquamous carcinomas, respectively. Twenty-three (30%) remained not-otherwise-specified NSCLC. The epithelial subtype may have influenced the outcome as presence of squamous differentiation was a factor of poor prognosis in these particular tumors. However, subtype of epithelial component, as a prognostic factor, was not reported in two previous series from Asia that included 70 and 45 patients [12,13]. However, immunohistochemistry had not been used in these series.

The main histological characteristic was blood vessel invasion. Multivariate analysis showed that blood vessel invasion was associated with shorter survival (HR = 1.22 [1.06–1.40], $p = 0.003$). Blood vessel invasion is usually detected in only 30–50% of NSCLC cases and is a poor prognostic factor [12,14,15]. The high prevalence of blood vessel invasion observed in SC could be consistent with this highly disseminated tumor disease, the high rate of atypical metastatic sites, and the poor prognosis [4]. We observed a significant association between blood vessel invasion and c-MET expression in tumor cells, which might underline the pro-angiogenic role of c-MET in this subgroup. The high prevalence of blood vessel invasion might indicate that caution is needed when using bevacizumab in these patients. In our previous report [4], 20% of patients had hemoptysis at diagnosis, which was usually abundant (personal data).

Molecular abnormalities, such as *KRAS* and *PIK3CA* mutations, are frequent in SC and are probably related to tobacco consumption. In this Caucasian cohort, *EGFR* mutations were rare events (3%) and were not "activating mutations". The c-MET score was positive in only 34% of cases. This score was lower than the 52% found in the Metmab trial [10], in which the same antibody and scoring systems were used, but that exclusively included patients with advanced NSCLC disease. We do not know whether the lower c-MET score observed herein is related to the early stage of the disease or to the SC histological subtype. In a Japanese series, c-MET expression was found in 21% of 43 SCs using the same antibody but a different scoring criteria (≥10% of tumoral with strongly stained cells) [16].

Even if SCs are probably dedifferentiated adenocarcinomas or squamous-cell carcinomas, patients with SC need to be screened and included in dedicated clinical trials as results of conventional chemotherapy alone are disappointing. Some molecular abnormalities are "druggable" with a targeted therapy such as *PIK3CA* or *MET* inhibitors [10]. Lastly, this study suggests that blood vessel invasion is a major prognostic factor. Further studies are needed to clarify the mechanisms of blood vessel invasion.

Conflict of interest statement

All authors have no financial or personal conflicts of interest to report.

Acknowledgments

M. Duruisseaux is a Post-Doctoral Fellow funded by "Le Fond de dotation – Recherche en Santé Respiratoire" 2010. T. Vieira is a Post-Doctoral Fellow funded by "Le Fond de dotation – Recherche en Santé Respiratoire" 2011. This study has been supported by

"Subvention 2013 Legs Poix – La Chancellerie des Universités de Paris".

We thank the Tumorothèque des Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien (HUEP), AP-HP, Hôpital Tenon, Service d'Anatomie Pathologique, F-75970 Paris, France, for providing the samples.

We thank J Lambert (Service de Biostatistique et Information Médicale Hôpital Saint Louis, Université Paris VII, Paris) for the statistical review.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.06.004.

References

[1] Travis WD. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. IARC; 2004. p. 53–8.
[2] Yendamuri S, Caty L, Pine M, Adem S, Bogner P, Miller A, et al. Outcomes of sarcomatoid carcinoma of the lung: a surveillance, epidemiology, and end results database analysis. Surgery 2012;152:397–402.
[3] Giroux Leprieur E, Lavole A, Ruppert A-M, Gounant V, Wislez M, Cadranel J, et al. Factors associated with long-term survival of patients with advanced non-small cell lung cancer. Respirology 2012;17:134–42.
[4] Vieira T, Girard N, Ung M, Monnet I, Cazes A, Bonnette P, et al. Efficacy of first-line chemotherapy in patients with advanced lung sarcomatoid carcinoma. J Thorac Oncol 2013;8:1574–7.
[5] Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. J Thorac Oncol 2007;2:593–602.
[6] Hurbin A, Wislez M, Busser B, Antoine M, Tenaud C, Rabbe N, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma. J Pathol 2011;225:83–95.
[7] Jokoji R, Yamasaki T, Minami S, Komuta K, Sakamaki Y, Takeuchi K, et al. Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. J Clin Pathol 2010;63:1065–70.
[8] Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, Roden AC, Oliveira AM, Aubry M-C, et al. Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. J Thorac Oncol 2011;6:459–65.
[9] Dziadziuszko R, Wynes MW, Singh S, Asuncion BR, Ranger-Moore J, Konopa K, et al. Correlation between MET gene copy number by silver in situ hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2012;7:340–7.
[10] Spigel DR, Ervin TJ, Ramlau RA, Daniel DB, Goldschmidt JH, Blumenschein GR, et al. Randomized phase II trial of onartuzumab in combination with erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2013;31:4105–14.
[11] Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2010;363:1693–703.
[12] Mochizuki T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Mizuno T, et al. Pleomorphic carcinoma of the lung: clinicopathologic characteristics of 70 cases. Am J Surg Pathol 2008;32:1727–35.
[13] Yuki T, Sakuma T, Ohbayashi C, Yoshimura M, Tsubota N, Okita Y, et al. Pleomorphic cardinoma of the lung: a surgical outcome. J Thorac Cardiovasc Surg 2007;134:399–404.
[14] Kaseda K, Ishii G, Aokage K, Takahashi A, Kuwata T, Hishida T, et al. Identification of intravascular tumor microenvironment features predicting the recurrence of pathological stage I lung adenocarcinoma. Cancer Sci 2013;104:1262–9.
[15] Wang J, Chen J, Chen X, Wang B, Li K, Bi J. Blood vessel invasion as a strong independent prognostic indicator in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 2011;6:e28844.
[16] Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, et al. c-MET/Phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. J Thorac Oncol 2012;7:331–9.

Lung Cancer 85 (2014) 465–471

Contents lists available at ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan

The homeobox gene EMX2 is a prognostic and predictive marker in malignant pleural mesothelioma

Etienne Giroux Leprieur[a,b,c,1], Tomomi Hirata[a,d,1], Minli Mo[e], Zhao Chen[a], Junichi Okamoto[a,d], Genevieve Clement[a], Hui Li[a], Marie Wislez[b], David M. Jablons[a,f], Biao He[a,f,*]

[a] Thoracic Oncology Program, Department of Surgery, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94115, United States
[b] Sorbonne Universities, UPMC Paris 6 University, GRC04 Theranoscan, F-75252 Paris, France
[c] Respiratory Diseases and Thoracic Oncology Department, Ambroise Pare Hospital – APHP, Versailles Saint Quentin en Yvelines University, 9 avenue Charles de Gaulle, 92100 Boulogne-Billancourt, France
[d] Department of Surgery, Division of Thoracic Surgery, Nippon Medical School, Tokyo 113-8602, Japan
[e] School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 10084, China
[f] Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143, United States

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 March 2014
Received in revised form 23 June 2014
Accepted 23 June 2014

Keywords:
Mesothelioma
EMX2
Prognosis
Predictive marker
Progression-free survival
Overall survival
Neoadjuvant chemotherapy

ABSTRACT

Objectives: Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive neoplasm with a poor prognosis and limited treatment options. EMX2 is a homeobox transcription factor that may regulate key developmental pathways known to promote tumorigenesis. In this study, we evaluated the prognostic and predictive significance of EMX2 expression in MPM.
Materials and methods: Fifty surgically resected MPM specimens were studied. Quantitative real-time RT-PCR was used to analyze EMX2 mRNA expression. Association of EMX2 levels with clinical outcomes was evaluated with using the Kaplan–Meier method and a multivariate Cox proportional hazards regression model.
Results: EMX2 expression was significantly associated with IMIG stage ($p < 0.001$) and smoking history ($p = 0.006$). Cox hazard regression modeling identified low-EMX2 expression as a negative prognostic factor in progression-free survival by both univariate ($p = 0.002$) and multivariate analysis ($p = 0.002$). Kaplan–Meier analysis revealed significant differences in progression-free survival between low- and high-EMX expressing groups in all patients ($p = 0.001$), and also when grouped by early (I/II) stage disease ($p < 0.001$), patients undergoing pleurectomy ($p < 0.001$) and patients with an epithelioid subtype ($p < 0.004$). Furthermore, EMX2 expression predicted response to neoadjuvant chemotherapy. High-EMX2 expression was associated with decreased progression-free survival after neoadjuvant therapy, suggesting that induction therapy should be avoided in these patients.
Conclusions: EMX2 expression is downregulated in advanced cases of malignant pleural mesothelioma and may serve as an important prognostic and predictive molecular biomarker of progression-free survival.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) incidence is still growing, but little progress has been made to improve patient survival. Prognosis remains dismal with a median overall survival of between 9 and 12 months (mo) from presentation [1,2].

Several staging and scoring systems have been popularized in recent years, like TNM classification proposed by the International Mesothelioma Interest Group [3–5] or the one proposed by Sugarbaker's group [6]. However, the existence of multiple staging systems is confusing as no single system is currently accepted as

* Corresponding author at: Thoracic Oncology Program, Department of Surgery, Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, 2340 Sutter Street, Room N222, San Francisco, CA 94115, United States. Tel.: +1 415 476 6907; fax: +1 415 502 6779.
E-mail address: biao.he@ucsfmedctr.org (B. He).
[1] These authors contributed equally.

http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.06.018
0169-5002/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

the gold standard of staging [7]. In addition, these popular staging systems classify the majority of tumors as stage III, decreasing the prognostic and therapeutic utility of tumor staging for both patients and providers [7]. Lastly, staging assessments must be performed post-operatively as they rely on pathologic assessment of lymph nodes and margins [7]. Because of the lack of major improvements to conventional pathologic staging methods over the years, there has been a recent call for molecular prognostic biomarkers that improve staging as well as predictive biomarkers that improve treatment decisions [7].

Recently, it has been shown that EMX2 (empty spiracles homeobox 2) may play an important regulatory function in the Wnt pathway during development. EMX2 belongs to the homeobox gene family whose members regulate morphogenesis and cell differentiation during embryogenesis by activating or repressing target genes expression [8]. EMX2 has important functions in neural development [8] by controlling the frequency of symmetric divisions in adult neural stem cells [9]. Homozygous EMX2 mutations in mice lead to ectopic Wnt-1 expression in the developing mammalian telencephalon resulting in cortical dysplasia [10]. In mammals, EMX2 also controls reproduction by regulating endometrial cell proliferation [11].

We have recently demonstrated that EMX2 acts as a novel tumor suppressor in lung adenocarcinoma by regulating Wnt signaling pathway [12]. This is consistent with other recent reports that EMX2 may have an important regulatory function in human tumors [11,13,14]. Based on these observations, we hypothesized that EMX2 may serve as an important molecular biomarker in MPM. In this study, we analyzed EMX2 expression levels in patients with MPM. We demonstrate that EMX2 expression is downregulated in advanced cases of MPM and may serve as an important prognostic and predictive molecular biomarker of progression-free survival (PFS).

2. Materials and methods

2.1. Patients

MPM specimens were obtained from patients who underwent surgical resection at the University of California, San Francisco (UCSF) from 1999 to 2005 by consecutive sampling. The pathologic classification of each sample was confirmed by review of hematoxylin and eosin stained sections. Complete clinicopathological information including age, gender, ethnicity, smoking status, Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS), histological subtype, International Mesothelioma Interest Group stage, surgical procedure, chemotherapy, radiation, recurrence, vital status, progression, overall survival (OS) and PFS were obtained from review of hospital medical records. OS and PFS were calculated as time intervals from the date of surgery to the event. Informed consent for all participants was obtained prospectively, and the study was approved by the Committee on Human Research at UCSF.

2.2. Tissues and RNA extraction

MPM and adjacent normal tissue samples were collected at the time of surgical resection. Samples were immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at −170 °C before use. Total RNA was extracted following a TRIzol extraction protocol (Invitrogen) and purified using RNeasy Mini Kits (Qiagen) per manufacturer's instructions.

2.3. Reverse transcription and quantitative real-time PCR

cDNA synthesis and Taqman PCR were performed as previously described [15]. Hybridization probes and primers (EMX2, Hs99999905_m1; GAPDH, Hs00244574_m1) were purchased from Applied Biosystems (ABI). EMX2 expression was assayed in triplicate using an Applied Biosystems 7300 Real-time PCR System. Gene expression levels were normalized to the housekeeping gene GAPDH for each sample. Gene expression was calculated as the level of gene expression in each sample relative to the level of gene expression in mixed adjacent normal pleural tissues derived from 11 patients using the comparative $2^{-\Delta\Delta\alpha}$ method [16].

2.4. Immunohistochemistry (IHC)

Standard protocol was used. Primary antibody used in the study was rabbit anti-human EMX2 (1:400; Pierce). Five micron tissue slides from tumor tissue were de-paraffinized using xylene. Heat-mediated antigen retrieval was performed using citrate buffer (BioGenex Laboratories). Antibody staining was visualized with DAB (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) and hematoxylin counterstain (Fisher Scientific). Representative fields were photographed using a Leica SCN400 slide scanner (Leica, Germany), and examined for positive nuclear staining.

2.5. Statistical analysis

Relative EMX2 expression was calculated for each patient. The optimal *p* approach was used to define a cut-off value for high- and low-EMX2 expression. This approach chooses a cutoff value associated with the lowest *p* obtained when comparing the high-risk group with low-risk group. The differences in clinicopathological variables between high- and low-EMX2 expression groups were analyzed using a two-sided *T*-test and χ^2 test. Differences in Kaplan–Meier survival curves were analyzed by the log-rank test. Correlation between EMX2 expression and the International Mesothelioma Interest Group staging system (stage, primary site (T) and lymph node metastasis (N)) was analyzed by one-way ANOVA and median test as well as a two-sided exact test, respectively. Multivariate analysis with clinical coefficients and EMX2 expression was performed using Cox proportional hazards modeling. Variables found to be prognostic by univariate analysis ($p < 0.1$) were entered into Cox proportional hazards models to estimate hazard ratios (HRs). Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All statistical tests were two-sided. Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics software package, version 18.0 (PC).

3. Results

3.1. Patient cohort

Fifty consecutive patients were operated for a MPM between 1999 and 2005 and included in the study (Table 1). Twenty-four patients received neoadjuvant chemotherapy (NC) prior to surgical resection. PFS (median) was 14.5 mo (±4.5), OS (median) was 18.4 mo (±3.6). There were 31 patients in the high-EMX2 expression group and 19 patients in the low-EMX2 expression group. Out of the 8 non-epitheliod tumors, 4 were sarcomatoid and it was found that 3 of the 4 had low EMX2 expression. When analyzed by EMX2 expression subgroups, there was a statistically significant difference in IMIG stage: of 18 patients with stage II tumors, 15 were in the high-EMX2 expression group, vs only 3 in the low-EMX2 expression group ($p = 0.043$). In addition, there was a significant difference in PFS according to the EMX2 expression level (17.6 mo vs 6.5 in the high- vs. 6.5 mo in the low-EMX2 expression groups, $p = 0.001$).

We used IHC to confirm EMX2 protein expressions in 6 mesothelioma tissues with either high or low EMX2 mRNA level. We found

Table 1
Clinicopathological characteristics of malignant mesothelioma patients according to EMX2 expression.

Factor		Total (N = 50)	High EMX2 (N = 31)	Low EMX2 (N = 19)	p value
Age	(mean ± SD)	66 ± 9 (45–84)	67 ± 10 (54–81)	66 ± 9 (45–84)	0.361
Gender	Male/female	41/9	26/5	15/4	0.715
Ethnicity	Caucasian/other	38/12	24/7	14/5	0.714
ECOG PS	0/1/2	10/13/1	9/6/1	1/7/0	0.064
Smoking	+/–	16/24	13/10	3/14	0.017
Subtype	Epithelioid/other	42/8	27/4	15/4	0.747
IMIG stage	I/II/III/IV	1/18/23/5	1/15/12/3	0/3/11/2	0.043
Primary tumor (T)	T1/T2/T3/T4	1/18/23/5	1/16/11/3	0/4/11/2	0.194
Regional lymph node (N)	N0/N1/N2	37/5/5/3	25/2/1/2	12/3/4/1	0.371
Surgical procedure	EPP/PLE/CWR/BIO	11/35/2/2	5/23/1/1	6/12/1/1	0.292
Chemotherapy	NC/PSC	24/26	16/15	8/11	0.459
Radiation (adjuvant)	+/–	20/30	15/16	5/14	0.162
Recurrence status	+/–	19/31	12/18	7/11	0.879
Vital status	Alive/dead	25/25	13/18	12/7	0.322
Progression	+/–	19/31	12/19	10/9	0.547
Overall survival	Median OS time (mo)	18.4 ± 3.6	20.4 ± 5.7	7.4 ± 2.0	0.087
Progression free survival	Median PFS time (mo)	14.5 ± 4.5	17.6 ± 15.9	6.5 ± 4.3	0.001

ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; IMIG: International Mesothelioma Interest Group; EPP: extra pleural pneumonectomy; PLE: pleurectomy; CWR: chest wall resection; BIO: biopsy; NC: neoadjuvant chemotherapy; PSC: postsurgical chemotherapy.

that the EMX2 protein expression was consistent with its mRNA level in those tissue samples (Supplemental Fig. S1).

3.2. Univariate analyses for OS and PFS (Table 2)

In univariate analysis of OS, ECOG PS of 1–2 (HR = 3.89, $p = 0.016$) and non-epithelioid subtype (HR = 2.91, $p = 0.038$) were significantly associated with decreased OS. Low-EMX2 expression (HR = 2.32, $p = 0.087$) and pleurectomy (HR = 2.44, $p = 0.056$) trended towards decreased OS while female gender trended towards increased OS (HR = 0.21, $p = 0.096$). In univariate analysis of PFS, low-EMX2 expression (HR = 5.89, $p = 0.002$), non-Caucasian ethnicity (HR = 2.99, $p = 0.046$), and ECOG PS of 1/2 (HR = 1.91, $p = 0.028$) were significantly associated with decreased PFS. EMX2 expression was significantly associated with PFS both when assessed as a categorical variable (high-EMX2 expression HR = 0.176, $p = 0.002$) or as a continuous variable ($p = 0.004$).Table 2

Table 2
Univariate analysis of overall survival and progression-free survival.

	Overall survival		Progression free survival	
	p value	Hazard ratio	p value	Hazard ratio
Age (average = 66 ± 9)				
≤66/>66	0.346	1/1.46	0.608	1/1.12
Gender				
Male/female	0.096	1/0.21	0.623	1/0.82
Ethnicity				
Caucasian/other	0.241	1/1.62	0.046	1/2.99
Smoking				
Yes/no	0.163	1/0.48	0.644	1/0.77
ECOG PS				
0/1 + 2	0.016	1/3.89	0.028	1/1.91
Surgical procedure				
EPP/PLE/CWR/BIO	0.056	0/2.44/0/1	0.329	1.57/1.19/0/1
IMIG staging system				
1 + 2/3 + 4	0.181	1/1.754	0.794	1/1.14
Primary tumor (T)				
T1 + T2/T3 + T4	0.241	1/1.63	0.793	1/1.14
Regional lymph node				
N–/N+	0.816	1/1.13	0.668	1/1.31
Subtype				
Epithelioid/other	0.038	1/2.91	0.845	1/1.14
Neo-adjuvant chemotherapy				
Yes/no	0.423	1/1.14	0.254	1/0.59
Adjuvant chemotherapy				
Yes/no	0.143	1/0.47	0.207	1/1.67
Radiation therapy				
Yes/no	0.395	1/0.70	0.785	1/0.93
EMX2 expression				
High/low	0.087	1/2.32	0.002	1/5.89

ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; IMIG: International Mesothelioma Interest Group; EPP: extra pleural pneumonectomy; PLE: pleurectomy; CWR: chest wall resection; BIO: biopsy; N–, lymph node metastasis negative; N+, lymph node metastasis positive.

3.3. Multivariate analysis for OS and PFS

Multivariate analysis demonstrated that low-EMX2 expression trended towards decreased OS (HR = 2.617 (95%CI: 0.974–7.035), Table 3). No other clinicopathological characteristics were found to be associated with OS. Both low-EMX2 expression (HR = 3.543 (95%CI: 1.112–11.287), $p = 0.004$) and non-Caucasian ethnicity (HR = 2.76 (95%CI: 1–7.618), $p = 0.048$) were significantly associated with decreased PFS (Table 3).

3.4. Association of EMX2 expression with clinicopathological characteristics

IMIG stage was significantly associated with EMX2 expression (ANOVA, $p < 0.001$) (Fig. 1A), as tumor size (ANOVA, $p < 0.001$) (Fig. 1B). Regional lymph node status was not associated with EMX2 expression ($p = 0.262$) (Fig. 1C). In 40 patients for whom smoking status was known, patients without a smoking history had significantly higher EMX2 expression ($p = 0.006$) (Fig. 1D).

Paired normal and tumor tissues were available in 11 patients. Comparison of relative EMX2 expression demonstrated significantly decreased EMX2 expression in tumor samples compared to their paired normal controls. These differences were found to be statistically significant when analyzed by both paired samples test ($p = 0.005$) and related-samples Wilcoxon signed rank test ($p = 0.004$) (data not shown).

3.5. Association of EMX2 expression with PFS by Kaplan–Meier analysis

The logarithm of relative EMX2 expression values in tumors ranged from −1.65 to 3.50 (mean ± SD: −0.03 ± 0.14, median value: −0.09) and demonstrated a bimodal frequency distribution (Supplemental Fig. S2A). High- and low-EMX2 subgroups

Table 3
Multivariate analysis (Cox regression hazard model) for overall survival and progression-free survival.

	Factor	Beta	Standard error of beta	Wald	p value	Hazard ratio	95% CI for hazard ratio	
							Lower	Upper
OS	Low EMX2	0.962	0.505	3.636	0.057	2.617	0.974	7.035
PFS	Ethnicity non-Caucasian	1.015	0.518	3.842	0.048	2.76	1	7.618
	Low EMX2	1.265	0.591	4.578	0.032	3.543	1.112	11.287

Wald: Wald statistics for logistic regression algorithm; 95%CI: 95% confidential interval.

were defined by relative EMX2 expression. The cutoff value for logarithmic EMX2 expression was defined as −0.47 to achieve a minimum p-value when comparing PFS between high- and low-EMX2 expression groups by log-rank test. Median PFS was 26.8 mo (±6.4) in patients with high-EMX2 expression vs. 7.4 mo (±1.2) in patients with low-EMX2 expression ($p = 0.001$) (Fig. 2A). To confirm that this difference was not an artifact of the cutoff point determined by the optimal p approach, patients were divided into three groups according to EMX2 expression using the 34th percentile (log10(EMX2 expression) = −0.60), and 66th percentile (log10(EMX2 expression) = 0.52). Kaplan–Meier analysis demonstrated significant differences in PFS between low- (log10(EMX2 expression) < −0.60), intermediate- (0.60 < log10(EMX2 expression) < 0.52), and high- (log10(EMX2 expression) > 0.52) EMX2 expression groups ($p = 0.001$) (Supplemental Fig. S2B).

There was no statistically significant difference in PFS in our study cohort when patients were grouped either by individual stage or by early (stage I/II) vs. late (stage III/IV) disease (Supplemental Fig. S2C). EMX2 expression among early stage (I/II) patients was, however, associated with PFS. Low-EMX2 expression in patients with stage I/II disease was associated with decreased PFS (median PFS = 4.8 ± 3.1 mo) when compared to high-EMX2 expression in patients with stage I/II disease (median PFS = 26.8 ± 6.6 mo). This difference was statistically significant by log-rank test ($p < 0.001$, Fig. 2B). There was no statistically significant difference in PFS associated with EMX2 expression in stage III/IV patients.

When analyzed by histological subtype, EMX2 expression was significantly associated with PFS in patients with epithelioid tumors ($n = 42$). Median PFS was 26.8 mo (±6.4) vs. 7.4 mo (±1.2) in tumors with high- vs. low-EMX2 expression, respectively

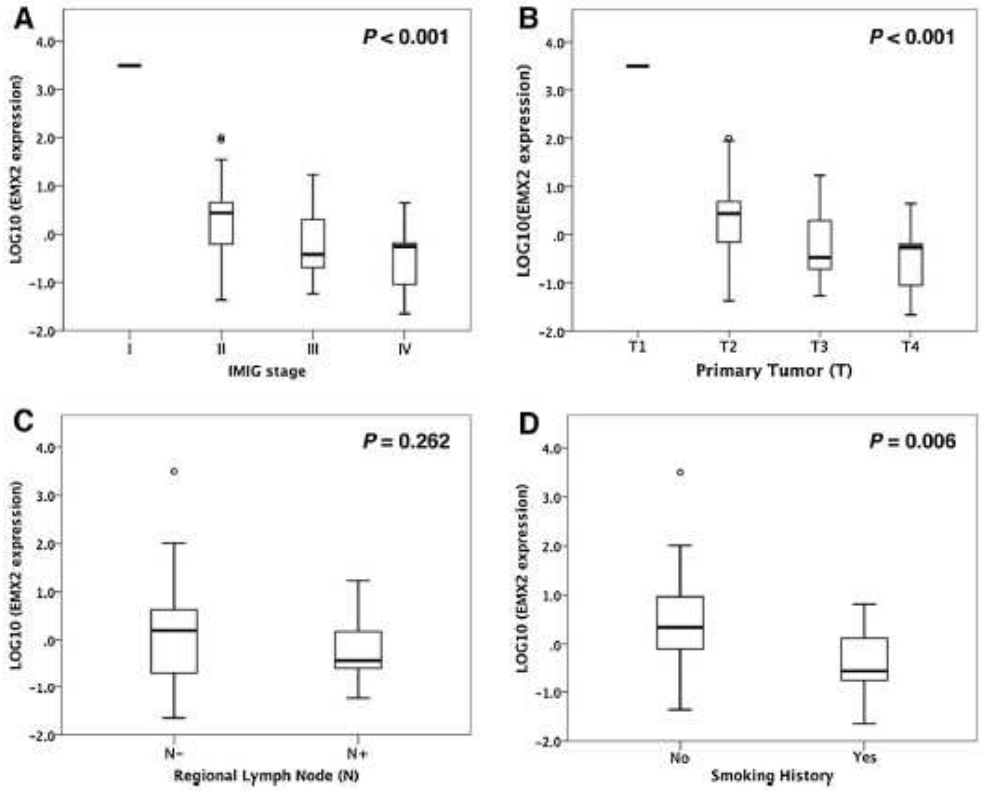


Fig. 1. EMX2 expression according to clinicopathological factors. (A) IMIG stage I, II, III, and IV. (B) Tumor size classified by IMIG primary tumor (T) factor T1, T2, T3 and T4. (C) IMIG regional lymph node status (N+: lymph node metastasis positive, N−: lymph node metastasis negative). (D) Smoking history. p values were calculated by ANOVA (A and B) and 2-sided exact test (C and D), respectively.

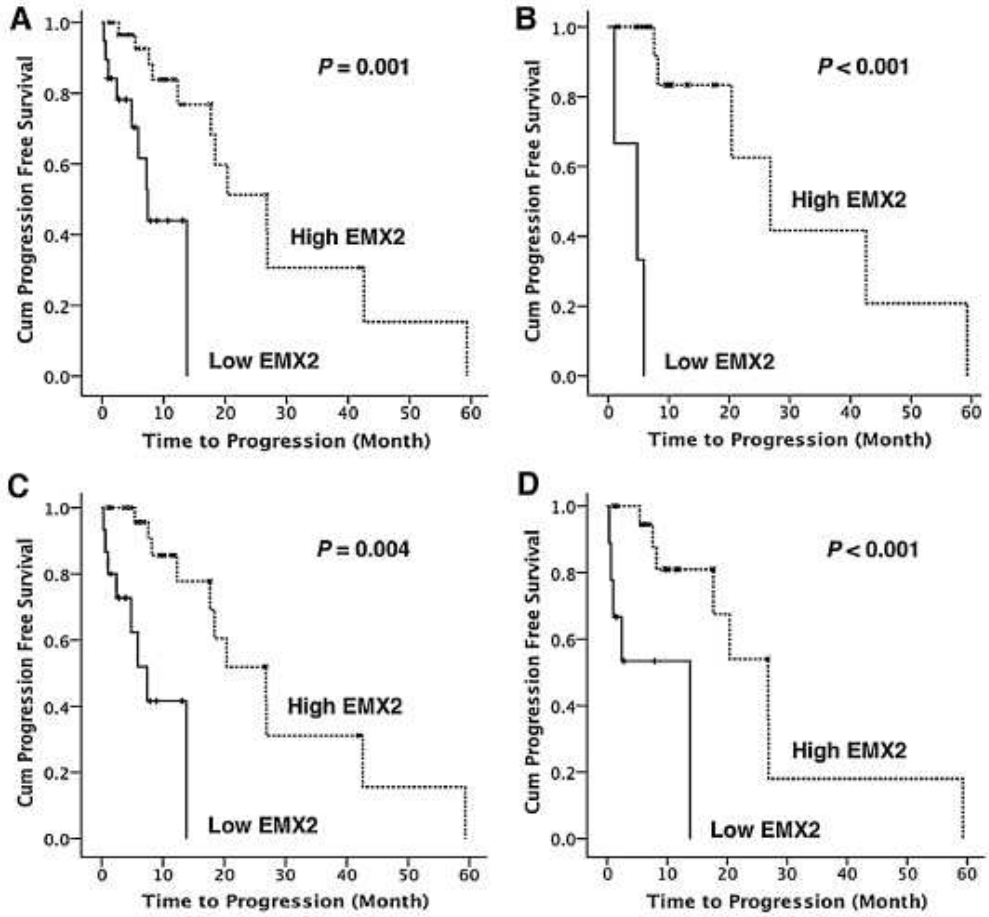


Fig. 2. Kaplan–Meier analysis of progression-free survival by EMX2 expression. (A) Progression-free survival (PFS) in the study cohort by EMX2 expression. (B) PFS in early stage (I/II) patients. (C) PFS in all patients after pleurectomy. (D) PFS in patients with epithelioid tumors after pleurectomy.

(p = 0,001). When analyzed by type of surgical procedure, EMX2 expression was significantly associated with PFS in patients who underwent pleurectomy (n = 30). Median PFS was 26,8 mo (±5,3) vs. 7,2 mo (±1,2) in tumors with high- vs. low-EMX2 expression, respectively (p = 0,004, Fig. 2C). When these two subgroups were combined, the median PFS of patients with epitheliod tumors who underwent pleurectomy (n = 31) was 26,8 mo (±5,4) vs. 13,8 mo in patients with high- vs. low-EMX2 expression, respectively (p < 0,001, Fig. 2D).

3.6. EMX2 expression predicts survival after NC

Almost half of our 50 patient cohort received NC (n = 24). The cohort who did not receive NC (n = 26) had more advanced (stage III/IV) tumors than the cohort who underwent NC (p = 0,002). High EMX2 expression was found to predict response to NC. Patients with high-EMX2 expression had worse PFS after NC (median PFS = 17,7 ± 6,3 mo) than without NC (median PFS = 42,6 ± 0 mo, p = 0,054) (Fig. 3A). Similarly, among patients who did not receive NC, PFS was significantly improved in patients with high-EMX2 expression (median PFS = 42,6 ± 0 mo) vs. low-EMX2 expression (median PFS = 7,4 ± 2,6 mo, p = 0,001) (Fig. 3B). In contrast, patients with low-EMX2 expression had equivalent survival with and without NC (median PFS = 13,8 ± 0 mo, vs. 7,4 ± 2,7 mo, respectively, p = 0,572) (Fig. 3C). In addition, in the cohort of patients who received NC, there were no significant differences in high- vs. low-EMX2 expressing tumors (median PFS = 13,8 ± 0 mo, vs. 17,7 ± 6,3 mo, respectively, p = 0,203) (Fig. 3D).

4. Discussion

The homeodomain containing EMX2 was identified in the 10q25.3-q26.1 endometrial cancer deletion interval by expressed sequence tag (EST) database searching [17]. In embryonic development, EMX2 plays an important role in neuroblast proliferation, migration and differentiation [18]. In adult tissues, expression was demonstrated to be abundant in postmenopausal endometrium but low in premenopausal endometrium, endometrioid

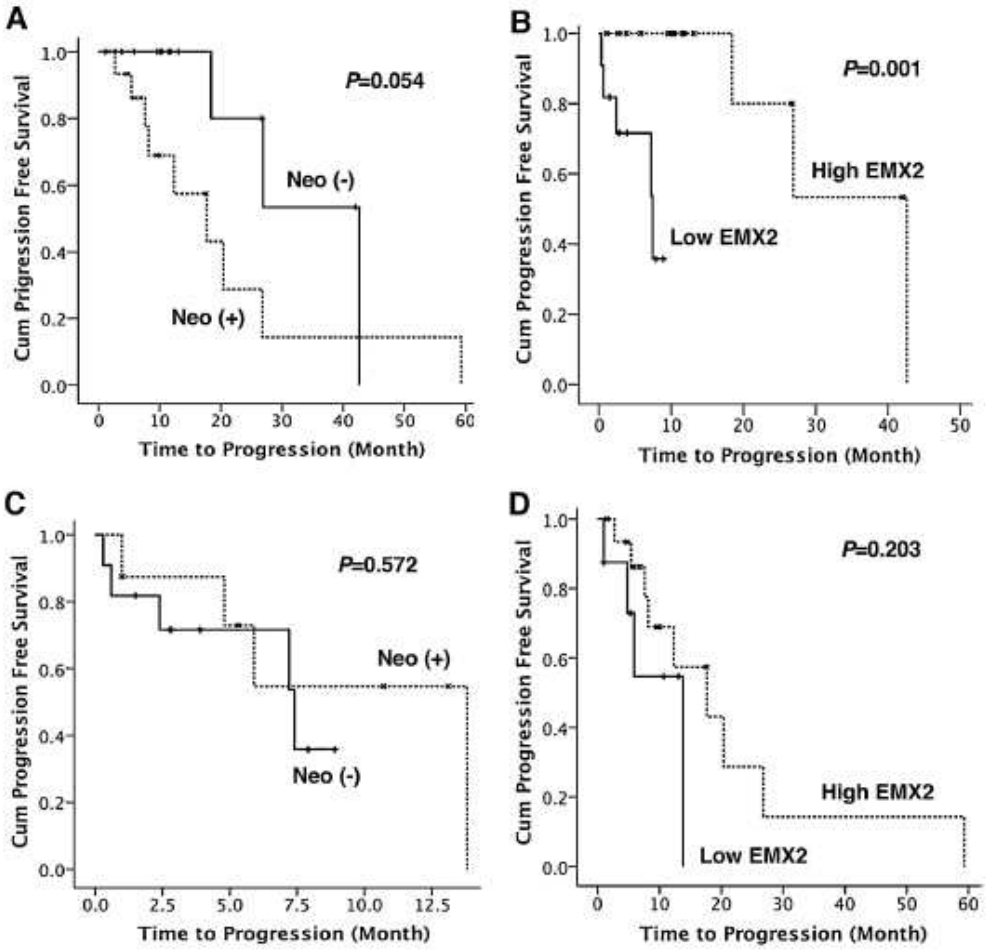


Fig. 3. Kaplan–Meier analysis of progression-free survival by EMX2 expression with and without neoadjuvant chemotherapy. (A) Progression-free survival (PFS) in patients with high-EMX2 expression with and without neoadjuvant chemotherapy. (B) PFS in patients without neoadjuvant chemotherapy treatment by EMX2 expression level. (C) PFS in patients with low-EMX2 expression with and without chemotherapy. (D) PFS in patients with neoadjuvant chemotherapy by EMX2 expression level.

adenocarcinomas and endometrial cancer cell lines [13]. These observations suggested that EMX2 may not only regulate cell proliferation, but may also function as a tumor suppressor in solid tumors. These functions are similar to described functions of other homeobox genes in both oncogenesis as well as normal embryonic development [19,20]. Recent work in our lab demonstrated that EMX2 is a tumor suppressor and novel prognostic biomarker in non-small cell lung cancer [12]. To our knowledge, this is the first investigation of the role of EMX2 in MPM. We found that EMX2 expression was not only downregulated in tumor vs. adjacent normal tissues, but also inversely correlated to IMIG stage. Our observations are consistent with previous demonstrations that homeobox genes expressed in differentiated tissues are often downregulated in cancer progression [20].

By univariate, multivariate, and Kaplan–Meier analyses, EMX2 expression was significantly associated with PFS. In order to ensure that the association between EMX2 expression and PFS was not due to an artifact of the cut-off point chosen by the optimal p method, three new EMX2 expression groups were defined using the 34th and 66th percentile as cut-off points. Kaplan–Meier analysis again demonstrated significant differences in PFS between these groups, suggesting that overfitting was not responsible for our observations. Further assurance came from the observation that EMX2 expression was also significantly associated with PFS when assessed as a continuous variable. Evaluation of the correlation between EMX2 expression and PFS in separate stage I/II and stage III/IV patient cohorts suggests that earlier stage patients may be driving the differences in PFS seen in the overall cohort. Importantly, statistically significant differences in PFS were not demonstrated by classifying patients either by individual or grouped (stage I/II vs. III/IV) disease. This indicates that EMX2 expression derives its prognostic power independently and not merely by serving as a surrogate marker of tumor stage. Additionally, this demonstrates how EMX2 expression is able to predict

meaningful outcomes as a molecular prognostic biomarker in a patient cohort in which conventional staging methods are not informative.

Recently, the use of NC in MPM has become common, but has not definitively been shown to offer a survival benefit [21–23]. Multicenter phase II trials using NC in the context of trimodality therapy showed feasibility and reasonable long-term survival rates [24]. Importantly, however, NC also appeared to affect compliance with surgery and radiation therapy, highlighting the need to identify which patients might benefit from NC. Three consecutive phase II trials using different chemotherapy agents revealed no association between objective tumor response and European Organization for Research and Treatment of Cancer Prognostic Score (EPS) [25]. In our study, high EMX2 expression was found to be predictive of PFS after NC; among patients who received NC, patients with high-EMX2 expression had significantly worse PFS. Besides, high-EMX2 expressing patients who did not receive NC had better PFS than low-EMX2 expressing patients. These observations suggest that high-EMX2 expression identifies a cohort of patients unlikely to benefit from NC and in whom such induction therapy should be avoided.

Our study has several limitations. Similar to previous studies based on MPM tissues, our power to make statistical inferences was limited by a modest sample size due to the rarity of MPM. Second, although assessment of EMX2 as a continuous variable by univariate analysis still demonstrated significant correlation with PFS, and although data was repartitioned according to percentile and still found to be statistically significant by Kaplan–Meier analysis, it is still possible that use of the optimal p method to select an expression cut-off point may have resulted in data overfitting. Ideally, our cohort would have been large enough to divide into separate training and validation groups. This would be a valuable area of future research as a larger cohort of MPM samples becomes available. Lastly, as this was a retrospective study, we are aware that patients receiving NC underwent different treatment regimens which may have biased the results. It may be argued, however, that this kind of bias would most likely be manifested as a regression to the mean, meaning that EMX2 expression would not be able to predict a difference in survival after NC. The observation that high-EMX2 expression is actually predictive of decreased survival after NC suggests that this type of bias from assessing different treatment regimens as a single variable is less likely to explain our observations.

In conclusion, our study demonstrates that EMX2 expression is downregulated in advanced cases of MPM and may serve as an important prognostic and predictive molecular biomarker of PFS. The successful use of molecular biomarkers in breast oncology [26] provides hope that further research into EMX2 and other potential prognostic and predictive biomarkers will offer significant advances in the staging and treatment of MPM.

Conflict of interest statement

No conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by: Joan's Legacy: Uniting Against Lung Cancer Research Grant, NCI R01CA125030, and the Eileen D. Ludwig Endowed for Thoracic Oncology Research (BH); The Kazan, McClain, Abrams, Fernandez, Lyons, Greenwood, Harley & Oberman Foundation, The Jeffrey and Karen Peterson Family Foundation, and Paul and Michelle Zygielbaum Research Fund (DMJ), The Fonds de Recherche en Santé Respiratoire (EGL).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.06.018.

References

[1] Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. N Engl J Med 2005;353:1591–603.
[2] Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol 2009;27:2081–90.
[3] Rusch VW. A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma. From the International Mesothelioma Interest Group. Chest 1995;108:1122–8.
[4] Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC Cancer Staging Manual. 6th edition New York: Springer; 2002.
[5] Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss; 2002.
[6] Richards WG, Godleski JJ, Yeap BY, Corson JM, Chirieac LR, Zellos L, et al. Proposed adjustments to pathologic staging of epithelial malignant pleural mesothelioma based on analysis of 354 cases. Cancer 2010;116:1510–7.
[7] Bueno R. Making the case for molecular staging of malignant pleural mesothelioma. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2009;21:188–93.
[8] Dalton D, Chadwick R, McGinnis W. Expression and embryonic function of empty spiracles: a Drosophila homeo box gene with two patterning functions on the anterior–posterior axis of the embryo. Genes Dev 1989;3:1940–56.
[9] Galli R, Fiocco R, De Filippis L, Muzio L, Gritti A, Mercurio S, et al. Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system. Development 2002;129:1633–44.
[10] Ligon KL, Echelard Y, Assimacopoulos S, Danielian PS, Kaing S, Grove EA, et al. Loss of Emx2 function leads to ectopic expression of Wnt1 in the developing telencephalon and cortical dysplasia. Development 2003;130:2275–87.
[11] Taylor HS, Fei X. Emx2 regulates mammalian reproduction by altering endometrial cell proliferation. Mol Endocrinol 2005;19:2839–46.
[12] Okamoto J, Hirata T, Chen Z, Zhou HM, Mikami I, Li H, et al., EMX2 is epigenetically silenced and suppresses growth in human lung cancer. Oncogene 2010;29:5969–75.
[13] Noonan FC, Mutch DG, Ann Mallon M, Goodfellow PJ. Characterization of the homeodomain gene EMX2: sequence conservation, expression analysis, and a search for mutations in endometrial cancers. Genomics 2001;76:37–44.
[14] Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, Abeler VM, Esteller M, Lothe RA. Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). J Pathol 2006;210:441–9.
[15] Raz DJ, Ray MR, Kim JY, He B, Taron M, Skrzypski M, et al., A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2008;14:5565–70.
[16] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc 2008;3:1101–8.
[17] Germline mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. Nat Genet 1996;12:94–6.
[18] Cecchi C. Emx2: a gene responsible for cortical development, regionalization and area specification. Gene 2002;291:1–9.
[19] Boersma CJ, Bloemen M, Hendriks JM, van Berkel EA, Olijve W, van Zoelen EJ. Homeobox proteins as signal transduction intermediates in regulation of NCAM expression by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in osteoblast-like cells. Mol Cell Biol Res Commun 1999;1:117–24.
[20] Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence. Nat Rev Cancer 2002;2:777–85.
[21] Flores RM. Induction chemotherapy, extrapleural pneumonectomy, and radiotherapy in the treatment of malignant pleural mesothelioma: the Memorial Sloan-Kettering experience. Lung Cancer 2005;49(Suppl. 1):S71–4.
[22] Tsao AS, Mehran R, Roth JA. Neoadjuvant and intrapleural therapies for malignant pleural mesothelioma. Clin Lung Cancer 2009;10:36–41.
[23] Weder W, Kestenholz P, Taverna C, Bodis S, Lardinois D, Jerman M, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy in malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol 2004;22:3451–7.
[24] Krug LM, Pass HI, Rusch VW, Kindler HL, Sugarbaker DJ, Rosenzweig KE, et al., Multicenter phase II trial of neoadjuvant pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and radiation for malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol 2009;27:3007–13.
[25] Fennell DA, Parmar A, Shamash J, Evans MT, Sheaff MT, Sylvester R, et al., Statistical validation of the EORTC prognostic model for malignant pleural mesothelioma based on three consecutive phase II trials. J Clin Oncol 2005;23:184–9.
[26] Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al., A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. N Engl J Med 2004;351:2817–26.

EMX2 is a predictive marker for adjuvant chemotherapy in lung squamous cell carcinomas

Dongsheng Yue[1,2,#], Hui Li[2,#], Juanjuan Che[3,#], Yi Zhang[4], Hua Zhang[1], Qingfeng Zheng[2,5], Yue Yang[5], Runfen Cheng[6], Joy Q. Jin[2], Thomas W. Luh[2], Cathryn Yang[2], Hsin-Hui K. Tseng[2], Etienne Giroux-Leprieur[2], Xishan Hao[1], Changli Wang[1,*], David M. Jablons[2], and Biao He[2,*]

[1]Department of Lung Cancer, Lung Cancer Center, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China
[2]Thoracic Oncology Program, Department of Surgery, Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California, San Francisco, CA 94115, USA
[3]Department of Oncology, Beijing Friendship Hospital of Capital Medical University, Beijing 100050, China
[4]Department of Thoracic Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China
[5]Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Thoracic Surgery II, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China
[6]Department of Pathology, Lung Cancer Center, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China
#These authors contributed equally.

*Corresponding Authors:
Biao He, PhD (email: biao.he@ucsfmedctr.org ; Tel: 415-476-6907)
Thoracic Oncology Program, Department of Surgery, Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California San Francisco, California 94115, USA;
or Changli Wang, MD (email: yuedongsheng_cg@163.com) Department of Lung Cancer, Lung Cancer Center, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

Running Title: Predictive role of EMX2 in lung squamous cell carcinomas

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Statement of Translational Relevance

Squamous cell carcinoma (SCC) is one of the major histologic subtypes of non-small cell lung cancer (NSCLC), accounting for approximate 30% of NSCLC cases. Most current efforts on prognostic and predictive biomarkers are being made to improve staging of adenocarcinomas. Such studies for lung SCC with unique clinic-pathological and molecular characteristics, however, are limited. Our study identified EMX2, a homeo-domain containing transcription factor, as a putative independent novel prognostic marker for stage I lung SCC patients, as well as a novel predictive marker for adjuvant chemotherapy in stage II/IIIA lung SCC patients. Once validated with large cohort of lung SCC patients, examination of EMX2 expression should become a better and more meaningful stratification method for early-mid stage lung SCC patients to benefit from adjuvant chemotherapy.

Abstract

Purpose: Squamous cell carcinomas (SCC) account for approximately 30% of non-small cell lung cancer (NSCLC). Current staging methods do not adequately predict outcome for this disease. EMX2 is a homeo-domain-containing transcription factor known to regulate a key developmental pathway. This study assessed the significance of EMX2 as a prognostic and predictive marker for resectable lung SCC.

Experimental Design: Two independent cohorts of patients with lung SCC undergoing surgical resection were studied. EMX2 protein expression was examined by immunohistochemistry, Western blot, or immunofluorescence. EMX2 expression levels in tissue specimens were scored and correlated with patient outcomes. Chemo-sensitivity of lung SCC cell lines stably transfected with EMX2 shRNAs to cisplatin, carboplatin, and docetaxol was examined in vitro.

Results: EMX2 expression was down-regulated in lung SCC tissue samples compared to their matched adjacent normal tissues. Positive EMX2 expression was significantly associated with improved overall survival in stage I lung SCC patients, and in stage II/IIIA lung SCC patients receiving adjuvant chemotherapy. EMX2 expression was also associated with expression of EMT markers in both lung SCC cell lines and tissue samples. Knock-down of EMX2 expression in lung SCC cells promoted chemo-resistance and cell migration.

Conclusions: EMX2 expression is down-regulated in lung SCC and its down-regulation is associated with chemo-resistance in lung SCC cells, possibly through regulation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT). EMX2 may serve as a novel prognostic marker for stage I lung SCC patients and a prediction marker for stage II/IIIA lung SCC patients receiving adjuvant chemotherapy.

Introduction

Lung cancer is the most common cancer worldwide and the leading cause of cancer-related mortality (1). Approximately 85% of newly diagnosed lung cancers are non–small cell lung cancer (NSCLC). Adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (SCC) are the most frequent histologic subtypes, accounting for 50% and 30% of NSCLC cases, respectively (2). Despite advances in our knowledge on lung tumor biology and improvements in surgery, radiotherapy and chemotherapy, we have made little impact on the overall survival rate of NSCLC patients in the past 30 years, indicating that our current staging methods are not adequate in predicting outcome (3). Current efforts on prognostic and predictive biomarkers are being made to improve staging of lung cancers, mostly adenocarcinomas (4-20). However, such studies for lung SCC are limited (21-23). Therefore, there is an urgent need to identify novel prognostic/predictive markers for lung SCC, which has unique clinic-pathological and molecular characteristics.

EMX2 (empty spiracles homeobox 2), a human homologue of the Drosophila empty spiracles gene (ems), is shown to regulate the Wnt pathway during development. The homeobox gene family encodes transcription factors, regulating morphogenesis and cell differentiation during embryogenesis by activating or repressing the expression of target genes (24). In addition to its important role in embryologic development, several studies suggest that EMX2 may be involved in human tumorigenesis (25-28). More recently, we have demonstrated epigenetic silencing of EMX2 expression in lung adenocarcinomas and its association with poor clinical outcomes in early stage lung adenocarcinoma patients (29, 30). In this study, we hypothesized that EMX2 might also serve as a novel prognostic and/or predictive biomarker in lung SCC. In addition, lung SCC tends to be locally aggressive (31). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) enables cancer cells to invade surrounding tissues and generate distant metastasis (32),

and has been shown to be associated with poor prognosis and chemo-resistance in different tumor models (33-35). In this study, we also investigated possible regulations between EMX2 and EMT in lung SCC.

Materials and Methods

Patients. Patients with stage I-IIIA lung SCC undergoing complete pulmonary resection and systematic node dissection of the hilar and mediastinal lymph nodes at the Cancer Institute and Hospital of Tianjin Medical University (Cohort-1, 177 patients from 2004 to 2007) and Beijing Tumor Hospital (Cohort-2, 42 patients from 1995 to 2000) were entered into the study (Table 1). 16 matched pairs of lung SCC and their adjacent normal tissue specimens were banked at the time of surgical resection at the University of California, San Francisco (UCSF). Patients receiving neoadjuvant chemotherapy or radiation therapy, or having a second primary cancer diagnosed within 5 years, were excluded from this study. Pathology of each patient was diagnosed by two certified pathologists. TNM staging was performed according to the International System for Staging Lung Cancer pathologic classification system [21]. Information on clinical variables and patient follow-up was extracted from prospectively maintained patient database. Adjuvant chemotherapy used to treat patients with lung SCC were vinorelbine, paclitaxel, or gemcitabine plus carboplatin or cisplatin for the Cohort-1, and vinorelbine, cyclophosphamide, or doxorubicin plus cisplatin for the Cohort-2. The primary endpoint was overall survival (OS) with the time range from 3 to 84 months. Patients consented to tissue specimen collection prospectively, and the study was approved by the Research Ethics

Committee of Cancer Institute and Hospital of Tianjin Medical University, Beijing Cancer Hospital, as well as the University of California, San Francisco Institutional Review Board.

Immunohostochemistry (IHC). Standard protocol was used. Primary antibodies used in the study included rabbit anti-human EMX2 (1:400; Pierce), rabbit anti-human E-cadherin (1:200; Cell Signaling), mouse anti-human β-catenin (1:200; Millipore). Five micron tissue slides from tumor and adjacent normal lung tissue were de-paraffinized using xylene. Heat-mediated antigen retrieval was performed using citrate buffer (BioGenex Laboratories). Antibody staining was visualized with DAB (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) and hematoxylin counterstain (Fisher Scientific). Representative fields were photographed using a Leica SCN400 slide scanner (Leica, Germany), and examined for positive nuclear staining. The mean number of positive cells in each tumor and matched normal tissue sample was compared using a two-tailed paired t-test.

Cell Culture. Lung SCC cell lines (H1703 and H2170) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). Both cell lines were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/ml)/streptomycin (100 μg/ml) at 37°C in a humid incubator with 5% CO_2.

Transfection and RNA Interference. pcDNA 3.1/EMX2 mammalian expression-vector was subcloned from pCMV6-XL5/EMX2 vector (Origene). EMX2 shRNAs and control (non-silencing) shRNA (all are in pRFP-C-RS vector) were purchased from Origene. The targeted EMX2 sequences are: 5'-TCAAGCCATTTACCAGGCTTCGGAGGAAG-3' and 5'-CGGTGGAGAATCGCCACCAAGCAGGCGAG-3'. Cells were plated in six-well plates with fresh media without antibiotics for 24 hours before transfection. Transfection was performed using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Transfected

cells were then re-plated in 10 cm dishes for selection with G418 (500 μg/ml; Invitrogen). Stable transfectants were maintained in regular medium with G418 (300 μg/ml) for further analysis.

Western Blot. Standard protocol was used. Total proteins were isolated from tissues and cell lines using T-PER and M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo) supplemented with protease and phosphatase inhibitors and pre-cleared using centrifugation, followed by measuring protein concentrations using the bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay kit (Pierce). Primary antibodies used were anti-human EMX2 (N-15) (1:500; Santa Cruz) and anti-human E-cadherin (1:200; Cell Signaling). 40 ug of proteins were loaded in each lane and equal protein loading was confirmed with probing for β-actin expression.

Proliferation Assay. CellTiter 96 Aqueous Proliferation Assay Kit (Promega) was used to determine cell proliferation according to the manufacturer's protocol. The assays were performed in triplicate after 5×10^3 cells/well were plated into 96-well plates and treated with cisplatin, carboplatin or docetaxol at different doses for 72 hours.

Migration Assay. Cells were prepared in 6-well plate and wound was created by manually scraping the cell monolayer with a p-200 pipet tip. Cells were then incubated for 48 hours before images were acquired through a light microscope.

Immunofluorescence Staining. Cytospin preparations of cells (5×10^5 cells/ml) were obtained on glass slides pretreated with poly-d-lysine by centrifugation at 1400 rpm for 3 min. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at -20^0C, permeablized with 0.5% Triton X-100 for 10 min and blocked in 10%FBS/PBS for 1hour at room temperature, followed by overnight incubation with primary antibodies (anti-EMX2 (1:400; Pierce), anti-E-Cadherin (1:200; Cell Signaling) and anti-β-catenin (1:100; BD)) at 4^0C. After washing with PBS, cells were incubated

with secondary Alexa488-conjugated IgG for 1 hour at room temperature. Slides were mounted in VectorShield mounting media with DAPI (Vector), and images were acquired with a Leica SCN400 slide scanner (Leica) and analyzed under 200× magnification.

Statistical Analysis. The Kaplan-Meier method was used to estimate overall survival (OS). Differences in survival between the low-risk group (positive EMX2 IHC staining) and high-risk group (negative EMX2 IHC staining) were analyzed by log-rank test. The associations between EMX2 positive/negative staining and discrete clinical factors were analyzed by the t-test, ANOVA with Bonferroni/Dunn test, Mann-Whitney's U-test for variables with two-categories, and the Kruskal-Wallis test for variables with more than two categories. All analyses were done using the SPSS software package, version IBM SPSS Statistics 18.0. All reported p-values were two-sided. A p value of 0.05 or less was considered to be significant.

Results

EMX2 expression is down-regulated in lung SCC. We first examined EMX2 protein expression by Western blot in 16 patients who had paired lung SCC as well as matched adjacent normal tissue banked at the time of surgical resection at UCSF. 62.5% (10 of 16) of lung SCC specimens had less EMX2 protein expression than their matched adjacent normal tissues (Fig. 1A). We also examined EMX2 protein expression by IHC in the same 16 lung SCC specimens (Fig.1B shows examples of IHC staining of the first set of 4 pairs of tissue samples shown Fig. 1A). We observed nuclear localization of EMX2 in those specimens and found EMX2 protein down-regulation in the tumor tissues when compared to their matched normal tissues, consistent with our Western blot results.

EMX2 expression is associated with improved survival in stage I lung SCC patients. We next assessed EMX2 protein expression by IHC using tissue arrays of lung SCC specimens (clinical characteristics of the patients were summarized in Table 1). EMX2 staining was scored (0 for negative and 1-3 for positive) by a pathologist under microscope. None of the 91 stage I lung SCC patients in Cohort-1 received neoadjuvant chemotherapy before surgery. Kaplan-Meier analysis using Cox proportional hazards modeling demonstrated a strong association between EMX2 protein expression and overall survival in stage I lung SCC patients (Fig. 2). Overall survival was significantly better in the patients with positive EMX2 staining compared to those with negative EMX2 staining ($p < 0.001$; the median survival: not reached (EMX2 positive group) vs. 42 months (EMX2 negative group)). A statistically significant difference in overall survival was not observed in stage II/IIIA lung SCC patients ($p = 0.755$) (data not shown).

EMX2 expression is associated with improved survival in stage II/IIIA lung SCC patients receiving adjuvant chemotherapy. Approximately 65% (56 of 86) patients with stage II/IIIA lung SCC in Cohort-1 received adjuvant chemotherapy after surgical intervention (Table 1). To investigate whether EMX2 expression could predict benefit from adjuvant chemotherapy, we analyzed IHC staining of EMX2 in these stage II/IIIA lung SCC specimens of Cohort-1. In the patients with positive EMX2 staining, we found that overall survival for the patients who received adjuvant chemotherapy was significantly better than that for patients who did not (Fig. 3A; 5-year OS: 36.8% vs. 5.6%; $p = 0.013$). In the patients with negative EMX2 staining, however, overall survival did not differ between those who received adjuvant chemotherapy and those who did not (Fig. 3B; 5-year OS: 42.1% vs. 25.0%; $p = 0.475$). Moreover, we validated our observations in an independent cohort of stage II/IIIA lung SCC patients (Cohort-2) in a double-blinded manner. In the patients with positive EMX2 staining of Cohort-2, overall survival for the patients who received adjuvant chemotherapy was also significantly better than that for patients who did not (Fig. 3C; 5-year OS: 27.8% vs. 0%; $p = 0.023$). In the patients with negative EMX2 staining of Cohort-2, no difference in overall survival was observed between those who received adjuvant chemotherapy and those who did not (Fig. 3D; 5-year OS: 8.3% vs. 0%; $p = 0.877$).

Knock-down of EMX2 expression promotes chemo-resistance in lung SCC cells. To examine roles of EMX2 in chemotherapy in lung SCC, we established stable lung SCC cell lines after transfection with two different EMX2 shRNA constructs and subsequent G418 selection, and confirmed down-regulation of EMX2 expression in these stable transfectants (Fig. 4A). Next we treated these stable lines with three chemo drugs that are commonly used for the treatment of lung cancer, cisplatin, carboplatin, and docetaxol, respectively. We found that down-regulation

of EMX2 expression by shRNA made H1703 and H2170 cells significantly more resistant to all three chemo treatments compared to the control cells stably transfected with a non-silencing shRNA construct (Fig. 4B). These results support our observation that EMX2 is associated with improved survival in lung SCC patients receiving adjuvant chemotherapy (Fig. 3).

EMX2 may regulate Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in lung SCC. EMT has been shown to be associated with poor prognosis and chemo-resistance in different tumor models (33-35). Our data demonstrated that EMX2 was down-regulated in lung SCC and this down-regulation was associated with chemo-resistance in lung SCC cells. Therefore, we decided to examine whether EMX2 was associated with EMT in lung SCC. Interestingly, we observed that hallmarks of EMT E-Cadherin and the membrane-bound β-Catenin were significantly down-regulated when EMX2 expression was silenced by shRNAs in lung SCC cells (Fig. 5A). On the other hand, transfection of EMX2 cDNA into lung SCC cells resulted in up-regulation of the membrane-bound β-Catenin in the cells over-expressing EMX2 (Fig. 5B). The association between EMX2 and EMT was also confirmed by cell migration assay with lung SCC cells stably transfected with two different EMX2 shRNA constructs. We observed that cell migration was significantly promoted when endogenous EMX2 expression was silenced by the shRNAs in these cells (Fig. 5C and D, $p < 0.001$). Moreover, expression analyses of EMX2, E-Cadherin and membrane-bound β-Catenin in 129 lung SCC tissue samples in Cohort-1 revealed that EXM2 expression was positively correlated with that of E-Cadherin ($p = 0.009$) and membrane-bound β-Catenin ($p = 0.000$) in these lung SCC specimens examined (Fig. 6). Taken together, these results suggest, for the first time, that EMX2 may play an important role as a novel regulator of EMT in lung SCC.

Discussion

For decades, homeobox genes have been known for its importance in development. Nonetheless, the study of these genes during oncogenesis is still in its infancy. Aberrant homeobox gene expressions have been reported in several types of cancers (36, 37), suggesting the significant role of homeobox genes in oncogenesis. However, fundamental questions still need to be fully addressed, such as the molecular mechanisms that drive the aberrant expression, and downstream targets and signaling pathways that promote oncogenesis, etc. As a part of the efforts to investigate roles that homeobox genes play in oncogenesis, our group and collaborators have recently identified EMX2, one of the homeobox gene family members, being epigenetically down-regulated and serving as a putative novel tumor suppressor in lung adenocarcinomas and gastric cancer (28-30). In the present study, we investigated whether EMX2 was also down-regulated and what roles it might play in human lung SCC.

Our results demonstrated a significant decrease in EMX2 expression in primary lung SCC tissue samples when compared to their adjacent normal tissues, similar to that observed in lung adenocarcinomas (29). Moreover, when we correlated the EMX2 expression levels with patient clinical outcomes, we found that positive EMX2 expression was significantly associated with improved overall survival in stage I Lung SCC patients who received surgery, but without either neo-adjuvant or adjuvant chemotherapy. This result suggests that EMX2 is a putative independent novel prognostic marker for stage I lung SCC patients. This is also consistent with previously published studies in which prognostic markers are better predictors of survival in early-stage vs. late stage NSCLC (10, 11, 14, 20). Together with our observations that high EMX2 expression levels were significantly associated with improved overall survival in early

stage lung adenocarcinomas (30), it appears that EMX2 may play similar roles in both subtypes of human NSCLC.

We also performed a double-blinded correlation analysis of EMX2 expression in two independent cohorts of stage II/IIIA lung SCC patients with or without adjuvant chemotherapy. Interestingly, patients with positive EMX2 staining significantly benefited from adjuvant chemotherapy in both groups. In contrast, patients with negative EMX2 staining did not benefit from adjuvant chemotherapy. This result suggests that EMX2 may serve as a novel predictive marker for adjuvant chemotherapy in stage II/IIIA lung SCC patients. To support our finding, we demonstrated the increase in resistance of lung SCC cell lines to routinely used chemo drugs by down-regulating endogenous EMX2 expression via shRNA knockdown. Although our finding was validated by two well-controlled independent cohorts in a double-blinded manner, one limitation of this study is the number of patient samples analyzed. A larger number of patient samples need to be examined to further validate the role of EMX2 as a novel predictive marker for adjuvant chemotherapy in lung SCC patients. Once confirmed, a prospective multi-center clinical trial would be the next logical step to provide more complete support for its clinical utility to better stratify early-mid stage lung SCC patients for benefits from adjuvant chemotherapy. Nevertheless, our results demonstrate, for the first time, the prognostic and predictive significance of EMX2 expression in lung SCC, suggesting exigencies for finding reliable prognostic and/or predictive markers for lung SCC. Because clinical evidence has shown that adjuvant therapy could be beneficial even for early-stage NSCLC, more meaningful stratification is necessary after surgical resection.

The biological mechanisms underlying the functional role of EMX2 as a prognostic and predictive marker in lung SCC biology are still unclear. Because EMT is known to enable cancer

cells to invade surrounding tissues and generate distant metastasis (32), and has been shown to be associated with poor prognosis and chemo-resistance in different tumor models (33-35), it is tempting to speculate that EMX2 is involved in the regulation of EMT in lung SCC. Indeed, we observed that EMX2 expression was significantly associated with expression of several EMT markers in both lung SCC cell lines and tissue samples. In addition, shRNA knockdown of endogenous EMX2 expression in lung SCC cells promoted cell migration and down-regulated the EMT markers, while over-expressing EMX2 up-regulated the EMT markers. Whether EMX2 directly or indirectly regulates expression of the EMT markers in lung SCC still needs to be elucidated. While silencing EMX2 has been suggested to aberrantly activate Wnt signaling in lung adenocarcinoma (29) and some EMT markers are downstream targets of Wnt pathway, such as E-cadherin (38), we postulate that Wnt signaling may play a role in mediating EMX2 function in the regulation of EMT in lung SCC.

Acknowledgements:

This work was supported by NIH/NCI R01CA125030, and the Eileen D. Ludwig Endowed for Thoracic Oncology Research (to B. He); The Bonnie J. Addario Lung Cancer Foundation, the Kazan, McClain, Abrams, Fernandez, Lyons, Greenwood, Harley & Oberman Foundation, and the Barbara Isackson Lung Cancer Research Fund (to D. Jablons); and the Key Program for Anti-cancer Research of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (12ZCDZSY15400) (to C.L. Wang).

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012; 62:10-29.
2. Travis WD. Pathology of lung cancer. Clin Chest Med 2011;32:669–92.
3. Little AG, Gay EG, Gaspar LE, Stewart AK. National survey of non-small cell lung cancer in the United States: epidemiology, pathology and patterns of care. Lung Cancer 2007;57:253-60.
4. Coate Le JTTMSSFA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. Lancet Oncol 2009;10:1001-10.
5. Roepman P, Jassem J, Smit EF, Muley T, Niklinski J, van de Velde T, et al. An immune response enriched 72-gene prognostic profile for early-stage non-small-cell lung cancer. Clin Cancer Res 2009;15:284-90.
6. Boutros PC, Lau SK, Pintilie M, Liu N, Shepherd FA, Der SD, et al. Prognostic gene signatures for non-small-cell lung cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:2824-8.
7. Sun Z, Wigle DA, Yang P. Non-overlapping and non-cell-type-specific gene expression signatures predict lung cancer survival. J Clin Oncol 2008;26:877-83.
8. Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Sanchez JJ, Mendez P, Rzyman W, et al. Three-gene expression signature predicts survival in early-stage squamous cell carcinoma of the lung. Clin Cancer Res 2008;14:4794-9.
9. Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, Tsao MS, Yeatman TJ, Gerald WL, et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. Nat Med 2008;14:822-7.
10. Raz DJ, Ray MR, Kim JY, He B, Taron M, Skrzypski M, et al. A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2008;14:5565-70.
11. Lau SK, Boutros PC, Pintilie M, Blackhall FH, Zhu CQ, Strumpf D, et al. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2007;25:5562-9.
12. Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, Bowman RV, Hayward NK, Fong KM. Gene expression signature predicts recurrence in lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2007;13:2946-54.
13. Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, Bowman R, Clarke BE, Hayward NK, et al. Expression profiling defines a recurrence signature in lung squamous cell carcinoma. Carcinogenesis 2007;28:760-6.
14. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, et al. A five-gene signature

and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2007;356:11-20.

15. Raponi M, Zhang Y, Yu J, Chen G, Lee G, Taylor JM, et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. Cancer Res 2006;66:7466-72.

16. Lu Y, Lemon W, Liu PY, Yi Y, Morrison C, Yang P, et al. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. PLoS Med 2006;3:e467.

17. Guo L, Ma Y, Ward R, Castranova V, Shi X, Qian Y. Constructing molecular classifiers for the accurate prognosis of lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2006;12:3344-54.

18. Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y, Harano T, Ogura N, Mitsudomi T, et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. Oncogene 2004;23:5360-70.

19. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. Nat Med 2002;8:816-24.

20. Kratz J, He J, Van Den Eeden S, Zhu ZH, Gao W, Pham P, et al. A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. The Lancet 2012;379:823-32.

21. Gong F, Peng X, Luo C, Shen G, Zhao C, Zou L, et al. Cathepsin B as a potential prognostic and therapeutic marker for human lung squamous cell carcinoma. Mol Cancer 2013;12:125.

22. Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, Vesin A, Ezponda T, Zudaire I, et al. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. J Clin Oncol 2012;30:1129-36.

23. O-charoenrat P, Rusch V, Talbot SG, Sarkaria I, Viale A, Socci N, et al. Casein kinase II alpha subunit and C1-inhibitor are independent predictors of outcome in patients with squamous cell carcinoma of the lung. Clin Cancer Res 2004;10:5792-803.

24. Dalton D, Chadwick R, McGinnis W. Expression and embryonic function of empty spiracles: a Drosophila homeo box gene with two patterning functions on the anterior-posterior axis of the embryo. Genes Dev 1989;3:1940-56.

25. Taylor HS, Fei X. Emx2 regulates mammalian reproduction by altering endometrial cell proliferation. Mol Endocrinol 2005;19:2839-46.

26. Noonan FC, Mutch DG, Ann Mallon M, Goodfellow PJ. Characterization of the homeodomain gene EMX2: sequence conservation, expression analysis, and a search for mutations in endometrial cancers. Genomics 2001;76:37-44.

27. Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, Abeler VM, Esteller M, Lothe RA. Novel

epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). J Pathol 2006;210:441-9.

28. Li J, Mo M, Chen Z, Chen Z, Sheng Q, Mu H, et al. Adenoviral delivery of the EMX2 gene suppresses growth in human gastric cancer. PLoS ONE 2012;7:e45970.

29. Okamoto J, Hirata T, Chen Z, Zhou HM, Mikami I, Li H, et al. EMX2 is epigenetically silenced and suppresses growth in human lung cancer. Oncogene 2010;29:5969-75.

30. Okamoto J, Kratz J, Hirata T, Mikami I, Raz D, Segal M, et al. Downregulation of EMX2 is associated with clinical outcomes in lung adenocarcinoma patients. Clinical Lung Cancer 2011;12:237-44.

31. Drilon A, Rekhtman N, Ladanyi M, Paik P. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. Lancet Oncol 2012;13:e418-26.

32. Craene BD, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. Nat Rev Cancer 2013;13:97-110.

33. Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, Weder W, et al. Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2008;14:7430-7.

34. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. Nat Cell Biol 2008;10:295-305.

35. Vendrell JA, Thollet A, Nguyen NT, Ghayad SE, Vinot S, Bièche I, et al. ZNF217 is a marker of poor prognosis in breast cancer that drives epithelial-mesenchymal transition and invasion. Cancer Res 2012;72:3593-606.

36. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. Nature Reviews Cancer 2010;10:361-71.

37. Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. Exp Cell Res 1999;248:1-9.

38. Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. Nature 2003;422:317-22.

Figure Legends

Figure 1. EMX2 is down-regulated in lung SCC tissue samples. (A) Western blots of EMX2 protein expression in sixteen matched pairs of lung SCC tissue samples. Actin serviced as a loading control. (B) IHC staining of EXM2 expression in matched pairs of lung SCC specimens. The four pairs of tissue samples shown were from the same patients as shown in the first row of Western blot in panel A.

Figure 2. EMX2 expression is associated with clinical outcomes in patients with stage I lung SCC. Kaplan-Meier plot of overall survival by EMX2 expression in 91 patients with stage I lung SCC in Cohort-1.

Figure 3. EMX2 expression is associated with improved survival in stage II-IIIA lung SCC patients receiving adjuvant chemotherapy. Kaplan-Meier plots of overall survival by IHC staining of EMX2 in patients with stage II-IIIA lung SCC in Cohort-1 (panels A and B) and Cohort-2 (panels C and D).

Figure 4. shRNA knock-down of EMX2 expression promotes chemo-resistance in lung SCC cells. (A) Western blots of EMX2 expression in lung SCC cell lines H1703 and H2170 stably transfected with different EMX2 shRNA constructs. Actin serviced as a loading control. (B) Cell survival (%) of stably transfected H1703 and H2170 cells after treatments with chemo drugs: cisplatin at 12.5 μM and 25 μM, carboplatin at 12.5 μM and 25 μM, and docetaxol at 1.0 μM and 2.0 μM, respectively. Cell survival was determined by MTS assays and measurements were normalized to that of H1703 or H1270 cells stably transfected with a non-silencing shRNA construct and treated with DMSO, which was set as 100%. Two-sided student's t-test was

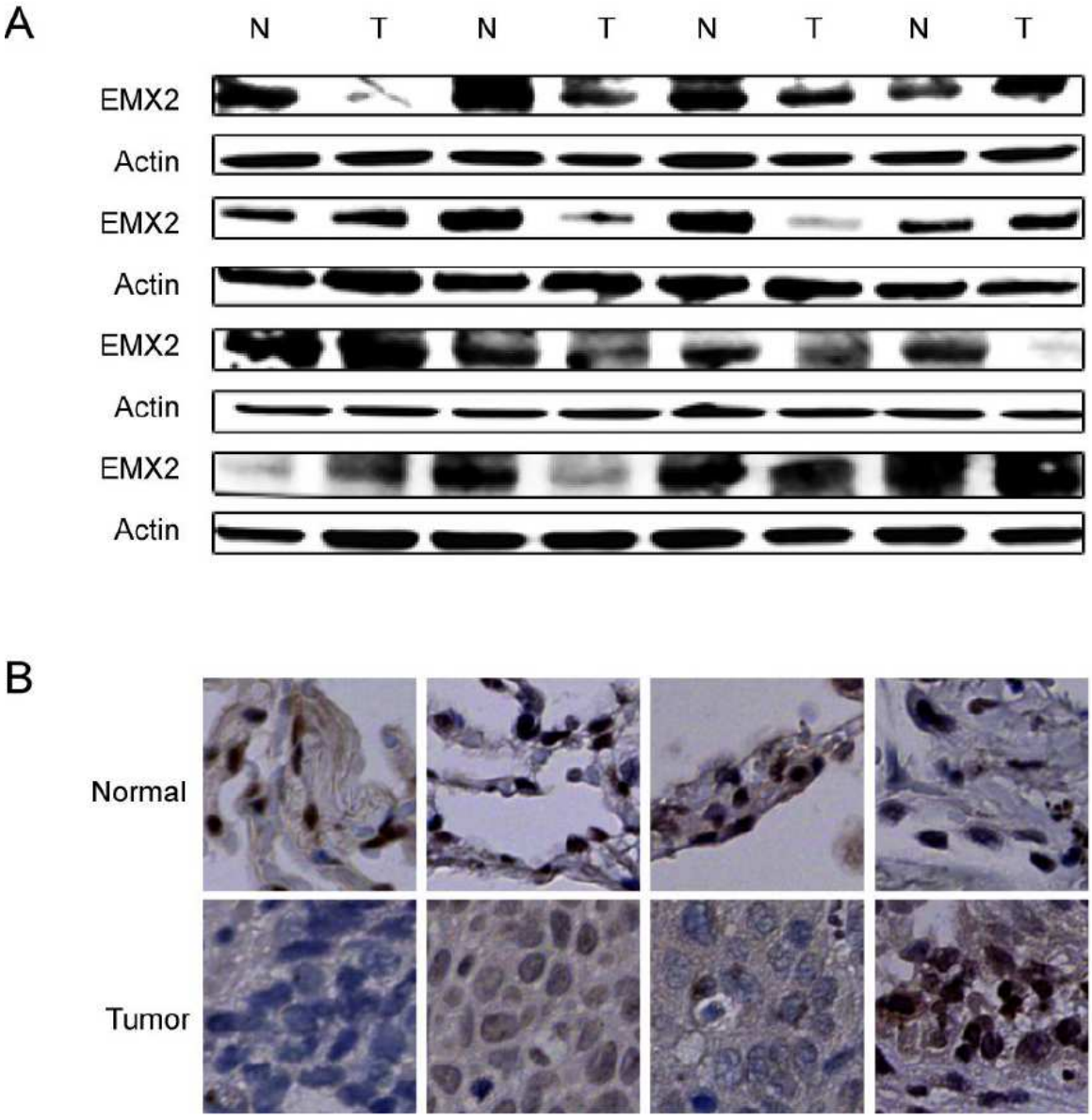
performed between control shRNA and EMX2 shRNA lines. A *p* value of 0.05 or less was indicated as *, 0.01 or less as **, and 0.001 or less as ***.

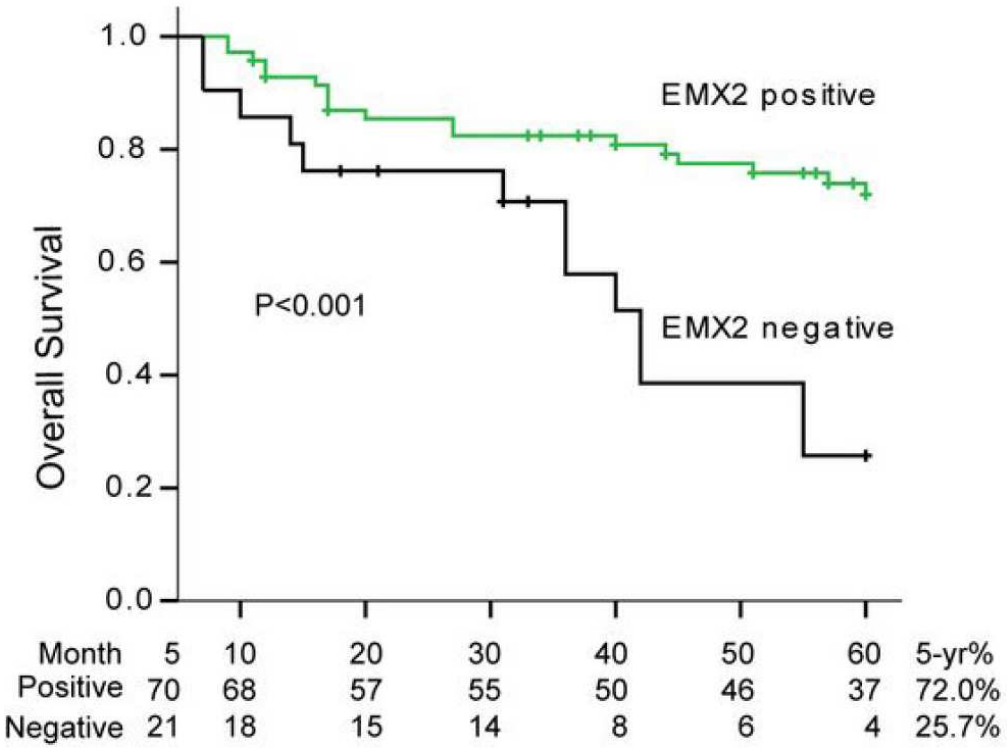
Figure 5. EMX2 may regulate EMT in lung SCC cell lines. (A) Immunofluorescence staining of EMX2 (red), E-Cadherin (green) and β-Catenin (green) in H2170 cells stably transfected with control shRNA or EMX2 shRNAs. (B) Immunofluorescence staining of EMX2 (red) and β-Catenin (green) in H1703 cells transiently transfected with EMX2 cDNA. Two representative fields were shown where the transfected cells had dramatic co-upregulation of EMX2 and membrane β-Catenin, compared to the non-transfected cells in the fields. DAPI (blue) was used to stain nuclei of those cells for both panels (A) and (B). (C) Wound healing assays of lung SCC H2170 cells stably transfected with EMX2 shRNAs. Representative pictures shown at day 1 and day 2 were taken under a light microscope (X100). (D) Quantification of the wound healing assays. The migration distance of cells stably transfected with control shRNA was set as 100%. A *p* value of 0.001 or less was indicated as ***.

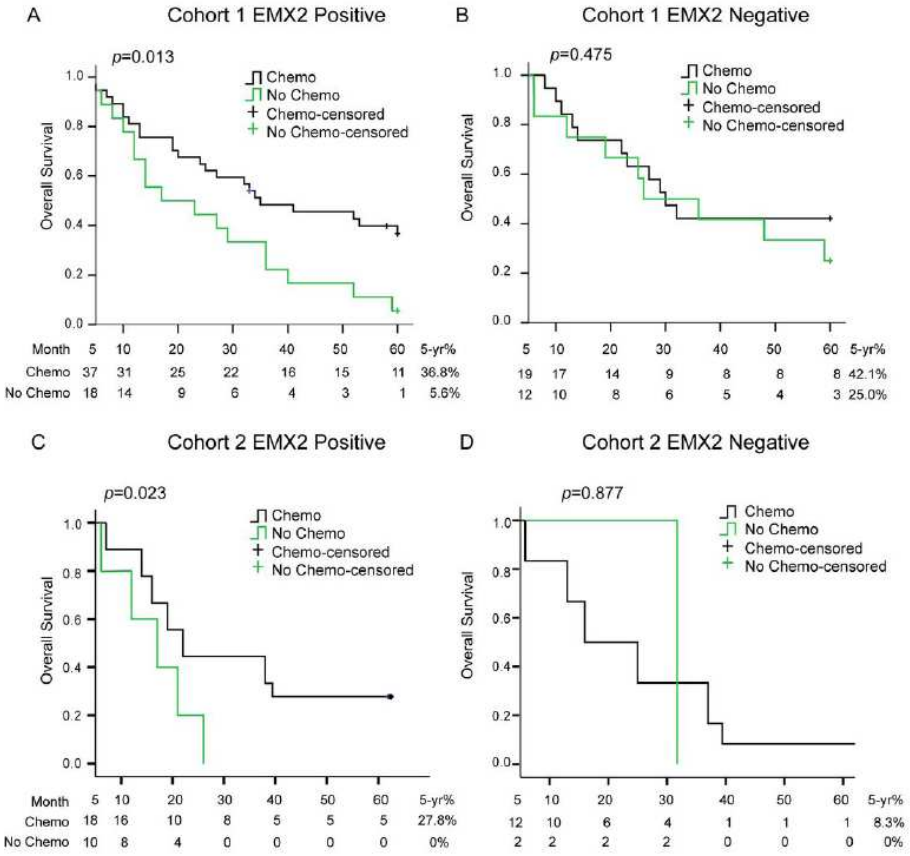
Figure 6. IHC staining of EMX2 and EMT markers in lung SCC tissue samples. 129 specimens in Cohort-1 were available for staining for all three proteins: EMX2, E-Cadherin and β-Catenin. Two representative specimens with positive EMX2 expression (tissues 1 and 2, labeled as High) and two representative ones with negative EMX2 expression (tissues 3 and 4, labeled as Low) were shown.

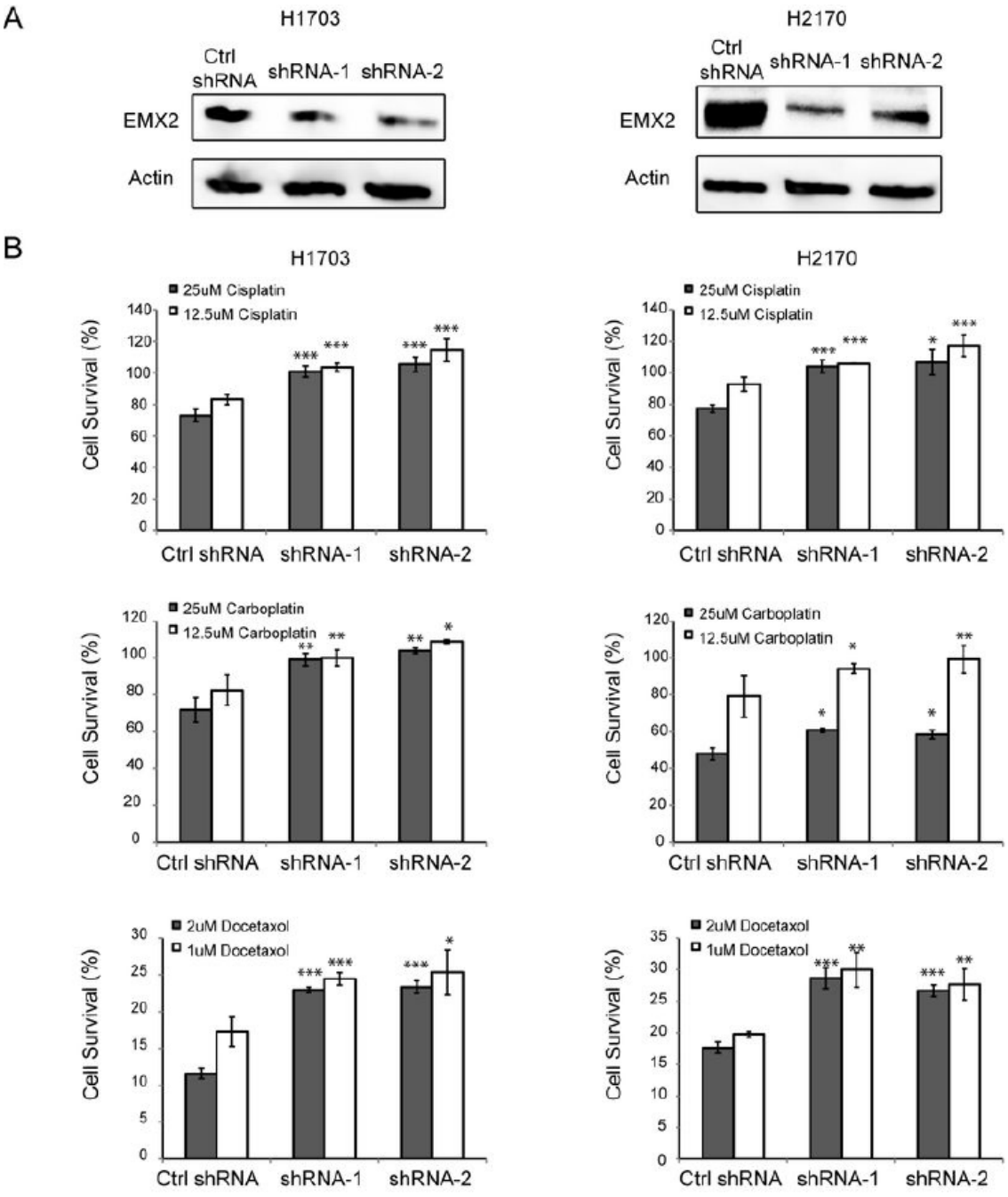
Table 1. Patient characteristics and five-year overall survival (OS)

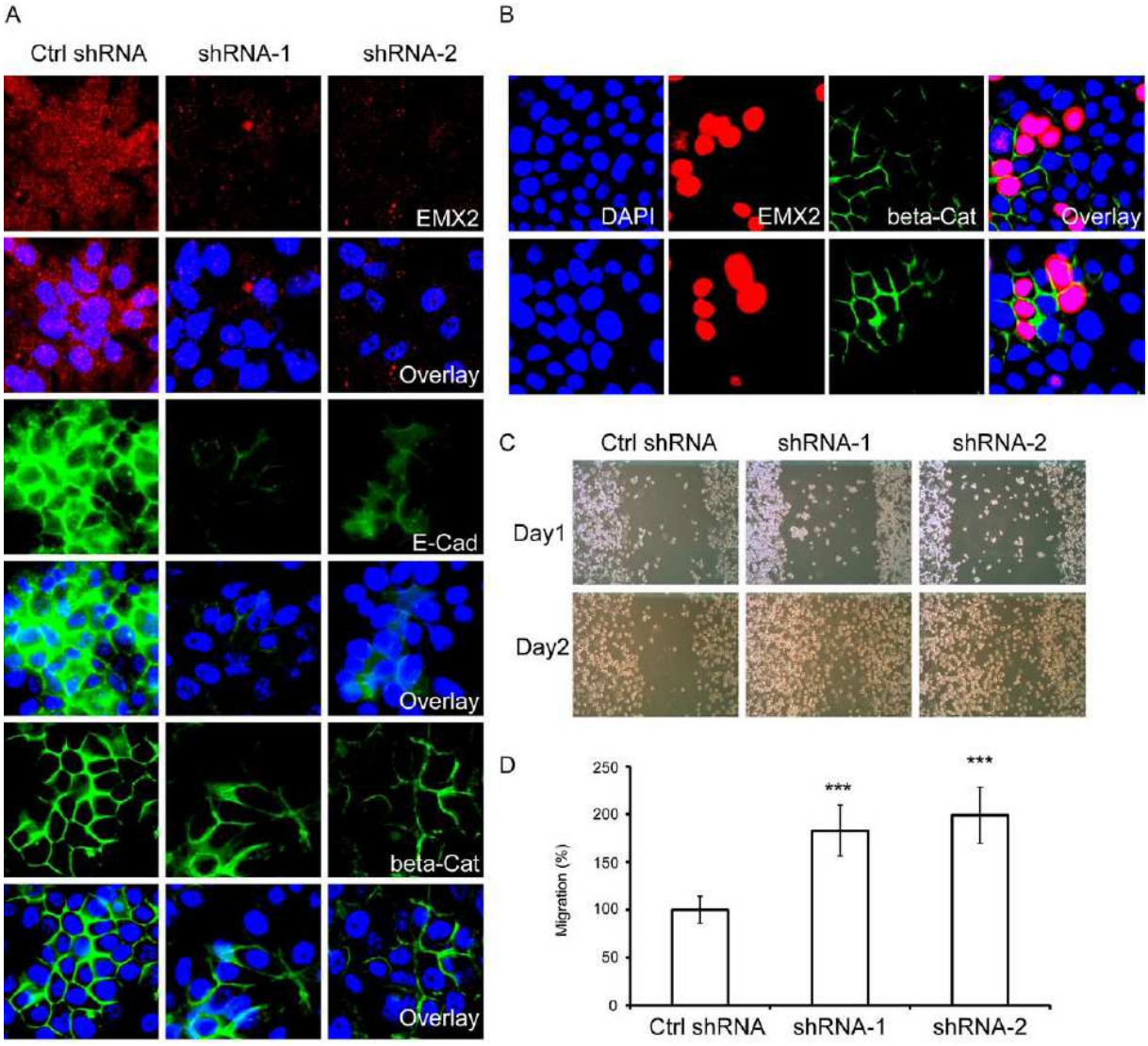
Characteristics	Cohort 1		Cohort 2	
	No.	5-yr OS (%)	No.	5-yr OS (%)
Age (Years)				
<60	71	40.10%	22	52.40%
≥60	106	59.90%	20	47.60%
Gender				
Male	151	85.30%	36	85.70%
Female	26	14.70%	6	14.30%
Smoking history				
Never	29	16.40%	10	16.40%
Smoker	148	83.60%	32	83.60%
Surgical Procedure				
Lobectomy	143	80.80%	32	76.20%
Pnumonectomy	30	16.90%	8	19.00%
Extended	4	2.30%	2	4.80%
T stage				
T1	45	25.40%	4	9.50%
T2	107	60.50%	10	23.80%
T3	25	14.10%	28	66.70%
N stage				
N0	126	71.20%	0	0%
N1	16	9.00%	24	57.10%
N2	35	19.80%	18	42.90%
TNM Stage				
I	91	51.40%	0	0%
II	48	27.10%	8	19%
IIIA	38	21.50%	34	81%
Adjuvant chemotherapy (II-IIIA)				
Yes	56	65.10%	30	71.40%
No	30	34.90%	12	28.60%
EMX2				
Positive	125	70.60%	28	66.70%
Negative	52	29.40%	14	33.30%

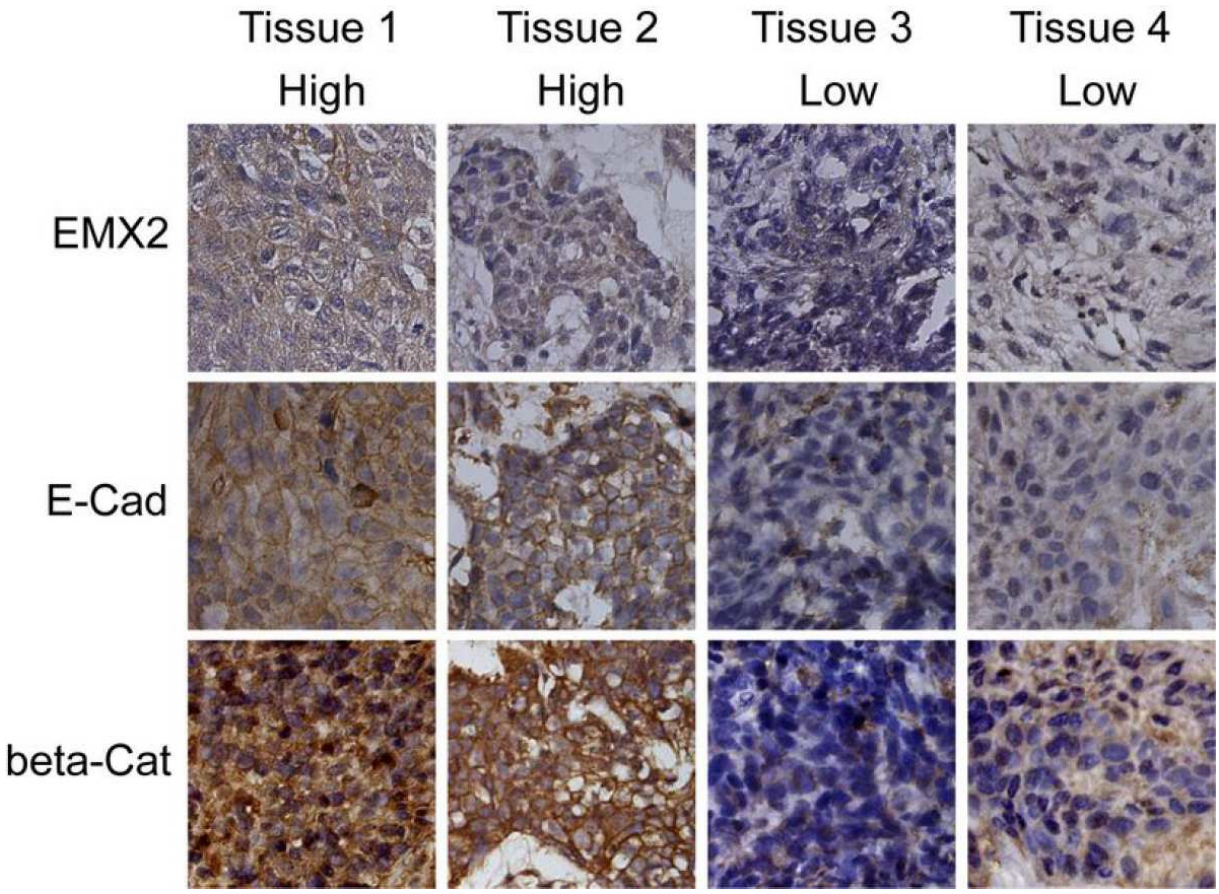

A
N
T
N
T
N
T
N
T
EMX2
Actin
EMX2
Actin
EMX2
Actin
EMX2
Actin
B
Normal
Tumor


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Overall Survival
EMX2 positive
EMX2 negative
P<0.001
Month 5 10 20 30 40 50 60 5-yr%
Positive 70 68 57 55 50 46 37 72.0%
Negative 21 18 15 14 8 6 4 25.7%


A
Cohort 1 EMX2 Positive
p=0.013
Chemo
No Chemo
Chemo-censored
No Chemo-censored
Overall Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Month 5 10 20 30 40 50 60 5-yr%
Chemo 37 31 25 22 16 15 11 36.8%
No Chemo 18 14 9 6 4 3 1 5.6%
B
Cohort 1 EMX2 Negative
p=0.475
Chemo
No Chemo
Chemo-censored
No Chemo-censored
Overall Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
5 10 20 30 40 50 60 5-yr%
19 17 14 9 8 8 8 42.1%
12 10 8 6 5 4 3 25.0%
C
Cohort 2 EMX2 Positive
p=0.023
Chemo
No Chemo
Chemo-censored
No Chemo-censored
Overall Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Month 5 10 20 30 40 50 60 5-yr%
Chemo 18 16 10 8 5 5 5 27.8%
No Chemo 10 8 4 0 0 0 0 0%
D
Cohort 2 EMX2 Negative
p=0.877
Chemo
No Chemo
Chemo-censored
No Chemo-censored
Overall Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
5 10 20 30 40 50 60 5-yr%
12 10 6 4 1 1 1 8.3%
2 2 2 2 0 0 0 0%


A
H1703
Ctrl shRNA
shRNA-1
shRNA-2
EMX2
Actin
H2170
Ctrl shRNA
shRNA-1
shRNA-2
EMX2
Actin
B
H1703
H2170
25uM Cisplatin
12.5uM Cisplatin
Cell Survival (%)
Ctrl shRNA
shRNA-1
shRNA-2
25uM Carboplatin
12.5uM Carboplatin
2uM Docetaxol
1uM Docetaxol


A
Ctrl shRNA
shRNA-1
shRNA-2
EMX2
Overlay
E-Cad
Overlay
beta-Cat
Overlay
B
DAPI
EMX2
beta-Cat
Overlay
C
Ctrl shRNA
shRNA-1
shRNA-2
Day1
Day2
D
Migration (%)
250
200
150
100
50
0
***
***
Ctrl shRNA
shRNA-1
shRNA-2


Tissue 1
High
Tissue 2
High
Tissue 3
Low
Tissue 4
Low
EMX2
E-Cad
beta-Cat

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ada AO, C Kunak S, Hancer F, Bilgen S, Suzen SH, Alpar S, Gulhan M, Kurt B, Iscan M. CYP and GST polymorphisms and survival in advanced non-small cell lung cancer patients. Neoplasma 2010;57:512-21.

Affolter M, Zeller R, Caussinus E. Tissue remodelling through branching morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:831-42.

Afsset, INSERM. Expertise collective. Cancer et environnement. 2008.

Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgard R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. Gene 2004;330:101-14.

Ahmad A, Maitah MY, Ginnebaugh KR, Li Y, Bao B, Gadgeel SM, Sarkar FH. Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMT-regulating miRNAs. J Hematol Oncol 2013;6:77.

Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, Roddam PL, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:11592-7.

Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. Hum Mol Genet 1996;5:1649-55.

Aplin JD, Haigh T, Vicovac L, Church HJ, Jones CJ. Anchorage in the developing placenta: an overlooked determinant of pregnancy outcome? Hum Fertil (Camb) 1998;1:75-79.

Arai T, Yasuda Y, Takaya T, Yoshimi N, Ito H, Fujiwara H. Correlation between the immunohistochemical and mRNA expression of glutathione S-transferase-pi and cisplatin plus etoposide chemotherapy response in patients with untreated primary non-small cell lung cancer. Int J Oncol 1997;11:127-31.

Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M, Radosavljevic D, Paccagnella A, Zatloukal P, Mazzanti P, Bisset D, Rosell R; CISCA (CISplatin versus CArboplatin) Meta-analysis Group. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. J Natl Cancer Inst 2007;99:847-57.

Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, Belderbos J, Clamon G, Ulutin HC, Paulus R, Yamanaka T, Bozonnat MC, Uitterhoeve A, Wang X, Stewart L, Arriagada R, Burdett S, Pignon JP. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2010;28:2181-90.

Bae HM, Min HS, Lee SH, Kim DW, Chung DH, Lee JS, Kim YW, Heo DS. Palliative chemotherapy for pulmonary pleomorphic carcinoma. Lung Cancer 2007;58:112-5.

Baggstrom MQ, Stinchcombe TE, Fried DB, Poole C, Hensing TA, Socinski MA. Third-generation chemotherapy agents in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. J Thorac Oncol 2007;2:845-53.

Bai F, Nakanishi Y, Kawasaki M, Takayama K, Yatsunami J, Pei XH, Tsuruta N, Wakamatsu K, Hara N. Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase-Pi can predict chemotherapy response in patients with nonsmall cell lung carcinoma. Cancer 1996;78:416-21.

Balicki D. Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. Cell Stem Cell 2007;1:485-7.

Barlesi F, Blons H, Beau-Faller M, Rouquette I, Ouafik L, Mosser J, Merlio JP, Bringuier PP, Jonveaux P, Le Marechal C, Denis MG, Frederique Penault-Llorca FM, Debieuvre D, Soria JC, Cadranel J, Mazieres J, Missy P, Morin F, Nowak F, Zalcman G. Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). J Clin Oncol 2013a;suppl:abstr 8000.

Barlesi F, Scherpereel A, Rittmeyer A, Pazzola A, Ferrer Tur N, Kim JH, Ahn MJ, Aerts JG, Gorbunova V, Vikström A, Wong EK, Perez-Moreno P, Mitchell L, Groen HJ. Randomized phase III trial of maintenance bevacizumab with or without pemetrexed after first-line induction with bevacizumab, cisplatin, and pemetrexed in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAPERL (MO22089). J Clin Oncol 2013b;31:3004-11.

Barlesi F, Scherpereel A, Gorbunova V, Gervais R, Vikström A, Chouaid C, Chella A, Kim JH, Ahn MJ, Reck M, Pazzola A, Kim HT, Aerts JG, Morando C, Loundou A, Groen HJ, Rittmeyer A. Maintenance bevacizumab-pemetrexed after first-line cisplatin-pemetrexed-bevacizumab for advanced nonsquamous non-small cell lung cancer: updated survival analysis of the AVAPERL (MO22089) randomized phase III trial. Ann Oncol 2014;25:1044-52.

Batra SK, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Molecular cloning and sequence analysis of the human ribosomal protein S16. J Biol Chem 1991;266:6830-3.

Beau-Faller M, Prim N, Ruppert AM, Nanni-Metéllus I, Lacave R, Lacroix L, Escande F, Lizard S, Pretet JL, Rouquette I, de Crémoux P, Solassol J, de Fraipont F, Bièche I, Cayre A, Favre-Guillevin E, Tomasini P, Wislez M, Besse B, Legrain M, Voegeli AC, Baudrin L, Morin F, Zalcman G, Quoix E, Blons H, Cadranel J. Rare EGFR exon 18 and exon 20 mutations in non-small-cell lung cancer on 10 117 patients: a multicentre observational study by the French ERMETIC-IFCT network. Ann Oncol 2014;25:126-31.

Beckett K, Franch-Marro X, Vincent JP. Glypican-mediated endocytosis of Hedgehog has opposite effects in flies and mice. Trends Cell Biol 2008;18:360-3.

Belani CK, Dahlberg SE, Rudin CM, Fleisher M, Chen HX, Takebe N, Ramalingam SS, Schiller JH. Three-arm randomized phase II study of cisplatin and etoposide (CE) versus CE with either vismodegib (V) or cixutumumab (Cx) for patients with extensive stage-small cell lung cancer (ES-SCLC) (ECOG 1508). J Clin Oncol 2013 ; 31 suppl : abstr 7508.

Bermudez O, Hennen E, Koch I, Lindner M, Eickelberg O. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. PLoS One 2013;8:e63226.

Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo Vullo S, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabrò E, Pastorino U, Sozzi G. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:16281-6.

Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. Oncogene 2004;23:6392-403.

Booton R, Ward T, Heighway J, Ashcroft L, Morris J, Thatcher N. Glutathione-S-transferase P1 isoenzyme polymorphisms, platinum-based chemotherapy, and non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2006;1:679-83.

Bosco-Clément G, Zhang F, Chen Z, Zhou HM, Li H, Mikami I, Hirata T, Yagui-Beltran A, Lui N, Do HT, Cheng T, Tseng HH, Choi H, Fang LT, Kim IJ, Yue D, Wang C, Zheng Q, Fujii N, Mann M, Jablons DM, He B. Targeting Gli transcription activation by small molecule suppresses tumor growth. Oncogene 2014;33:2087-97.

Bourguignon LY, Peyrollier K, Gilad E, Brightman A. Hyaluronan-CD44 interaction with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) promotes actin polymerization and ErbB2 activation leading to beta-catenin nuclear translocation, transcriptional up-regulation, and cell migration in ovarian tumor cells. J Biol Chem 2007;282:1265-80.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:10356-61.

Brodowicz T, Krzakowski M, Zwitter M, Tzekova V, Ramlau R, Ghilezan N, Ciuleanu T, Cucevic B, Gyurkovits K, Ulsperger E, Jassem J, Grgic M, Saip P, Szilasi M, Wiltschke C, Wagnerova M, Oskina N, Soldatenkova V, Zielinski C, Wenczl M. Cisplatin and gemcitabine first-line chemotherapy followed by maintenance gemcitabine or best supportive care in advanced non-small cell lung cancer: a phase III trial. Lung Cancer 2006;52:155-63.

Broers JL, Viallet J, Jensen SM, Pass H, Travis WD, Minna JD, Linnoila RI. Expression of c-myc in progenitor cells of the bronchopulmonary epithelium and in a large number of non-small cell lung cancers. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;9:33-43.

Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. Cancer Res 19991;59:1391-9.

Campbell K, Brosseau S, Reviron-Rabec L, Bergot E, Lechapt E, Levallet G, Zalcman G. Mésothéliomes malins pleuraux : le point en 2013. Bull Cancer 2013;100:1283-93.

Cañadas I, Rojo F, Taus Á, Arpí O, Arumí-Uría M, Pijuan L, Menéndez S, Zazo S, Dómine M, Salido M, Mojal S, García de Herreros A, Rovira A, Albanell J, Arriola E. Targeting epithelial-to-mesenchymal transition with Met inhibitors reverts chemoresistance in small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2014;20:938-50.

Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenas S, Szczésna A, Juhász E, Esteban E, Molinier O, Brugger W, Melezínek I, Klingelschmitt G, Klughammer B, Giaccone G. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. Lancet Oncol 2010;11:521-9.

Carney DN, Gazdar AF, Bunn PA Jr, Guccion JG. Demonstration of the stem cell nature of clonogenic tumor cells from lung cancer patients. Stem Cells 1982;1:149-64.

Chang C, Hsu LC, Davé V, Yoshida A. Expression of human aldehyde dehydrogenase-3 associated with hepatocellular carcinoma: promoter regions and nuclear protein factors related to the expression. Int J Mol Med 1998;2:333-8.

Chaudhary K, Deb S, Moniaux N, Ponnusamy MP, Batra SK. Human RNA polymerase II-associated factor complex: dysregulation in cancer. Oncogene 2007;26:7499-507.

Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. Cancer Res 2010;70:10433-44.

Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res 2010;70:440-6.

Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. Nature 1999;397:617-21.

Ciuleanu T, Brodowicz T, Zielinski C, Kim JH, Krzakowski M, Laack E, Wu YL, Bover I, Begbie S, Tzekova V, Cucevic B, Pereira JR, Yang SH, Madhavan J, Sugarman KP, Peterson P, John WJ, Krejcy K, Belani CP. Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. Lancet 2009;374:1432-40.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 1992;258:1650-4.

Cooper WA, Kohonen-Corish MR, Chan C, Kwun SY, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS. Prognostic significance of DNA repair proteins MLH1, MSH2 and MGMT expression in non-small-cell lung cancer and precursor lesions. Histopathology 2008;52:613-22.

Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. Nature 2005;437:1018-21.

Crinò L, Scagliotti GV, Ricci S, De Marinis F, Rinaldi M, Gridelli C, Ceribelli A, Bianco R, Marangolo M, Di Costanzo F, Sassi M, Barni S, Ravaioli A, Adamo V, Portalone L, Cruciani G, Masotti A, Ferrara G, Gozzelino F, Tonato M. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase III study of the Italian Lung Cancer Project. J Clin Oncol 1999;17:3522–30.

Cui F, Wang J, Chen D, Chen YJ. CD133 is a temporary marker of cancer stem cells in small cell lung cancer, but not in non-small cell lung cancer. Oncol Rep 2011;25:701-8.

D'Addario G, Pintilie M, Leighl NB, Feld R, Cerny T, Shepherd FA. Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. J Clin Oncol 2005;23:2926-36.

de las Peñas R, Sanchez-Ronco M, Alberola V, Taron M, Camps C, Garcia-Carbonero R, Massuti B, Queralt C, Botia M, Garcia-Gomez R, Isla D, Cobo M, Santarpia M, Cecere F, Mendez P, Sanchez JJ, Rosell R. Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. Ann Oncol 2006;17:668-75.

Delbaldo C, Michiels S, Syz N, Soria JC, Le Chevalier T, Pignon JP. Benefits of adding a drug to a single-agent or a 2-agent chemotherapy regimen in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. JAMA 2004;292:470-84.

Depierre A, Chastang C, Quoix E, Lebeau B, Blanchon F, Paillot N, Lemarie E, Milleron B, Moro D, Clavier J, Herman D, Tuchais E, Jacoulet P, Brechot JM, Cordier JF, Solal-Celigny P, Badri N, Besenval M. Vinorelbine versus vinorelbine plus cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a randomized trial. Ann Oncol 1994;5:37–42.

Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. BMJ 1994;309:901-11.

Douillard JY, Laporte S, Fossella F, Georgoulias V, Pujol JL, Kubota K, Monnier A, Kudoh S, Rubio JE, Cucherat M. Comparison of docetaxel- and vinca alkaloid-based chemotherapy in the first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis of seven randomized clinical trials. J Thorac Oncol 2007;2:939-46.

Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. Clin Cancer Res 2008;14:6751-60.

Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, Ince WL, Jänne PA, Januario T, Johnson DH, Klein P, Miller VA, Ostland MA, Ramies DA, Sebisanovic D, Stinson JA, Zhang YR, Seshagiri S, Hillan KJ. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. J Clin Oncol 2005;23:5900-9.

Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ 2008;15:504-14

Fasano M, Sabatini MT, Wieczorek R, Sidhu G, Goswami S, Jagirdar J. CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors: a role in histogenesis? Cancer 1997;80:34-41.

Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. Cancer Res 2007;67:2187-96.

Fidias PM, Dakhil SR, Lyss AP, Loesch DM, Waterhouse DM, Bromund JL, Chen R, Hristova-Kazmierski M, Treat J, Obasaju CK, Marciniak M, Gill J, Schiller JH. Phase III study of immediate compared with delayed docetaxel after front-line therapy with gemcitabine plus carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2009;27:591-8.

Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. Lancet Oncol 2008;9:808.

Filipits M, Haddad V, Schmid K, Huynh A, Dunant A, André F, Brambilla E, Stahel R, Pignon JP, Soria JC, Popper HH, Le Chevalier T, Pirker R. Multidrug resistance proteins do not predict benefit of adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program. Clin Cancer Res 2007;13:3892-8.

Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, Pluzanska A, Gorbounova V, Kaukel E, Mattson KV, Ramlau R, Szczesna A, Fidias P, Millward M, Belani CP. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. J Clin Oncol 2003;21:3016-24.

Fouquet C, Antoine M, Tisserand P, Favis R, Wislez M, Commo F, Rabbe N, Carette MF, Milleron B, Barany F, Cadranel J, Zalcman G, Soussi T. Rapid and sensitive p53 alteration analysis in biopsies from lung cancer patients using a functional assay and a universal oligonucleotide array: a prospective study. Clin Cancer Res 2004;10:3479-89.

Furler RL, Uittenbogaart CH. GLI2 regulates TGF-β1 in human CD4+ T cells: implications in cancer and HIV pathogenesis. PLoS One 2012;7:e40874.

Friboulet L, Olaussen KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, Kratzke R, Douillard JY, Seymour L, Pirker R, Filipits M, André F, Solary E, Ponsonnailles F, Robin A, Stoclin A, Dorvault N, Commo F, Adam J, Vanhecke E, Saulnier P, Thomale J, Le Chevalier T, Dunant A, Rousseau V, Le Teuff G, Brambilla E, Soria JC. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2013a;368:1101-10.

Friboulet L, Postel-Vinay S, Sourisseau T, Adam J, Stoclin A, Ponsonnailles F, Dorvault N, Commo F, Saulnier P, Salome-Desmoulez S, Pottier G, André F, Kroemer G, Soria JC, Olaussen KA. ERCC1 function in nuclear excision and interstrand crosslink repair pathways is mediated exclusively by the ERCC1-202 isoform. Cell Cycle 2013b;12:3298-306.

Fu J, Rodova M, Roy SK, Sharma J, Singh KP, Srivastava RK, Shankar S. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft. Cancer Lett 2013;330:22-32.

Georgoulias V, Ardavanis A, Agelidou A, Agelidou M, Chandrinos V, Tsaroucha E, Toumbis M, Kouroussis C, Syrigos K, Polyzos A, Samaras N, Papakotoulas P, Christofilakis C, Ziras N, Alegakis A. Docetaxel versus docetaxel plus cisplatin as front-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter phase III trial. J Clin Oncol 2004;22:2602–9.

Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, Varakis J, Kourea H, Papadaki H. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas. Lung Cancer 2009;66:64-74.

Giarnieri E, De Vitis C, Noto A, Roscilli G, Salerno G, Mariotta S, Ricci A, Bruno P, Russo G, Laurenzi A, Giovagnoli MR, Ciliberto G, Mancini R. EMT markers in lung adenocarcinoma pleural effusion spheroid cells. J Cell Physiol 2013;228:1720-6.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell 2007;1:555-67.

Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. J Thorac Oncol 2007;2:706-14.

Gomez-Casal R, Bhattacharya C, Ganesh N, Bailey L, Basse P, Gibson M, Epperly M, Levina V. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. Mol Cancer 2013;12:94.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med 1996;183:1797-806.

Gregorc V, Ludovini V, Pistola L, Darwish S, Floriani I, Bellezza G, Sidoni A, Cavaliere A, Scheibel M, De Angelis V, Bucciarelli E, Tonato M. Relevance of p53, bcl-2 and Rb expression on resistance to cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2003;39:41-8.

Gridelli C. The ELVIS trial: a phase III study of single-agent vinorelbine as first-line treatment in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. Elderly Lung Cancer Vinorelbine Italian Study. Oncologist 2001;6 Suppl 1:4-7.

Gridelli C, Perrone F, Gallo C, Cigolari S, Rossi A, Piantedosi F, Barbera S, Ferraù F, Piazza E, Rosetti F, Clerici M, Bertetto O, Robbiati SF, Frontini L, Sacco C, Castiglione F, Favaretto A, Novello S, Migliorino MR, Gasparini G, Galetta D, Iaffaioli RV, Gebbia V. Chemotherapy for elderly patients with advanced

non-small-cell lung cancer: the Multicenter Italian Lung Cancer in the Elderly Study (MILES) phase III randomized trial. J Natl Cancer Inst 2003a;95:362-72.

Gridelli C, Gallo C, Shepherd FA, Illiano A, Piantedosi F, Robbiati SF, Manzione L, Barbera S, Frontini L, Veltri E, Findlay B, Cigolari S, Myers R, Ianniello GP, Gebbia V, Gasparini G, Fava S, Hirsh V, Bezjak A, Seymour L, Perrone F. Gemcitabine plus vinorelbine compared with cisplatin plus vinorelbine or cisplatin plus gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol 2003b:3025–34.

Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Zhou W, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Neuberg DS, Christiani DC. XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy. J Clin Oncol 2004;22:2594-601

Gutova M, Najbauer J, Gevorgyan A, Metz MZ, Weng Y, Shih CC, Aboody KS. Identification of uPAR-positive chemoresistant cells in small cell lung cancer. PLoS One 2007;2:e243.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Unden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. Cell 1996;85:841-51.

Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. Carcinogenesis 2001;22:367-74.

Hallikas O, Palin K, Sinjushina N, Rautiainen R, Partanen J, Ukkonen E, Taipale J. Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity. Cell 2006;124:47-59.

Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, Pereira JR, De Marinis F, von Pawel J, Gatzemeier U, Tsao TC, Pless M, Muller T, Lim HL, Desch C, Szondy K, Gervais R, Shaharyar, Manegold C, Paul S, Paoletti P, Einhorn L, Bunn PA Jr. J Clin Oncol 2004;22:1589-97.

Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. Stem Cells 2006;24:506-13.

Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. PLoS Genet 2005;1:e53.

Hesketh PJ, Lilenbaum RC, Chansky K, Dowlati A, Graham P, Chapman RA, Crowley JJ, Gandara DR. Chemotherapy in patients > or = 80 with advanced non-small cell lung cancer: combined results from SWOG 0027 and LUN 6. J Thorac Oncol 2007;2:494-8.

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:14228-33.

Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. Cancer Res 2007;67:4827-33.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:3473-8.

Huang L, Walter V, Hayes DN, Onaitis M. Hedgehog-GLI Signaling Inhibition Suppresses Tumor Growth in Squamous Lung Cancer. Clin Cancer Res 2014;20:1566-75.

Huntsman DG, Chin SF, Muleris M, Batley SJ, Collins VP, Wiedemann LM, Aparicio S, Caldas C. MLL2, the second human homolog of the Drosophila trithorax gene, maps to 19q13.1 and is amplified in solid tumor cell lines. Oncogene 1999;18:7975-84.

Huo Z, Liu HR. Pathological study of pulmonary carcinomas with spindle and/or giant cells. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2006;28:391-4.

Ikram MS, Neill GW, Regl G, Eichberger T, Frischauf AM, Aberger F, Quinn A, Philpott M. Gli2 is expressed in normal human epidermidis and BCC and induces Gli1 expression by binding to its promoter. J Invest Dermatol 2004;122:1503-29.

Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, Ando M, Yamazaki K, Saijo Y, Gemma A, Miyazawa H, Tanaka T, Ikebuchi K, Nukiwa T, Morita S, Hagiwara K. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. J Clin Oncol 2009;27:1394-400.

Ito K, Oizumi S, Fukumoto S, Harada M, Ishida T, Fujita Y, Harada T, Kojima T, Yokouchi H, Nishimura M. Clinical characteristics of pleomorphic carcinoma of the lung. Lung Cancer 2010;68:204-10.

Jechlinger M, Grünert S, Beug H. Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2002;7:415-32.

Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. Mol Cancer Res 2009;7:330-8.

Joerger M, deJong D, Burylo A, Burgers JA, Baas P, Huitema AD, Beijnen JH, Schellens JH. Tubulin, BRCA1, ERCC1, Abraxas, RAP80 mRNA expression, p53/p21 immunohistochemistry and clinical

outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy. Lung Cancer.2011;74:310-7.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. Science.1996;272:1668-71.

Johnson BE, Kabbinavar F, Fehrenbacher L, Hainsworth J, Kasubhai S, Kressel B, Lin CY, Marsland T, Patel T, Polikoff J, Rubin M, White L, Yang JC, Bowden C, Miller V. ATLAS: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIB trial comparing bevacizumab therapy with or without erlotinib, after completion of chemotherapy, with bevacizumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2013;31:3926-34.

Kaira K, Horie Y, Ayabe E, Murakami H, Takahashi T, Tsuya A, Nakamura Y, Naito T, Endo M, Kondo H, Nakajima T, Yamamoto N. Pulmonary pleomorphic carcinoma: a clinicopathological study including EGFR mutation analysis. J Thorac Oncol 2010;5:460-5.

Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H, Souglakos J, Voutsina A, Georgoulias V, Mavroudis D. DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer 2009;10:118-23.

Kalikaki A, Koutsopoulos A, Hatzidaki D, Trypaki M, Kontopodis E, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulias V, Voutsina A. Clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving front-line chemotherapy according to EGFR and K-RAS mutation status. Lung Cancer 2010;69:110-5.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest 2009;119:1420–1428.

Kandioler-Eckersberger D, Kappel S, Mittlböck M, Dekan G, Ludwig C, Janschek E, Pirker R, Wolner E, Eckersberger F. The TP53 genotype but not immunohistochemical result is predictive of response to

cisplatin-based neoadjuvant therapy in stage III non-small cell lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;117:744-50.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. Nature 2004;431:707-12.

Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. Blood 1990;75:1947-50.

Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. Curr Mol Med 2009;9:873-86.

Ke HG, Li J, Shen Y, You QS, Yan Y, Dong HX, Liu JH, Shen ZY. Prognostic significance of GSTP1, XRCC1 and XRCC3 polymorphisms in non-small cell lung cancer patients. Asian Pac J Cancer Prev 2012;13:4413-6.

Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr, Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, Ramsey SD, Wozniak AJ, Weiss GR, Moore DF, Israel VK, Livingston RB, Gandara DR. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non—small cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. J Clin Oncol 2001;19:3210-8.

Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. Development 2003;130:15-28.

Kim IG, Kim SY, Choi SI, Lee JH, Kim KC, Cho EW. Fibulin-3-mediated inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and self-renewal of ALDH+ lung cancer stem cells through IGF1R signaling. Oncogene 2013. doi:10.1038/onc.2013.373. Sous presse.

Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:13180-5.

Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. Cancer Res 1992;52:4799-804.

Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. Nat Cell Biol 1999;1:312-9.

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. Cancer Res 1997;57:3537-47.

Kouso H, Yoshino I, Miura N, Takenaka T, Ohba T, Yohena T, Osoegawa A, Shoji F, Maehara Y. Expression of mismatch repair proteins, hMLH1/hMSH2, in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. J Surg Oncol 2008;98:377-83.

Koyabu Y, Nakata K, Mizugishi K, Aruga J, Mikoshiba K. Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins. J Biol Chem 2001;276:6889-92.

Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. Cancer Res 2004;64:6071-4.

Kudoh S, Takeda K, Nakagawa K, Takada M, Katakami N, Matsui K, Shinkai T, Sawa T, Goto I, Semba H, Seto T, Ando M, Satoh T, Yoshimura N, Negoro S, Fukuoka M. Phase III study of docetaxel compared with vinorelbine in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of the West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG 9904). J Clin Oncol 2006;24:3657-63.

Kumar M, Allison DF, Baranova NN, Wamsley JJ, Katz AJ, Bekiranov S, Jones DR, Mayo MW. NF-κB regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. PLoS One 2013;8:e68597.

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small cell lung cancer. N Engl J Med 2010;363:1693-703.

Lauth M, Toftgård R. Non-canonical activation of GLI transcription factors: implications for targeted anti-cancer therapy. Cell Cycle 2007;6:2458-63.

Le Chevalier T, Scagliotti G, Natale R, Danson S, Rosell R, Stahel R, Thomas P, Rudd RM, Vansteenkiste J, Thatcher N, Manegold C, Pujol JL, van Zandwijk N, Gridelli C, van Meerbeeck JP, Crino L, Brown A, Fitzgerald P, Aristides M, Schiller JH. Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of survival outcomes. Lung Cancer 2005;47:69-80.

Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. Science 1994;266:1528-37.

Lee HW, Choi YW, Han JH, Kim JH, Jung JH, Jeong SH, Kang SY, Choi JH, Oh YT, Park KJ, Hwang SC, Sheen SS. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. Lung Cancer 2009;65:377-82.

Lee S, Kim Y, Sun JM, Choi YL, Kim JG, Shim YM, Park YH, Ahn JS, Park K, Han JH, Ahn MJ. Molecular profiles of EGFR, K-ras, c-met, and FGFR in pulmonary pleomorphic carcinoma, a rare lung malignancy. J Cancer Res Clin Oncol 2011;137:1203-11.

Lee SH, Noh KB, Lee JS, Lee EJ, Min KH, Hur GY, Lee SH, Lee SY, Kim JH, Lee SY, Shin C, Shim JJ, Kim CH, Kang KH, In KH. Thymidylate synthase and ERCC1 as predictive markers in patients with pulmonary adenocarcinoma treated with pemetrexed and cisplatin. Lung Cancer 2013;81:102-8.

Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V, Sidhu SS, Mengistab A, Finkbeiner W, Gallup M, Basbaum C. Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer. PLoS One 2006;1:e93.

Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP, Cheng LC, Sihoe AD, Fink LM, Ma Y, Wong MP. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. PLoS One 2010;5:e14062.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res 2007;67:1030-7.

Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J Natl Cancer Inst 2008;100:672-9.

Li XQ, Li J, Shi SB, Chen P, Yu LC, Bao QL. Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy. Int J Biol Markers 2009;24:230-7.

Liang D, Shi Y. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. Med Oncol 2012;29:633-9.

Lipinski RJ, Gipp JJ, Zhang J, Doles JD, Bushman W. Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling. Exp Cell Res 2006;312:1925-38.

Loe DW, Deeley RG, Cole SP. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. Eur J Cancer 1996;32A:945-57.

Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, Cardenal F, Sánchez JM, Gumerlock PH, Tarón M, Sánchez JJ, Danenberg KD, Danenberg PV, Rosell R. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2002;8:2286-91.

Loriot Y, Mordant P, Deutsch E, Olaussen KA, Soria JC. Are RAS mutations predictive markers of resistance to standard chemotherapy? Nat Rev Clin Oncol 2009;6:528-34.

Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, Guan XY. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. Mol Cancer Res 2008;6:1146-53.

Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. N Engl J Med 2010;362:2380-8.

Maitah MY, Ali S, Ahmad A, Gadgeel S, Sarkar FH. Up-Regulation of Sonic Hedgehog Contributes to TGF-b1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in NSCLC Cells. PLoS One 2011;6:e16068.

Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert AP, Noel S, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. Br J Cancer 2005;92:131-9.

McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. Curr Top Dev Biol 2003;53:1-114.

Mellema WW, Dingemans AM, Thunnissen E, Snijders PJ, Derks J, Heideman DA, Van Suylen R, Smit EF. KRAS mutations in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum-based chemotherapy have no predictive value. J Thorac Oncol 2013;8:1190-5.

Meng X, Li M, Wang X, Wang Y, Ma D. Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. Cancer Sci 2009;100:1040-6.

Mimeault M, Batra SK. Frequent deregulations in the hedgehog signaling network and cross-talks with the epidermal growth factor receptor pathway involved in cancer progression and targeted therapies. Pharmacol Rev 2010;62:497-524.

Mimeault M, Batra SK. Altered gene products involved in the malignant reprogramming of cancer stem/progenitor cells and multitargeted therapies. Mol Aspects Med 2013;pii: S0098-2997(13)00059-9.

Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2010;11:121-8.

Miyatake K, Gemba K, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Shibayama T, Takigawa N, Kawaraya M, Tanimoto M. Prognostic significance of mutant p53 protein, P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in patients with unresectable non-small cell lung cancer. Anticancer Res 2003;23:2829-36.

Mizugishi K, Aruga J, Nakata K, Mikoshiba K. Molecular properties of Zic proteins as transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. J Biol Chem 2001;276:2180-8.

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med 2009;361:947-57.

Moniaux N, Nemos C, Schmied BM, Chauhan SC, Deb S, Morikane K, Choudhury A, Vanlith M, Sutherlin M, Sikela JM, Hollingsworth MA, Batra SK. The human homologue of the RNA polymerase II-associated factor 1 (hPaf1), localized on the 19q13 amplicon, is associated with tumorigenesis. Oncogene 2006;25:3247-57.

Moniaux N, Nemos C, Deb S, Zhu B, Dornreiter I, Hollingsworth MA, Batra SK. The human RNA polymerase II-associated factor 1 (hPaf1): a new regulator of cell-cycle progression. PLoS One 2009;4:e7077.

Moreb JS, Zucali JR, Ostmark B, Benson NA. Heterogeneity of aldehyde dehydrogenase expression in lung cancer cell lines is revealed by Aldefluor flow cytometry-based assay. Cytometry B Clin Cytom 2007;72:281-9.

Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. Cell 2006;125:327-41.

Mosimann C, Hausmann G, Basler K. The role of Parafibromin/Hyrax as a nuclear Gli/Ci-interacting protein in Hedgehog target gene control. Mech Dev 2009;126:394-405.

Nakajima M, Kasai T, Hashimoto H, Iwata Y, Manabe H. Sarcomatoid carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 37 cases. Cancer 1999;86:608-16.

Nakanishi Y, Kawasaki M, Bai F, Takayama K, Pei XH, Takano K, Inoue K, Osaki S, Hara N, Kiyohara C. Expression of p53 and glutathione S-transferase-pi relates to clinical drug resistance in non-small cell lung cancer. Oncology 1999;57:318-23.

Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. Oncogene 1999;18:3004-16.

NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. J Clin Oncol 2008;26:4617-25.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC; IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N Engl J Med 2006;355:983-91.

Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. Genes Dev 2002;16:3074-86.

Ota E, Abe Y, Oshika Y, Ozeki Y, Iwasaki M, Inoue H, Yamazaki H, Ueyama Y, Takagi K, Ogata T. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in non-small-cell lung cancer. Br J Cancer 1995;72:550-4.

Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojika M, Murata Y, Yamazaki M, Nishiwaki Y, Eguchi K, Ochiai A. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. Lung Cancer 2009;64:98-104.

Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. PLoS Med 2005;2:e17.

Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G, Lagoudaki E, Trypaki M, Tryfonidis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulias V, Souglakos J. ERCC1 and BRAC1 mRNA expression levels in the

primary tumor could predict the effectiveness of the second-line cisplatin-based chemotherapy in pretreated patients with metastatic non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol 2012;7:663-71.

Park KS, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, Bernard K, Conklin JF, Szczepny A, Yuan J, Guo R, Ospina B, Falzon J, Bennett S, Brown TJ, Markovic A, Devereux WL, Ocasio CA, Chen JK, Stearns T, Thomas RK, Dorsch M, Buonamici S, Watkins DN, Peacock CD, Sage J. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. Nat Med 2011;17:1504-8.

Patel JD, Socinski MA, Garon EB, Reynolds CH, Spigel DR, Olsen MR, Hermann RC, Jotte RM, Beck T, Richards DA, Guba SC, Liu J, Frimodt-Moller B, John WJ, Obasaju CK, Pennella EJ, Bonomi P, Govindan R. PointBreak: a randomized phase III study of pemetrexed plus carboplatin and bevacizumab followed by maintenance pemetrexed and bevacizumab versus paclitaxel plus carboplatin and bevacizumab followed by maintenance bevacizumab in patients with stage IIIB or IV nonsquamous non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2013;31:4349-57.

Patel M, Lu L, Zander DS, Sreerama L, Coco D, Moreb JS. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. Lung Cancer 2008;59:340-9.

Paz-Ares LG, de Marinis F, Dediu M, Thomas M, Pujol JL, Bidoli P, Molinier O, Sahoo TP, Laack E, Reck M, Corral J, Melemed S, John W, Chouaki N, Zimmermann AH, Visseren-Grul C, Gridelli C. PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2013;31:2895-902.

Peacock CD, Watkins DN. Cancer Stem Cells and the Ontogeny of Lung Cancer. J Clin Oncol 26:2883-2889.

Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, Bonnet D. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. Stem Cells 2005;23:752-60.

Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. J Biol Chem 1998;273:14037-45.

Pérol M, Chouaid C, Pérol D, Barlési F, Gervais R, Westeel V, Crequit J, Léna H, Vergnenègre A, Zalcman G, Monnet I, Le Caer H, Fournel P, Falchero L, Poudenx M, Vaylet F, Ségura-Ferlay C, Devouassoux-Shisheboran M, Taron M, Milleron B. Randomized, phase III study of gemcitabine or erlotinib maintenance therapy versus observation, with predefined second-line treatment, after cisplatin-gemcitabine induction chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2012;30:3516-24.

Perona R, López-Ayllón BD, de Castro Carpeño J, Belda-Iniesta C. A role for cancer stem cells in drug resistance and metastasis in non-small-cell lung cancer. Clin Transl Oncol 2011;13:289-93.

Pierceall WE, Olaussen KA, Rousseau V, Brambilla E, Sprott KM, Andre F, Pignon JP, Le Chevalier T, Pirker R, Jiang C, Filipits M, Chen Y, Kutok JL, Weaver DT, Ward BE, Soria JC. Cisplatin benefit is predicted by immunohistochemical analysis of DNA repair proteins in squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma: theranostic modeling by NSCLC constituent histological subclasses. Ann Oncol 2012;23:2245-52.

Ponnusamy MP, Deb S, Dey P, Chakraborty S, Rachagani S, Senapati S, Batra SK. RNA polymerase II associated factor 1/PD2 maintains self-renewal by its interaction with Oct3/4 in mouse embryonic stem cells. Stem Cells 2009;27:3001-11.

Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. Science 1996;274:255-9.

Powell HA, Iyen-Omofoman B, Hubbard RB, Baldwin DR, Tata LJ. The association between smoking quantity and lung cancer in men and women. Chest 2013;143:123–129.

Quoix E, Zalcman G, Oster JP, Westeel V, Pichon E, Lavolé A, Dauba J, Debieuvre D, Souquet PJ, Bigay-Game L, Dansin E, Poudenx M, Molinier O, Vaylet F, Moro-Sibilot D, Herman D, Bennouna J, Tredaniel J, Ducoloné A, Lebitasy MP, Baudrin L, Laporte S, Milleron B. Carboplatin and weekly paclitaxel doublet chemotherapy compared with monotherapy in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: IFCT-0501 randomised, phase 3 trial. Lancet 2011;378:1079-88.

Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B, Xun WW, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, Sommar J, Forsberg B, Modig L, Oudin A, Oftedal B, Schwarze PE, Nafstad P, De Faire U, Pedersen NL, Ostenson CG, Fratiglioni L, Penell J, Korek M, Pershagen G, Eriksen KT, Sørensen M, Tjønneland A, Ellermann T, Eeftens M, Peeters PH, Meliefste K, Wang M, Bueno-de-Mesquita B, Key TJ, de Hoogh K, Concin H, Nagel G, Vilier A, Grioni S, Krogh V, Tsai MY, Ricceri F, Sacerdote C, Galassi C, Migliore E, Ranzi A, Cesaroni G, Badaloni C, Forastiere F, Tamayo I, Amiano P, Dorronsoro M, Trichopoulou A, Bamia C, Vineis P, Hoek G. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). Lancet Oncol 2013;14:813-22.

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. Cancer Res 1997;57:842-5.

Raz G, Allen KE, Kingsley C, Cherni I, Arora S, Watanabe A, Lorenzo CD, Edwards V DK, Sridhar S, Hostetter G, Weiss GJ. Hedgehog signaling pathway molecules and ALDH1A1 expression in early-stage non-small cell lung cancer. Lung Cancer 2012;76:191-6.

Ren J, Chen Y, Song H, Chen L, Wang R. Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line. J Cell Biochem 2013;114:1395-403.

Rivera C, Rivera S, Loriot Y, Vozenin MC, Deutsch E. Lung cancer stem cell: new insights on experimental models and preclinical data. J Oncol 2011;2011:549181.

Robbins DJ, Hebrok M. Hedgehogs: la dolce vita. Workshop on Hedgehog-Gli Signaling in Cancer and Stem Cells. EMBO Rep.2007;8:451-5.

Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, Slebos RJ, Mooi WJ, van't Veer L, van Zandwijk N. Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. J Clin Oncol 1997;15:285-91.

Rodova M, Fu J, Watkins DN, Srivastava RK, Shankar S. Sonic hedgehog signaling inhibition provides opportunities for targeted therapy by sulforaphane in regulating pancreatic cancer stem cell self-renewal. PLoS One 2012;7:e46083.

Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC, Keppler U, Macha HN, Pirker R, Berthet P, Breau JL, Lianes P, Nicholson M, Ardizzoni A, Chemaissani A, Bogaerts J, Gallant G. Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a cooperative multinational trial. Ann Oncol 2002;13:1539–49.

Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, Cobo M, Moran T, Chaib I, Provencio M, Domine M, Sala MA, Jimenez U, Diz P, Barneto I, Macias JA, de Las Peñas R, Catot S, Isla D, Sanchez JM, Ibeas R, Lopez-Vivanco G, Oramas J, Mendez P, Reguart N, Blanco R, Taron M. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. PLoS One 2009;4:e5133.

Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M,

Moreno MA, Terrasa J, Muñoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, Baize N, Garcia-Campelo R, Robinet G, Rodriguez-Abreu D, Lopez-Vivanco G, Gebbia V, Ferrera-Delgado L, Bombaron P, Bernabe R, Bearz A, Artal A, Cortesi E, Rolfo C, Sanchez-Ronco M, Drozdowskyj A, Queralt C, de Aguirre I, Ramirez JL, Sanchez JJ, Molina MA, Taron M, Paz-Ares L. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2012;13:239-46.

Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. Int J Cancer. 2010 Feb 15;126(4):950-8.

Sanchez JM, Cobo M, Arrabal R, Massuti B, Rodriguez Paniagua JM, Moran T, Astudillo J, Jimenez U, Pun YW, Bujanda DA, Freixenet J, Gonzalez-Larriba JL, Hernando-Trancho F, Gómez-Codina J, Penalver JC, Banaclocha NM, Lopez-Vivanco G, Pac J, Taron M, Rosell R. Pilot SCAT trial: Spanish customized adjuvant chemotherapy (CT) based on BRCA1 mRNA expression levels (l) in resected stage II-IIIA non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p). J Clin Oncol 2012:30(suppl):abstr7011.

Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. Annu Rev Physiol 2007;69:377-400.

Sato M, Shames DS, Hasegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. Respirology 2012;17:1048-59.

Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crinò L, Gridelli C, Ricci S, Matano E, Boni C, Marangolo M, Failla G, Altavilla G, Adamo V, Ceribelli A, Clerici M, Di Costanzo F, Frontini L, Tonato M. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2002;20:4285-91.

Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, Serwatowski P, Gatzemeier U, Digumarti R, Zukin M, Lee JS, Mellemgaard A, Park K, Patil S, Rolski J, Goksel T, de Marinis F, Simms L, Sugarman KP, Gandara D. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2008;26:650-6.

Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Chambon P, Egly JM. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. Science 1993;260:58-63.

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2002;346:92-8.

Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. J Thorac Oncol 2006;1:31-7.

Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, Solomon JA, Yoo S, Arron ST, Friedlander PA, Marmur E, Rudin CM, Chang AL, Low JA, Mackey HM, Yauch RL, Graham RA, Reddy JC, Hauschild A. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. N Engl J Med 2012;366:2171-9.

Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, Geater SL, Orlov S, Tsai CM, Boyer M, Su WC, Bennouna J, Kato T, Gorbunova V, Lee KH, Shah R, Massey D, Zazulina V, Shahidi M, Schuler M. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. J Clin Oncol 2013;31:3327-34.

Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, Solomon B, Stubbs H, Admane S, McDermott U, Settleman J, Kobayashi S, Mark EJ, Rodig SJ, Chirieac LR, Kwak EL, Lynch TJ, Iafrate AJ. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. J Clin Oncol 2009;27:4247-53.

Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, Mattson K, Gralla R, O'Rourke M, Levitan N, Gressot L, Vincent M, Burkes R, Coughlin S, Kim Y, Berille J. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. J Clin Oncol. 2000 May;18(10):2095-103.

Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabárbara P, Seymour L. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2005;353:123-32.

Shi Y, Moura U, Opitz I, Soltermann A, Rehrauer H, Thies S, Weder W, Stahel RA, Felley-Bosco E. Role of hedgehog signaling in malignant pleural mesothelioma. Clin Cancer Res 2012;18:4646-56.

Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J, Chao KS. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. Oncogene 2007;26:5674-9.

Smit EF, van Meerbeeck JPAM, Lianes P, Debruyne C, Legrand C, Schramel F, Smit H, Gaafar R, Biesma B, Manegold C, Neymark N, Giaccone G. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group-EORTC 08975. J Clin Oncol 2003;21:3909–17.

Smith CJ, Perfetti TA, Garg R, Hansch C. IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values. Food Chem Toxicol 2003;41:807-17.

Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature 2007;448:561-6.

Song Z, Yue W, Wei B, Wang N, Li T, Guan L, Shi S, Zeng Q, Pei X, Chen L. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. PLoS One 2011;6:e17687.

Soria JC, Mauguen A, Reck M, Sandler AB, Saijo N, Johnson DH, Burcoveanu D, Fukuoka M, Besse B, Pignon JP. Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Ann Oncol 2013;24:20-30.

Stewart GA, Lowrey JA, Wakelin SJ, Fitch PM, Lindey S, Dallman MJ, Lamb JR, Howie SEM. Sonic Hedgehog Signaling Modulates Activation of and Cytokine Production by Human Peripheral CD4+ T Cells. J Immunol 2002;169:5451–7.

Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:9118-23.

Sun N, Sun X, Chen B, Cheng H, Feng J, Cheng L, Lu Z. MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2010;65:437-46.

Sung JM, Cho HJ, Yi H, Lee CH, Kim HS, Kim DK, Abd El-Aty AM, Kim JS, Landowski CP, Hediger MA, Shin HC. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. Biochem Biophys Res Commun 2008;371:163-7.

Sweeney CJ, Zhu J, Sandler AB, Schiller J, Belani CP, Langer C, Krook J, Harrington D, Johnson DH. Outcome of patients with a performance status of 2 in Eastern Cooperative Oncology Group Study E1594: a Phase II trial in patients with metastatic nonsmall cell lung carcinoma. Cancer 2001;92:2639-47.

Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation. Curr Opin Oncol 2000;12:450-8.

Tang JY, So PL, Epstein EH Jr. Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma. Toxicol Appl Pharmacol 2007;224:257-64.

Tang TC, Sham JS, Xie D, Fang Y, Huo KK, Wu QL, Guan XY. Identification of a candidate oncogene SEI-1 within a minimal amplified region at 19q13.1 in ovarian cancer cell lines. Cancer Res 2002;62:7157-61.

Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, Queralt C, Majo J, Sanchez JM, Sanchez JJ, Maestre J. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. Hum Mol Genet 2004;13:2443-9.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. Nature 2003;425:851-6.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2002;2:442-54.

Tian F, Mysliwietz J, Ellwart J, Gamarra F, Huber RM, Bergner A. Effects of the Hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 on lung cancer cell lines are mediated by side populations. Clin Exp Med 2012a;12:25-30.

Tian F, Schrödl K, Kiefl R, Huber RM, Bergner A. The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 alters intracellular Ca2+ homeostasis and inhibits cell growth in cisplatin-resistant lung cancer cells. Anticancer Res 2012b;32:89-94.

Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, Rocco G, Pirozzi G. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. Eur J Cardiothorac Surg 2009;36:446-53.

Torroja C, Gorfinkiel N, Guerrero I. Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. Development 2004;131:2395-408.

Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. 3rd ed. Lyon, France: IARC Press; 2004. World Health Organization Classification of Tumours; vol 10.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol 2011;6:244-85.

Treat JA, Gonin R, Socinski MA, Edelman MJ, Catalano RB, Marinucci DM, Ansari R, Gillenwater HH, Rowland KM, Comis RL, Obasaju CK, Belani CP. A randomized, phase III multicenter trial of gemcitabine in combination with carboplatin or paclitaxel versus paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. Ann Oncol 2010;21:540-7.

Tsai CM, Chang KT, Perng RP, Mitsudomi T, Chen MH, Kadoyama C, Gazdar AF. Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. J Natl Cancer Inst 1993;85:897-901.

Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, Whitehead M, Zhu CQ, Livingston R, Johnson DH, Rigas J, Seymour L, Winton T, Shepherd FA. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 2007;25:5240-7.

Tsuta K, Kozu Y, Mimae T, Yoshida A, Kohno T, Sekine I, Tamura T, Asamura H, Furuta K, Tsuda H. c-MET/Phospho-MET protein expression and MET gene copy number in non-small cell lung carcinomas. J Thorac Oncol 2012;7:331-9.

Vieira T, Duruisseaux M, Ruppert AM, Cadranel J, Antoine M, Wislez M. Carcinome sarcomatoïdes pulmonaires. Bull Cancer 2012;99:995-1001.

Vieira T, Girard N, Ung M, Monnet I, Cazes A, Bonnette P, Duruisseaux M, Mazieres J, Antoine M, Cadranel J, Wislez M. Efficacy of first-line chemotherapy in patients with advanced lung sarcomatoid carcinoma. J Thorac Oncol 2013;8:1574-7.

Vieira T, Antoine M, Fallet V, Duruisseaux M, Giroux Leprieur E, Poulot V, Rabbe V, Sclick L, Beau-Faller M, Lacave R, Lavole A, Cadranel J, Wislez M. Blood vessel invasion is a major feature and a factor of poor prognosis in sarcomatoid carcinoma of the lung. Lung Cancer 2014. Sous presse. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.06.004.

Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol 2003;21:2636-44.

Wang J, Pham-Mitchell N, Schindler C, Campbell IL. Dysregulated Sonic hedgehog signaling and medulloblastoma consequent to IFN-alpha-stimulated STAT2-independent production of IFN-gamma in the brain. J Clin Invest 2003;112:535–43.

Wang H, Zhang G, Zhang H, Zhang F, Zhou B, Ning F, Wang HS, Cai SH, Du J. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/β-catenin/Snail signaling pathway. Eur J Pharmacol 2014;723:156-66.

Wang YF, Chang CJ, Lin CP, Chang SY, Chu PY, Tai SK, Li WY, Chao KS, Chen YJ. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. Head Neck 2012;34:1556-61.

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. Nature 2003;422:313-7.

Wei SZ, Zhan P, Shi MQ, Shi Y, Qian Q, Yu LK, Song Y. Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. Med Oncol 2011;28:315-21.

Wei HB, Hu J, Shang LH, Zhang YY, Lu FF, Wei M, Yu Y. A meta-analytic review of ERCC1/MDR1 polymorphism and chemosensitivity to platinum in patients with advanced non-small cell lung cancer. Chin Med J (Engl) 2012;125:2902-7.

Wendler F, Franch-Marro X, Vincent JP. How does cholesterol affect the way Hedgehog works? Development 2006;133:3055-61.

Wislez M, Barlesi F, Besse B, Mazières J, Merle P, Cadranel J, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, Gautier-Felizot L, Goupil F, Renault A, Quoix E, Souquet PJ, Madroszyck A, Corre R, Pérol D, Morin F, Zalcman G, Soria JC. Customized adjuvant phase II trial in patients with non-small-cell lung cancer: IFCT-0801 TASTE. J Clin Oncol 2014;32:1256-61.

Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, Li W, Hou M, Shi JH, Lee KY, Xu CR, Massey D, Kim M, Shi Y, Geater SL. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol 2014;15:213-22.

Xie KJ, He HE, Sun AJ, Liu XB, Sun LP, Dong XJ. Expression of ERCC1, MSH2 and PARP1 in non-small cell lung cancer and prognostic value in patients treated with platinum-based chemotherapy. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:2591-6.

Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS. Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas. Stem Cells 2008;26:3018-26.

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev Cell 2008;14:818-29.

Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression. Respiration 2003;70:32-5.

Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, Nishiwaki Y, Kodama T, Suga M, Ochiai A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2004;10:1691-7.

Yoo SH, Han J, Kim TJ, Chung DH. Expression of CD99 in pleomorphic carcinomas of the lung. J Korean Med Sci 2005;20:50-5.

Yoshida A, Hsu LC, Davé V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. Enzyme 1992;46:239-44.

Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, Memoli VA, Dmitrovsky E, Robbins DJ. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. Oncogene 2007;26:1046-55.

You M, Varona-Santos J, Singh S, Robbins DJ, Savaraj N, Nguyen DM. Targeting of the Hedgehog signal transduction pathway suppresses survival of malignant pleural mesothelioma cells in vitro. J Thorac Cardiovasc Surg 2014;147:508-16.

Zajac-Kaye M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. Lung Cancer 2001;34 Suppl 2:S43-6.

Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. J Biol Chem 2005;280:8094-100.

Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S, Lu S, Zhang L, Hu C, Hu C, Luo Y, Chen L, Ye M, Huang J, Zhi X, Zhang Y, Xiu Q, Ma J, Zhang L, You C. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol 2011;12:735-42.

Zukin M, Barrios CH, Pereira JR, Ribeiro Rde A, Beato CA, do Nascimento YN, Murad A, Franke FA, Precivale M, Araujo LH, Baldotto CS, Vieira FM, Small IA, Ferreira CG, Lilenbaum RC. Randomized phase III trial of single-agent pemetrexed versus carboplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small-cell lung cancer and Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 2. J Clin Oncol 2013;31:2849-53.

VIII. TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Fréquence des différents types d'anomalies moléculaires dans le CBNPC……. ..17

Figure 2 : Fréquence des différents types d'anomalies moléculaires dans le CBNPC, en fonction du statut tabagique……..17

Figure 3 : Composition moléculaire du cisplatine et du carboplatine……..…….....31

Figure 4 : Mode d'action du cisplatine : formation d'adduits intra –brin ou inter-brin……...31

Figure 5 : Composition moléculaire de la gemcitabine et du pemetrexed……...……32

Figure 6 : Composition moléculaire de la vinorelbine, du docetaxel et du paclitaxel…….....33

Figure 7 : Voie Shh……...…….....49

Figure 8 : Différentes étapes du bourgeonnement et de la ramification bronchique lors du développement, et rôle de la voie Shh……..53

Figure 9 : Hypothèse de résistance tumorale à la chimiothérapie médiée par les CSC...…....65

IX. TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification TNM des cancers bronchiques (9e édition)……..…….....14

Tableau 2 : Regroupement par stades TNM et corrélation au pronostic…….....16

Tableau 3 : Résultats des principaux essais de phase III de maintenance dans le CBNPC….28

Tableau 4 : Différents biomarqueurs étudiés dans la prédiction de la chimiorésistance aux sels de platine.…….....35

Tableau 5 : Principaux gènes cibles de la voie Shh……...……..57

Etienne Giroux Leprieur – Thèse de doctorat – 2014

RESUME

Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) est particulièrement chimiorésistant. Aucun marqueur robuste de chimiorésistance n'a été validé dans ce type de cancer. Nous avons cherché à décrire dans ce travail des marqueurs innovants de résistance à la chimiothérapie à base de platine dans les CBNPC. Après avoir étudié les caractéristiques cliniques et moléculaires habituelles des patients réfractaires à la chimiothérapie, nous avons étudié le rôle de la voie Sonic Hedgehog (Shh) dans le CBNPC et son impact en termes de chimiorésistance. Nous avons ainsi montré que cette voie de signalisation, connue comme liée aux cellules souches cancéreuses, est corrélée au caractère réfractaire à la chimiothérapie. L'expression de Gli2 est associée à la progression tumorale, à la survie sans progression et à la survie globale. Nous avons également démontré une corrélation entre l'activation de la voie Shh et la transition épithélio-mésenchymateuse, qui est liée à l'agressivité tumorale, le pouvoir métastasiant et la chimiorésistance. Nous avons aussi validé le rôle de la voie Shh dans la prolifération tumorale et la chimiorésistance dans un autre modèle de cancer thoracique, le mésothéliome pleural malin. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression de hPAF1C (*human polymerase II-associated factor 1 complex*), facteur suractivé dans les cellules souches cancéreuses et lié à l'activation de la voie Shh. Nous avons montré que l'expression de hPAF1C est associée à un mauvais pronostic et à la prolifération tumorale par interaction avec c-Myc. Ces résultats soulignent le rôle important de la voie Shh dans le CBNPC en termes de chimiorésistance et d'agressivité tumorale.

Mots-clés : cancer ; poumon ; chimiothérapie ; résistance ; Sonic Hedgehog ; Gli

SUMMARY

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is known to be chemoresistant. Few robust markers of chemoresistance have been validated so far in this type of cancer. We have described in this work new innovative markers of resistance to cisplatin-based chemotherapy in NSCLC. After the study of usual clinical and molecular caracteristics of patients who were refractory to chemotherapy, we have then explored the role of the Sonic Hedgehog (Shh) pathway in NSCLC and its impact in term of chemoresistance. We have shown that Shh pathway, closely linked with cancer stem cells, was correlated with the refractory property to chemotherapy. Positive Gli2 immunohistochemistry score was associated with tumor progression et progression-free survival. We have also demonstrated a correlation between Shh activation and epithelial-mesenchymal transition, known to be linked with tumor aggressiveness, metastatic ability and chemoresistance. We have then validated the great role of Shh pathway in tumor proliferation and chemoresistance in another thoracic cancer, known to be chemoresistant, the malignant pleural mesothelioma. At last, the impact of ceancer stem cells on tumor aggressiveness and prognosis has been demonstrated through the study of the expression of hPAF1C (*human polymerase II-associated factor 1 complex*), described as overactivated in cancer stem cells and linked to Shh pathway activation. We have shown that hPAF1C expression was associated with poor prognosis and with tumor proliferation through an interaction with c-Myc. These results underline the major role of Shh pathway and cancer stem cells in SNCLC in term of chemoresistance and tumor aggressiveness.

Keys words: cancer; lung; chemotherapy; resistance; Sonic Hedgehog; Gli