

Université Louis Pasteur de Strasbourg  
Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

## THÈSE

Présentée pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR  
Discipline : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : pharmacologie cellulaire et moléculaire

*par*

Carole SOURBIER

# **Implication des voies signalétiques de survie dans la croissance du carcinome à cellules rénales**

Soutenue publiquement le 8 juin 2007

devant les membres du jury

Docteur	<b>Thierry MASSFELDER</b>	CR INSERM, Strasbourg	Directeur de thèse
Professeur	<b>Alain DOUCET</b>	DR CNRS, Paris	Rapporteur externe
Professeur	<b>Jean-Jacques PATARD</b>	PUPH, Rennes	Rapporteur externe
Professeur	<b>Jean-Pierre BERGERAT</b>	PUPH, Strasbourg	Rapporteur interne
Professeur	<b>Hervé LANG</b>	PUPH, Strasbourg	Membre invité

## TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	1
Table des illustrations.....	3
Avant-propos.....	5
<b>Chapitre 1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>6</b>
<b>1. LE CANCER DU REIN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Les tumeurs rénales .....</b>	<b>7</b>
1.1.1. Classification des tumeurs du rein .....	7
1.1.2. Facteurs favorisants.....	8
<b>1.2. Le carcinome à cellules rénales .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Les taux de survie.....	9
1.2.2. Les anomalies génétiques répertoriées associées au CCR .....	10
1.2.3. Facteurs pronostiques .....	12
<b>1.3. Le carcinome à cellules conventionnelles .....</b>	<b>15</b>
1.3.1. Le VHL .....	16
1.3.2. Le VHL et le CCC.....	20
<b>2. THERAPIES ACTUELLES ET PHENOMENES DE RESISTANCE.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Les différentes approches thérapeutiques.....</b>	<b>21</b>
2.1.1. La thérapie actuelle des CCR : La chirurgie et les cytokines.....	21
2.1.2. La radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie .....	22
<b>2.2. Thérapies en cours de développement.....</b>	<b>23</b>
2.2.1. Immunothérapie spécifique .....	23
2.2.2. Thérapies anti-angiogéniques.....	24
2.2.3. Inhibition de mTOR (« <i>mammalian Target Of Rapamycin</i> ») .....	26
2.2.5. hsp90 .....	27
2.2.6. Perspectives .....	27
<b>3. VOIES DE SURVIE.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Les voies de prolifération et de survie .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. La voie PI3K/Akt.....</b>	<b>31</b>
3.2.1. Description de la voie.....	31
3.2.2. Cibles en aval de l'Akt .....	32
3.2.3. Régulation de la voie.....	32
3.2.4. Implication de la voie PI3K/Akt dans les cancers.....	34
<b>3.3. La voie NFκB .....</b>	<b>35</b>
3.3.1. Description de la voie.....	35
3.3.2. Régulation de la voie.....	37
3.3.3. Les cibles transcriptionnelles de NFκB.....	37
3.3.4. Implication de NFκB dans les cancers .....	39
<b>4. OBJECTIFS.....</b>	<b>40</b>

<b>Chapitre 2. METHODES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>41</b>
1. MODELES D'ETUDE.....	42
1.1. Les lignées cellulaires humaines.....	42
1.1. Les biopsies de carcinomes à cellules rénales humains.....	42
1.2. Les souris « <i>nude</i> ».....	43
1.3. La puce à tissus humain (Tissu Microarray ou TMA).....	45
2. LES INHIBITEURS.....	48
2.1. Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt.....	48
2.2. Inhibiteurs de la voie NFκB.....	49
3. ETUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE.....	51
3.1. <i>in vitro</i> par western blot.....	51
3.2. <i>in vivo</i> par immunohistochimie (IHC).....	52
4. LA CROISSANCE CELLULAIRE.....	53
4.1. <i>in vitro</i> .....	53
4.2. <i>in vivo</i> .....	53
5. LA MORT CELLULAIRE INDUITE.....	54
5.1. <i>in vitro</i> .....	54
5.2. <i>in vivo</i> .....	55
6. ETUDE DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE NFκB.....	56
7. STATISTIQUES.....	57
<b>Chapitre 3. IDENTIFICATION DE SURVIE DANS LE CCC.....</b>	<b>58</b>
1. SCREENING DE VOIES DE SURVIE.....	59
2. ETUDE DE LA VOIE PI3K/Akt.....	60
2.1. Publication n°1.....	60
2.2. Résumé.....	61
2.3. Discussion.....	62
3. ETUDE DE LA VOIE NFκB.....	65
3.1. Publication n°2.....	65
3.2. Résumé.....	66
3.3. Discussion.....	67
<b>Chapitre 4. IDENTIFICATION D'UNE BOUCLE DE REGULATION ET DES CIBLES DE NFκB.....</b>	<b>71</b>
1. RESUME.....	72
2. INTRODUCTION.....	74
3. MATERIELS ET METHODES.....	76
4. RESULTATS.....	82
5. DISCUSSION.....	84
<b>Chapitre 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>95</b>
<b>Chapitre 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>100</b>
<b>Chapitre 7. ANNEXES.....</b>	<b>110</b>

**Chapitre 1.**

**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. LE CANCER DU REIN

Le cancer du rein est le troisième cancer de l'appareil urogénital, après ceux de la prostate et de la vessie. Il représente 3% des cancers de l'adulte et est la sixième cause de décès par cancer dans les pays industrialisés. Il est caractérisé par une évolution lente et souvent asymptomatique.

### 1.1. Les tumeurs rénales

#### 1.1.1. Classification des tumeurs du rein

Il existe plusieurs types de tumeurs rénales, distinguables par leur origine histologique. Elles sont classifiées ci-dessous.

- Les tumeurs ayant une origine épithéliale :

Les tumeurs épithéliales bénignes : adénome cortical, oncocytome, tumeur de l'appareil juxta-glomérulaire, adénome métanéphrique

Les tumeurs épithéliales malignes ou carcinomes à cellules rénales (CCR): types conventionnel, chromophile, papillaire, du canal collecteur ou de Bellini, non classées

Les tumeurs épithéliales bénignes ou malignes d'origine endocrine : tumeur carcinoïde ou carcinome

- Les tumeurs ayant une origine mésenchymateuse :

Les tumeurs mésenchymateuses bénignes : angiomyolipome, léiomyome, lipome

Les tumeurs mésenchymateuses malignes : sarcomes, lymphomes

- Les tumeurs blastémateuses :

Le néphrome mésoblastique

Le néphroblastome de l'adulte

Le sarcome à cellules claires

- Les métastases



### 1.1.2. Facteurs favorisants

Un certain nombre de facteurs favorisant le développement de tumeurs rénales a pu être mis en évidence. De manière non exhaustive, en voici quelques uns.

#### **Les facteurs environnementaux**

Le lien de causalité entre la consommation de tabac et le cancer du rein et en particulier, le CCR, est aujourd'hui bien établi (Lipworth et al., 2006; Longuemaux S et al., 2003). Le tabac serait à l'origine d'environ 20 à 30% des CCR chez l'homme et 10 à 20% des CCR chez la femme (Lipworth et al., 2006). L'obésité et l'hypertension artérielle sont également fréquemment citées par des études épidémiologiques. Il faut noter que 50% des cancers du rein sont attribuables à ces trois facteurs (Lipworth et al., 2006; Longuemaux S et al., 2003). Une exposition professionnelle à l'amiante ou au cadmium, ou encore une alimentation riche en graisse avec de faibles apports en vitamine E et en magnésium peuvent être des facteurs favorisant du CCR (Longuemaux S et al., 2003). Cependant, à ce jour, aucune explication scientifique expliquant la relation entre ces facteurs environnementaux et le CCR n'a été établie.

#### **Les maladies héréditaires**

La maladie de von Hippel-Lindau (qui sera détaillée dans le paragraphe 1.2.2) est une maladie à transmission autosomique dominante, caractérisée par une inactivation du gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL). Elle se présente chez le sujet jeune principalement sous forme de tumeurs multiples, souvent bilatérales du rein. D'autres maladies héréditaires telles que la sclérose tubéreuse de Bourneville ou le syndrome de Birt-Hogg-Dube (BHD) peuvent également présenter des cancers du rein dans leur tableau clinique.

## **1.2. Le carcinome à cellules rénales**

Parmi les différents types de tumeurs rénales, les tumeurs épithéliales sont les plus fréquentes. Parmi elles, nous retrouvons 90% de CCR. Au niveau mondial, le CCR représente 200.000 nouveaux cas et 100.000 décès par an et est ainsi responsable de 2 à 3% des décès liés au cancer. A titre indicatif, en 2000 en France, 7000 nouveaux cas et 3500 décès ont été recensés. Le CCR est plus fréquent chez l'homme que chez la femme (ratio de 2 pour 1), avec un pic d'incidence entre 50 et 70 ans. Les taux d'incidence standardisés sont de 12,2 chez l'homme et de 5,7 chez la femme avec des taux de mortalité standardisés respectivement de



4,6 et 1,7 (Drucker, 2005). En France, les taux d'incidences les plus élevés sont retrouvés en Alsace, où le taux d'incidence standardisé est doublé par rapport aux taux national et européen, alors que les taux les plus faibles sont retrouvés en Isère, dans le Tarn et l'Hérault. L'incidence est en progression constante de 2 à 4% par an depuis 1975, mais dans le même temps, la mortalité n'a que légèrement augmenté ; le taux de mortalité standardisé est même en légère diminution chez les femmes. Cependant, le taux de mortalité reste toujours d'environ 30%.

Le CCR se subdivise en cinq types principaux :

- le CCR de type conventionnel (comprenant les carcinomes à cellules claires - CCC - et éosinophiles) dans 75 à 80% des cas,
- les CCR de type papillaire ou chromophile (10 à 15%),
- les CCR de type chromophobe (5%),
- les CCR du canal collecteur ou du canal de Bellini dans 1% des cas,
- les CCR non classés (1%).

Cette classification proposée et acceptée à Heidelberg en 1997 au « *Heidelberg Workshop* » est basée sur nos connaissances actuelles en génétique et est corrélée avec nos connaissances sur l'évolution de ces tumeurs (Kovacs et al., 1997).

Restent quelques types histologiques de découverte plus récente venant compléter cette classification :

- le CCR multiloculaire à cellules claires
- le carcinome rénal mucineux tubuleux à cellules fusiformes
- le carcinome rénal associé aux translocations Xp11.2/TFE (gène de fusion).

A partir de ces différents types de carcinome rénal peut se développer une différenciation sarcomatoïde, c'est à dire ressemblant morphologiquement à du sarcome. Cette différenciation de mauvais pronostic se développe cependant plus fréquemment dans le type conventionnel.

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés exclusivement au CCR et plus particulièrement à sa forme la plus fréquente, le CCC.

### 1.2.1. Les taux de survie

Le taux de survie à 5 ans est de 70% en cas de tumeurs purement intra-rénales (tumeurs localisées) mais chute à 5% en cas d'évolution métastatique (poumon et foie essentiellement), ce qui survient dans la majorité des cas (>50%) en raison du caractère latent et asymptomatique du CCC. Une des caractéristiques fondamentales de ces tumeurs est leur



résistance à toutes les thérapies actuellement disponibles incluant la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Ainsi, dans le cas des cancers du rein métastatiques, la chimiothérapie et les traitements destinés à stimuler les défenses immunitaires (comme les interleukines et les interférons) donnent des résultats décevants avec des réponses ne dépassant pas 15 %, et induisent des effets secondaires importants (Drucker, 2005). Le chapitre 2 de cette introduction traitera en détail de cet aspect.

### 1.2.2. Les anomalies génétiques répertoriées associées au CCR

#### **Les formes familiales de CCR** (Kopper & Timar, 2006; Linehan, 2006)

Plusieurs maladies héréditaires ou familiales sont associées avec le CCR dont la maladie de VHL, le CCC non-VHL héréditaire, le carcinome rénal papillaire héréditaire et le syndrome familial de Birt-Hogg-Dubé (BHD) associé à un oncocytome. Les formes héréditaires représentent environ 1 à 2% des cancers du rein. Certains gènes de prédisposition, tels que le VHL ou le BHD, ont été identifiés. Ils sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-dessous. Un dépistage génétique est indispensable dans le cas où des personnes de la famille du patient sont atteintes de l'une de ces maladies.

Type de CCR	Maladie	Gène
<b>CCC</b> Bilatéral, multiple Unilatéral, localisé	von Hippel-Lindau Translocations chromosome 3 Forme familiale de CCC	VHL (3p25-26) n.d., VHL ? n.d.
<b>CCC</b>	Paragangliome héréditaire Pheochromocytome	SDHB (1p36)
<b>CCC, angiomyolipome</b>	Sclérose tubéreuse de Bourneville	TSC1 (9q34) TSC2 (16p13)
<b>CCR papillaire</b> Type 1, bilatéral, multiple Type 2, unilatéral, localisé	CCR papillaire héréditaire CCR leiomyomatose héréditaire	MET (7q31) <i>Fumarate Hydratase</i> (1q42-43)
<b>CCR papillaire (néphroblastome ou tumeurs de Wilms)</b>	Hyperparathyroïdie avec tumeur ostéofibreuse des maxillaires	HRPT (1q25-32)
<b>CCR papillaire</b>	Cancer familial papillaire thyroïde	? (1q21)
<b>CCR chromophile et clair (ou autres types), hybrides, oncocytome</b>	Syndrome de BHD	BHD (17p11.2)

**Tableau 1. Gènes associés aux formes familiales de CCR** (Linehan, 2006).

n.d. : non déterminé ; TSC : sclérose tubéreuse ; SDHB : *succinate dehydrogenase B*



### Les anomalies chromosomiques associées au CCR

Pour les formes sporadiques de CCR, les recherches actuelles s'orientent vers l'établissement d'une carte moléculaire corrélée à l'histoire naturelle des cancers grâce à la protéomique et aux puces à ADN ou à tissus. L'objectif de ces recherches est de mettre au jour de nouvelles cibles thérapeutiques, ceci grâce à l'identification de dérégulations au niveau de l'expression d'un gène ou de ses fonctions. La recherche d'altérations génétiques a également pour but une caractérisation génotypique des tumeurs sporadiques, permettant ainsi de compléter la classification pathologique et cytogénétique. Ainsi, en phase initiale, des mutations somatiques du gène VHL ou une hyperméthylation de ce gène entraînant son inactivation, sont retrouvées dans 40 à 80% des CCC (Zbar, 1995). En phase tardive, des mutations de p53 (gène pro-apoptotique) ont été trouvées dans les CCC et les CCR à cellules chromophobes (Gurova et al., 2004) et des surexpressions de l'oncogène c-ErB-1 et 2 codant pour le récepteur à l'EGF « *Epidermal Growth Factor* » ont été retrouvées respectivement dans les CCC et les carcinomes des tubes collecteurs de Bellini (Hofmockel et al., 1997). Les différentes mutations connues à ce jour sont répertoriées dans le Tableau 2, représentant une classification pathologique et cytogénétique des CCR.

<u>Classification pathologique</u>	Cellule d'origine	Cytogénétique Phase initiale	Cytogénétique Phase tardive	Incidence %
CCR de type conventionnel (cellules claires et/ou acidophiles)	Tubule Proximal	3p LOH : 3p25-26 (VHL) (3p13-14, 3p21) Mutation/hyperMe gène VHL	+5q, -14q, -8p, -9p, (-11p, -13q, -17p) Mutation p53 ↗ Expression oncogène C-ErB-1 (EGFR)	75-80
Tubulo-papillaire	Tubule Proximal	+7, +17, -Y mutation proto-oncogène c-met	+12, +16, +20 -9p, -11q, -14q, -17p, -21q, -6p	10
A cellules chromophobes	Intercalaires B (canal collecteur cortical)	-1	-1p, -2p, -3p, -6p, -13q, -17p, -21q, -Y Mutation p53	5
De Bellini (du tube collecteur)	Canal collecteur dans la médullaire	-18, -Y	-1q, -6p, -8p, -11, -13q, -21q ↗ Expression oncogène C-ErB-2 (EGFR)	0,5-2,5
Carcinome à différenciation sarcomatoïde	Tubules contournés ou collecteurs	n.d.	n.d.	1-6
Oncocytome (tumeur bénigne)	Intercalaires A (canal collecteur cortical)	-1, -Y, réarrangement 11q, altérations ADN mitochondrial Nombreuses anomalies génétiques	-	3-5

**Tableau 2. Classification pathologique et cytogénétique des CCR.** Résumé des différentes anomalies génétiques associées au CCR connues à ce jour. (Collins et al., 2006; Pantuck et al., 2001c). hyperMe : hyperméthylation. LOH : *loss of heterozygosity*.



### 1.2.3. Facteurs pronostiques

Il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueur de diagnostic précoce du CCR, seuls quelques signes cliniques permettent de suspecter l'existence d'un cancer du rein. Les facteurs pronostiques du CCR sont représentés essentiellement par des facteurs histopathologiques (stade pTNM, grade de Fuhrman...) établis à partir de la pièce opératoire. Certains facteurs cliniques (état général du patient, présence de métastases, néphrectomie...) ont également une valeur pronostique mais surtout lors de la sélection des patients destinés aux essais cliniques. Aucun facteur biomoléculaire n'ayant encore été validé (Cohen & Zhou, 2005), le stade tumoral et le grade de Fuhrman restent actuellement les plus utilisés.

#### **Les facteurs cliniques**

- La classification pTNM

L'examen anatomopathologique permettra d'établir un stade pTNM du carcinome à cellules rénales (p pour pathologique). Ce stade pTNM a été révisé en 2002 (Sagalowsky, 2002). Le T correspond à la tumeur, en prenant en compte sa taille, l'envahissement éventuel de la graisse péri-rénale, hilare ou du sinus, une extension directe à la surrénale, un envahissement de la veine rénale ou cave, ou encore un envahissement du fascia de Gérota. Pour les ganglions (N), c'est le nombre d'adénopathies métastatiques régionales qui importe (une ou plusieurs). Le M représente l'existence de métastases à distance. Les différents stades sont présentés dans le Tableau 3.

- Le grade de Fuhrman

Le grade nucléaire est le plus important facteur pronostique dans le CCR avec le stade (Novara et al., 2007; Srigley et al., 1997). Le grade nucléaire le plus utilisé est le grade nucléaire de Fuhrman (grade 1 à 4) basé sur les atypies nucléaires prenant en compte la taille du noyau, son contour, l'existence et la taille du nucléole, ou encore l'existence de cellules monstrueuses. Il est le plus communément utilisé (Novara et al., 2007) et ce malgré une reproductibilité inter- et intra-observateur faible et une certaine hétérogénéité du grade au sein de la tumeur, surtout lorsque celle-ci est volumineuse. En effet, le grade retenu correspond au grade le plus élevé même si celui-ci n'est présent que de manière focalisée (Fuhrman S, 1982). Pour de nombreux auteurs, il serait judicieux de simplifier ce système de « *grading* » mais il n'existe cependant pas de réel consensus pour le regroupement de 2 grades bien que plusieurs auteurs tendent à regrouper les grades 1 et 2 (Green et al., 1989; Lang et al., 2005; Medeiros et al., 1997)



<b>T, Tumeurs primitives</b>	
<b>T0/pT0</b>	Absence de tumeur primitive identifiable
<b>T1/pT1</b>	Tumeur inférieure ou égale à 7 cm de grand axe, limitée au rein <b>T1a/pT1a</b> : tumeur ≤ 4cm <b>T1b/pT1b</b> : tumeur > 4cm
<b>T2/pT2</b>	Tumeur supérieure à 7 cm de grand axe, limitée au rein
<b>T3/pT3</b>	Tumeur étendue à la veine rénale, ou à la surrenale, ou à la graisse péri rénale mais sans dépassement du fascia de Gérota <b>T3a/pT3a</b> : tumeur étendue à la surrenale ou à la graisse péri-rénale, y compris la graisse du sinus mais sans dépassement du fascia de Gérota <b>T3b/pT3b</b> : tumeur étendue macroscopiquement à la veine rénale (ou ses branches musculaires) ou à la veine cave susdiaphragmatique <b>T3c/pT3c</b> : tumeur étendue macroscopiquement à la veine cave susdiaphragmatique
<b>T4/pT4</b>	Tumeur envahissant le fascia de Gérota ou les organes de voisinage
<b>N, Ganglions régionaux (hilaires, para aortiques abdominaux et para caves)</b>	
<b>NX</b>	Envahissement ganglionnaire non évalué
<b>N0</b>	Absence de métastase ganglionnaire régionale
<b>N1</b>	Métastase ganglionnaire régionale unique
<b>N2</b>	Plus d'une métastase ganglionnaire régionale
<b>M, Métastase à distance</b>	
<b>MX</b>	Métastase non évaluée
<b>M0</b>	Absence de métastase à distance
<b>M1</b>	Métastase à distance

**Tableau 3. Classification TNM et pTNM des CCR de l'International union against cancer (Sagalowsky, 2002).**



- L'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)

Il mesure le « performance status » du patient, c'est-à-dire son activité physique. Quatre grades ont été décrits : 0 pour une activité normale, 1 pour un patient restreint dans son activité physique qui peut être considérée comme difficile, 2 pour une personne étant alitée moins de 50% du temps, et 3 pour une personne complètement alitée.

- L'angiogenèse

Le CCR est un des cancers les plus vascularisés chez l'homme. Dans différentes études cliniques, la fréquence de l'angiogenèse variait de 22% à 36,5%, tous stades confondus. Cependant, même si l'angiogenèse apparaît comme étant liée à la progression métastatique ainsi qu'à la survie, le caractère indépendant de ce facteur pronostique n'est pas reconnu dans toutes ces études (Delahunt et al., 1997; MacLennan & Bostwick, 1995). De plus, dans le CCC, une surexpression de la cavéoline associée avec une grande densité vasculaire pourrait être un facteur de mauvais pronostic (Joo et al., 2004).

### **Les facteurs histologiques**

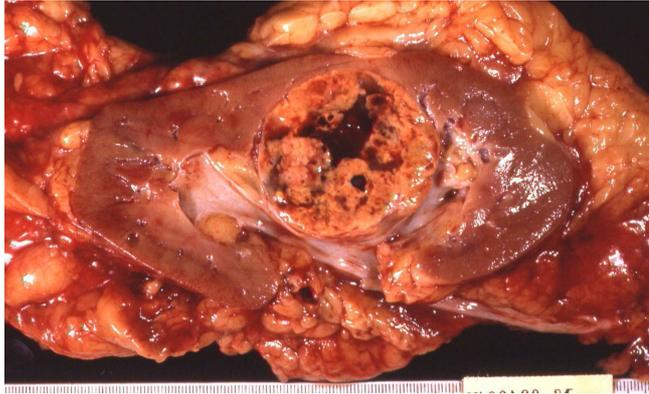
De façon simplifiée, les CCR ont une agressivité décroissante selon les types cellulaires suivant : cellules du canal collecteur, cellules conventionnelles, cellules papillaires et enfin cellules chromophobes. Il faut cependant souligner le caractère péjoratif d'une éventuelle composante sarcomatoïde associée (Cheville et al., 2003; Cheville et al., 2004; Eble, 1998; Gelb, 1997). D'après une étude sur 2385 patients, Cheville et al. montrent que la présence d'une nécrose tumorale en histologie est un facteur de plus mauvais pronostic pour les carcinomes rénaux de types conventionnel et chromophobe, mais pas pour les types papillaires (Cheville et al., 2004; Lee et al., 2006).

### **Les facteurs biomoléculaires**

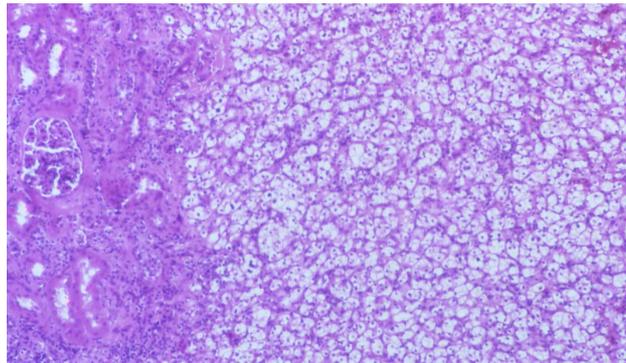
Les différents marqueurs biomoléculaires cités ci-dessous sont peu utilisés ou encore en cours d'évaluation. Actuellement, aucun marqueur biomoléculaire n'est validé.

- La ploïdie, les marqueurs de prolifération

Les facteurs pronostiques péjoratifs sont classiquement une aneuploïdie et une grande fraction de cellules en phase S. Ces paramètres semblent cependant peu informatifs dans le CCR. L'index de prolifération obtenu grâce au marquage avec le Ki67 est prometteur puisque l'intensité de marquage paraît être corrélée au grade tumoral et à la survie du patient (Chautard et al., 2004; Kopper & Timar, 2006; Yildiz et al., 2004).



**Figure 1.** Aspect macroscopique d'un carcinome à cellules rénales : la tumeur est classiquement de couleur jaune-orangée et présente des remaniements hémorragiques.



**Figure 2.** Aspect histologique d'un carcinome à cellules rénales : le type le plus fréquemment observé est le type conventionnel constitué comme ici de cellules au cytoplasme clair pouvant être accompagnées de cellules acidophiles, ces cellules s'agencent ici sous forme d'acini infiltrant le cortex rénal (HE, x 20).

- Les marqueurs de l'apoptose

Les CCR sont caractérisés dans 70% des cas par une surexpression de p53. Cela est généralement de mauvais pronostic (Zigeuner et al., 2004). Bcl2 est également fréquemment exprimé dans les CCR (70%) et lorsqu'il est corrélé avec un faible index prolifératif (Ki67) et une faible expression de p53, il serait d'un pronostic favorable.

- Les marqueurs de l'adhésion cellulaire

Deux molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire, la cadhérine 6 et MUC1/EMA, ont été montrées comme étant des facteurs de mauvais pronostic. (Langner et al., 2004; Shimazui et al., 2004).

- Les facteurs de croissance : l'EGF et son récepteur EGFR

La valeur pronostique de l'expression de EGF et EGFR dans le CCR est variable selon les études (Hofmockel et al., 1997; Stumm et al., 1996).

- L'angiogénèse

VEGF « *Vascular Endothelial Growth Factor* » est présent de façon constitutive dans le sérum des patients atteints de CCR, cependant son dosage ne présente pas de significativité pronostique. L'expression de VEGF peut également être visualisée sur les tissus par immunohistochimie et il semblerait que l'intensité de marquage ait une corrélation avec le grade et le stade de la tumeur (Jacobsen et al., 2004). Il est important de souligner ici que la plupart des études, mais pas toutes, montrent que le CCC est une tumeur très vascularisée (Mancuso & Sternberg, 2005). En effet, il a été proposé que dans les tumeurs de mauvais pronostiques, une diminution de la densité microvasculaire est associée avec le développement de larges vaisseaux, ce qui faciliterait la dissémination métastatique (Delahunt et al., 1997; MacLennan & Bostwick, 1995).

### 1.3. Le carcinome à cellules conventionnelles

Le carcinome à cellules conventionnelles (CCC), illustré Figures 1 et 2, représente 75 à 80% des CCR. Cette tumeur épithéliale trouve son origine au niveau des structures tubulaires proximales matures. Il s'agit de la forme la plus fréquente des tumeurs rénales, représentant environ 70 à 75% de l'ensemble des cancers du rein de l'adulte (Cohen et al 2005). Il est responsable de 2% des décès liés au cancer (Motzer et al., 1996; Pantuck et al., 2001b; Vogelzang & Stadler, 1998).

Il existe une forme familiale majeure de CCC, la maladie de von Hippel-Lindau (VHL), caractérisée par une mutation bi-allélique d'un gène suppresseur de tumeur, le gène VHL. Une



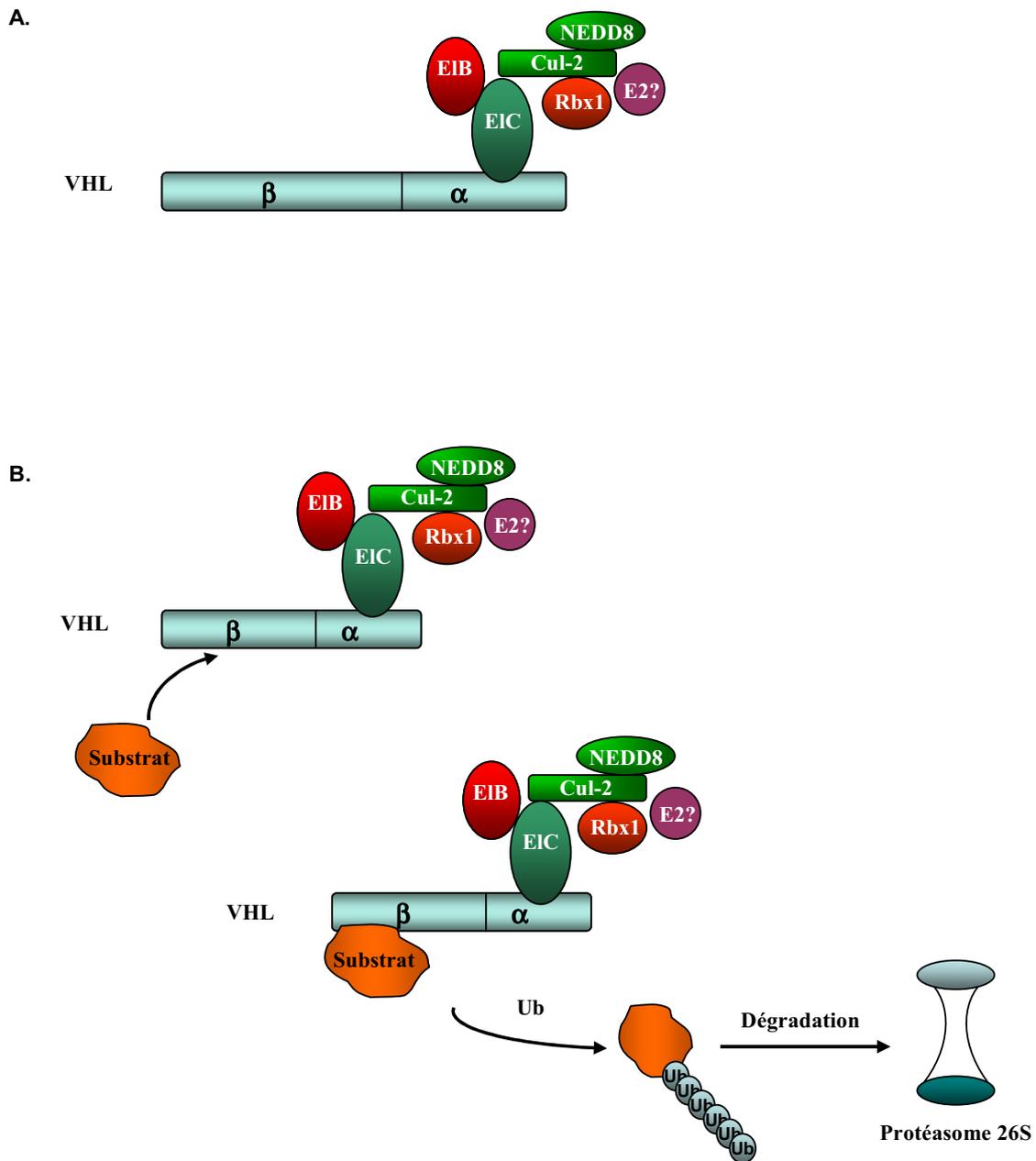
inactivation de ce gène est également retrouvée dans 40 à 80% des cas sporadiques suivant les études et les patients inclus (ethnie, stade tumoral ...) (Brauch et al., 2000; Gnarr et al., 1994; Herman et al., 1994). L'importance du VHL et son implication dans la croissance du CCC seront détaillées dans le paragraphe suivant.

### 1.3.1. Le VHL

Le gène VHL, découvert en 1988 et isolé en 1993 (Maher et al., 1991; Richards et al., 1993) est situé sur le bras court du chromosome 3 en position 3p25-26. Il est constitué de trois exons qui codent pour deux ARN messager (ARNm), qui seront traduits en 3 protéines. Les altérations germinales du gène VHL sont à l'origine de la maladie de VHL, les altérations somatiques étant responsables de la majorité des CCC sporadiques et des hémangioblastomes sporadiques (Ohh, 2006). Le premier ARNm de 4,7kb (exon 1 à 3), est exprimé de manière ubiquitaire chez le fœtus et l'adulte (Kaelin, 2003). Il est traduit en deux protéines par épissage alternatif. La première des isoformes à avoir été identifiée est constituée de 213 acides aminés, sa masse moléculaire est d'environ 28-30kDa. La seconde protéine d'environ 19kDa, est constituée de 160 acides aminés, sa traduction ne commençant qu'au niveau d'une méthionine présente dans le cadre de lecture en position 54. Cette seconde isoforme semblerait avoir une plus grande affinité pour le noyau que la première (Corless et al., 1997; Kaelin, 2003). Le second ARNm (exons 1 et 3) est moins transcrit que le premier et la protéine traduite ne semble pas jouer un rôle de suppresseur de tumeur (Ohh, 2006). Les protéines isoformes de VHL sont localisées principalement au niveau du cytoplasme mais peuvent également se trouver dans le noyau, les mitochondries ou encore au niveau du réticulum endoplasmique ou des membranes plasmiques. Cependant, à l'heure actuelle, il est encore très difficile de faire la distinction entre ces isoformes, ces dernières se comportant de manière similaire dans de nombreux travaux. Donc, pour la suite de ce manuscrit, lorsque je parlerai de la protéine VHL, ce terme concernera les deux isoformes qui jouent un rôle de suppresseur de tumeur.

### **La maladie de von Hippel-Lindau**

Les manifestations majeures de la maladie de VHL sont un développement d'hémangioblastomes du système nerveux central et de la rétine, de kystes et/ou de tumeurs des reins (en particulier, des CCC) et du pancréas (tumeurs neuro-endocrines), de phéochromocytomes et de tumeurs du sac endolymphatique (Woodward & Maher, 2006). Les



**Figure 3. Le complexe d'ubiquitine ligase du VHL.**

**A.** Le VHL se lie à l'EIC (élongine C) au niveau de son domaine  $\alpha$ . EIC sert de protéine adaptatrice avec la culline 2 (Cul-2) et l'EIB (élongine B), Rbx1 se fixant sur la Cul-2. Ceci forme le complexe d'ubiquitine ligase du VHL. Il n'est pas encore défini si l'activité ubiquitine ligase est due au VHL lui-même ou à une protéine ubiquitine ligase E2.

**B.** Les substrats du VHL tels que HIF $\alpha$  ou PKC $\zeta$  se lient au niveau du domaine  $\beta$ . Ils sont alors polyubiquitinilés (Ub) puis dégradés par le protéasome 26S.

hémangioblastomes et les CCC sont les principales causes de décès de cette maladie. Le CCC est alors souvent multifocal et bilatéral.

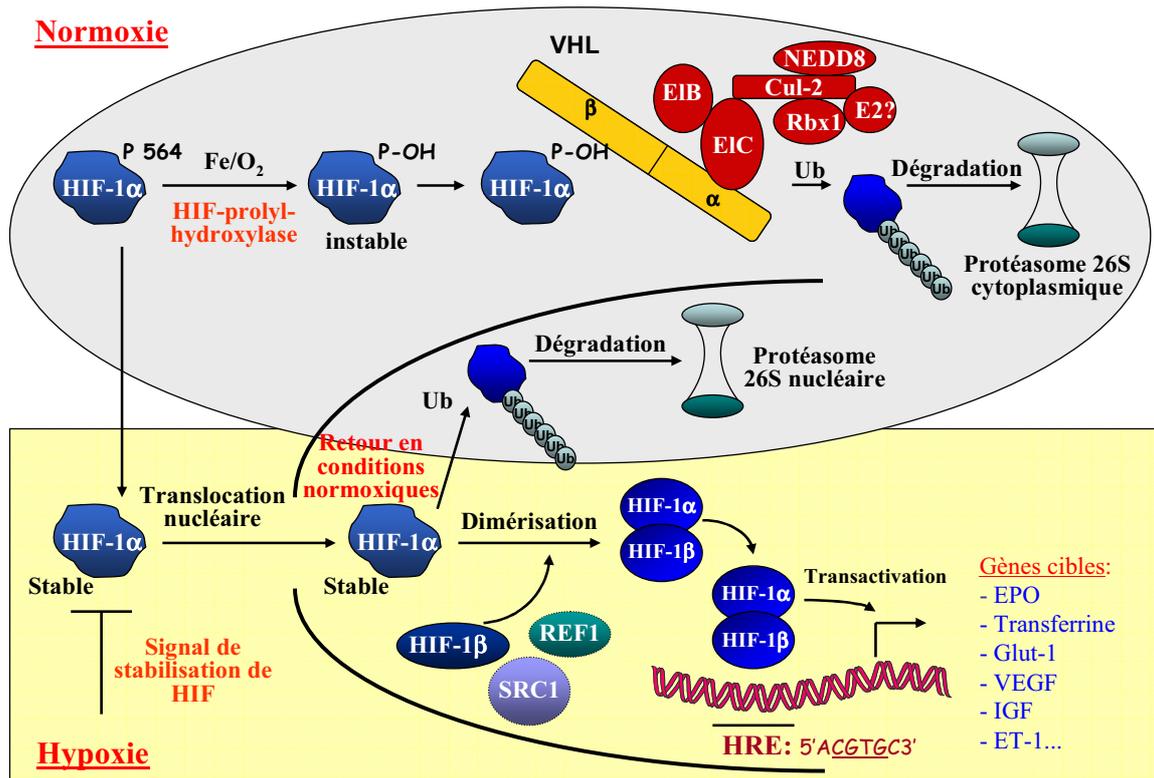
La maladie de VHL a une incidence d'environ 1/36.000 individus. En France, elle affecte probablement près de 1500 personnes (Latif et al., 1993; Richard et al., 2000). Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique dominante due à un seul gène : le gène VHL. Tous les individus qui vont développer la maladie présentent une mutation germinale d'un des deux allèles VHL (Kaelin, 2003). Dans 13% des cas, il y a une apparition *de novo* de la maladie, liée à une mosaïque parentale de mutations au niveau du VHL. Ceci résulte probablement de mutations au cours du développement. En effet, plus de 150 mutations différentes liées à la maladie de VHL ont été répertoriées sur l'ensemble des 3 exons du gène VHL, les plus fréquentes touchant l'extrémité 3' de l'exon 1 et l'extrémité 5' de l'exon 3. Le développement de la maladie est lié à la perte ou à l'inactivation de l'allèle VHL sauvage restant.

Il faut noter que les souris VHL(-/-) meurent dès le début de l'embryogénèse à cause d'une insuffisance placentaire (Gnarra et al., 1997). Les souris hétérozygote VHL(+/-) sont viables mais développent de multiples tumeurs vascularisées dans le foie et présentent une surexpression des cibles transcriptionnelles du facteur induit par l'hypoxie, HIF (« *Hypoxia Induced Factor* ») (Haase et al., 2001). Le VHL fait en effet partie d'un système de régulation dépendant de l'état hypoxique ou normoxique de la cellule.

### **Le système VHL/HIF**

- Le complexe d'ubiquitine ligase

Le VHL est impliqué dans un complexe d'ubiquitine ligase. Ce complexe multi-enzymatique constitué du VHL, des élongines B et C, de la culline 2 et de Rbx1, est impliqué dans la dégradation, après ubiquitination, de nombreux substrats protéiques. En effet, le VHL possède deux domaines de liaison : le domaine  $\alpha$ , situé à l'extrémité 5' de l'exon 3, qui permet la liaison du VHL à l'élongine C et le domaine  $\beta$  qui permet la liaison de la protéine VHL à ses substrats dont HIF (Haase, 2006; Ohh, 2006). Le VHL se lie à l'élongine C, qui est une protéine adaptatrice permettant la liaison du VHL avec l'élongine B et la culline 2, Rbx1 se liant au niveau de la culline 2. Une fois ce complexe formé (similaire au complexe SCF chez la levure), les substrats du VHL peuvent se lier au niveau de son domaine  $\beta$ , où ils seront polyubiquitinylés puis dégradés par le protéasome 26S (Figure 3).



**Figure 4. Le système VHL/HIF.** En condition normoxique, une fois hydroxylé, HIF $\alpha$  peut se lier au domaine  $\beta$  du VHL. Il sera ensuite polyubiquitinilé et dégradé par le protéasome 26S. En condition hypoxique, ou en absence d'un VHL fonctionnel, HIF $\alpha$  est stabilisé, se dimérise avec HIF $\beta$  et peut ainsi jouer son rôle de facteur de transcription. Il y a alors une transcription des gènes codant pour le VEGF, la transferrine ou l'IGF.

- Le facteur induit par l'hypoxie (HIF)

Il existe plusieurs isoformes de HIF : HIF $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , HIF3 $\alpha$ ) et HIF $\beta$  (HIF1 $\beta$  ou ARNT « *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* »). De nombreux gènes induits par l'hypoxie, sont régulés par HIF au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel. Parmi eux, nous pouvons trouver des facteurs impliqués dans l'angiogénèse comme VEGF et PDGF $\beta$  (« *Platelet-Derived Growth Factor  $\beta$*  »), la fibronectine, impliquée dans la formation de la matrice extracellulaire et des facteurs impliqués dans la prolifération et l'apoptose comme par exemple le TGF $\beta$  (« *Transforming Growth Factor  $\beta$*  »). Il est intéressant de noter ici que le TGF $\beta$ , avec le TGF $\alpha$  et la PTHrP (« *ParaThyroïde Hormone-related Protein* ») constituent actuellement les seuls exemples de gènes régulés par le système VHL/HIF spécifiquement au niveau post-transcriptionnel sur la stabilité des ARNm respectifs. Différentes cibles régulées par HIF sont répertoriées dans le Tableau 4.

- Mécanisme moléculaire

En présence d'oxygène (conditions normoxiques), HIF $\alpha$  est hydroxylé sur deux résidus proline (P402 et P564) par un membre de la famille des « *Egg Laying Defective Nine* » ainsi que sur un résidu asparagine (N803) par FIH1 (« *factor inhibiting HIF1* ») (Ohh, 2006). FIH1 peut se lier au complexe formé par le VHL et ainsi faciliter la dégradation de HIF. HIF $\alpha$  peut alors se lier au domaine  $\beta$  du VHL et sera ensuite polyubiquitinylé puis dégradé par le protéasome (Kaelin, 2003; Ke & Costa, 2006). En conditions hypoxiques, l'hydroxylation de HIF $\alpha$  ne peut se faire, HIF $\alpha$  ne peut donc plus se lier au VHL et par conséquent, ne peut plus être dégradé. Il peut alors jouer son rôle de facteur de transcription (Figure 4). HIF $\alpha$  est à ce jour la principale cible de VHL impliquée dans la tumorigénèse du CCC (Ke & Costa, 2006). En absence ou inactivation de VHL, le complexe multi-enzymatique ne fonctionne plus et les substrats de VHL ne sont donc plus dégradés par le protéasome. HIF $\alpha$  est alors activé et ses cibles transcrites (Tableau 4 et Figure 4).



Prolifération Cellulaire et apoptose	Facteur de croissance Insuline-like -2 (IGF-2) TGF $\alpha$ et $\beta$ p21 Bnip3 PTHrP
Métabolisme du glucose	Kinase Phosphoglycérate 1 (PGK1) Transporteurs du glucose 1 et 3 (Glut 1 et 3) Lactate déshydrogénase A Aldolase A Phosphofructokinase L
Régulation du pH	Anhydrase carbonique IX
Erythropoïèse	Erythropoïétine (EPO)
Métabolisme du fer	Transferrine et son récepteur
Métabolisme de la matrice extracellulaire	Metalloprotéinase 2 de la matrice Fibronectine
Inflammation	Interleukine 8 Récepteur aux chemokines CXCR4 Facteur dérivé du stroma 1 $\alpha$
Facteurs de transcription	Oct4/Pou5F1
Angiogénèse	VEGF Récepteurs 1 et 2 à VEGF PDGF $\beta$ Angiopoïétine 2 Tie-2 Endothéline 1 Inhibiteur de l'activateur des plasminogènes-1 Monoxyde d'azote synthase 2 Adrénomédulline

**Tableau 4.** Liste de gènes régulés au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel par HIF en conditions hypoxiques ou en absence de VHL.



### 1.3.2. Le VHL et le CCC

Dans la grande majorité des cas de CCC, nous retrouvons une inactivation du VHL précocement lors de la tumorigenèse, et ce, aussi bien pour les CCC héréditaires que pour les CCC sporadiques. Cette inactivation induit par conséquent une accumulation de HIF $\alpha$  et de ses cibles, telles que VEGF, PDGF ou TGF $\alpha$ . Ces facteurs angiogéniques et/ou de croissance sont alors surexprimés, ainsi que leurs récepteurs. Le VHL peut alors être considéré comme un gène suppresseur de tumeur précoce, bien que d'autres altérations génétiques soient nécessaires pour que les kystes rénaux induits par la délétion du VHL, évoluent en CCC. Il faut noter que la réintroduction de VHL dans des cellules VHL(-/-), suffit à prévenir cette évolution en CCC *in vivo* chez la souris nude implantées par des tumeurs humaines de CCC (Iliopoulos et al., 1995). Quant au rôle de HIF $\alpha$  dans les tumeurs VHL(-/-), bien que HIF1 $\alpha$  puisse affecter la croissance cellulaire *in vitro*, seule l'inhibition de HIF2 $\alpha$  et non de HIF1 $\alpha$ , est nécessaire pour que l'effet suppresseur de tumeur de VHL soit obtenu. Cela suggère que HIF2 $\alpha$  est plus oncogénique que HIF1 $\alpha$ .

Le système VHL/HIF et les gènes qu'il régule peuvent par conséquent être considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles. Ainsi, de nouvelles thérapies contre le CCC utilisant des inhibiteurs de VEGF, PDGF ou EGF sont actuellement en cours de développement. Ces dernières seront détaillées plus amplement dans le chapitre suivant dédié aux différentes thérapies du CCC.



## 2. THERAPIES ACTUELLES ET PHENOMENES DE RESISTANCE

Le CCR, et en particulier le CCC, est réfractaire à toutes les thérapies actuelles incluant la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie. Le taux de survie du cancer du rein métastatique est, en effet, de seulement 10% à 1 an. Le traitement actuel du CCR métastatique est, dans un premier temps, une chirurgie d'exérèse de la tumeur primitive et si possible des métastases, suivie d'un traitement par cytokines : interféron- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) et/ou interleukine 2 (IL2). Mais ces traitements induisent malheureusement de nombreux effets secondaires.

### 2.1. Les différentes approches thérapeutiques

#### 2.1.1. La thérapie actuelle des CCR : La chirurgie et les cytokines

##### **La chirurgie**

Bien que la néphrectomie ait des effets limités, elle reste efficace dans le traitement du CCR. En effet, différentes études (Pantuck et al., 2001a; van Spronsen & De Mulder, 2006) montrent le bénéfice d'une néphrectomie précédant le traitement par IFN $\alpha$ , puisque les patients ont une espérance de vie augmentée de 6 mois et un meilleur pronostic par rapport à ceux n'ayant pas subi de néphrectomie.

##### **Les cytokines**

IL2 et IFN $\alpha$  ont été les premiers agents utilisés ayant montré une activité anti-tumorale dans les années 80, chez 10 à 15% des patients (Motzer et al., 1996; Motzer & Bukowski, 2006). L'utilisation de cytokines a pour but de stimuler une réponse immunitaire non spécifique. D'autres cytokines, comme l'acide rétinoïque 13-cis (CRA), ont été testées, mais sans résultats.

- L'interleukine 2

IL2 est un activateur des lymphocytes T et des cellules NK (« *Natural Killer* »). Son effet anti-tumoral serait dû à cette activation de la réponse immune. IL2 peut être administrée en intraveineuse ou en sous-cutanée. Les taux de réponses varient de 7 à 23% selon les études (Fisher et al., 1997; Fyfe et al., 1995), dont environ un tiers de réponse complète. La toxicité de IL2, largement dépendante de la dose injectée, est plus prononcée que celle de IFN $\alpha$ .



- L'interféron  $\alpha$

IFN $\alpha$  peut être administré en sous-cutané, en intramusculaire ou en intraveineuse, le taux de réponse n'étant pas dépendant du mode d'administration. L'efficacité du traitement est obtenue pour des posologies entre 20 et 40 mUI/semaine. Des dosages plus élevés présentent une augmentation des effets secondaires, sans amélioration significative du taux de réponse. Dans le CCR métastatique, IFN $\alpha$  administré seul présente un taux de réponse de 8 à 26%, et un taux de réponse complète compris entre 2 et 7% (Banerjee et al., 2006; Motzer et al., 1995).

- Combinaison de IL2 et IFN $\alpha$

Des études de phase II ont montré que le taux de réponse obtenu lors d'une combinaison de IL2 et IFN $\alpha$  est compris entre 11 et 27%, ce qui correspond approximativement aux taux de réponse obtenus avec chacune des cytokines seules (de Gast et al., 2000; Tourani et al., 2003; Verra et al., 2003). Une étude clinique de phase III, comprenant 425 patients, a comparé les effets de ces cytokines seules ou en combinaison et bien que le taux de réponse soit significativement plus élevé lorsque les cytokines sont en combinaison, aucune différence significative quant à l'espérance de vie des patients sélectionnés n'est observable (Negrier et al., 1998).

### 2.1.2. La radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et l'immunothérapie

#### **La radiothérapie et l'hormonothérapie**

Le CCR présente une résistance à la radiothérapie, qu'elle soit palliative ou antalgique osseuse, et bien que le CCR exprime des récepteurs pour les oestrogènes ou les progestérones, l'hormonothérapie (progestatifs, anti-androgènes ou anti-oestrogènes) n'est malheureusement pas une thérapie systémique efficace (Jacobsohn & Wood, 2006).

#### **La chimiothérapie**

Les différents agents testés, tels que la vinblastine, le 5-fluoruracil (5-FU), la cisplatine ou la gemcitabine n'ont montré qu'une faible efficacité, et ce, à des doses élevées. De nombreuses études ont testé diverses combinaisons d'agents chimiothérapeutiques (entre eux ou avec IL2 et/ou IFN $\alpha$ ) sans obtenir de résultats probants. Les taux de réponse sont seulement de 1 à 4%, que les agents chimiothérapeutiques soient utilisés seuls, en combinaison ou couplés à



l'immunothérapie (Bleumer et al., 2003; Ramsey & Aitchison, 2006; van Spronsen et al., 2005b).

### **L'immunothérapie**

Après des résultats relativement décevants par immunothérapie non spécifique, des études ont été menées, ciblant cette fois le système adaptatif de la cellule (Hoffman et al., 2000).

Les cellules lymphoïdes LAK (« *Lymphokines Activated Killer* ») font partie d'une population de lymphocytes trouvée au niveau de la circulation sanguine périphérique. Activées lors d'un traitement par IL2, elles peuvent être réinjectées au patient et ainsi conduire à une activité anti-tumorale non-spécificique.

Les TIL (« *Tumour Infiltrating Lymphocytes* ») sont une population de lymphocytes infiltrés dans les tissus tumoraux comprenant des cellules immunitaires non-spécifiques comme les cellules NK mais aussi des cellules spécifiques comme les cellules T cytotoxiques (CTL). Les TIL peuvent être isolés du tissu tumoral, amplifiés puis réinjectés au patient.

Cependant, devant l'absence de bénéfice thérapeutique, ces études ont été abandonnées. Seuls les traitements par IL2 et IFN $\alpha$  ont permis d'obtenir des résultats reproductibles mais limités à une minorité de patients, il est donc très important de poursuivre le développement de nouvelles voies thérapeutiques pour les patients atteints de CCR métastatiques.

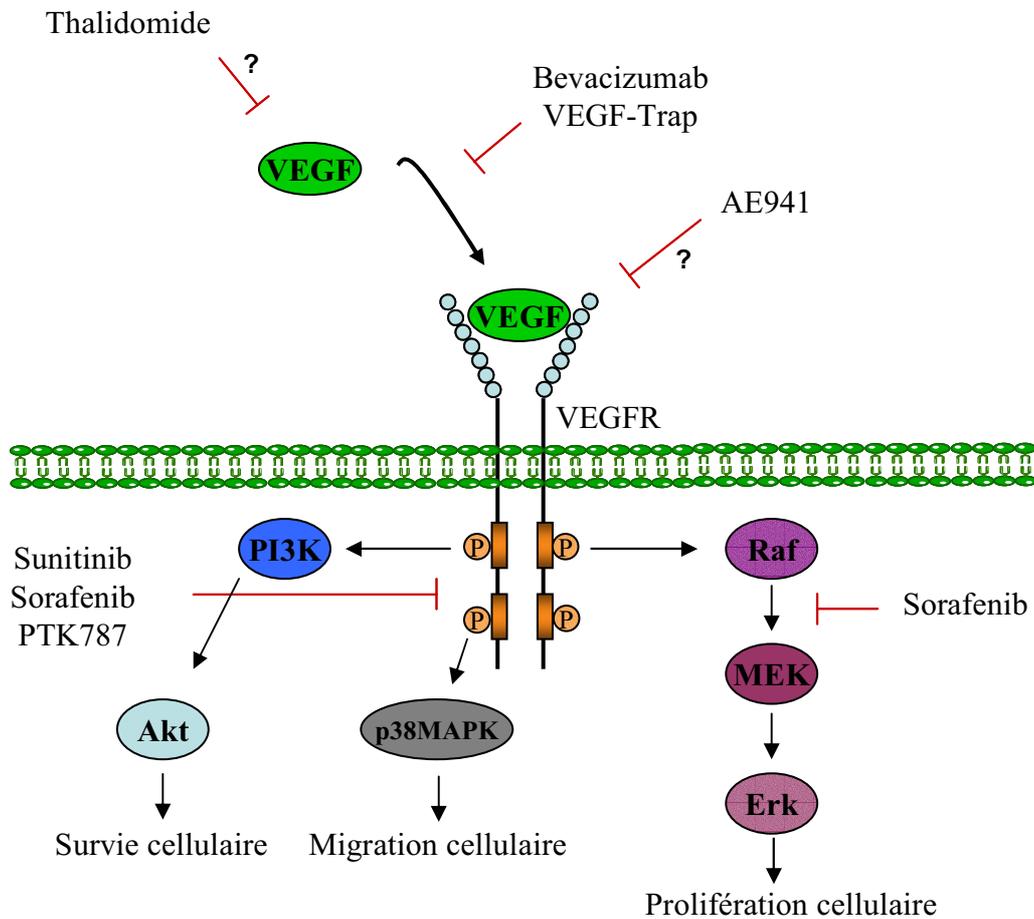
## **2.2. Thérapies en cours de développement**

### 2.2.1. Immunothérapie spécifique

Les thérapies basées sur les cytokines sont actuellement les plus efficaces dans le traitement du CCR métastatique mais elles sont cependant également à l'origine de nombreux effets secondaires, comme précisé précédemment. L'un des objectifs actuels est d'augmenter la spécificité de la réponse immunitaire induite afin d'en diminuer les effets secondaires (Bleumer et al., 2003; Golby & Spencer, 2001; Ramsey & Aitchison, 2006; van Spronsen et al., 2005a).

Différents axes de recherche visant à augmenter cette spécificité sont à l'heure actuelle en cours de développement parmi lesquels :

- une approche vaccinale basée sur les cellules présentatrices d'antigène : les cellules dendritiques (Avigan, 2004; Marten et al., 2003),
- des greffes de cellules souches allogéniques mais les taux de réponse obtenus sont extrêmement variables (de 0 à 56%, (Takahashi & Childs, 2004),



**Figure 5. Approches anti-angiogéniques ciblant VEGF/VEGFR.**

Le bevacizumab et le VEGF-Trap bloquent l'interaction de VEGF avec son récepteur alors que la thalidomide diminue la transcription de VEGF. AE941 est un inhibiteur compétitif de VEGF vis-à-vis de son récepteur. Le sunitinib, le sorafenib et PTK787 n'ont pas une activité spécifique à VEGFR, mais inhibent la phosphorylation au niveau cytoplasmique de plusieurs récepteurs tyrosine kinase. Le sorafenib inhibe également la kinase Raf, qui est impliquée dans une des voies de signalisation activées par VEGF.

*D'après Rini et small, 2005.*

- l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant des molécules surexprimées dans le CCR par rapport au rein sain dont G250, un antigène présent dans 85% des CCR, l'interleukine 6 (IL6) qui est une cytokine essentielle dans la croissance du CCR, et le TNF $\alpha$ . Ainsi, par exemple, des résultats d'études cliniques obtenus avec l'infliximab, un anticorps monoclonal chimérique humain/souris spécifique du TNF $\alpha$ , sont très prometteurs. Cependant le nombre de patients impliqués étant faible, il est nécessaire de poursuivre ces investigations (Mancuso & Sternberg, 2005).

### 2.2.2. Thérapies anti-angiogéniques

Les CCR sont des tumeurs extrêmement vascularisées. L'angiogenèse pourrait donc jouer un rôle crucial au cours de la croissance tumorale (Patard et al., 2006; Rini & Small, 2005; Rini et al., 2005), tout en se rappelant de l'absence de consensus quant à la survie des patients en fonction du degré de microvascularisation argumentée dans le chapitre 1.2.2.

#### **Le VEGF**

Il a été montré que le VEGF est surexprimé dans la majorité des CCR (Rini et al., 2005). Cette surexpression peut être liée, comme précisé dans le chapitre consacré au VHL, à l'inactivation du VHL, entraînant l'activation de HIF et de ses cibles dont VEGF. Les récepteurs au VEGF font partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase impliquée dans la prolifération, la différenciation, la migration et le métabolisme cellulaires. Ils possèdent une activité enzymatique cytoplasmique intrinsèque et la fixation de VEGF à son récepteur facilite la dimérisation de celui-ci et l'autophosphorylation du résidu tyrosine de sa portion cytoplasmique. Les récepteurs du VEGF sont impliqués dans la vascularisation, la croissance et l'extension métastatique, tout au moins dans certaines tumeurs (Rini, 2006; Virtanen & Lehto, 2004). Ainsi, par exemple, VEGF-A est une cytokine jouant un rôle dans l'angiogenèse des tumeurs. Pour ces raisons, des facteurs de croissance comme VEGF et ses trois récepteurs (VEGF-R1, VEGF-R2 et VEGF-R3) sont des cibles thérapeutiques potentielles intéressantes.

#### **Les approches thérapeutiques ciblant VEGF et l'angiogenèse**

Trois approches sont à l'heure actuelle en cours d'étude. Elles sont représentées Figure 5. La première est l'inhibition directe de VEGF. La thalidomide, le VEGF-trap et le bevacizumab (un anticorps monoclonal dirigé contre VEGF) se lient à VEGF, et inhibent son action. La seconde tentative d'inhibition de la voie VEGF est l'utilisation d'un antagoniste de



VEGF : le neovastat ou AE-941 qui se lie de manière compétitive à VEGF-R2. La troisième approche est intracellulaire : il s'agit de l'inhibition de l'autophosphorylation du récepteur VEGF au niveau cytoplasmique. Trois candidats sont en cours d'étude : SU011248, PTK787 et BAY43-9006.

Cependant, ces inhibiteurs de l'angiogenèse ne sont pas tous spécifiques de VEGF ou VEGFR. Ainsi, PTK787/ZK222584 est un inhibiteur de tyrosine kinases qui inhibe sélectivement VEGF-R1, VEGF-R2 et PDGFR. Il est intéressant de rappeler que PDGF est également une cible du système VHL/HIF. PTK787 est actuellement en phase clinique I.

- Le sorafenib (BAY43-9006), considéré à l'origine comme un inhibiteur de la Raf-1 sérine/thréonine kinase, a également une action sur d'autres kinases ou récepteurs à activité tyrosine kinase tels que B-Raf, VEGF-R2, PDGFR, FLT-3 et c-KIT (Feldman & Motzer, 2006). Son administration sur des xénogreffes de CCR humain a montré une activité anti-tumorale (Chang et al., 2007; Lyons et al., 2001). La voie Ras/Raf/MEK, qui mène à une augmentation de la production du complexe HIF-1, joue un rôle central dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Cette voie est stimulée par l'intermédiaire d'un récepteur tyrosine kinase, entraînant l'activation de Ras et la formation d'un complexe actif Ras/Raf (Figure 5). Cela résulte en une stimulation de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse (Patel et al., 2006). Une étude clinique de phase III sur environ 900 patients résistants aux cytokines, a montré que le sorafenib apporte un bénéfice thérapeutique par rapport à un placebo. Le taux de réponse obtenu était de 80% (dont 2% de réponse partielle et 78% de stabilisation de la maladie) contre 55% de cas stabilisés avec le placebo. La survie est également augmentée de 3 mois par rapport au placebo (19,3 mois vs 15,9) (Smith et al., 2006).

- Le sunitinib (SU11248) est une petite molécule aux effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques qui a pour cibles VEGFR, PDGFR, c-KIT et FLT3R. Ces différents récepteurs, lorsqu'ils sont activés, induisent la prolifération et la différenciation cellulaire, tout en inhibant l'apoptose. Des études cliniques de phase II ont montré un taux de réponse partielle d'environ 40% auquel s'ajoute environ 20% de cas stabilisés pendant près de 3 mois (Motzer & Bukowski, 2006). En phase III, le sunitinib a montré un bénéfice thérapeutique par rapport à IFN $\alpha$ .

- AG013736 cible les trois récepteurs de VEGF, PDGFR $\beta$  et c-KIT. Les premiers résultats obtenus avec cette molécule sont prometteurs : en phase II d'essais cliniques, un taux de réponse de 40% a été obtenu sur 52 patients réfractaires aux cytokines. D'autres études, également de phase II, sont en cours avec des patients présentant une résistance au sorafenib. Cependant les résultats obtenus à ce jour par ces agents ne sont pas tous concluants. La



thalidomide et AE941 présentent des taux de réponse inférieurs à 10%, et il n'y a pas de bénéfice de survie par rapport aux cytokines. Le VEGF-trap n'a également pas montré de réponse significative sur les CCR métastatiques résistants aux cytokines. L'avenir clinique de ces trois agents est plus qu'incertain. Des études cliniques impliquant les autres agents sont en cours (Rini & Small, 2005).

### 2.2.3. Inhibition de mTOR (« mammalian Target Of Rapamycine »)

mTOR, cible de la rapamycine, est une sérine/thréonine kinase en aval de la voie de la phosphatidyl-inositol-3-phosphate (PI3K) et de l'Akt. La rapamycine n'agit pas directement sur mTOR mais se lie à la protéine « *FK-binding-protein-12* ». Ce complexe lui permet d'interagir avec mTOR et d'inhiber son activité. La voie PI3K/Akt (qui sera décrite plus largement dans le chapitre 3 de cette introduction) est activée par de nombreux facteurs de croissance via des récepteurs tyrosine kinase ou des récepteurs couplés aux protéines G. Elle est impliquée dans la prolifération et la croissance cellulaire, tout en ayant des effets anti-apoptotiques. Cette voie a été montrée comme étant activée dans de nombreux cancers (Morgensztern & McLeod, 2005). Selon le stade tumoral et/ou le statut en VHL, après phosphorylation par Akt, mTOR est activée et va permettre la transcription de nombreux ARNm (dont celui de HIF1 $\alpha$ ) et ainsi stimuler la prolifération, la survie et la motilité cellulaire ainsi que l'angiogenèse. Etant donné l'étendue de son implication, l'inhibition de mTOR peut induire un arrêt du cycle cellulaire (Bjelogrlic et al., 2006). mTOR semble donc être une cible thérapeutique intéressante dans de nombreux cancers et plusieurs dérivés de la rapamycine sont en cours d'étude pour le CCR métastatique dont le temsirolimus (CCI-779), inhibiteur spécifique de mTOR. Ayant montré une activité anti-tumorale dans des études précliniques et dans d'autres modèles de cancers (Costa, 2007; Jimeno et al., 2007; Mounier et al., 2006), il est actuellement en phase clinique III et semble apporter un bénéfice thérapeutique par rapport à l'IFN $\alpha$  (Motzer & Bukowski, 2006). D'autres études cliniques sont en cours (Motzer & Bukowski, 2006; Patel et al., 2006).

### 2.2.4. Inhibition du récepteur à l'EGF

EGFR est surexprimé dans les CCR métastatiques, ce qui en fait avec son ligand une cible thérapeutique potentielle. Plusieurs études cliniques ont été menées, impliquant des anticorps monoclonaux dirigés contre EGFR ou des molécules inhibant son activité tyrosine kinase telles que le gefitinib ou ZD1839, mais les résultats restent décevants (Patel et al., 2006; van Spronsen & De Mulder, 2006).



- Le lapatinib (GW572016)

Le lapatinib (GW572016) est un inhibiteur de tyrosine kinases et a deux cibles : le récepteur à l'EGF (EGFR, erbB1) et HER-2/erbB-2. Cependant, bien qu'ayant montré une activité anti-tumorale lors d'études précliniques, une étude clinique de phase III a montré que le lapatinib n'apportait aucun bénéfice thérapeutique par rapport à l'hormonothérapie.

- erlotinib et bevacizumab

Une autre stratégie est de coupler l'inhibition de la voie VEGF à celle de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR. Ainsi, lors d'une étude clinique de phase II, 62 patients avec des CCR métastatiques ont été traités avec l'erlotinib (un inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase de EGFR) et le bevacizumab (anticorps monoclonal dirigé contre VEGF). Le taux de réponse fut de 25% (Hainsworth et al., 2005), mais d'autres études cliniques comparant l'activité de ces molécules avec le bevacizumab et un placebo n'ont pas montré de différences significatives. Cette variabilité de réponse pourrait être due aux différents critères d'inclusions des sujets sélectionnés dans les études (Motzer & Bukowski, 2006).

#### 2.2.5. hsp90

Les protéines chaperonnes hsp (« *heat-shock protein*») sont exprimées dans toutes les cellules et permettent aux protéines d'acquérir la conformation nécessaire à leur activité. La protéine chaperonne hsp90 interagit avec, entre autre, HIF1 $\alpha$  et lui permet d'adopter une conformation activable lors de phénomènes hypoxiques (Minet et al., 1999; Neckers, 2002). Cette interaction semble liée aux conditions d'oxygénation. En effet, hsp90 se dissocie de HIF1 $\alpha$  en conditions hypoxiques. Par ailleurs, la modification de conformation de HIF1 $\alpha$  par HIF1 $\beta$  dans le noyau n'a pas lieu en l'absence d'interaction préalable entre hsp90 et HIF1 $\alpha$ . En revanche une étude récente présente hsp90 comme un nouveau régulateur de la stabilité de HIF1 $\alpha$ , indépendant du VHL et du taux d'oxygène. Dans des cellules de CCC déficientes en VHL, l'interruption de l'association HIF1 $\alpha$ /hsp90, par l'utilisation d'un antagoniste de hsp90 (la geldanamycine), entraîne l'ubiquitination et la dégradation de HIF1 $\alpha$  par le protéasome (Isaacs et al., 2002; Minet et al., 1999; Neckers, 2002). Des études cliniques sont en cours.

#### 2.2.6. Perspectives

Bien qu'ayant des taux de réponse intéressants (en particulier pour le sorafenib et le sunitinib), ces nouveaux agents thérapeutiques induisent un phénomène de résistance et actuellement, leur bénéfice clinique se limite à un arrêt de la progression tumorale pendant



environ trois ou quatre mois. Les mécanismes de cette résistance ne sont pas élucidés mais pourraient être liés par exemple à des mutations des récepteurs ciblés, les rendant insensibles à l'action de ces molécules. Afin de limiter ces phénomènes de résistance, plusieurs études cliniques tentent de combiner ces différentes molécules avec IL2 et IFN $\alpha$  (Rini & Small, 2005). La chirurgie reste cependant la thérapie la plus efficace du CCR, et dans le cas de CCR métastatiques, les cytokines restent le traitement classique après néphrectomie. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, plus spécifiques, basées sur les résultats de biologie moléculaire, avec les limites connues du CCR qui sont que ce dernier présente *in vivo* une résistance aux différents agents thérapeutiques tels que les agents chimiothérapeutiques alors qu'*in vitro* cette résistance est inexistante.

### **Cibler le système VHL/HIF**

L'intérêt de cibler ce système est double. En effet, le CCC présente dans la majorité des cas une déficience en VHL et donc une surexpression de HIF. De plus, il existe des régions hypoxiques au sein de divers cancers solides présentant une surexpression de HIF et de ses cibles. Ces régions sont connues pour être résistantes aux thérapies (Boyle & Travers, 2006). Le développement de petites molécules anti-angiogéniques (bevacizumab) ou ciblant des récepteurs tyrosine kinases (par exemple SU11248) pourrait s'avérer intéressant d'un point de vue thérapeutique.

Le laboratoire a montré que l'expression de la PTHrP est régulée par le système VHL/HIF. En effet, la réintroduction du gène VHL dans des cellules tumorales déficientes en VHL est à l'origine d'une diminution de 50% de l'expression de PTHrP au niveau de l'ARNm et de la protéine elle-même. L'étude préliminaire du mécanisme de régulation de l'expression de la PTHrP par le VHL suggère que le système VHL/HIF régule l'expression de la PTHrP au niveau post-transcriptionnel en diminuant la stabilité de son ARNm. Ces résultats nous ont alors amené à étudier l'implication de la PTHrP dans la croissance du CCC humain. Ainsi, *in vivo*, le laboratoire a montré sur des xéno greffes de CCC déficient en VHL chez la souris nude, que le blocage du système PTHrP/R-PTH1, par un anticorps anti-PTHrP inhibe complètement la croissance tumorale sur une période de 17 jours, allant même jusqu'à une régression complète de 70% des tumeurs implantées (Massfelder et al., 2004). Le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre la PTHrP pourrait donc s'avérer intéressant pour de futures études cliniques, seul et/ou en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques. Une telle possibilité est en cours d'étude au laboratoire.

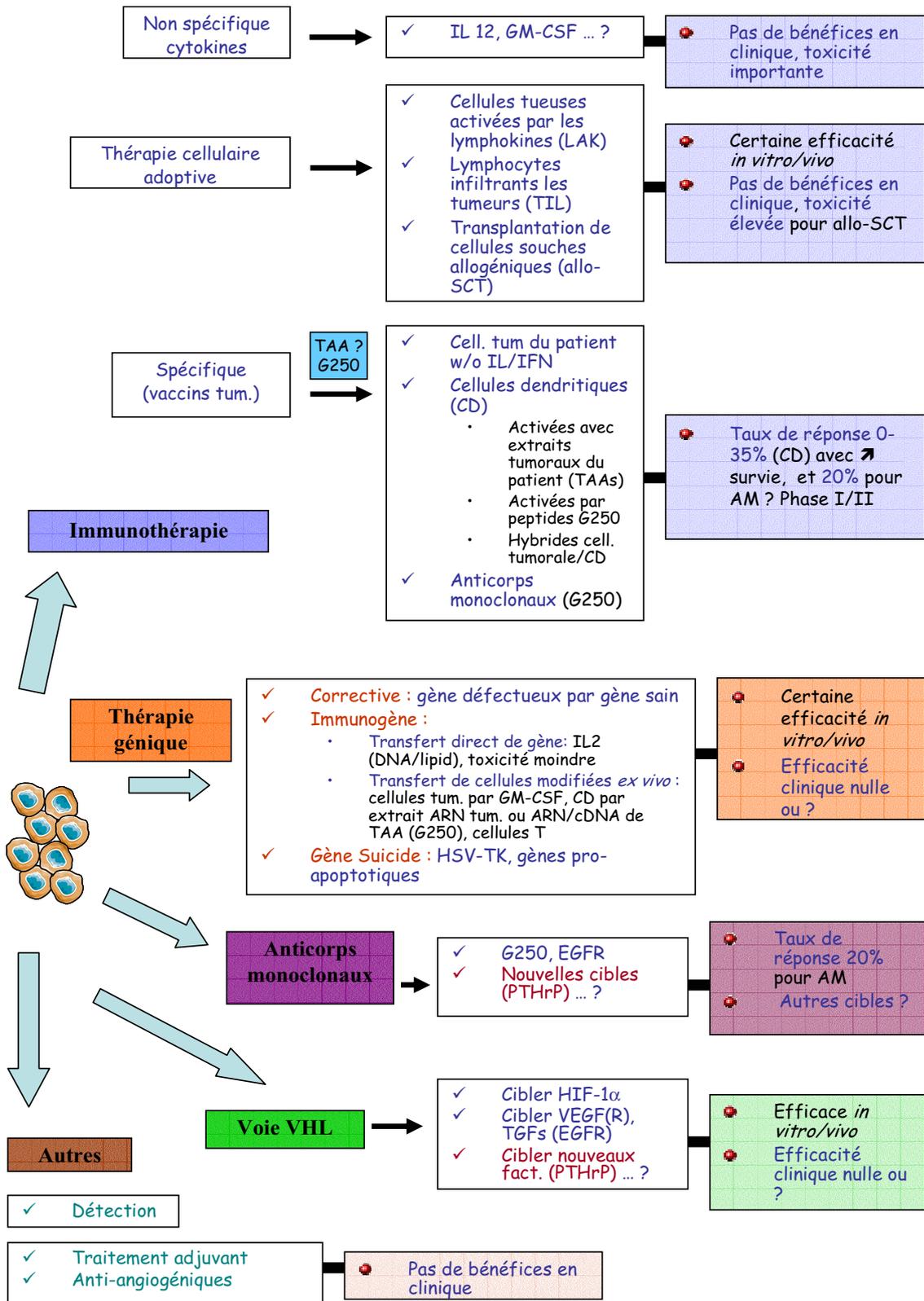


Figure 6. Résumé des nouvelles approches et stratégies thérapeutiques du CCR métastatique : par immunothérapie, thérapie génique, utilisation d'anticorps monoclonaux ou inhibition de la voie VHL.

### **Identification de nouvelles cibles thérapeutiques**

Une autre stratégie thérapeutique développée actuellement en biologie moléculaire est la recherche de nouveaux facteurs impliqués dans la croissance et la survie du CCR grâce à l'évolution des techniques de protéomique, comme l'électrophorèse 2D différentielle (« 2D-Difference Gel Electrophoresis », ou 2D-DIGE) et les puces à ADN ou à tissus.

### **Compréhension des phénomènes de résistance**

Le principal problème des CCR est leur résistance aux thérapies classiques. Un des objectifs actuels est de décrypter le(s) mécanisme(s) à l'origine de cette résistance *in vivo*, dans le but de comprendre le phénomène de résistance des cellules tumorales à l'apoptose non seulement intrinsèque mais également en réponse aux thérapies. A terme, avec ces connaissances, des stratégies thérapeutiques pourront émerger, basées sur la monothérapie ou la combinaison de drogues (incluant les agents chimiothérapeutiques) à effets synergiques sur l'induction de la mort des cellules tumorales. L'une des hypothèses actuelles, basée sur l'étude d'autres cancers, est que ces phénomènes de résistance *in vivo* pourraient être dus à une activation de voies anti-apoptotiques et/ou une inhibition de voies apoptotiques, de manière constitutive ou induite par le traitement (Arlt et al., 2003; Chang et al., 2003; Krasilnikov et al., 2003; Krystal et al., 2002; Longley & Johnston, 2005).

Les nouvelles approches et stratégies thérapeutiques du CCR sont schématisées Figure 6.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de voies anti-apoptotiques ou voies de survie qui seront décrites dans le chapitre suivant.



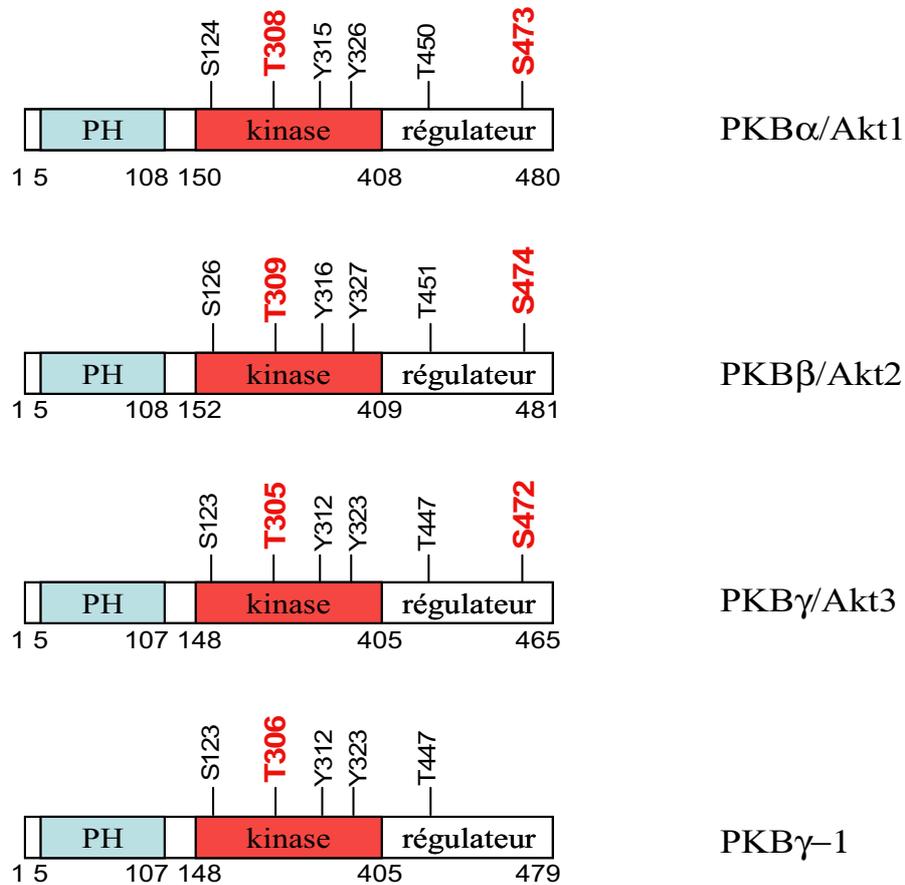
### 3. VOIES DE SURVIE

#### 3.1. Les voies de prolifération et de survie

Les cellules tumorales, qu'elles soient bénignes ou malignes, sont diverses et hétérogènes. Cependant, toutes ont deux caractéristiques communes qui est de proliférer et de résister à la mort programmée malgré les contrôles normaux. Les cellules néoplasiques malignes ont en outre la capacité d'envahir et de coloniser les tissus environnants. Il est clairement établi que le développement d'un cancer résulte d'une combinaison entre, d'une part, l'activation de voies cellulaires à effets prolifératifs et/ou anti-apoptotiques et, d'autre part, l'inhibition de voies cellulaires à effets anti-prolifératifs et/ou apoptotiques. Dans leur étude, Hanahan et Weinberg ont proposé une classification des différentes modifications que l'on retrouve dans la majorité des cancers en six catégories: une autosuffisance en signaux de croissance, une forte résistance à l'apoptose, une insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, un potentiel de réplication infini ou immortalisation, un potentiel de néovascularisation et une capacité de migration et d'invasion des tissus (Hanahan & Weinberg, 2000). Je ne détaillerai que le deuxième processus dont l'étude dans le CCC constitue l'essentiel de mes travaux expérimentaux.

Les molécules ou facteurs induisant la survie cellulaire sont fréquemment activés ou surexprimés dans les cancers. Le maintien de la survie joue un rôle essentiel dans la signalisation mitogénique. Dans les thérapies systémiques incluant la chimiothérapie et l'immunothérapie, la résistance au traitement dépend de nombreux facteurs. Le recrutement de molécules ou facteurs anti-apoptotiques est presque systématiquement rencontré. Il augmente la capacité de survie des cellules, facilite la progression de la maladie et permet aux cellules cancéreuses d'échapper aux traitements qui induisent l'apoptose. Les voies cellulaires anti-apoptotiques contribuant au développement néoplasique et à la résistance aux thérapies, incluent, mais ne sont pas restreintes à, la voie PI3K/Akt, la voie du facteur de transcription NFκB, la voie Ras/MAPK, la voie des intégrines et la voie des hsp (Drysdale et al., 2006; Gollob et al., 2006; Hennessy et al., 2005; Inoue et al., 2007).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux voies bien connues, la voie PI3K/Akt et la voie du NFκB qui sont impliquées dans de nombreux cancers dont les cancers hématologiques, le cancer du sein, le cancer de l'ovaire, le carcinome de la prostate ou de la thyroïde. L'importance de ces voies dans la tumorigenèse du rein



**Figure 7. Structure des 3 isoformes humaines de Akt et du variant d'épissage d'Akt3.**

Les isoformes de l'Akt sont constituées en amino-terminal, d'un domaine PH (homologue à la pleckstrine), au centre d'un domaine kinase et en carboxy-terminal, d'un domaine régulateur. Les trois isoformes doivent être phosphorylées sur deux résidus thréonine et sérine, situés respectivement au niveau du domaine kinase et du domaine de régulation de l'Akt. Seul, le variant d'épissage d'Akt3 (PKB $\gamma$ -1), qui est moins actif, n'est phosphorylé qu'en thréonine au niveau du domaine kinase.

*D'après Nicholson and Anderson, 2002.*

n'était pas documentée dans le CCR avant l'initiation de mes travaux. Je ne décrirai donc ici, parmi le processus de résistance à l'apoptose, que ces deux voies de signalisation.

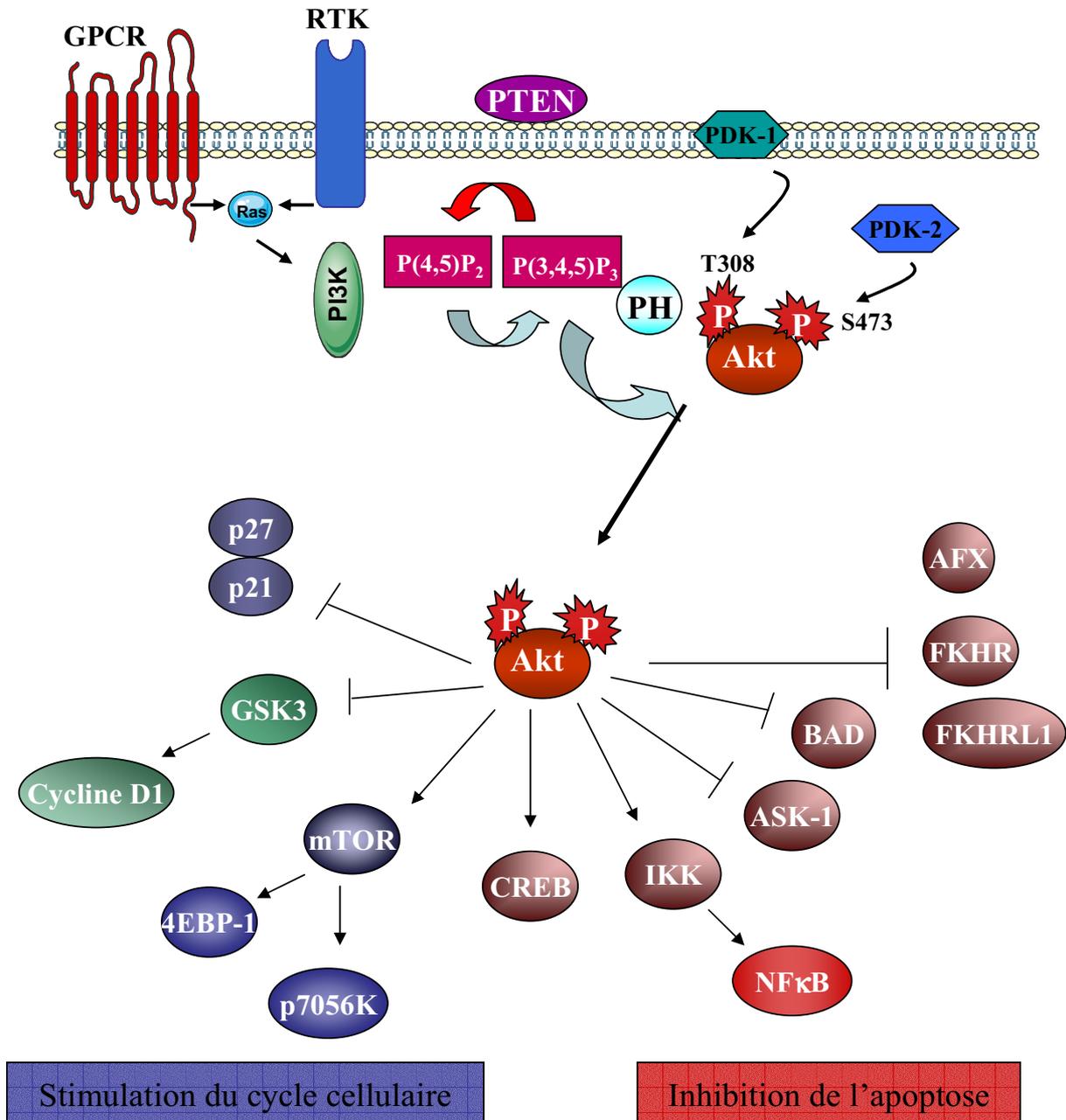
## 3.2. La voie PI3K/Akt

### 3.2.1. Description de la voie

La voie PI3K/Akt joue un rôle crucial dans la croissance et la survie cellulaire. L'Akt phosphoryle une série de protéines impliquées dans des processus aussi variés que la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, l'adhésion et la motilité cellulaires, la néovascularisation, le métabolisme et la transformation cellulaire.

La PI3K est un hétérodimère constituée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice, de 110 et 85 kDa, respectivement. Elle est considérée comme un oncogène. Elle est activée par des récepteurs à tyrosine kinase ou couplés aux protéines G ou encore par la GTPase Ras. Les diverses isoformes (au moins cinq) de la PI3K phosphorylent le phosphatidylinositol-4,5diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate (PIP3). Ce dernier est un second messager lipidique essentiel pour la translocation de l'Akt vers la membrane.

L'Akt (ou PKB) est une sérine/thréonine kinase qui comprend trois isoformes chez les mammifères : Akt1, Akt2 et Akt3 dont les gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes 14q32, 19q13 et 1q44. Ces isoformes sont constituées d'un domaine amino-terminal homologue à la pleckstrine (domaine PH), d'un domaine central catalytique et d'un domaine carboxy-terminal de régulation. Cette organisation structurale est illustrée Figure 7 (Nicholson & Anderson, 2002). Le domaine PH de l'Akt interagit avec des lipides membranaires tels que le PIP3 ou le PIP2. Des études biochimiques ont montré que le domaine PH de l'Akt interagit avec PIP2 et PIP3 avec une affinité similaire (James et al., 1996; Song et al., 2005). Le domaine catalytique de l'Akt présente un grand degré de similarité avec d'autres kinases de la super famille des kinases AGC (protéine kinase A dépendante de l'AMPc/protéine kinase G/protéine kinase C), incluant également p90RSK (Peterson & Schreiber, 1999; Song et al., 2005). Il y a également dans ce domaine une thréonine conservée (thréonine 308 ou T308 chez Akt1) dont la phosphorylation peut partiellement activer l'Akt. Le domaine carboxy-terminal possède un motif hydrophobe FPQFSY caractéristique de la super famille des kinases AGC, identique entre les isoformes de mammifères. La phosphorylation d'un résidu sérine ou thréonine dans ce motif est nécessaire à la pleine activation des diverses isoformes de l'Akt.



**Figure 8. La voie PI3K/Akt.**

Après stimulation via des récepteurs tyrosine kinase (RTK) ou couplés aux protéines G (GPCR) de la PI3K, l'Akt est recrutée à la membrane où elle va être phosphorylée en T308 par une PDK1 et en S473 par une PDK2. Ainsi doublement phosphorylée, l'Akt va phosphoryler tout un panel de molécules, telles que GSK3, mTOR, IKK ou FKHR, entraînant une stimulation du cycle cellulaire et une inhibition de l'apoptose.

*D'après West et al, 2002*

Chez l'homme, afin d'être activée pleinement, l'isoforme prépondérante Akt1 doit être phosphorylée en T308 située dans le site catalytique et en sérine 473 (S473) dans la partie régulatrice de la kinase. Cette double phosphorylation se fait respectivement par la kinase dépendante des phosphoinositides-1 (« *phosphoinositide-dependent kinase-1* », ou PDK-1) d'expression et d'activité constitutives, et par (au moins) une PDK-2 dont l'identité est encore controversée dans le CCR (Semenza, 2003). Cependant un certain nombre de kinases comme l'ILK (« *integrin-linked kinase* »), la PKC, la DNA-PK (« *DNA-dependent protein kinase* ») ou encore mTOR-riCTOR, pourrait jouer ce rôle dépendamment du tissu considéré. L'Akt, ainsi phosphorylée et activée, est alors libérée de la membrane et va être dirigée vers d'autres compartiments cellulaires pour réguler, par phosphorylation, l'activité et la fonction de toute une série de protéines, qui seront détaillées dans le paragraphe suivant (Figure 8).

### 3.2.2. Cibles en aval de l'Akt

Une fois activée, l'Akt va phosphoryler et réguler tout un panel de protéines impliquées dans le métabolisme du glucose (la « *glycogène synthase kinase 3* », ou GSK3), la régulation de l'apoptose (BAD, la caspase 9), ou la survie cellulaire comme mTOR et les facteurs de transcription Forkhead (FKHR) et NFκB (West et al., 2002). Les principales cibles de l'Akt sont illustrées dans la Figure 8 et détaillées dans le Tableau 5 ci-dessous qui présente également leurs principales implications biologiques.

### 3.2.3. Régulation de la voie

Le taux de PIP3 est régulé par des phosphatases tel que PTEN (« *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10* ») qui déphosphoryle le PIP3 en position 3 et reforme ainsi du PIP2. Le PIP3 n'active pas directement l'Akt mais permet son recrutement à la membrane et lui permet d'avoir la bonne conformation afin d'être phosphorylée par PDK-1. Plusieurs études tendent à montrer que l'Akt pourrait également être activée d'une manière indépendante de PI3K, par exemple, par la PKA, la kinase dépendante du Ca<sup>2+</sup>/calmoduline ou la protéine chaperonne hsp27. Mais de plus amples investigations sont nécessaires afin de confirmer ces résultats (Filippa et al., 1999; Konishi et al., 1997; Perez-Garcia et al., 2004; Song et al., 2005)

Outres ses substrats, plusieurs protéines peuvent interagir avec l'Akt et réguler son activité de manière transitoire. Ainsi, des protéines comme la CTMP (« *carboxy-terminal modulator protein* ») ou Trb3 inhibent l'activité de l'Akt alors que d'autres protéines, comme hsp90, hsp27 ou Grb10, la stimulent (Song et al., 2005).



Substrats	Site de phosphorylation	Effets biologiques	ref
<i>Survie cellulaire</i>			
ASK1	S83	Inhibition des kinases du stress oxydatif	Mochizuki et al., 2006
BAD	S136	Association avec les protéines 14-3-3	Mitsiades et al., 2004
CREB	S133	Stimulation de la transcription	Kato et al., 2007
FKHR	T24, S256, S319	Exclusion nucléaire, association avec les protéines 14-3-3	Woods & Rena, 2002
IKK	T23	Activation de NFκB	Hacker & Karin, 2006
Procaspase-9	T145	Suppression de la mort cellulaire passant par les caspases	Nicholson & Anderson, 2002
<i>Progression du cycle cellulaire</i>			
GSK3	S9 (β), S21 (α)	Inhibition de l'activité catalytique de GSK3	Jope & Johnson, 2004
mTOR	T2446,S2448	Modification de la traduction	Bjelogrljic et al., 2006
p21	T145	Progression du cycle cellulaire	Lin et al., 2007
<i>Autres</i>			
AR	S210,S790	Diminution de la transcription des gènes cibles de AR	Lin et al., 2001
BRCA1	T509	Localisation nucléocytoplasmique	Hinton et al., 2007
eNOS	S1177	Activation, production de NO	Roviezzo et al., 2007
c-Raf	S259	Inhibition de la voie c-Raf	Zimmermann & Moelling, 1999
B-Raf	S364,S428	Inhibition de l'activité de B-Raf	McCubrey et al., 2006

Tableau 5. Les substrats de l'Akt.



### 3.2.4. Implication de la voie PI3K/Akt dans les cancers

Akt a été initialement identifiée comme étant l'homologue cellulaire normal de l'oncogène *v-akt* exprimée par un rétrovirus murin (Nicholson & Anderson, 2002). La voie PI3K/Akt est activée dans divers types cellulaires par des facteurs de croissance (comme VEGF, FGF2, PDGF, SCF, ou NGF), des cytokines (IL2 à 5 ou IL8) (Songyang et al., 1997) mais également par l'insuline (Burgering & Coffey, 1995). Cette activation est bloquée par le LY294002 et la wortmannine, deux inhibiteurs de la PI3K (Walker et al., 2000; West et al., 2002).

Les membres de la famille Akt sont activés et/ou surexprimés dans diverses tumeurs comme précisé dans l'introduction de ce chapitre suggérant que les kinases Akt pourraient participer aux phénomènes de résistance à l'apoptose intrinsèque et en réponse aux thérapies fréquemment observés dans les cellules tumorales. Ainsi, depuis 1992, de nombreuses tumeurs humaines ont montré une implication de cette voie par augmentation d'activité et/ou surexpression. Par exemple Akt2 a été montrée comme surexprimée dans 10% des carcinomes ovariens (Cheng et al., 2005; Thompson et al., 1996). Ce phénomène d'amplification et de surexpression de l'Akt et en particulier de l'Akt2 pourrait jouer un rôle important dans la transformation maligne des cellules (Altomare & Testa, 2005). De plus, il a été montré *in vitro* que la surexpression d'Akt2 dans des lignées humaines de cancers du sein et des ovaires, favorise l'invasion des cellules tumorales ainsi que la formation de métastases (Altomare & Testa, 2005; Arboleda et al., 2003).

La suractivation de l'Akt a été montrée dans de nombreux cancers humains comme le carcinome du sein qui présente une suractivité de l'Akt dans 20 à 55% des cas, le carcinome de la thyroïde dans 80 à 100% des cas, le carcinome de la prostate dans 40% des cas, et d'autres types de cancers comme les gliomes (55%) ou le mélanome malin (43 à 67% des cas). Cette suractivation de l'Akt fut dans la plupart des cas vérifiée par l'état de phosphorylation de ses différentes cibles comme GSK3, mTOR ou FKHR. Plusieurs mécanismes peuvent amener à cette suractivation comme des mutations de PTEN ou de la PI3K entraînant l'arrêt de la régulation endogène de l'Akt, ou une suractivation de PI3K qui peut être due à une surexpression de récepteurs tyrosine kinase comme celui de l'EGF dans les glioblastomes par exemple (Schlegel et al., 2002). D'autres facteurs comme FKHR, en aval de l'Akt, pourraient également avoir un rôle de suppresseurs de tumeur dans certains cancers (Ramaswamy et al., 2002).

Des interactions entre la voie PI3K/Akt et d'autres voies de survie comme la voie MAPK Erk1/2 ont également été documentées (MacKeigan et al., 2002). Les agents thérapeutiques tuent les cellules tumorales en réplication par induction de l'apoptose. Des études récentes



dans divers types de cancer démontrent que l'activation de voies de survie joue un rôle crucial dans la résistance intrinsèque et en réponse aux thérapies (Arlt et al., 2003; Krasilnikov et al., 2003; Krystal et al., 2002; Longley & Johnston, 2005; Shelton et al., 2003). Des effets synergiques sur l'induction de la mort cellulaire en combinant divers inhibiteurs de voies cellulaires de survie et des agents chimiothérapeutiques ont été décrits concernant les voies PI3K/Akt et MAPK Erk1/2 (Shelton et al., 2003). Ainsi, il y a des évidences claires que l'activation de la voie PI3K/Akt est liée non seulement à la progression tumorale mais également à la résistance aux radiations et aux thérapies systémiques.

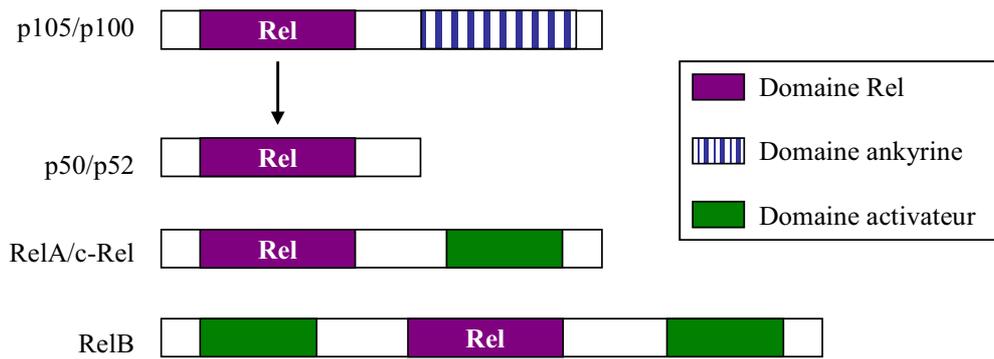
A côté de ces effets sur la croissance tumorale, la voie PI3K/Akt a également une activité pro-angiogénique dans divers types cellulaires et tissulaires (Bardos & Ashcroft, 2004; Nicholson & Anderson, 2002). En outre, l'effet stimulateur sur l'expression du VEGF a été montré comme étant obtenu à travers l'activation transcriptionnel des facteurs HIFs dans les cancers ovariens (Skinner et al., 2004) qui sont eux-mêmes régulés, au moins en partie, par l'activité kinase de l'Akt. Cependant, dans leur étude, Chen et al montrent que les réponses angiogéniques, dans trois modèles expérimentaux différents, étaient augmentées chez les souris délétées du gène de l'Akt1 et que ces réponses étaient liées à la diminution d'expression des thrombospondine-1 et -2, deux régulateurs vasculaires connus (Cheng et al., 2005). Les effets d'une délétion des Akt2 ou 3 chez la souris ne sont pas documentés et pourraient montrer l'inverse mais cela nécessite bien entendu des expérimentations spécifiques. Akt pourrait ainsi également contrôler la néovascularisation des tumeurs et participer ainsi au développement et à l'invasion tumorale.

Comme précisé en introduction de ce chapitre, à l'initiation de mes travaux de thèse, l'implication de la voie PI3K/Akt dans le CCR, et en particulier dans le CCC, n'avait pas encore été démontrée.

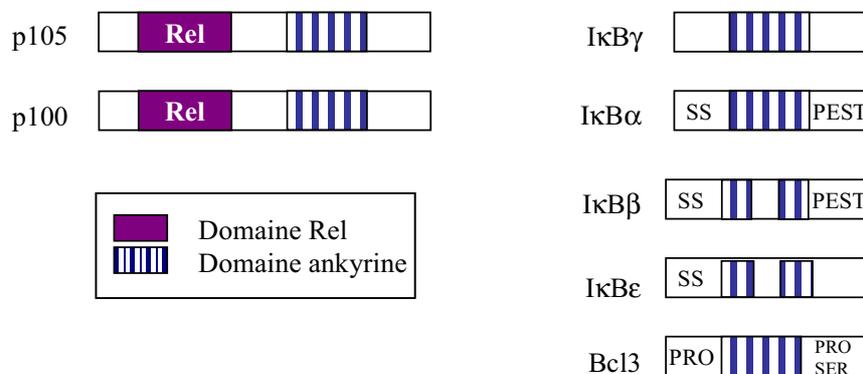
### **3.3. La voie NFκB**

#### **3.3.1. Description de la voie**

Le facteur de transcription Nuclear Factor kappa B (NFκB) a été découvert en 1986. Il joue un rôle central dans les réponses immunitaires, les réactions inflammatoires et la croissance cellulaire. Il est dimérique et peut être constitué de diverses protéines appartenant à la famille Rel, à savoir RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 et NFκB2. NFκB1 est constituée de la protéine p50 et de son précurseur p105, alors que NFκB2 est constituée de la protéine p52 et de son précurseur cytoplasmique p100 (Ghosh et al., 1998). Toutes ces protéines possèdent un



**Figure 9. Les protéines de la famille Rel/NFκB.** Les précurseurs cytoplasmiques p105 et p100 libèrent respectivement p50 et p52 après clivage protéolytique et élimination du domaine ankyrine carboxy-terminal. RelA, RelB et c-Rel présentent un ou plusieurs domaines transactivateurs. *D'après Bours et al, 1998.*



**Figure 10. Les membres de la famille IκB.**

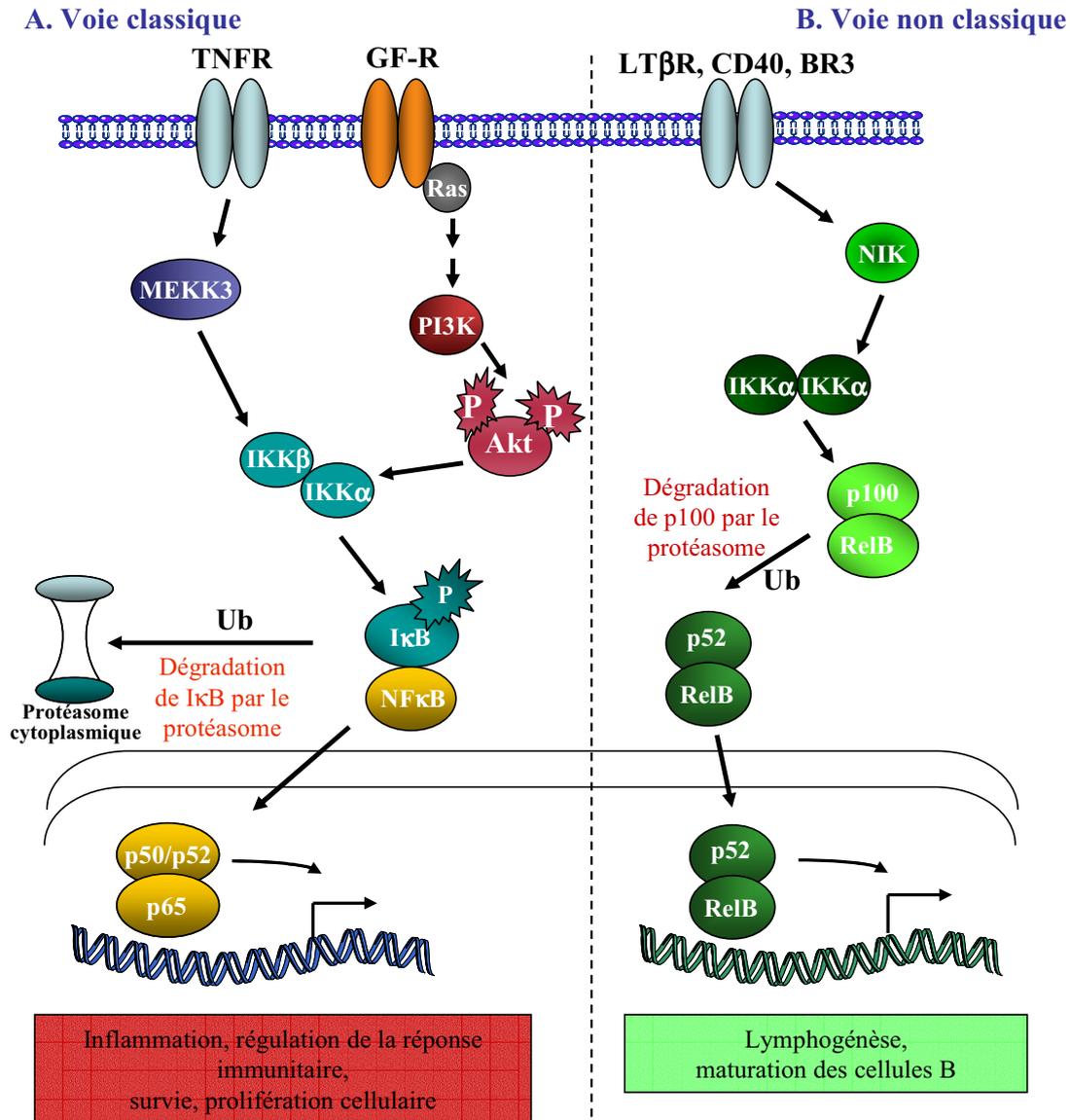
IκBγ correspond à la partie carboxy-terminale de p105. IκBα, β, ε possèdent en amino-terminal des sites *signal-induced serine phosphorylation* (SS) et *phosphorylation-dependent ubiquitination*, ainsi qu'un domaine PEST en carboxy-terminal. Bcl3 possède un domaine riche en proline en amino-terminal (PRO), et des séquences riches en sérine et proline en carboxy-terminal (PRO/SER). Il peut ainsi s'associer aux homodimères p50 et p52 et stimuler la transcription. *D'après Karin et al.1999.*

domaine conservé d'environ 300 résidus en N-terminal. Ce domaine d'homologie avec Rel permet la dimérisation du facteur de transcription NF $\kappa$ B, sa translocation nucléaire et sa liaison à l'ADN. Ce domaine est retrouvé au sein du produit de l'oncogène viral v-Rel et du proto-oncogène c-Rel. RelA, RelB, et c-Rel, possèdent en outre un ou plusieurs domaines d'activation de la transcription en C-terminal, ce qui n'est pas le cas de p50/p105 et p52/p100 (Figure 9).

Dans la majorité des types cellulaires, les dimères NF $\kappa$ B sont cytoplasmiques en raison de leur interaction avec les inhibiteurs endogènes de NF $\kappa$ B appelés I $\kappa$ B (« *inhibitor of NF $\kappa$ B* », inhibiteurs de NF $\kappa$ B). Il s'agit d'une famille d'au moins six protéines comprenant I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$  (région C-terminale de p105), I $\kappa$ B $\delta$  et Bcl-3 qui possèdent des répétitions de domaines « *ankyrin* » qui interagissent avec le domaine conservé Rel (évoqué dans le paragraphe précédent) provoquant ainsi la rétention cytoplasmique de NF $\kappa$ B (Ghosh et al., 1998) (Figure 10). Cette rétention est principalement due à I $\kappa$ B qui masque les séquences de localisation nucléaire (NLSs) de NF $\kappa$ B. Cependant, I $\kappa$ B $\alpha$  et probablement I $\kappa$ B $\epsilon$ , peuvent cacher seulement une des séquences NLS du dimère. Donc le complexe NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  peut avoir une translocation constitutive dans le noyau (Malek et al., 2001). Il faut noter que Bcl3 peut, quant à lui, interagir directement avec des dimères de p50 ou de p52. Il forme alors un complexe pouvant se lier à l'ADN et stimulant la transcription (Baeuerle, 1998; Lenardo & Siebenlist, 1994).

Les voies d'activation de NF $\kappa$ B sont classées en voie classique, qui est largement prédominante, et en voie non classique. Cela dépend si cette activation implique, respectivement, la dégradation de I $\kappa$ B, ou du p100, sur lesquels je reviendrai ci-dessous (Figure 11) (Hayden & Ghosh, 2004).

Dans la voie classique, la stimulation de la cellule par un agoniste comme les facteurs de croissance active le complexe IKK (« *I $\kappa$ B kinase* »), soit directement via leur récepteur soit indirectement via la voie des MAPK ou de la PI3K/Akt,. Ce complexe phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  qui est alors ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome 26S. Cette dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  libère le facteur NF $\kappa$ B constitué par le dimère p50/RelA(p65) qui peut alors entrer dans le noyau pour réguler l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, l'immunité et l'apoptose. L'hétérodimère NF $\kappa$ B classique (p50/p65) est, de manière prédominante, régulé par I $\kappa$ B $\alpha$ . En accord avec cette notion, les souris déficientes en I $\kappa$ B $\alpha$  montrent une nette augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du complexe p50/p65. Bien que les autres membres I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$  peuvent également jouer ce rôle dans certaines conditions, les expériences d'inactivation



**Figure 11. Les voies de NFκB**

**A. La voie classique de NFκB.** Après phosphorylation et activation de la kinase de IκB (IKK), cette dernière va phosphoryler IκB qui va alors se dissocier de NFκB. NFκB peut être phosphorylé, se dimériser et transloquer dans le noyau où il jouera son rôle de facteur de transcription, entraînant une stimulation de la prolifération cellulaire et une inhibition de l'apoptose. GF-R: récepteurs aux facteurs de croissance tels que EGF, TNF ou NGF.

**B. La voie non classique de NFκB.** Après stimulation de NIK par les récepteurs des LT ou du CD40, l'homodimère IKKα est activé et induit la dégradation de p100 couplé à RelB en p52 (via le protéasome). Le dimère p52/RelB transloque dans le noyau où il induit la transcription de gènes impliqués dans la lymphogénèse ou la maturation des cellules B.

Adapté de Kim et al. 2006 et [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)

sélective de ces protéines montrent bien le rôle central de I $\kappa$ B $\alpha$  dans la régulation de la voie classique de NF $\kappa$ B.

Dans la voie non classique, que l'on rencontre essentiellement dans les lymphocytes B, la stimulation de certains récepteurs active la protéine kinase NIK (« *NF $\kappa$ B inducing kinase* ») qui active IKK $\alpha$ . IKK $\alpha$  phosphoryle alors p100 qui conduit à la dégradation sélective de son domaine apparenté à I $\kappa$ B par le protéasome 26S conduisant à la formation de p52. Le dimère formé par p52 et RelB entre alors dans le noyau pour y exercer son activité de transcription de gènes surtout impliqués dans la lymphogenèse et la maturation des lymphocytes B.

### 3.3.2. Régulation de la voie

Les membres de la famille I $\kappa$ B sont eux-mêmes régulés par le complexe IKK. Ce complexe est constitué de deux sous-unités catalytiques (IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ), et d'une sous-unité de structure IKK $\gamma$ . Il peut être activé par de nombreuses kinases comme l'Akt, les « *mitogen-activated protein kinase kinase kinases* » (MAP3K), ainsi que MEKK1, MEKK3 ou TAK1. Le complexe IKK est alors le point de convergence de nombreux stimuli, tels que les ligands des récepteurs « *Toll-like* » (TLRs), des récepteurs aux interleukines 1 et 18, ou encore les ligands de la superfamille des récepteurs au TNF, ou ceux des récepteurs des lymphocyte B et T (Moynagh, 2005; Scheidereit, 2006).

L'activité transcriptionnelle de NF $\kappa$ B est en majeure partie régulée par la dégradation des I $\kappa$ B. Dans un premier temps, en réponse à divers stimuli au niveau de la cellule, les membres de la famille des I $\kappa$ B sont phosphorylés en N-terminal sur deux sérines (S32 et S36) par le complexe IKK (Yamamoto & Gaynor, 2004). Cette phosphorylation induit ensuite la polyubiquitination des membres de la famille I $\kappa$ B et leur dégradation par le protéasome 26S. Le dimère NF $\kappa$ B ainsi libéré, va pouvoir assurer ses fonctions de facteur de transcription (Karin & Ben-Neriah, 2000). I $\kappa$ B $\alpha$ , rapidement resynthétisé après sa dégradation, peut alors entrer dans le noyau, se recomplexer avec NF $\kappa$ B et ainsi inhiber son activité transcriptionnelle.

### 3.3.3. Les cibles transcriptionnelles de NF $\kappa$ B

De part son implication dans des phénomènes aussi vastes et importants que l'immunité, l'inflammation et la croissance cellulaire, il est important de bien connaître les cibles de NF $\kappa$ B impliquées dans chacun de ces phénomènes. Un résumé des principales cibles transcriptionnelles de NF $\kappa$ B se trouve dans le Tableau 6.



Gènes cibles	Activité biologique	Ref.
HLA-G1	Evasion de l'immunosurveillance	Zidi et al., 2006
A1AT	Inhibiteur de protéases	Garcia-Orad et al., 1994
A20	Régulateur négatif de NFκB; anti-apoptotique; angiogenèse	Chng et al., 2006
CD48	Différenciation; réponse immunitaire	Midorikawa et al., 2002
Cycline D1	Prolifération cellulaire; anti-apoptotique	Perez-Ordóñez et al., 2006
FTH	Métabolisme du fer; développement; lié à l'hypoxie; anti-apoptotique	Kang et al., 2006
CSF2	Réponse immunitaire	Shorts et al., 2006
GRO1	Facteur de croissance; angiogenèse	Straight et al., 2006
MnSOD	Stress oxydatif	Ahn et al., 2006
IRF1	<i>Interferon regulatory factor-1</i> , bloque les effets des IFN, cytokine	Wei et al., 2006
IRF2	bloque les effets des IFN; cytokine	Nicolini et al., 2006
IL6	Interleukine 6, cytokine inflammatoire	Karin, 2006
IL11	Réponse immunitaire Cytokine	Nicolini et al., 2006
IκBα	Inhibiteur endogène de NFκB	Garg & Aggarwal, 2002
NFκB1	Précurseur de NFκB (p105)	Garg & Aggarwal, 2002
NFκB2	Précurseur de NFκB (p100); proto-oncogène; prolifération cellulaire; anti-apoptotique; adhésion cellulaire; chimio-résistance	Van Laere et al., 2006
PRG1	Prolifération cellulaire; anti-apoptotique; réponse au stress	Schafer et al., 1996

**Tableau 6. Les gènes cibles de NFκB.**

A1AT: alpha-1-antitrypsin; FTH: ferritin heavy chain; CSF2: colony-stimulating factor 2; GRO1: melanoma growth-stimulating factor 1; MnSOD: manganese superoxyde dismutase; PRG1: p22/PACAP response gene 1.



### 3.3.4. Implication de NFκB dans les cancers

L'activation de la voie de NFκB est un processus inductible et transitoire. Un certain nombre d'observations indiquent que ce facteur pourrait être impliqué dans la croissance cellulaire et notamment dans le développement et la progression de certains cancers (Hayden & Ghosh, 2004). Dans les cellules tumorales, différentes altérations moléculaires peuvent résulter en une régulation modifiée de l'activité de NFκB. Un des premiers arguments indiquant que NFκB pourrait jouer un rôle très important dans le développement et/ou la progression tumorale dans les cancers humains est que le gène *v-Rel*, évoqué plus haut, du virus de la réticuloendothéliose T (responsable de leucémies et lymphomes très rapides) est un puissant oncogène. Dans les tumeurs solides, comme le cancer du sein, les carcinomes à cellules squameuses ou encore le carcinome gastrique, une activation de la voie de NFκB a pu être mise en évidence, bien que des résultats contradictoires aient également été obtenus quant à l'implication de cette voie dans la progression tumorale de certains de ces cancers (Dolcet et al., 2005; Gilmore, 1999). De la même manière, une activation constitutive des sous-unités RelA (p65), RelB et p50 a été mise en évidence dans un panel de cancers, bien que des altérations génétiques de ces mêmes sous-unités soient des événements rares. A côté des sous-unités formant NFκB, une activité IκB faisant défaut a été observée dans plusieurs types de cancers chez l'homme, comme le cancer du sein, du colon, de la vessie ou encore de la prostate (Dolcet et al., 2005). En outre, l'expression des kinases régulant IκB, les IKKs a pu être montrée comme étant corrélée à la progression de certains cancers, mais là encore, l'inverse a été montré avec des expressions minimales voir nulles aussi bien de NFκB que des IKKs. Enfin, des altérations d'autres voie de signalisations connues pour interférer avec la voie de NFκB comme par exemple la voie des MAPK ou de la PI3K/Akt peuvent également intervenir dans l'augmentation d'activation de la voie de NFκB ainsi que les mutations inactivatrices de certains gènes suppresseurs de tumeur comme le PTEN ou encore de proto-oncogènes comme Ras (Dolcet et al., 2005; Finco et al., 1997). Le fait que divers agents chimiothérapeutiques soient capables d'activer ce facteur, suggère également un rôle potentiellement important de ce facteur dans la réponse aux thérapies (Wang et al., 1999b; Wang et al., 1996).



## 4. OBJECTIFS

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication de voies de survies dans la croissance du CCC afin de mieux comprendre à quoi sont dus les phénomènes de résistance *in vivo* du CCC et ainsi essayer d'amplifier l'effet des traitements actuels. Notre hypothèse de travail est que cette résistance pourrait être due à une activation de voies anti-apoptotiques et/ou à une inhibition de voies apoptotiques qui peuvent être constitutives et/ou induites par le traitement.

En considérant le contexte bibliographique décrit précédemment, l'objectif de ma thèse était d'étudier, en relation avec le statut du VHL, l'implication de deux voies anti-apoptotiques dans la croissance du CCC: la voie PI3K/Akt et la voie NFκB. Pour ce faire, nous avons choisi de mener des approches *in vitro* et *in vivo* en parallèle qui seront décrites dans le prochain chapitre.

**Chapitre 2.**

**METHODES EXPERIMENTALES**

## 1. MODELES D'ETUDE

Plusieurs modèles d'étude ont été utilisés. Pour l'étude des voies de signalisation *in vitro*, nous avons utilisé différentes lignées tumorales de CCC humain ainsi que des biopsies humaines (tumeurs et tissus sains correspondants). Sachant que le cancer du rein est sensible à l'action apoptotique des substances utilisées en thérapie sur des modèles *in vitro* mais qu'il est réfractaire à la thérapie *in vivo*, nous avons vérifié les résultats obtenus *in vitro* par implantation en sous-cutanée de cellules tumorales chez la souris nude. Enfin, nous avons confirmé ces résultats grâce à une puce à tissus construite à partir de biopsies de patients. Cette puce nous a également permis de voir si nos différentes cibles pouvaient servir de facteurs pronostiques.

### 1.1. Les lignées cellulaires humaines

Nous disposons au laboratoire de 7 lignées cellulaires issues de CCC humain sporadique, déficientes ou non en VHL. Les lignées 786-0, UOK-126, UOK-128 et A498 sont déficientes en VHL; les lignées ACHN, Caki-1 et Caki-2 expriment le VHL sauvage. Ces lignées cellulaires ont été fournies par ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA), exceptées les UOK-126 et UOK-128 qui nous ont été données par le Dr. P. Anglard (INSERM U575, Strasbourg).

Un premier « *screening* » des voies signalétiques pouvant être impliquées dans la croissance du CCC (et ce, quel que soit le statut en VHL) a été fait sur ces 7 lignées. Pour la suite des expériences, nous avons essentiellement utilisé les 2 lignées 786-0 (exprimant un VHL 1-111 inactif tronqué dans sa partie C-terminale, cellules issues de la tumeur primitive) et Caki-1 (exprimant le VHL sauvage, cellules issues de métastases cutanées).

### 1.1. Les biopsies de carcinomes à cellules rénales humains

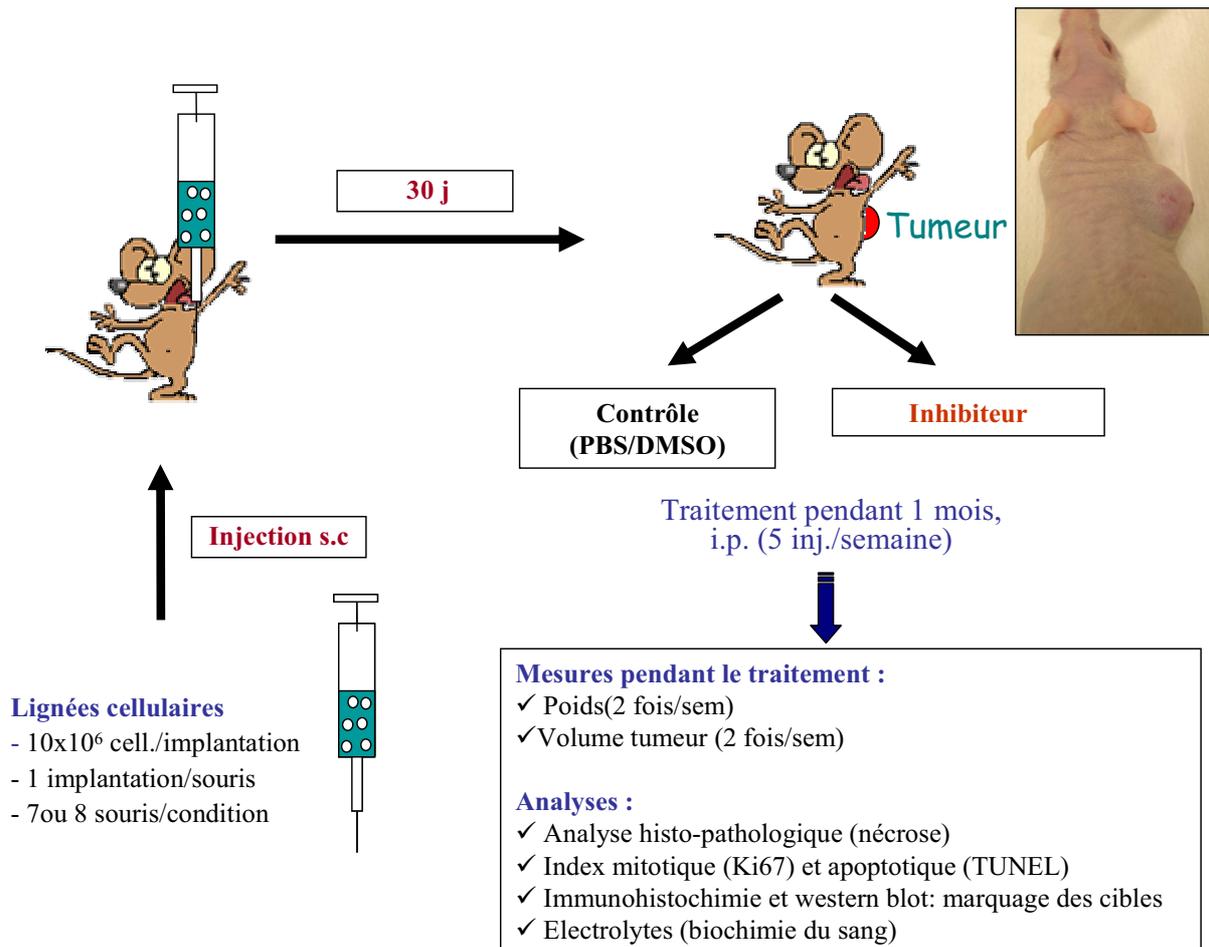
Afin de pouvoir étudier l'expression différentielle de nos cibles entre le CCC et le rein sain, nous avons utilisé 3 biopsies de CCC sporadique ainsi que les tissus sains correspondants. Ces biopsies ont été obtenues grâce à une collaboration avec le Service de Chirurgie Urologique des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) (Prs Didier Jacqmin et Hervé Lang), après consentement éclairé des patients. Les biopsies prélevées avec un temps d'ischémie inférieur

à 30 minutes ont été conservées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation. D'après la classification TNM, il s'agit de tumeurs pT<sub>3b</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>.

## 1.2. Les souris « *nude* »

Toutes les études effectuées ont été faites en suivant les règles bioéthiques et la législation française. Les xénogreffes de CCC humain ont été faites sur des souris « *nude* » athymiques SWISS nu(-/-) (Charles River) âgées de 7 semaines. Les souris ont été maintenues dans des conditions aseptisées ; la nourriture, l'eau et la litière ont été autoclavées et les manipulations ont été effectuées dans une pièce dédiée à l'expérimentation animale.

L'implantation des lignées tumorales (786-0 ou Caki-1) chez les souris anesthésiées à l'isoflurane (anesthésie gazeuse) est réalisée à partir de cellules en phase exponentielle de croissance (80% de confluence). Environ 10 millions de cellules sont injectées en sous-cutané dans le dos des souris, alors âgées de 8 à 9 semaines. Quatre semaines environ après l'injection, le volume des tumeurs est suffisant (environ 120-150mm<sup>3</sup>) pour commencer le traitement des souris. Le volume des tumeurs est mesuré grâce à un pied à coulisse puis calculé selon la formule : longueur x largeur x épaisseur x 0.5236. Les souris sont alors réparties au hasard en groupes de volume moyen équivalent : un groupe contrôle et un groupe traité. Le traitement est réalisé par injections intra-péritonéales, 5 fois par semaine, sur une période d'un mois. Les inhibiteurs utilisés (LY294002 et BAY11-7085) ont été dilués dans un mélange PBS/DMSO (diluent, v/v). Les souris témoins ont été traitées dans des conditions similaires avec le diluent. Le volume des tumeurs et le poids des souris ont été mesurés 2 fois par semaine. A l'issue des protocoles, les souris ont été anesthésiées puis sacrifiées. Le sang ainsi que les tumeurs ont été récupérés. Un certain nombre de paramètres physiologiques (électrolytes, créatinine, urée ...) ont été mesurés dans le plasma. Toutes les tumeurs ont été coupées en 3 parties après dissection et élimination des régions nécrotiques : deux parties ont été congelées dans l'azote liquide afin d'en extraire ensuite les protéines ou les ARN totaux et la troisième partie a été fixée et conservée dans la paraffine pour des analyses ultérieures d'immunohistochimie.



**Figure 12. Protocole d'implantation de xénogreffes et de traitement des souris nude.**

Les lignées tumorales de CCC humain sont injectées en sous-cutané dans le dos des souris nude (environ  $10 \cdot 10^6$  cellules par injection). Après environ 1 mois, les tumeurs ont atteint une taille suffisante pour être traitées (environ  $150 \text{ mm}^3$ ). Le traitement est alors injecté en intrapéritonéal 5 fois par semaine. Les inhibiteurs que nous avons utilisés lors des différents protocoles ont été solubilisés dans un mélange PBS/DMSO (v/v), les souris contrôles sont donc traitées de manière équivalente avec un mélange PBS/DMSO (v/v). Pendant toute la durée du traitement, les souris sont pesées 2 fois par semaine et le volume des tumeurs est mesuré également deux fois par semaine. A la fin de l'expérience, les tumeurs sont prélevées et analysées par immunohistochimie ou western blot. Une biochimie du sang des souris est également effectuée.

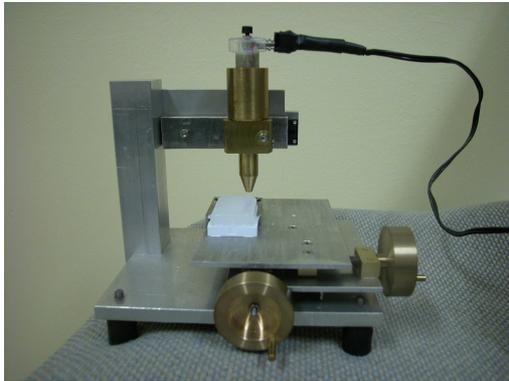
### 1.3. La puce à tissus humain (Tissu Microarray ou TMA)

Nous disposons, grâce à une collaboration avec les Services de Chirurgie Urologique et d'Anatomo-pathologie (Dr Véronique Lindner, Anatomo-pathologiste) des HUS, d'une puce à tissus construite à partir de 241 CCR humains opérés entre 1980 et 1990 au Service de Chirurgie Urologique. Le recul clinique est actuellement de 12 à 22 ans (l'analyse a été faite jusqu'en 2002). Les données cliniques concernant les patients sont répertoriées dans le Tableau 7 ci-dessous.

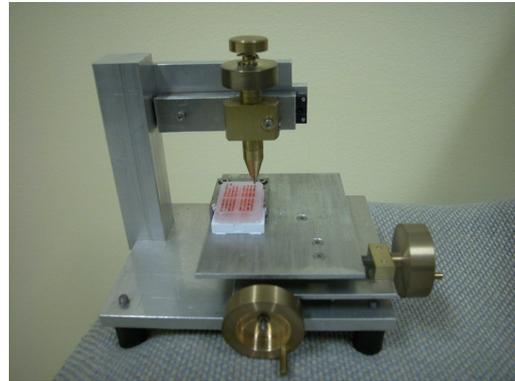
		<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Age</b>	60.98 ans (de 23.44 à 90.07 ans)		
<b>Sexe</b>	Homme	161	66.8
	Femme	80	33.2
<b>Type de CCR</b>	Conventionnel	212	88
	Papillaire de type 1	8	3.3
	Papillaire de type 2	15	6.2
	Chromophobe	6	2.5
<b>Stade pTNM</b>	pT1a	60	24.9
	pT1b	84	34.9
	pT2	22	9.1
	pT3a	26	10.8
	pT3b	49	20.3
<b>Grade de Fuhrman</b>	1	17	7
	2	92	38.2
	3	95	39.4
	4	37	15.4
<b>Microangioinvasion</b>	Présent	70	29
	Absent	171	71
<b>Taille tumeur (cm)</b>	Moyenne : 5.8 (de 1 à 19)		
<b>Mort</b>	Oui	141	58.5
	Non	100	41.5
<b>Origine de la mort</b>	Liée au cancer	19	13.5
	Non liée au cancer	62	44
	Pas d'information	60	42.6

**Tableau 7. Caractéristiques clinico-pathologiques des patients rentrants dans la constitution du TMA.**

Cette puce à tissus, constituée d'un fragment tumoral de haut grade et d'un fragment normal correspondant pour chaque patient, a été construite par le Dr Véronique Lindner grâce à un « *tissu micro-arrayeur* » (Figure 13) fabriqué par Alain Lambert, ingénieur à l'INSERM U727. Après repérage de régions morphologiquement représentatives des biopsies conservées dans des blocs de paraffine, des carottes de 1 mm de diamètre ont été prélevées grâce au « *tissu micro-arrayeur* ». Les carottes ont ensuite été transférées dans un nouveau bloc de paraffine, dit bloc receveur. Au final, cinq blocs de paraffine ont été obtenus. Parallèlement à la puce de constitution « simple », nous avons développé une autre puce à partir de ces biopsies, comportant cette fois deux carottes de fragments tumoraux (un prélevé en haut grade de Fuhrman, un autre en bas grade), une carotte de la jonction tumeur-tissus sain et une carotte prélevée dans le tissu sain de chaque patient. Avec de telles caractéristiques et un tel recul clinique, ces puces sont uniques à l'heure actuelle pour ce qui concerne le CCR humain. Chaque bloc receveur est ensuite coupé en lames de 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, sur lesquelles nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques (Figure 14). Dans le cadre de ma thèse, nous avons voulu regarder l'activité de NF $\kappa$ B dans le CCR. Nous avons donc fait un marquage avec l'anticorps de lapin polyclonal anti-phospho-NF $\kappa$ B (S276) (Ozyme), dilué au 1/50 dans du PBS-Tween, incubé la nuit à 4°C. Un anticorps secondaire anti-lapin couplé à une peroxydase est utilisé pour la détection. Le marquage est révélé à l'aide du kit « *LSAB2-horseradish peroxydase system* » (Dako), selon la procédure décrite par le fournisseur. L'analyse du marquage, faite par Le Dr Véronique Lindner, est basée sur l'intensité de marquage nucléaire. L'intensité du marquage permet une classification en 4 grades : faible, modérée, intense ou nulle (1+,2+,3+, 0). La répartition de ces intensités est ensuite ramenée en pourcentage de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules et analysée statistiquement.

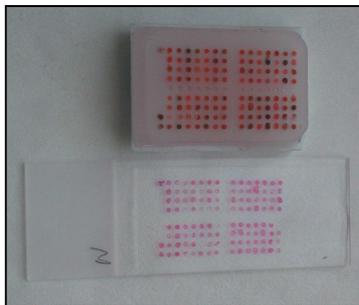


**TMArrayeur avec le bloc receveur**

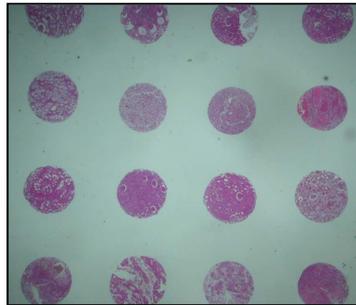


**Bloc receveur en cours de construction**

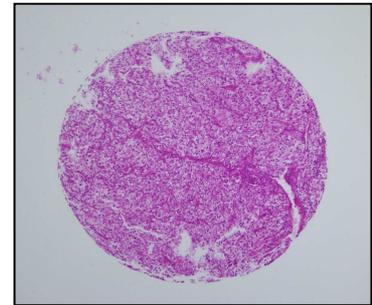
**Figure 13. Le Microarrayeur.**



**a.**



**b.**



**c.**

**Figure 14. Le TMA.**

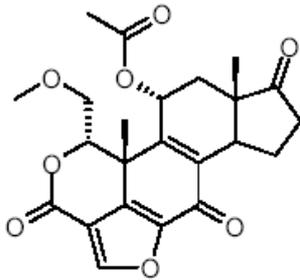
**a.** Vue macroscopique d'un bloc receveur et d'une lame de  $4\mu\text{m}$  d'épaisseur du bloc correspondant, qui a été colorée à l'hématoxyline-éosine. **b.** Microphotographie montrant une vue globale des carottes de tissus (1 mm de diamètre) sur une lame colorée à l'hématoxyline-éosine (grossissement : x 20). **c.** Vision microscopique du TMA avant marquage avec l'anticorps d'intérêt (grossissement : x 100).

## 2. LES INHIBITEURS

Nous avons utilisé deux inhibiteurs sélectifs de chacune des différentes voies signalétiques que nous avons étudiées, afin de déterminer leur implication dans la croissance et la survie du CCC humain.

### 2.1. Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt

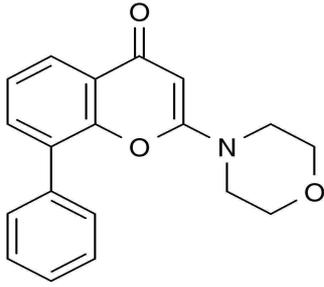
Nous avons utilisé deux inhibiteurs de la PI3K à savoir la wortmannin et le LY294002 (Sigma-Aldrich) (West et al., 2002). Il existe d'autres inhibiteurs de la PI3K tels que la quercétine, la myricétine ou la staurosporine mais ces dernières inhibent également d'autres kinases avec des concentrations d'inhibition moyenne ( $IC_{50}$ ) comparables.



#### *Wortmannine*

Elle inhibe l'activité de la PI3K *in vitro* et *in vivo* avec une  $IC_{50}$  de 2-4 nM, en ciblant le site de liaison de l'ATP de la sous-unité catalytique p110. La wortmannin inhibe irréversiblement la PI3K en se liant à sa sous-unité catalytique.

C'est un métabolite de divers champignons microscopiques. Il est produit à partir de *Penicillium wortmannii* mais est également synthétisé à partir de *Penicillium fusiculosum*, *Myrothecium roridum* ou encore *Fusarium oxysporum*. Les premières publications citant ce composé datent de 1974 (Wiesinger et al., 1974) et 1981 (Closse et al., 1981). Bien que la wortmannine possède une haute sélectivité pour la PI3K, elle inhibe d'autres enzymes, notamment celles contenant des domaines PI3K, mais à des concentrations supérieures à celles nécessaires pour inhiber la PI3K. Ainsi, la wortmannin inhibe également la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), la phospholipase C, la phospholipase D, la phospholipase A2 et la protéine kinase dépendante de l'ADN (« *DNA-dependent protein kinase* »). Dans des études avec la wortmannine, la sélectivité de ses effets vis-à-vis de la PI3K doit donc être confirmée par le LY294002 et/ou des approches génétiques telles que les transfections (West et al., 2002).



### **LY294002**

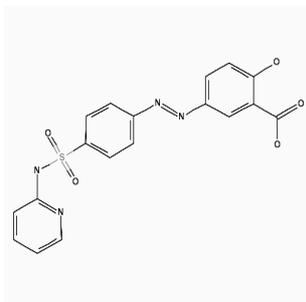
Le LY294002 est un inhibiteur compétitif et réversible du site de liaison de l'ATP. Il a une  $IC_{50}$  de 1,4  $\mu$ M. C'est un dérivé des flavonoïdes et il est spécifique de la PI3K. Il n'inhibe pas d'autres kinases comme la PI4K, l'« *EGF receptor tyrosine kinase* », le c-src, les MAPK, la S6 kinase, la diacylglycérol kinase, la protéine kinase A et la protéine kinase C (West et al., 2002).

### **Sélectivité de ces inhibiteurs vis-à-vis de Akt**

Afin de vérifier que l'effet de ces inhibiteurs passe bien via l'inhibition de l'Akt, nous avons regardé l'effet de ces derniers sur l'état de phosphorylation de l'Akt par western blot, dans les cellules normales ou transfectées transitoirement par diverses constructions plasmidiques codant pour l'Akt native, l'Akt constitutivement active ou un dominant-négatif de l'Akt. Ces vecteurs, ainsi que leur utilisation, sont explicités dans la Publication n° 1 de ce mémoire. Nous avons également utilisé des siRNA dirigés spécifiquement contre Akt1 et comparé leurs effets avec ceux obtenus avec les inhibiteurs.

## **2.2. Inhibiteurs de la voie NF $\kappa$ B**

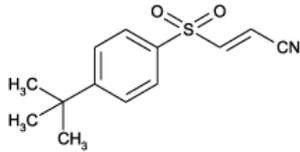
Nous avons utilisé deux activateurs du I $\kappa$ B $\alpha$  : la sulfazalazine et le BAY 11-7085. Ces deux composés traversent les membranes cytoplasmiques. Le BAY 11-7085 est commercialisé par Calbiochem et la sulfasalazine par Sigma-Aldrich. Ces deux produits ont été décrits au départ comme des composés anti-inflammatoires.



### **Sulfazalazine**

C'est le produit synthétique actif d'un médicament développé par la société Pfizer (« *Pfizer Holding France* ») qui porte le nom de Salazopyrine® (AMM 3226880).

La sulfazalazine empêche la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  via l'inhibition de IKK avec une  $IC_{50}$  d'environ 1 mM. I $\kappa$ B $\alpha$  ne peut alors plus se dissocier du dimère NF $\kappa$ B, empêchant ainsi sa translocation nucléaire, bloquant ainsi son activité transcriptionnelle (Wahl et al., 1998; Weber et al., 2000).

**BAY 11-7085**

ou (E)-3-[(4-*t*-Butylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile

Le BAY 11-7085, décrit il y a plus de 10 ans, inhibe la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  avec une IC<sub>50</sub> d'environ 10  $\mu$ M, empêchant ainsi la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  et donc l'activation de NF $\kappa$ B (Pierce et al., 1997). Son activité est similaire à un autre composé, le BAY 11-7082 [(*E*)-3-[(4-*t*-methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile].

**Sélectivité des inhibiteurs vis-à-vis de NF $\kappa$ B**

La sélectivité d'action de ces 2 inhibiteurs a été vérifiée par western blot (visualisation de l'état de phosphorylation de NF $\kappa$ B p65 et d'I $\kappa$ B $\alpha$ ), par microscopie confocale (visualisation de la translocation nucléaire d'NF $\kappa$ B), et par l'utilisation d'un test d'activité transcriptionnelle de NF $\kappa$ B (comparaison avec l'effet de siRNA dirigés spécifiquement contre la sous-unité p65 de NF $\kappa$ B).

### 3. ETUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE

#### 3.1. *in vitro* par western blot

L'expression des protéines étudiées a été visualisée *in vitro* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) suivie d'une immuno-détection indirecte, ou technique de western blot.

Afin d'extraire les protéines totales, pour les cellules en culture, nous utilisons un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,02% azide de sodium, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml aprotinine, 1% NP-40). Après lavage des cellules adhérentes avec du PBS, le tampon de lyse (300 µl pour une boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup>) est ajouté, et incubé 20 min à 4°C. Les cellules sont ensuite grattées et centrifugées (12 000 g, 10 min, 4°C). Le surnageant contenant les protéines est enfin, récupéré. Afin d'extraire les protéines à partir de tissus, ceux-ci sont broyés grâce à un potter dans un tampon A (10% glycérol, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,1 µg/ml aprotinine, 1 mM EDTA, 5 mM orthovanadate de sodium, 1% leupeptine, 760 µg/ml EGTA). Après centrifugation (27 000g, 30 min, 4°C), les culots obtenus sont repris dans un tampon B (tampon A + 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% déoxycholate) puis agités pendant 30 min à 4°C et centrifugés pendant 30 min à 30 000 g, 4°C. Les protéines se trouvent dans le surnageant ainsi obtenu.

De manière classique, la concentration des protéines a été mesurée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) avec une courbe étalon faite avec de l'albumine de sérum bovin. Après ajout de tampon de charge de Laemmli (concentration finale : 32 mM, 1% SDS, 5% glycérol, 0,5% bleu de bromophénol, 3,25% de 2β-mercaptoethanol, pH6,8), les protéines sont dénaturées à 100°C. Les extraits protéiques (10 à 30 µg) sont déposés sur un gel de concentration (acrylamide/bisacrylamide 30%, Tris 1 M, SDS 10%, APS 10%, TEMED) et les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 10%. La migration est effectuée à 150 V pendant 2h. Les protéines sont ensuite transférées avec un système Biorad sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h à 100 V. Une coloration du gel avec du rouge Ponceau, permettant de visualiser l'ensemble des protéines, est généralement réalisée. La membrane est ensuite rincée pendant 5 minutes dans du tampon salin Tris (TBS), pH7,5, contenant 0,1% de tween-20 (TBST), puis saturée 1h sous agitation à température ambiante avec du TBST contenant 5% de lait écrémé. La membrane est alors incubée sous agitation, à

4°C, pendant la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans le TBST contenant 5% de lait écrémé ou pendant 1 h à température ambiante, toujours sous agitation. Les différents anticorps utilisés sont répertoriés dans les différents projets. La membrane est ensuite lavée trois fois avec du TBST, puis incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (chèvre anti-lapin, 1/1000 et chèvre anti-souris, 1/2000). Après 3 lavages avec du TBST, le marquage est révélé par chimioluminescence avec un kit de détection (ECL plus, Enhanced chemiluminescence, Amersham). Différents temps d'exposition sont pratiqués en fonction de l'intensité du signal. Les membranes de nitrocellulose peuvent être utilisées plusieurs fois grâce au kit ReblotPlus (Euromedex, Mundolsheim, France).

### 3.2. *in vivo* par immunohistochimie (IHC)

Nous avons étudié l'expression des protéines cibles *in vivo* par immunohistochimie.

Les tissus prélevés (biopsies humaines ou tumeurs de CCC greffées sur des souris nude) sont fixés dans du formol tamponné (4%). Après différents bains de déshydratation (alcool) et de perméation (xylène), ils sont inclus dans la paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à partir des blocs ; ces coupes sont déparaffinées puis réhydratées. Une coloration hématoxyline-éosine est systématiquement réalisée avant chaque marquage immunohistochimique.

Nous avons essayé autant que possible d'utiliser les mêmes anticorps primaires que ceux utilisés pour les western blot. Après saturation des tissus avec du PBS contenant 5% de BSA pendant 30 min et perméabilisation avec du Triton X-100 0,1% dilué dans PBS/BSA 5%, les tissus sont incubés la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans PBS/BSA 5%. La lame est ensuite lavée 3 fois avec du PBS et incubée avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Des photographies de plusieurs champs représentatifs de la lame sont alors prises. Comme pour le TMA, l'analyse du marquage se fait selon son intensité, classée en 4 grades : faible, modérée, intense ou nulle (1+,2+,3+, 0). La répartition de ces intensités est ensuite ramenée en pourcentage de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules. Là encore, les différents anticorps utilisés sont répertoriés au niveau de chacun des projets.

## 4. LA CROISSANCE CELLULAIRE

Nous avons étudié l'effet des inhibiteurs sur la croissance cellulaire des 786-0 et des Caki-1 et là encore *in vitro et in vivo*. Nous avons également effectué des courbes dose-réponse avec les inhibiteurs *in vitro* sur les cellules 786-0 et Caki-1 afin de déterminer leurs IC<sub>50</sub>.

### 1.1. *in vitro*

#### Densité cellulaire

Le comptage manuel permet de déterminer le nombre de cellules restant attachées au support après traitement. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits (20 000 cellules par puits), et traitées pendant 48 h. Les cellules restantes sont alors comptées avec une cellule de Malassez.

#### Test de MTT

Il permet une quantification de la viabilité cellulaire et donc une estimation de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité des inhibiteurs utilisés. Ce test colorimétrique est basé sur la capacité des cellules viables à réduire le sel de tétrazolium (bromure de 3-(4-5iméthylthiazol-2-yl)-diphényl tétrazolium ou MTT) en formazan, sel insoluble et coloré. Ce produit absorbe fortement entre 550 et 600nm. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 96 puits (10 000 cellules par puits). Après 48 h de traitement avec les inhibiteurs, nous ajoutons 50 µg/ml de MTT. Les plaques sont alors incubées 4 h à 37°C (10% de CO<sub>2</sub>), avant d'ajouter une solution de solubilisation du formazan (H<sub>2</sub>O, 10% SDS, 0,01 M HCl). Après 12 h à 37°C, toujours sous CO<sub>2</sub>, les plaques sont lues à 570nm par un lecteur de plaque (µQuant multiplate reader, Fisher Bioblock Scientific).

Ces tests ne nous donnent aucune information sur la ou les causes de la diminution de la viabilité et de la densité cellulaire. Il est donc impératif de les compléter par d'autres expériences afin d'étudier la mort cellulaire induite par les inhibiteurs.

### 1.2. *in vivo*

Le comptage manuel et le test de viabilité ne sont pas applicables aux échantillons *in vivo*. Afin de visualiser la prolifération cellulaire, nous avons donc réalisé des expériences d'IHC en utilisant un anticorps anti-Ki67.

## 2. LA MORT CELLULAIRE INDUITE

### 2.1. *in vitro*

#### **TUNEL (« Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nicked end labeling »)**

Cette technique permet la quantification *in situ* de la mort cellulaire (préférentiellement l'apoptose), par marquage et détection de la fragmentation de l'ADN résultant de l'activation des endonucléases au cours de l'apoptose. Cette méthode est basée sur le marquage des extrémités 3'-OH libres de l'ADN par la terminal transférase (TdT) : cette enzyme catalyse l'accrochage aux extrémités 3'-OH libres de nucléotides marqués à la fluorescéine conjuguée à une peroxydase. Le marquage est ensuite observé au microscope.

Les cellules sont mises en culture dans des lames à chambres (« *Chamber-slides* ») (50 000 cellules par puits). Elles sont traitées pendant 48 h, puis fixées par un mélange méthanol/acétone (1/1, à 4°C). Les lames sont alors saturées, perméabilisées et marquées selon le protocole fourni avec le kit « *in situ* cell death detection kit, POD » de Roche. Des photographies de plusieurs champs représentatifs des lames sont prises avec un microscope à fluorescence. Le ratio de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules est alors calculé. L'avantage du TUNEL est que cette technique est applicable aussi bien sur des cellules *in vitro*, que sur des tissus. Avec un marquage préférentiel de l'apoptose par rapport à la nécrose, elle permet une estimation de la quantité de cellules apoptotiques, mais la perte de cellules durant la fixation est difficilement quantifiable et l'existence d'un phénomène de nécrose, voire d'autres types de morts cellulaires, n'est pas à exclure.

#### **FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)**

La cytométrie en flux permet la détection de cellules marquées et en suspension grâce à des lasers. Elle permet donc une quantification des cellules ayant subi différents marquages par rapport au nombre de cellules totales. Ces expériences ont été réalisées dans l'unité INSERM U338 sur un FACS Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ).

J'ai réalisé un double marquage annexine V/iodure de propidium afin de distinguer l'apoptose de la nécrose et de quantifier ces deux phénomènes.

L'annexine V marque la phosphatidylsérine (PS) qui est un phospholipide situé uniquement sur le feuillet interne de la membrane cytoplasmique. Au stade précoce de l'apoptose, la PS

transloque sur le feuillet externe de la membrane et peut donc être visualisée avec l'annexine V qui est donc un marqueur précoce de l'apoptose si les cellules ne sont pas perméabilisées. L'iodure de propidium (IP) est quant à lui un intercalant de l'ADN. Quand les cellules ne sont pas perméabilisées, il permet de visualiser l'ADN accessible c'est-à-dire l'ADN des cellules nécrotiques dont les membranes plasmiques se sont rompues. L'IP est donc dans ce cas un marqueur de la nécrose. Quand les cellules sont perméabilisées, il permet de visualiser le cycle cellulaire (en fonction de la quantité d'ADN contenue par les cellules).

Les cellules sont traitées avec les inhibiteurs pendant 48h. Après récupération du surnageant et des cellules adhérentes par plusieurs cycles de lavages au PBS et de centrifugations (2000g, 5min, 4°C), le culot (constitué des corps cellulaires du surnageant et des cellules adhérentes, non perméabilisés) est remis en suspension et incubé 10 minutes dans un tampon d'incubation (140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes) contenant 0,5% d'annexine V couplée à FITC (Roche) et 1 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma), dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite centrifugées et fixées avec du formol 1% (4°C, entre dix min et 5 jours) et peuvent être conservées une semaine. Le jour de l'analyse par FACS, les échantillons sont centrifugés puis le culot est repris dans du tampon d'incubation.

Les avantages de cette méthode sont, d'une part, la reproductibilité des résultats, la détection précoce de l'apoptose, et d'autre part la quantification et la différenciation entre l'apoptose et la nécrose. Les inconvénients sont la perte de corps apoptotiques lors des différentes centrifugations, mais également le fait que cette technique n'est pas applicable aux tissus.

## 2.2. *in vivo*

L'étude de la mort cellulaire induite se fait, comme pour l'étude de la croissance cellulaire, par IHC. La technique de TUNEL étant applicable aux tissus conservés dans des blocs de paraffine, nous avons donc utilisé le même kit que pour la partie *in vitro* qui nous permet d'avoir une estimation de l'apoptose induite.

### 3. ETUDE DE L'ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE DE NFκB

L'activité transcriptionnelle de NFκB a été déterminée grâce au kit « NFκB p50/65 transcription factor assay » (Chemicon), selon le protocole du fournisseur. Cette technique combine le principe de l'EMSA (« *Electrophoretic Mobility Shift Assay* ») avec celui de l'ELISA (« *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* »). Elle permet de détecter spécifiquement la liaison du facteur de transcription NFκB à l'ADN, à partir d'extraits protéiques nucléaires. Les cellules sont traitées avec des inhibiteurs ou en contrôle avec du DMSO. L'extraction des protéines nucléaires se fait grâce à un kit d'extraction protéique (« *Nuclear extraction kit* », Chemicon) et leur concentration est mesurée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). Le volume des échantillons est alors ajusté avec du PBS froid (4°C) afin d'avoir une concentration finale des échantillons comprise entre 2,5 et 5 mg/ml. Les extraits nucléaires sont ensuite mélangés avec un oligonucléotide biotinylé contenant la séquence consensus de liaison à l'ADN de NFκB (5'-GGGACTTCC-3'). Les formes actives de NFκB qui contiennent cette séquence consensus, se lient à cet oligonucléotide biotinylé. Le mélange est alors directement transféré sur la plaque 96 puits contenant de la streptavidine. Après lavages, seuls les complexes NFκB actifs liés aux oligonucléotides biotinylés sont retenus sur la plaque. La liaison de NFκB sur la plaque est visualisée avec deux anticorps primaires de lapin : le premier étant dirigé contre NFκB p50 et l'autre contre NFκB p65. Un anticorps secondaire couplé à une peroxydase est ensuite utilisé afin de visualiser les complexes de NFκB actifs liés sur la plaque 96 puits. La détection colorimétrique est réalisée avec un spectrophotomètre à 450nm (μQuant multiplate reader, Fisher Bioblock Scientific).

## 4. STATISTIQUES

### **Analyses statistiques**

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  s.e.m. Elles sont comparées en utilisant une analyse multifactorielle de la variance, basée sur le test de Student-Newman-Keul pour les comparaisons multiples. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque  $p$  est inférieur à 0,05.

### **Analyse statistique du TMA humain**

La survie a été définie comme le temps entre la néphrectomie et la mort du patient. Un test non paramétrique de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis a été effectué afin de déterminer la significativité du marquage du NF $\kappa$ B activé avec les caractéristiques du patient, à savoir le sexe, le grade de Fuhrman, l'angioinvasion, la dimension tumorale et le stade TNM. Afin de déterminer si l'expression du NF $\kappa$ B activé est associée avec le pronostic du patient, nous avons utilisé la méthode de Kaplan-Meier (avec « *Log Rank test* »). L'analyse multivariée du pronostic a été effectuée en utilisant le modèle de hasard proportionnel de Cox. Le grade et le stade de la tumeur ont été utilisés comme paramètres dans cette analyse. L'analyse informatique a été faite en utilisant le logiciel SPSS 13.0. Un  $P < 0,05$  a été considéré comme significatif. L'analyse statistique du TMA humain a été réalisée par Nicolas Meyer, statisticien (département de Santé Public, HUS, Strasbourg).

## **Chapitre 3.**

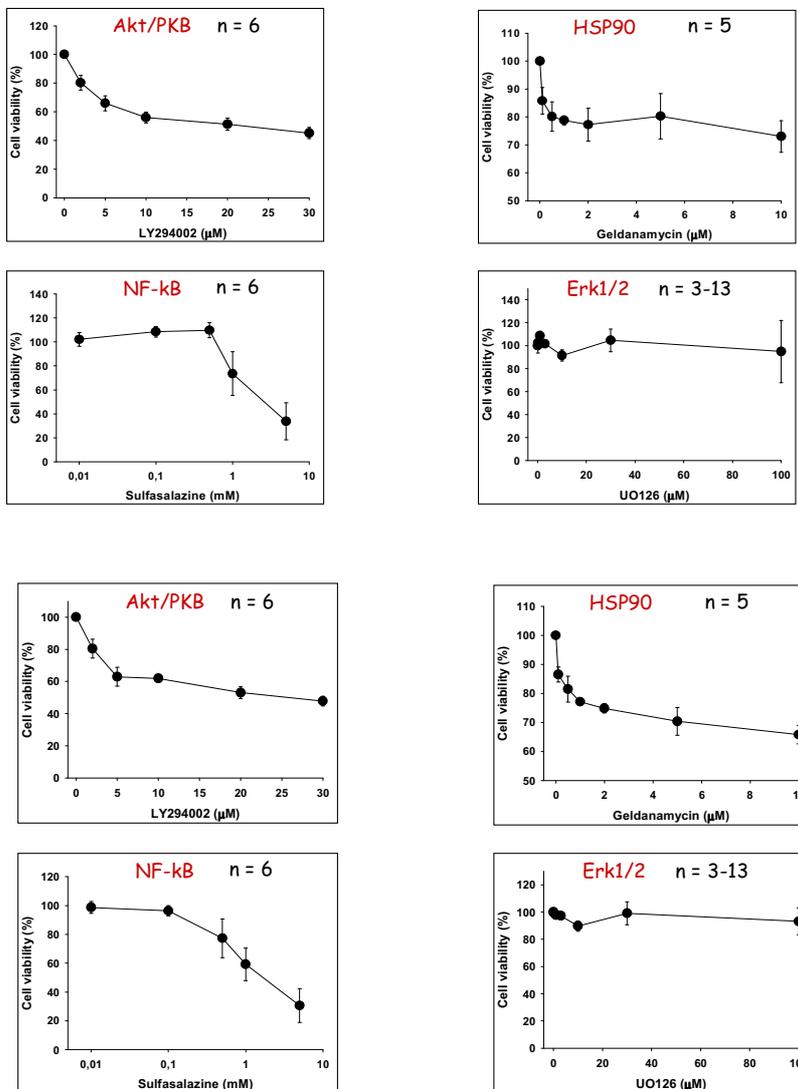
# **IDENTIFICATION DE VOIES DE SURVIE DANS LE CCC**

Présentation sous forme de deux publications

## 1. SCREENING DE VOIES DE SURVIE

Des résultats préliminaires au laboratoire ont montré, sur deux lignées cellulaires de CCC humain déficientes ou non en VHL, que les inhibitions de PI3K/Akt (par le LY294002), de hsp90 (par la geldanamycine) et de NFκB (par la sulfasalazine) entraînaient une diminution de la viabilité cellulaire *in vitro*, alors que l'inhibition de ERK1/2 (par UO128) n'avait aucun effet (Figure 15).

Notre premier objectif a donc été de déterminer le rôle de la voie PI3K/Akt dans la croissance du CCC *in vitro* et *in vivo*.



### A. 786-0

Une courbe dose-réponse avec les 4 inhibiteurs a été réalisée afin de déterminer quels sont leurs effets sur la viabilité cellulaire (test MTT).

L'inhibition de la PI3K, de hsp90 ainsi que de NFκB diminue de la viabilité cellulaire alors que l'inhibition de ERK1/2 ne l'affecte pas. Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée Caki-1.

### B. Caki-1

Figure 15. Screening de différentes voies de survie impliquées dans le CCC par un test de viabilité MTT.

## **2. ETUDE DE LA VOIE PI3K/Akt**

### **2.1. Publication n°1**

The Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway: A New Target  
in Human Renal Cell Carcinoma Therapy

*[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SICD – Service des thèses électroniques]*

**The Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway: A New Target in Human Renal Cell Carcinoma Therapy**

**Carole Sourbier**, Véronique Lindner, Hervé Lang, Abdelali Agouni, Eric Schordan, Sabrina Danilin, Sylvie Rothhut, Didier Jacqmin, Jean-Jacques Helwig, et Thierry Massfelder

**Cancer Research, 2006, Vol. 66, Pages 5130-5142**

Pages 5130 à 5142 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/66/10/5130>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)

## 2.2. Résumé

La voie PI3K/Akt est impliquée dans différents processus biologiques tels que la croissance, la transformation cellulaire et la néo-vascularisation. Dans ce travail, nous avons étudié l'implication de cette voie dans la croissance et la survie du CCC afin de déterminer si la voie PI3K/Akt pouvait avoir un intérêt thérapeutique.

L'activation de la voie PI3K/Akt et son rôle dans la croissance cellulaire ont été évalués *in vitro* sur 7 lignées de CCC humain par western blot, comptage cellulaire manuel, test de viabilité (MTT), TUNEL, et cytométrie en flux. Nous avons utilisé 2 inhibiteurs de la PI3K, le LY294002 (LY) et la wortmanine, et nous avons vérifié la spécificité de ces derniers par transfection de différentes constructions de l'Akt (vecteur seul, Akt sauvage, dominant positif et dominant négatif) et par transfection de siRNA dirigés contre Akt1. *In vivo*, nous avons réalisé des xénogreffes en sous-cutané sur des souris nude avec une lignée de CCC humain déficiente en VHL, les cellules 786-0. Lorsque les greffes ont atteint une taille d'environ 140mm<sup>3</sup>, nous les avons traitées pendant 4 semaines en intra-péritonéal avec le LY, à raison de 75 mg par kg et par semaine. La taille des tumeurs et le poids des souris ont été mesurés 2 fois par semaine. A la fin de l'expérience, les tumeurs ont été prélevées et analysées par western blot et immunohistochimie.

Nous avons montré que l'Akt, tout comme certaines de ses cibles connues telle que la GSK3, est constitutivement active aussi bien dans les cellules en culture, et ce indépendamment du statut en VHL, que dans des biopsies de CCC provenant du Service de Chirurgie Urologique des HUS. D'autres cibles de l'Akt comme le facteur de transcription de la famille forkhead (FKHR) et mTOR, bien qu'exprimées, ne sont pas phosphorylées dans nos lignées. Les inhibiteurs de la PI3K diminuent l'activation de l'Akt ainsi que la phosphorylation de GSK3, et diminuent la croissance cellulaire d'environ 70% par induction de l'apoptose. Ces résultats ont été vérifiés par transfection de différentes constructions de l'Akt et par les siRNA spécifiques de cette dernière. *In vivo*, le traitement par le LY de souris nude greffées avec des lignées CCC humain, induit une régression tumorale significative d'environ 20% qui est due à une augmentation de l'index apoptotique, l'index prolifératif n'étant pas affecté. Le traitement induit également de façon significative, une augmentation de la néo-vascularisation des tumeurs. Les effets bénéfiques obtenus avec le LY ne sont pas associés à des effets délétères dans nos conditions expérimentales. Nos résultats mettent ainsi en évidence l'importance de la voie PI3K/Akt dans la croissance du CCC *in vitro* et *in vivo* et suggèrent l'intérêt potentiel de l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie dans de futures thérapies du CCR humain.

### 2.3. Discussion

Lors de l'initiation de ce projet, aucune donnée bibliographique ne suggérait l'implication de la voie PI3K/Akt dans la croissance du CCC humain. En effet, l'implication possible de l'Akt dans le CCR humain avait été étudiée seulement dans quatre publications. En 2003, une publication montrait, par immunohistochimie sur 48 patients atteints de CCR, que l'Akt est active dans les tumeurs de plus haut grade et que son activation est corrélée avec les cas de CCR métastatiques (Horiguchi et al., 2003). Deux autres publications mettaient en évidence *in vitro* une relation entre l'Akt et les phénomènes apoptotiques. Ainsi, Asakuma et al. ont montré que l'Akt est impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par le TRAIL (« TNF-related apoptosis-inducing ligand ») *in vitro* sur deux lignées de CCR humain, Caki-1 et SKRC-49, et Woo et al. ont montré que l'apoptose induite par le curcumin dans la lignée cellulaire Caki-1 est due à une inhibition de l'Akt (Asakuma et al., 2003; Woo et al., 2003). Enfin, en étudiant la stabilisation et la régulation de HIF1 $\alpha$  dans les CCR humains, Zhou et al. ont démontré que l'activation de la voie PI3K/Akt provoque l'expression des protéines chaperonnes hsp90 et hsp70, permettant ainsi la stabilisation de HIF1 $\alpha$  (Zhou et al., 2004). En résumé, aucune publication ne concernait directement l'implication de la voie PI3K/Akt dans le CCR ; de plus, les résultats de ces travaux ont été obtenus *in vitro* avec seulement 2 lignées de CCR humain et n'ont pas été confirmés *in vivo*.

Lors de ce travail, nous avons montré que la voie PI3K/Akt est constitutivement active dans le CCC humain et qu'elle est également impliquée dans la croissance des cellules de CCC *in vitro* et *in vivo*, son inhibition induisant une régression tumorale de 20%. Cibler cette voie pourrait donc avoir un intérêt thérapeutique dans le CCC humain, quel que soit l'expression du gène suppresseur de tumeurs VHL. Parmi les substrats connus de l'Akt, mTOR et FHKR ne sont pas activés par celle-ci dans les lignées de CCC humain utilisées lors de nos expériences. Cependant, des essais cliniques avec des inhibiteurs de mTOR et des facteurs de transcription FHKR sont en cours et se révèlent prometteurs (van Spronsen et al., 2005a). Bien que cela semble contradictoire avec nos résultats, il est possible que l'activation de ces substrats par l'Akt dépende du stade de la tumeur, nos résultats suggérant que l'activité des ces deux substrats n'est pas dépendante du statut en VHL. Il serait intéressant de compléter cette étude avec des biopsies de CCC humain à différents stades (pT1 à pT4) afin de vérifier cette hypothèse et de définir à quel stade mTOR et FHKR sont activés. Cela pourrait, par la suite, permettre de mieux cibler les traitements des CCC humains en fonction du stade de la tumeur.

Depuis la soumission du manuscrit, de nombreuses publications sont parues concernant l'implication de l'Akt dans le CCR humain et confirmant nos résultats. Ainsi, en 2005, Yu et al. ont testé les effets d'un analogue de la wortmanine, le PWT-458, sur des xénogreffes issues de lignées cellulaires de différents cancers sur des souris nude (Yu et al., 2005). Ils ont montré que cet inhibiteur de la voie PI3K/Akt associé à l'IFN $\alpha$ , induit de fortes régressions tumorales des greffes issues de la lignée cellulaire A498. Hara et al. ont montré également en 2005, que l'activité de l'Akt dans les CCR pourrait être due à une diminution de l'expression de PTEN et que, en accord avec nos résultats, l'utilisation d'inhibiteurs de l'Akt pourrait être une nouvelle option thérapeutique du CCR humain (Hara et al., 2005). Lin et al. ont d'ailleurs récemment montré, sur des lignées de CCR humains, qu'une déficience en PTEN induit une activation de l'Akt conduisant à une stabilisation de p21. Cette accumulation de p21 rend les cellules résistantes à la cisplatine. Les auteurs en concluent que des inhibiteurs de p21 pourraient sensibiliser les tumeurs de CCR déficientes en PTEN à la chimiothérapie (Lin et al., 2007). Un autre sujet largement abordé dans la littérature est l'implication de mTOR dans le CCR et donc l'étude de l'axe PI3K/Akt/mTOR (Faivre et al., 2006; Gemmill et al., 2005; Lin et al., 2006; Morgensztern & McLeod, 2005; Pantuck et al., 2006).

Au cours de ce travail, nous avons identifié deux cibles phosphorylées par l'Akt, GSK3 et NF $\kappa$ B. La voie de la GSK3 est impliquée dans de nombreux processus cellulaires dont la prolifération, la mort cellulaire et le métabolisme du glycogène. Cette sérine/thréonine kinase a une double particularité : son activité est inhibée par phosphorylation (par exemple par Akt) et elle phosphoryle préférentiellement des substrats déjà phosphorylés par d'autres kinases comme la caséine I. Il existe deux isoformes de GSK3 : GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$ , qui sont structurellement très proches mais qui présentent des activités biologiques différentes. La GSK3 fait partie de nombreux complexes protéiques et elle est impliquée dans des voies de signalisations dont la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Jope & Johnson, 2004). Toute dérégulation de cette voie peut conduire à un développement cellulaire anormal. Par exemple, l'accumulation de  $\beta$ -caténine, due à des mutations ou à une inhibition de GSK3, est retrouvée dans de nombreux cancers tels que des mélanomes, le cancer de l'endomètre et les médulloblastomes (Kim & Kimmell, 2000). GSK3 permettant la dégradation de la  $\beta$ -caténine, elle peut être considérée comme un suppresseur de tumeur (Jope & Johnson, 2004; Kim & Kimmell, 2000; Morin, 1999), alors que les kinases inhibant GSK3 comme l'Akt ou la PKA peuvent être considérées comme des pro-oncogènes, leur dérégulation pouvant également conduire à un développement cellulaire anormal. Il faut noter que GSK3 a plus d'une quarantaine de

substrats dont environ une douzaine de facteurs de transcription dont NFκB (Jope & Johnson, 2004).

La voie du facteur de transcription NFκB est impliquée dans divers processus biologiques tels que l'immunité, l'inflammation ou la prolifération cellulaire. De récentes études ont montré l'implication de cette voie dans la croissance et la résistance aux thérapies de différents cancers comme le cancer du sein (Zhou et al., 2005) ou de l'ovaire (Ahmed et al., 2006; Liu et al., 2006; Ohta et al., 2006). Il nous a paru intéressant de continuer ce travail par l'étude de la voie NFκB et de son implication dans la croissance du CCC humain.

### **3. ETUDE DE LA VOIE NF $\kappa$ B**

#### **3.1. Publication n°2**

**Targeting the NF-kappa B rescue pathway :  
the ultimate avenue for renal cell carcinoma therapy?**

# **Targeting the NF-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy**

Carole Sourbier,<sup>1</sup> Sabrina Danilin,<sup>1</sup> Véronique Lindner,<sup>2</sup> Jacques Steger,<sup>1</sup> Sylvie Rothhut,<sup>1</sup> Nicolas Meyer,<sup>3</sup> Didier Jacqmin,<sup>4</sup> Jean-Jacques Helwig,<sup>1</sup> Hervé Lang,<sup>4</sup> and Thierry Massfelder<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>INSERM U727, Section of Renal Pharmacology and Physiopathology, University Louis Pasteur, School of Medicine, Strasbourg, 67085 France; Hôpitaux Universitaires de Strasbourg <sup>2</sup>Department of Pathology, <sup>3</sup>Department of Statistics and <sup>4</sup>Department of Urology, Strasbourg, 67091 France*

Requests for reprints: Dr Thierry Massfelder, PhD, INSERM U727, Section of Renal Pharmacology and Physiopathology, University Louis Pasteur, School of Medicine, Strasbourg, 67085 France; Phone : 333-90-24-34-56; Fax : 333-90-24-34-59; email: [thierry.massfelder@medecine.u-strasbg.fr](mailto:thierry.massfelder@medecine.u-strasbg.fr)

Running title: NF-kB signaling pathway in renal cell carcinoma

Abbreviations: RCC, renal cell carcinoma; VHL, von Hippel-Lindau; NF-κB, nuclear factor kappa enhancer binding protein; siRNA, small interfering RNA; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

## ABSTRACT

Metastatic renal cell carcinoma (RCC) remains refractory to therapies. The NF- $\kappa$ B transcription factor is involved in cell growth, cell motility and vascularization. We evaluated whether targeting NF- $\kappa$ B could be of therapeutic and prognostic values in human RCC. The activation of the NF- $\kappa$ B pathway in human RCC cells and tumors was investigated by western blot. *In vitro*, the effects of BAY 11-7085 and sulfasalazine, two NF- $\kappa$ B inhibitors, on tumor cell growth were investigated by cell counting, MTT analysis, TUNEL and fluorescence-activated cell sorting. Their specificity towards NF- $\kappa$ B was analyzed by western blot, confocal microscopy, NF- $\kappa$ B siRNA and NF- $\kappa$ B transcription assay. *In vivo*, the effects of BAY 11-7085 on the growth of human RCC tumors was investigated in nude mice. A tissue microarray (TMA) containing 249 cases of human RCC with 12-22 years of clinical follow-up and corresponding normal tissues was built-up to assess prognostic significance of activated NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B is constitutively activated in cultured cells expressing or not the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene as a consequence of Akt kinase activation, and in tumors. *In vitro* and *in vivo* NF- $\kappa$ B inhibition blocked tumor cell growth by inducing cell apoptosis. On the TMA, NF- $\kappa$ B activation was correlated with tumor dimension, but was not found to be an independent prognostic factor for patient survival. This report provides strong evidence that the mechanisms responsible for the intrinsic resistance of RCC cells to apoptosis converge on NF- $\kappa$ B independently of VHL expression and that targeting this pathway has great anticancer potential.

## INTRODUCTION

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 3% of adult malignancy and more than 90% of adult renal neoplasms. RCC is among the first ten leading cause of cancer-related death worldwide (1). Metastatic RCC is resistant to radiotherapy and to systemic therapy (2). However, it should be stressed that recent advances in understanding the biology of human RCC have led to novel targeted therapeutic approaches with higher response rates, especially inhibitors of tyrosine kinase receptors such as sunitinib or sorafenib that have been approved by the FDA for the treatment of advanced kidney cancer (3, 4). Unfortunately, the clinical response to these agents is limited in time due to the development of tumor resistance by still unknown mechanisms. New therapeutic options, including combination regimens, have still to be uncovered.

Biallelic inactivating mutations of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene occur in patients with the VHL syndrome and in most patients with sporadic RCC (5, 6). The VHL gene products (pVHL) are involved in the degradation of hypoxia-induced transcription factors (HIF) leading to the down-regulation of several angiogenic and growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), that contribute to RCC tumorigenesis (7).

The nuclear factor kappa enhancer binding protein (NF- $\kappa$ B) transcriptional pathway is involved in many fundamental biological processes including immunity, inflammation, angiogenesis, cell migration, cell proliferation and apoptosis (8). Two NF- $\kappa$ B activation pathways exist. In the classical pathway, NF- $\kappa$ B consists essentially of the heterodimers Rel A (p65)/p50. In resting conditions, NF- $\kappa$ B is maintained in an inactive state in the cytoplasm through binding to the endogenous inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ . Upon stimulation by G-protein coupled receptors or tyrosine kinase receptors ligands, the I $\kappa$ B kinase (IKK) tripartite complex may be activated leading to I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and degradation by a proteasome-mediated process. This releases NF- $\kappa$ B from the negative regulation of I $\kappa$ B exposing its nuclear

localization signal allowing it to translocate to the nucleus where it exerts its transcriptional activity (8). The activation of the IKK complex may be achieved through different ways including phosphorylation by mitogen-activated protein kinase (MAPK) or Akt (8). The classical pathway is responsible for inhibition of programmed cell death in most conditions (8, 9).

RCC is characterized by a high resistance to tumor cell apoptosis both intrinsic and induced by radiation or systemic therapies including chemotherapy and immunotherapy. This latter points are clearly evidenced by more than 200 clinical trials showing poor response rates ranging from 0 to 15% in metastatic RCC (2). Such resistance is not observed in vitro in cultured cells and strongly suggests that RCC cells acquire, in the in vivo environment, a phenotype that renders them resistant to apoptosis. The mechanisms of this resistance are not elucidated. Recent data in other tumors including tumors from the pancreas, the bladder, the ovary, the breast or the lung suggest that survival signaling pathways such as the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt or MAPK Erk1/2 pathways are involved in the resistance of these tumors to current chemotherapies using apoptotic compounds (10-12). Interestingly, in these studies, synergistic effects on apoptosis have been obtained using low concentrations of inhibitors of these pathways and chemotherapeutic agents such as paclitaxel or vinblastine (10-12). This is particularly interesting in a clinical point of view because this could decrease by some decades the concentrations needed of the chemotherapeutic agent and thus its adverse effects. The results obtained by various investigators have ruled out the involvement of multidrug resistance gene in human RCC resistance (2, 13). We have recently shown the critical role played by the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway in human RCC growth (14). In this study, this pathway was found to be constitutively activated and found to promote inhibition of tumor cell apoptosis both in vitro and in vivo. However, the downstream target(s) of Akt responsible for its survival effect were not investigated. In their recent study, Oka et al. (15) have shown that inhibition of NF- $\kappa$ B phosphorylation/activation

with parthenolide slows down RCC tumor (OUR-10 cells) growth in nude mice through induction of tumor cell apoptosis. This study is interesting since the activity of NF- $\kappa$ B is known to be regulated by Akt.

The present study was conducted to characterize the intracellular pathways involved in human RCC tumorigenesis and to identify molecular targets that might be used to design efficient, targeted and safe therapies for this refractory disease. We found that the NF- $\kappa$ B signaling pathway plays a fundamental role in promoting growth and that the intrinsic resistance of RCC to cell apoptosis converges on NF- $\kappa$ B independently on the VHL status. Targeting NF- $\kappa$ B or one of its downstream target genes specific for RCC may thus constitute potential targets for therapeutic intervention.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cells and Cell Culture**

Human clear RCC cell lines either deficient in VHL (786-0, UOK-126, UOK-128 and A498) or expressing VHL (ACHN, Caki-1 and Caki-2) were maintained in DMEM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and used at 80% confluence, unless otherwise specified. These cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia) except UOK-126 and UOK-128 that were generously given by Dr P. Anglard (INSERM U575, Centre de Neurochimie, Strasbourg, France) (16).

### **Human Tumor Biopsies**

The tumor and normal corresponding tissues of 3 patients with sporadic CCC were obtained from the Urology department (University Hospital of Strasbourg). Informed consent was obtained from all patients. The tumors were staged pT3bN0M0, according to TNM classification (17, 18). Immediately after surgical resection tissues were flash frozen and kept in liquid nitrogen until protein expression analysis.

### **Small Interfering (si)RNA Transfection**

siRNA duplexes specific for human NF- $\kappa$ B p65 subunit and control non-silencing siRNA were obtained from Ozyme (Cell Signaling local distributor, St Quentin Yvelines, France). Transient transfection of RCC cells in 25cm<sup>2</sup> plates (20,000 cells/ml) was performed according to the manufacturer's instructions.

### **Western Blot Analysis**

Tumor tissue or whole cell lysates were prepared in lysis buffer (14). Protein concentrations were determined according to the method of Lowry et al. (20). The membranes were incubated for 24h at 4°C with 1/250 dilution of the following primary antibodies (Ozyme, France): polyclonal rabbit anti-NF- $\kappa$ B p65 antibody and polyclonal rabbit anti-phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S536) antibody; polyclonal rabbit anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  antibody and monoclonal mouse anti-phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  (S32/36) (5A5) antibody. For visualization of protein gel loading, a monoclonal mouse anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was used at 1/5000 dilution. The appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used (14). Immunoreactivity was visualized with the ECL Western blotting detection kit (Amersham, Courtaboeuf, France). Phospho-NF- $\kappa$ B to total NF- $\kappa$ B ratios and phospho-I $\kappa$ B to total I $\kappa$ B ratios were calculated using Adobe Photoshop version 7.0 analysis software.

### **Cell Proliferation Measurements**

RCC cell proliferation was assessed by counting adherent cells, as described (14). RCC cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 48 h and then treated for 48 h with various concentrations of the NF- $\kappa$ B inhibitors BAY 11-7085 [(*E*)-3-[(4-*t*-butylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile] (0-30 $\mu$ M) (VWR International, Strasbourg, France) or sulfasalazine (0.1-10mM) (Sigma-Aldrich).

### **Cell Viability Measurements**

RCC cell viability was assessed by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay (Sigma-Aldrich) in cells treated as above (14, 21).

### **TUNEL Staining**

RCC cells were seeded in 4-well Tissue-Tek chamber slides (20000 cells/ml), grown for 48 h and then treated with either NF- $\kappa$ B inhibitor or DMSO alone (Ctl) for 24 h or 48 h. RCC cell death was assayed as described (14) by the TUNEL (Tdt dependent, dUTP-biotin Nick End Labelling) method. Total and stained cells in 10 fields (0.25mm<sup>2</sup> each) were counted and cell death, which was expressed as a percentage of stained cells to total cells.

### **Fluorescent-Activated Cell Sorting (FACS) Analysis**

RCC cells were seeded in 25cm<sup>2</sup> plates (20,000 cells/ml) and treated as above. FACS analysis was performed exactly as described (14) using annexin V-FITC and propidium iodide, except for sulfasalazine experiments that were performed using annexin V alone since sulfasalazine has the same color than propidium iodide in solution. To ensure that cell death was due to cell apoptosis, we also performed DNA fragmentation assay in cells treated with sulfasalazine. In some experiments, the cell-permeable pan caspase inhibitor Boc-Asp (Ome)-fluoro-methylketone (B-D-FMK, Enzyme Systems Products, Livermore, CA) was used. In this case, RCC cells were treated for 48 h with 20 $\mu$ M BAY 11-7085 or 0.2 mM sulfasalazine in the presence or absence of 40  $\mu$ M B-D-FMK.

### **DNA Fragmentation Assay**

Experiment was performed as described previously (19).

### **Confocal Microscopy**

RCC cells were plated in 4-well chamber slides (20,000 cells/ml) for 48h and then treated with either NF- $\kappa$ B inhibitor or DMSO alone (ctl) for 8h. Tumor cells were fixed with paraformaldehyde at 4% for 20 min at 4°C and then permeabilized with Triton X100 at 0.5% for 5 min. Slides were saturated in BSA at 3% for 30 min and incubated with monoclonal mouse anti-NF-kappaB p65 (Tebu-Bio, Santa Cruz biotechnology local distributor, Le Perray en Yvelines, France) and polyclonal rabbit anti-phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S276) (Abcam, Paris, France) primary antibodies diluted at 1/50 and 1/25, respectively, in BSA 1.5%, at 4°C

overnight in a wet atmosphere. Slides were then washed three times for 10 min in PBS and incubated with polyclonal mouse and rabbit secondary antibodies coupled respectively to A555 and A488 (Invitrogen) diluted at 1/500 in BSA 1.5% at room temperature for 1h in the dark. Slides were washed two times 10 min in PBS 1x and one time 10 min in bidistilled water and were mounted with aquamount and analyzed by confocal microscopy (Zeiss invert microscope LSM 510).

### **NF- $\kappa$ B Transcriptional Activity Measurement**

It was assayed using the non-radioactive NF- $\kappa$ B p50/p65 transcription factor assay (Chemicon, Hampshire, United Kingdom), according to the manufacturer's protocol.

### **RCC Tumor Model**

**Tumor Implantation and Growth.** All animal studies were in compliance with the French animal use regulations. Xenografts with 10 millions of 786-0 or Caki-1 cells were performed on 20 seven week old male Swiss Nu/Nu nude mice each (Iffa-Credo, St Germain sur l'Arbresle, France) (14). One group was treated with BAY 11-7085 (one injection daily of 5 mg/kg, ip) dissolved in DMSO/PBS (diluent, 1/1, v/v). The other group was treated with the diluent alone(Ctl). The average volume of the tumors were  $155.56 \pm 38.34 \text{ mm}^3$  (Ctl) and  $160.36 \pm 36.05 \text{ mm}^3$  (BAY 11-7085, not significant) for 786-0 tumors, and  $117.03 \pm 36.76 \text{ mm}^3$  (Ctl) and  $125.42 \pm 47.11 \text{ mm}^3$  (BAY 11-7085, not significant) for Caki-1 tumors. The tumor volumes and animal weight were measured two times per week during the treatment period.

The tumors were harvested, paraffin-embedded and cut in four  $\mu\text{m}$ -thick sections for subsequent immunohistochemistry analysis (19). A TMA was built-up by taking a 1 mm cylindrical sample from each tumor. To assess the possible relationship between Akt (14) and NF- $\kappa$ B activations, we built-up a TMA including samples from tumors grown in mice treated with the PI3K/Akt inhibitor LY294002 (14). Staining with polyclonal rabbit anti-NF- $\kappa$ B p65 and anti-phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S536) antibodies at 1/250 dilution were performed.

**Immunohistochemistry.** TMA sections were processed as described (14) using the following primary polyclonal rabbit antibodies obtained from Ozyme: polyclonal rabbit anti-phospho Akt (S473) and anti-phospho NF- $\kappa$ B p65 (S276) at 1/50 dilution; polyclonal rabbit anti-phospho-GSK3 $\beta$  (S9) at 1/25 dilution. Endometrial and prostatic adenocarcinoma samples were incorporated in the TMA and used as positive tissue controls in all TMAs used. Negative control reaction was performed by omitting the primary antibody.

The scoring was based on cytoplasmic, nuclear staining or both for phospho-GSK3 $\beta$ , phospho-NF- $\kappa$ B and phospho-Akt expression, respectively. Staining intensity was graded as weak, moderate, intense or negative (1+,2+,3+,0) and plotted as shown in the corresponding figures.

**Proliferative and Apoptotic Index.** Both indexes were determined as described (14) using a mouse monoclonal anti-human Ki67 antibody (Mib-1) (Dako) and the TUNEL method (Roche Diagnostics), respectively. Stainings were quantified in a blinded fashion by an experienced urologic histopathologist (Dr Véronique Lindner, Department of Pathology, University Hospital, Strasbourg, France).

**Neovascularization.** Tumor sections were stained for endothelial cells with a rabbit polyclonal anti-human factor VIII antibody (Dako) using a standard immunohistochemistry method described previously (19). Quantifications of both vessel intersecting points and the total number of vessels were performed as previously described (14, 19, 22).

#### **Tissue Microarray of Human RCC.**

**Patients and Clinical Data.** From January 1980 to December 1990, 255 RCC patients were subjected to radical nephrectomy in the Urology department of the University Hospital of Strasbourg. The tumors were staged according to TNM classification (17, 18) and ranged from pT1a to pT3bN0M0. The characteristics of the population are summarized in Table 1 (supplemental data). Four patients were lost during follow-up. Death occurred in 141 cases.

In a multicentric and retrospective study, these tumors were graded according to the

Fuhrman's classification by three independent urologic histopathologists (23).

**Tissue Microarray and Immunohistochemistry.** RCC tumors biopsies were fixed in buffered formalin and paraffin-embedded. For each patient, normal kidney tissue was available in the renal biopsies. After selection of morphologically representative regions of individual paraffin-embedded renal tumors, core biopsies of 1mm in diameter of tumor and corresponding normal tissue were taken and transferred to a recipient paraffin block using a custom-built microarrayer. Four  $\mu\text{m}$ -thick sections were prepared and used for subsequent immunohistochemistry analysis.

Sections were processed as described above and using a polyclonal rabbit anti-phospho-NF- $\kappa\text{B}$  (S276) (Ozyme) at 1/50 dilution in PBST buffer overnight at 4°C. Standard indirect immunoperoxidase procedures were used for visualization.

The scoring was based on nuclear staining and scored as described above. The distribution was graded in percentage (%) of stained cells among the total number of cells.

### **Statistical Analysis**

All values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Values were compared using multifactorial analysis of variance followed by the Student-Newman-Keul's test for multiple comparisons.  $P < 0.05$  was considered significant.

For analysis of the patients TMA, overall survival was defined as the time between nephrectomy and patient death or censoring. Non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test were performed to assess significativity of activated NF- $\kappa\text{B}$  staining with patients characteristics, i.e sex, Fuhrman grade, microvascular invasion, tumor dimension and TNM stage. Correlation coefficient were computed using Spearman test. To assess whether activated NF- $\kappa\text{B}$  expression is associated with poor patient prognosis, we used Kaplan-Meier (with Log Rank test) method. Multivariate prognosis analysis were performed using Cox proportional hazard model. Tumor stage and grade were used as parameters in this analysis. Computations were done using SPSS 13.0. A p-value  $<0.05$  was considered significant.

## RESULTS

**NF- $\kappa$ B Expression in Human RCC Tumors treated with the PI3K/Akt Inhibitor LY294002.** We have previously shown that the PI3K/Akt pathway is constitutively activated in human RCC both in vitro and in vivo (14) and NF- $\kappa$ B is known to be activated through Akt-dependent IKK phosphorylation. In this previous studies, we identified GSK-3 $\beta$  as being regulated by Akt. Using the TMA, phospho-Akt (S473) was substantially decreased by more than 30% (Fig. 1A). We confirmed the Akt-dependent GSK-3 phosphorylation and inactivation (Fig. 1B). Now, we extend this finding by showing that the NF- $\kappa$ B transcription factor is also a downstream target of Akt in human RCC (Fig. 1C).

**NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B Expression in Human RCC Tumor Biopsies.** The activation state of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B were thus investigated in human RCC tumors compared to corresponding normal kidney tissues. For that we analyzed both NF- $\kappa$ B p65 subunit and I $\kappa$ B expression as well as their phosphorylation status in tumor and normal tissues protein samples. Both proteins are expressed in the non-phosphorylated state at a similar level in tumors as well as in normal corresponding tissues (Fig. 2A). In contrast, high levels of phosphoproteins are found in tumors compared to corresponding normal tissues (Fig. 2A), indicating that NF- $\kappa$ B is constitutively activated in human RCC tumors. The ratios of phospho-NF- $\kappa$ B to total NF- $\kappa$ B were 0.25, 0.14, 0.05, 0.43, 0.9 and 0.23 for N1, N2, N3, T1, T2 and T3, respectively.

**NF- $\kappa$ B and I- $\kappa$ B Expression in Human RCC Cell Lines.** A panel of human RCC cell lines either expressing the VHL tumor suppressor or deficient in VHL were used to analyze the expression of both NF- $\kappa$ B p65 subunit and I $\kappa$ B in their non-phosphorylated or phosphorylated states and the possible relationship with the VHL status. No differences in phosphorylation states or in the levels of expression of both proteins were observed, indicating a constitutive activation of NF- $\kappa$ B regardless of the VHL status (Fig. 2B). The ratios of phospho-I $\kappa$ B to total I $\kappa$ B were 0.7, 0.37, 0.38, 1.0, 0.44, 0.79 and 1.1 for 786-0, UOK-126, UOK-128, A498, ACHN, Caki-1 and Caki-2 cells, respectively.

**Effect of NF- $\kappa$ B inhibitors on Cultured RCC Cells Growth and Death.** We used two NF- $\kappa$ B inhibitors, BAY 11-7085 and sulfasalazine, to investigate the involvement of NF- $\kappa$ B activation on RCC growth. Both inhibitors act by maintaining I $\kappa$ B bound to NF- $\kappa$ B thus inhibiting the activation and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B (24, 25). We used 786-0 and caki-1 cells, respectively deficient in normal VHL tumor suppressor gene products or expressing them, in further experiments. Both inhibitors decreased cell density by up to 100% in a concentration-dependent manner. No difference in the effectiveness of the inhibitors were noted with the VHL status of the cells (Fig. 3A, supplemental data). Testing cell viability by MTT (Fig. 3B, supplemental data) and cell death by TUNEL staining (Fig. 4A) and FACS analysis (Fig. 4B) in response to either inhibitor in both cell lines strongly suggest that the effects of the inhibitor is achieved through induction of cell apoptosis independently of VHL expression. In addition, for sulfasalazine, we performed DNA fragmentation assay and we observed clear DNA laddering characteristic of cell apoptosis (data not shown). To further ensure that the effects of both NF- $\kappa$ B inhibitors is achieved through induction of cell apoptosis, the effects of either NF- $\kappa$ B inhibitor was also measured by FACS in the presence of B-D-FMK (26) which reduced significantly the apoptotic effects of both NF- $\kappa$ B inhibitors (Fig. 4B). The NF- $\kappa$ B pathway thus appears to be turned towards cell survival in human RCC.

**Specificity Towards NF- $\kappa$ B of the Effects of the Inhibitors.** To ascertain that the apoptotic effects of BAY 11-7085 and sulfasalazine were obtained through inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway we followed three experimental procedures.

The effect of both inhibitors on NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation was then studied in 786-0 and Caki-1 cells by treating them for 0, 30 min, 1h, 2h, 5h, 8h, 24h and 48h with a maximally effective concentration of either inhibitor, i.e BAY 11-7085 at 20 $\mu$ M and sulfasalazine at 0.2 mM. While unphosphorylated proteins remained unchanged during this time-course, phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S256) was rapidly undetectable (30 min in cells treated with BAY 11-7085 and 1 to 2h in cells treated with sulfasalazine) and returned to basal value only after 24

to 48h of treatment (Fig. 5A).

The effect of a maximally effective concentration of either inhibitor on phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S276) expression and subcellular localization was also assessed by confocal microscopy. In 786-0 cells treated in control phospho-NF- $\kappa$ B p65 was observed in the nucleus of virtually all cells (Fig. 5B) arguing in favor of the constitutive activation of NF- $\kappa$ B in human RCC. After treatment with either inhibitor, phospho-NF- $\kappa$ B p65 was no longer detected. Again, similar results were obtained in Caki-1 cells (data not shown).

Finally, NF- $\kappa$ B p65 was specifically knock-down in RCC cells using specific siRNA. Apoptosis was then assessed by FACS analysis in the presence or absence of a maximally effective concentrations of either inhibitor, as above. In 786-0 cells transfected with p65-specific siRNA, p65 expression was significantly reduced while no difference were noted between untransfected cells and cells transfected with transfection reagent. In 786-0 cells treated with BAY 11-7085, we obtained similar results as the ones shown in Fig 4, B (Fig. 5C). The transfection with p65-specific siRNA at the concentration used (100 nmole/well) alone induced apoptosis by around 20% further arguing the critical role of NF- $\kappa$ B in tumor cell survival (Fig. 5C). The efficiency of BAY 11-7085 to induce tumor cell apoptosis was substantially decreased in cells transfected with p65-specific siRNA by 30% (Fig. 5C). Since similar results were obtained with sulfasalazine in 786-0 cells and in Caki-1 cells with both inhibitors.

Taken together, these results strongly suggest that the apoptotic effects of NF- $\kappa$ B inhibitors were attributable to NF- $\kappa$ B inhibition.

**Transcriptional Activity of NF- $\kappa$ B.** NF- $\kappa$ B activity was evaluated using a NF- $\kappa$ B p50/p65 transcription factor kit as detailed in the Materials and Methods section in resting cells and in cells treated with either inhibitor at a maximally effective concentration. Since the effects of both inhibitors on NF- $\kappa$ B phosphorylation were maximal after 30 min of exposure and sustained for at least 8h (Fig. 5D), we choose to measure NF- $\kappa$ B activity in cells treated for 2h

with either inhibitor. NF- $\kappa$ B is constitutively activated in human RCC and this activity is inhibited by 40 to 50% by BAY 11-7085 and sip65 in both cell lines (Fig. 5D). Similar results were obtained with sulfasalazine (data not shown). No significant difference were observed in 786-0 vs. Caki-1 cells. Thus, tumor cell apoptosis mediated by NF- $\kappa$ B inhibitors is achieved through inhibition of NF- $\kappa$ B transcriptional activity.

**Effects of NF- $\kappa$ B Inhibition on RCC Tumor Growth In Vivo.** The treatment of xenograft athymic mice with BAY 11-7085 (5 mg/kg) inhibited significantly tumor growth by about 80% (Fig. 6). This concentration of the NF- $\kappa$ B inhibitor was chosen from previous studies by other investigators in nude mice (27, 28). No difference were observed in the overall efficiency of the NF- $\kappa$ B inhibitor with the VHL status of the implanted tumors. In some mice, partial regression was observed following the treatment.

All the mice maintained body weight and no difference were observed between mice treated in control or with BAY 11-7085 (Table 2, supplemental data). The treatment seems to be well tolerated, indeed, plasma concentrations of electrolytes, creatinine, albumine and urea showed no difference between mice bearing 786-0 or Caki-1 tumors treated in control or with BAY 11-7085 (Table 2).

Immunohistochemistry analysis of tumors revealed that BAY 11-7085 exerts its anti-tumoral effect through induction of tumor cell apoptosis (786-0 tumors:  $1.4 \pm 0.2$  vs.  $2.4 \pm 0.3\%$  of TUNEL-stained cells in tumors of control- and BAY 11-7085-treated mice, respectively;  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ; Caki-1 tumors:  $1.2 \pm 0.3$  vs.  $2.5 \pm 0.3\%$  of TUNEL-stained cells in tumors of control- and BAY 11-7085-treated mice, respectively;  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 7A), confirming the *in vitro* data. No effects were observed on tumor cell proliferation (Fig. 7B) and neovascularization (Fig. 7C) of 786-0 tumors and similar data were obtained in Caki-1 tumors (data not shown).

To assess the efficiency of the treatment on NF- $\kappa$ B activation, a tissue microarray was built-up with the tumors harvested from the mice in order to avoid difference in staining due

to the manipulation of many slides. Immunostaining clearly showed a substantial diminution of activated NF- $\kappa$ B in tumors harvested from mice treated by the NF- $\kappa$ B inhibitor compared to tumors harvested from mice treated in control regardless of the VHL status of the tumors (Fig. 7D). This finding confirms appropriate drug targeting *in vivo* and also the constitutive activation of NF- $\kappa$ B in RCC tumors.

These results strongly suggest that NF- $\kappa$ B and its downstream targets participate in the overall intrinsic resistance of human RCC to tumor cell death and that the treatment by specific inhibitor appears to be safe.

### **Clinicopathologic Tumor Parameters and Activated NF- $\kappa$ B Expression in Human RCC.**

Clinicopathologic tumor parameters and patient characteristics are detailed in Table 1. Different views of the patient TMA are shown in Fig. 8A and B (supplemental data). Some normal tissues showed weak activated NF- $\kappa$ B staining that were systematically less than corresponding tumor tissues (data not shown). Analysis of tumor tissues showed that, as already known, sex, age, tumor dimension and Fuhrman grade are independent prognostic factor for patient survival. Parameters that were tested concerning activated NF- $\kappa$ B are sex, RCC sub-type, Fuhrman grade, microvascular invasion, tumor dimension, TNM stage and death. Among these parameters, significance was obtained for clear RCC having higher expression of activated NF- $\kappa$ B compared to the other types taken together ( $P=0.002$ ) and for tumor dimension ( $P=0.02$ ). Concerning the significance with RCC types, expression values were  $28.3 \pm 2.4$  (median 5%) for clear RCC and  $6.8 \pm 2.7$  (median 0%) for the other RCC types. Concerning tumor dimension, the Spearman non-parametric correlation coefficient was  $-0.153$ . Activated NF- $\kappa$ B did not appear as a independent prognostic factor for patient survival (Fig. 8C).

## **DISCUSSION**

The NF- $\kappa$ B signal transduction pathway is misregulated in a variety of hematologic and solid tumor malignancies due either to genetic changes, such as chromosomal rearrangements,

amplifications, and mutations, or to chronic activation of the pathway. Constitutive activation of the NF- $\kappa$ B pathway can contribute to the oncogenic state in several ways, for example, by driving proliferation, by enhancing cell survival, and/or by promoting angiogenesis or metastasis.

At the non-phosphorylated state NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  were found at similar levels in tumors compared to normal corresponding tissues suggesting that DNA duplication or amplification events are not present in human RCC, although such assumption will need to be confirmed by specific genetic studies. However, phosphorylation of both NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  were only observed in tumors and not in corresponding normal tissues, as well as in cultured tumor cells, suggesting that this pathway is constitutively activated in human RCC. Our results also strongly suggest that the constitutive activation of NF- $\kappa$ B is most essentially the result of the constitutive activation of Akt in human RCC. Thus, besides GSK-3, Akt also regulates NF- $\kappa$ B activity in this tumor type.

The results presented here, using various experimental approaches, strongly suggest that the NF- $\kappa$ B signaling pathway is turned towards tumor cell survival in human RCC. In contrast to other tumor types, the possible involvement of NF- $\kappa$ B in human RCC tumorigenesis has only received little attention, and no NF- $\kappa$ B-regulated genes or set of genes that might be involved in this disease have been described. In addition, *in vivo* data are missing and the few data available on cultured cells are in most cases difficult to interpret or contradictory (29-33). The VHL gene products have been shown to suppress NF- $\kappa$ B activity in human RCC. However, the role VHL may play in tumor cell survival remains unknown at present in human RCC (32-34). Evidence has been presented that certain tumor suppressors can block NF- $\kappa$ B activation such as Arf, CYLD and in some conditions p53 (35-37). Using both *in vitro* and *in vivo* approaches, our results did not reveal any difference in the efficiency and mechanism of action of the NF- $\kappa$ B inhibitors depending on the VHL status of the cells. The absence of VHL dependency was already observed in our previous studies dealing with the involvement of the

PI3K/Akt pathway in RCC growth. Thus, VHL gene products do not seem to control the NF- $\kappa$ B signaling pathway in human RCC although HIF has been shown to be regulated by NF- $\kappa$ B (38). Consistent with our findings, Oka et al. (15) have recently shown that inhibition of NF- $\kappa$ B phosphorylation by sesquiterpene lactone parthenolide slows down OUR-10 RCC tumor growth in nude mice through induction of tumor cell apoptosis. However, the VHL status of OUR-10 cells has not been reported. Thus, additional experiments focusing on that particular point are needed to more precisely define the role, if any, of the VHL tumor suppressor gene in the sensitivity of human RCC to NF- $\kappa$ B inhibition.

In the nucleus, NF- $\kappa$ B complexes bind to target DNA sequences and regulate the expression of genes involved in immune responses, cell growth, cell survival, cell motility and neovascularization. Cancer relevant NF- $\kappa$ B-dependent genes include those encoding cytokines and chemokines (such as TNF $\alpha$ , IL1, IL8 and monocyte chemoattractant protein-1 MCP-1), proliferative regulators (such as cyclin D1), antiapoptotic proteins (such as Bcl-2, Bcl-XL and inhibitors of apoptosis IAPs) and modulators of invasion and angiogenesis (such as matrix metalloproteinases MMPs and VEGF) (39, 40). Besides VEGF, which is mainly controlled by the VHL/HIF system in human RCC, there are no consistent data allowing to know whether some of these downstream targets are involved in this disease. NF- $\kappa$ B is known to control sets of target genes depending on the cell type and environmental conditions. Part of our ongoing work using target gene array and 2D difference gel electrophoresis (2D-DIGE) aims at identifying genes controlled by NF- $\kappa$ B in human RCC.

An exciting feature of NF- $\kappa$ B is the demonstration in various reports that this transcription factor is activated in response to chemotherapies and to radiation and that it functions to suppress the apoptotic potential of that cancer therapy in various tumor types (41-43). Some clinical trials utilizing certain chemotherapies in conjunction with NF- $\kappa$ B inhibitors such as thalidomide are presently underway to assess whether NF- $\kappa$ B blockade promotes cancer therapy efficacy. Since chemotherapeutic agents such as daunorubicin or vinblastine have

been shown to activate the NF- $\kappa$ B signaling pathway in human RCC cells in culture, the possibility exists that such association may have therapeutic potential in human RCC as well. Part of our ongoing work explores this possibility in human RCC.

Oya et al. (44) have shown that out of 45 cases of human RCC they investigated, 15 cases showed an increase of more than 200% in NF- $\kappa$ B activity compared to corresponding normal renal tissue. Such increase was more often observed in locally advanced cases than in localized cases. They concluded that an increase in NF- $\kappa$ B activity may be related to tumor development. However, the relation, if any, of the increase in NF- $\kappa$ B activity with patient survival was not investigated. In the present study, we used a TMA composed of 249 cases of human RCC that have been harvested between 1980 and 1990 with the clinicopathologic data available for all patients. The activation of NF- $\kappa$ B was investigated by specific immunochemistry studies. NF- $\kappa$ B activation was found to be higher in clear RCC vs. other sub-types and to be related to tumor dimension but did not appear to be an independent prognostic factor for patient survival. We did not find significant differences in NF- $\kappa$ B activation between localized and locally advanced cases. The reason for this apparent discrepancy between the study of Oya et al. (44) and the present study is not known but may be related to the number of cases that were analyzed.

This report provides strong evidence that the mechanisms responsible for the intrinsic resistance of RCC to cell apoptosis converge on NF- $\kappa$ B independently on the VHL status and that NF- $\kappa$ B or its downstream targets have potential therapeutic value in this refractory disease. The identification of these downstream targets is currently on the way in our laboratory.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

We thank IRCAD (Institut de Recherche sur les Cancers de l'Appareil Digestif) and Université Louis Pasteur EA 3430 (Dr F. Raul, IRCAD, Strasbourg, France) for housing nude mice. We thank Dr Bouissac for help in confocal microscopy and Dr Crémel for allowing us

to perform FACS analysis in his laboratory (INSERM U575). We thank Ms Reymann (Pathology Department, Strasbourg University Hospital) for technical assistance in immunohistochemistry studies. This work was supported by grants from INSERM, University Louis Pasteur of Strasbourg, Strasbourg School of Medicine (recipient TM), the French Ligue Contre le Cancer (Comités du Bas-Rhin et du Haut-Rhin et Comité National, recipient TM) and ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer, recipient TM).

## REFERENCES

1. Cohen HT. Renal cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005;353:2477-90.
2. Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* 2000;163:408-17.
3. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:115-24.
4. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:125-34.
5. Latif F, Tory K, Gnarra J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317-20.
6. Friedrich CA. Von Hippel-Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer* 1999;86:2478-82.
7. Kim W, Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:55-60.
8. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004;18:2195-224.
9. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelin C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 2003;22:8961-82.
10. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C., Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30:193-204.

11. MacKeigan JP, Taxman DJ, Hunter D, Earp HS 3rd, Graves LM, Ting JP. Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of taxol and mitogen-activated protein kinase kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2091-9.
12. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005;205:275-92.
13. Hartmann JT, Bokemeyer C. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999;19:1541-3.
14. Sourbier C, Lindner V, Lang H, et al. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2006;66:5130-42.
15. Oka D, Nishimura K, Shiba M, et al. Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB. *Int J Cancer* 2007;120:2576-81.
16. Anglard P, Trahan E, Liu S, et al. Molecular and cellular characterization of human renal cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1992;52:348-56.
17. Curti BD. Renal cell carcinoma. *JAMA* 2004;292:97-100.
18. Lindner V, Lang H, Jacqmin D. Pathology and genetics in renal cell cancer. *EAU Update Series* 2003;1: 197-208.
19. Massfelder T, Lang H, Schordan E, et al. Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 2004;64:180-8.
20. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
21. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd M R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 1991;51:2515-20.

22. Talon I, Lindner V, Schordan E, et al. Anti-tumor effect of parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 2006;27:73-83.
23. Lang H, Lindner V, de Fromont M, et al. Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;103:625-9.
24. Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, et al. Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 1997;272:21096-103.
25. Habens F, Srinivasan N, Oakley F, Mann DA, Ganesan A, Packham G. Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF- $\kappa$ B inhibitory and apoptosis promoting activity. *Apoptosis* 2005;10:481-91.
26. Yang B, Johnson TS, Haylor JL, et al. Effects of caspase inhibition on the progression of experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2003;63:2050-64.
27. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, et al. Inhibition of NF $\kappa$ B increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *J Biol Chem* 2004;279:23477-85.
28. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, et al. Inhibition of inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B phosphorylation increases the efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Clin Cancer Res* 2004;10:7645-54.
29. Pawlowski JE, Nesterov A, Scheinman RI, Johnson TR, Kraft AS. NF- $\kappa$ B does not modulate sensitivity of renal carcinoma cells to TNF  $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Anticancer Res* 2000;20:4243-55.
30. Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, Tachibana M, Shimizu N, Murai M. Constitutive activation of nuclear factor- $\kappa$ B prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 2001;20:3888-96.

31. An J, Sun Y, Fisher M, Rettig MB. Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor-kappaB dependent. *Mol Cancer Ther* 2004;3:727-736.
32. An J, Fisher M, Rettig MB. VHL expression in renal cell carcinoma sensitizes to bortezomib (PS-341) through an NF-kappaB-dependent mechanism. *Oncogene* 2005;24:1563-70.
33. An J, Rettig MB. Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* 2005;25:7546-56.
34. Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res* 2003;63:7076-80.
35. Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND. Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor. *EMBO J* 2005;24:1157-69.
36. Chen F. Endogenous inhibitors of nuclear factor-kappaB, an opportunity for cancer control. *Cancer Res* 2004;64:8135-8.
37. Webster GA, Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* 1999;19:3485-95.
38. Tacchini L, De Ponti C, Matteucci E, Follis R, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor-activated NF-kappaB regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 2004;25:2089-100.
39. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006;441:431-6.
40. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Diff* 2006;13:738-47.

41. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274:784-7.
42. Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999;5:412-7.
43. Cusack JC Jr, Liu R, Houston M, et al. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 2001;61:3535-40.
44. Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, et al. Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003;24:377-84.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Effect of PI3K/Akt inhibition on Akt, GSK-3 and NF- $\kappa$ B expression in human RCC tumors grown in nude mice. TMA was constructed with cylindric samples taken from the 786-0 human RCC tumors grown in nude mice that have been treated in control (*Ctl*) or with the PI3K/Akt inhibitor LY294002 (**LY294002**) for 28 days (14). Slides were then immunostained with specific antibodies against phospho-Akt (S473), phospho-GSK-3 (S9) or phospho-NF- $\kappa$ B (S276) and the stainings results quantified as detailed in Materials and Methods in the histograms shown in *A*, *B* and *C*, respectively. Results in *A*, *B* and *C* are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 8; \*, P < 0.05 from Ctl. Also shown are representative microphotographs of the TMA immunostained with the various antibodies. Scale bars, 200  $\mu$ m in *a* and *c*; 50  $\mu$ m in *b* and *d*.

**Fig.2.** NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B expression in human RCC tumors and normal tissues and in cultured cells. *A*, Western blot analysis of NF- $\kappa$ B, phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S526), I $\kappa$ B, phospho-I $\kappa$ B (Ser 32/36), and corresponding  $\beta$ -actin expression in human RCC tumors biopsies from RCC patients (*T1*, *T2* and *T3*) and corresponding normal renal tissues (*N1*, *N2* and *N3*) lysates (*A*) and in RCC cell lysates (*B*). Shown are representative radiographs of at least three independent experiments. The VHL status of the cell lines is shown below the blots.

**Fig. 3.** Effect of NF- $\kappa$ B signaling pathway inhibition on RCC cell growth *in vitro*. *A*, Effects of BAY 11-7085 (*top panels*) and sulfasalazine (*lower panels*) at various concentrations on cell density in 786-0 cells (*left panels*) and Caki-1 cells (*right panels*). Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 5 (*upper left panel*), n = 6 (*upper right panel*), n = 4 (*lower left and right panels*); \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 from no inhibitor. *B*, Effects of BAY 11-7085 (*top panels*) and sulfasalazine (*lower panels*) at various concentrations on cell viability in 786-0 cells (*left panels*) and Caki-1 cells (*right panels*). Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 8 (*upper left and right panels*), n = 5 (*lower left and right panels*); \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 from no inhibitor.

**Fig. 4.** Effect of NF- $\kappa$ B signaling pathway inhibition on RCC cell death *in vitro*. **A**, Effects of the treatment of 786-0 cells and Caki-1 cells with 20  $\mu$ M BAY 11-7085 (**BAY 11-7085, left panel**) or 0.2 mM sulfasalazine (**Sulfasalazine, right panel**) for 24 h (**open bars**) or 48 h (**gray bars**) on cell death, as measured by TUNEL staining. Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 5-6; \*\*,  $P < 0.01$  from Ctl with no inhibitor (**Ctl, black bars**). Photographs show a representative TUNEL staining in 786-0 cells treated in control (**Ctl**) or treated with 20  $\mu$ M BAY 11-7085 (**BAY 11-7085**) or 0.2 mM sulfasalazine (Sulfasalazine) for 24 h. Scale bar, 20  $\mu$ m. **B**, FACS analysis of 786-0 and Caki-1 cells treated with 20  $\mu$ M BAY 11-7085 (**BAY 11-7085, left panel**) or 0.2 mM sulfasalazine (**Sulfasalazine, right panel**) for 24 h (**open bars**) or 48 h (**gray bars**) in the presence or absence of the pan caspase inhibitor B-D-FMK at 40  $\mu$ M. Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 4-5 (786-0 cells) and n = 4-8 (Caki-1 cells); \*\*,  $P < 0.01$  from Ctl with no inhibitor (**Ctl, black bars**). #,  $P < 0.01$  from NF- $\kappa$ B inhibitor.

**Fig. 5.** Specificity towards NF- $\kappa$ B of the inhibitors. **A**, Western blot of 786-0 (**upper gels**) or Caki-1 (**lower gels**) cell lysates incubated with antibodies against NF- $\kappa$ B p65, phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S536) or PARP and  $\beta$ -actin in cells treated with 20  $\mu$ M BAY 11-7085 (**left gels**) or 0.2 mM sulfasalazine (**right gels**) for the indicated period of time. Shown are representative radiographs of at least three independent experiments. **B**, Confocal microscopy analysis of activated phosphorylated NF- $\kappa$ B in 786-0 cells treated in control (**Ctl**) or with 20  $\mu$ M BAY 11-7085 (**BAY**) for 8 h. phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S276) is shown in green. Shown are representative microphotographs of at least four independent experiments. Scale bar, 20  $\mu$ m, **C**, 786-0 cells transfected or not with NF- $\kappa$ B p65-specific siRNA (100 nmole/well) were treated with 20  $\mu$ M BAY 11-7085 or no inhibitor for 48 h and subjected to FACS analysis as detailed in Materials and Methods. Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 3-7; \*\*,  $P < 0.01$  from Ctl and transfection reagent (TR). #,  $P < 0.05$  from the NF- $\kappa$ B inhibitor. No evidence of cell necrosis was observed. **D**, NF- $\kappa$ B transcription activity in 786-0 and Caki-1 cells treated in control (**Ctl**) or with 20  $\mu$ M BAY 11-7085 (**BAY**) or transfected with of p65-specific

siRNA (100 nmole/well, *si65*) for 2 h were subjected to NF- $\kappa$ B transcription activity measurement using a NF- $\kappa$ B p50/65 transcription factor colorimetric assay kit as presented in Materials and Methods. Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 3-4 (786-0 cells) and n = 3-6 (Caki-1 cells); \*\*,  $P < 0.01$  from Ctl activity.

**Fig. 6.** Effect of NF- $\kappa$ B blockade on human RCC tumor growth in nude mice *in vivo*. **A**, Growth, defined as volume increase in % from day 0 set to 100%, of 786-0 tumors (**top**) or Caki-1 tumors (**bottom**) in nude mice treated daily for 35 days and 28 days, respectively, with control buffer PBS/DMSO (1/1:vol/vol) (**Ctl**) or with 5mg/kg of the NF- $\kappa$ B inhibitor BAY 11-7085 (**BAY**). Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 8 (786-0 tumors) and n = 7 (Caki-1 tumors) for both control (**Ctl**)-treated and BAY 11-7085 (**BAY**)-treated groups of mice; \*,  $P < 0.05$  and \*\*,  $P < 0.01$  from day 0; #  $P < 0.01$  BAY 11-7085-treated mice vs Ctl-treated mice. **B**, Photographs show the implanted tumors in a representative 786-0 tumor-bearing mouse at the first day of drug injection (**left**, day 0), in a representative Ctl-treated mouse (**middle**, day 35) and in a representative mouse treated with the NF- $\kappa$ B inhibitor (**right**, day 35).

**Fig. 7.** Histopathological analysis of 786-0 and Caki-1 tumors from Ctl- and BAY 11-7085-treated mice. **A**, 786-0 tumor sections of Ctl- (**left**) or BAY 11-7085 (**right**)-treated mice immunostained with an antibody against Ki67. Scale bar, 50  $\mu$ m. Quantification of Ki67 staining and calculation of the proliferative index (**right**). Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 8 and n = 7 for 786-0 and Caki-1 tumors, respectively. **B**, 786-0 tumor sections of Ctl- (**left**) or BAY 11-7085 (**right**)-treated mice immunostained for DNA fragmentation (TUNEL). Scale bar, 50  $\mu$ m. Quantification of TUNEL staining and calculation of the apoptotic index (**right**). Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 8 (786-0 tumors) and n = 7 (Caki-1 tumors); \*,  $P < 0.05$  from Ctl-treated mice. **C**, 786-0 tumor sections of Ctl- (**top left**) or BAY 11-7085 (**top right**)-treated mice immunostained with an antibody against factor VIII. Scale bar, 50  $\mu$ m. Quantification of crossing vessels intersecting points and of vessels per surface area (0.25 mm<sup>2</sup>). Results are shown as mean  $\pm$  s.e.m., n = 8 and n = 7 for 786-0 and Caki-1 tumors,

respectively. **D**, Representative views of the TMAs that have been built-up with 786-0 (*left*) and Caki-1 (*right*) tumors harvested from mice treated in control (*a, b*) or with the NF- $\kappa$ B inhibitor (*c, d*) and that have been stained with an antibody against phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S276). Scale bar, 200  $\mu$ m in *a* and *c*; 50  $\mu$ m in *b* and *d*.

**Fig. 8.** Patient TMA. **A**, General view of one of the paraffin bloc composing the TMA (*a*). More precise view of some samples of the TMA on a slide (*b*). View of one cylindric piece of tissue on the slide (*c*) and histological view of one piece of tissue (*d*). Scale bar: 1mm in *b*; 140  $\mu$ m in *c*; 35  $\mu$ m in *d*. Slides were stained with haematoxylin-eosin. **B**, Views of tissues stained in control (without primary antibody) (*left photographs*) or stained with an antibody against phospho-NF- $\kappa$ B p65 (S276) (*right photographs*) on a patient TMA slide. Scale bar: 140  $\mu$ m in *a* and *b*; 35  $\mu$ m in *c* and *d*. Shown in **A** and **B** are representative photographs. **C**, Activated NF- $\kappa$ B staining to patient survival curve. Low staining: staining intensity 0 and 1+; High staining: staining intensity: 2+ and 3+.

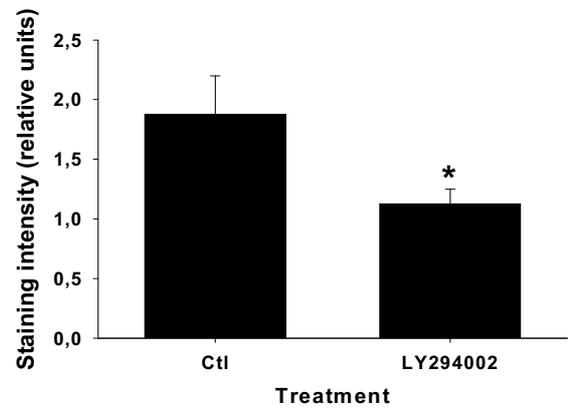
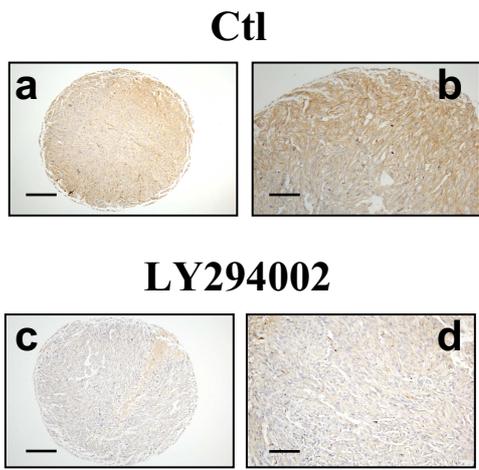
		<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Age (year)</b>	Mean : 60.98 (Range : 23.44-90.07 years)		
<b>Sexe</b>	Men	161	66.8
	Women	80	33.2
<b>RCC Sub-type</b>	Clear	212	88
	Papillary type 1	8	3.3
	Papillary type 2	15	6.2
	Chromophobe	6	2.5
<b>pTNM stage</b>	pT1a	60	24.9
	pT1b	84	34.9
	pT2	22	9.1
	pT3a	26	10.8
	pT3b	49	20.3
<b>Fuhrman grade</b>	1	17	7
	2	92	38.2
	3	95	39.4
	4	37	15.4
<b>Microangiomas</b>	Present	70	29
	Absent	171	71
<b>Tumor size (cm)</b>	Mean : 5.8 (Range : 1-19)		
<b>Death</b>	Yes	141	58.5
	No	100	41.5
<b>Death origin</b>	Cancer-related	19	13.5
	Not related to cancer	62	44
	No information	60	42.6

**Table 1.** Clinicopathologic characteristics of the patients.

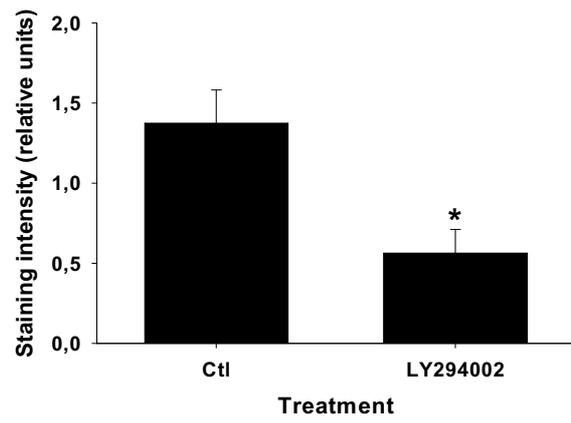
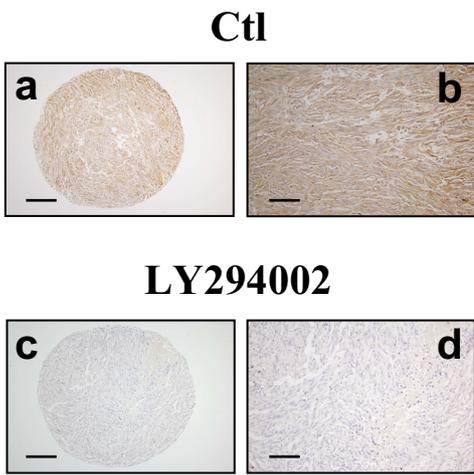
Group	Sodium mM	Phosphate mM	Chlore mM	Creatinine μM	Albumin g/l	Urea mM	Weight g (Day 0)	Weight g (Day 35/28)
786-0 Ctl	141.1 ±4.3	1.6 ±0.1	107.9 ±2.8	10.8 ±0.4	24.6 ±1.1	8.5 ±0.6	32.8 ±1.0	34.1 ±1.3
786-0 BAY	144.0 ±3.7	2.2 ±0.2	111.9 ±2.9	9.5 ±0.6	24.1 ±0.8	8.1 ±0.4	31.9 ±0.3	30.9 ±0.7
Caki-1 Ctl	122.0 ±1.9	1.5 ±0.1	92.1 ±1.0	8.1 ±0.4	20.9 ±0.3	6.6 ±0.3	31.9 ±0.9	32.7 ±0.7
Caki-1 BAY	129.2 ±6.6	1.8 ±0.3	98.3 ±6.2	8.2 ±0.3	21.7 ±1.1	7.0 ±0.8	31.8 ±0.3	31.4 ±0.5

**Table 2.** Treatments of nude mice with BAY 11-7085 do not affect plasma parameters and body weight. Mice treated for 35 (786-0 tumors-bearing mice) or 28 (Caki-1 tumors-bearing mice) days in control (Ctl) or with BAY 11-7085 were anesthetized and the blood was collected. Concentrations of sodium, phosphate, chlore, creatinine, albumin and urea in plasma were measured. Animal weights were measured at the beginning (Day 0) and at the end (Day 35 or Day 28 for 786-0 or Caki-1 tumors-bearing mice, respectively) of each treatment.

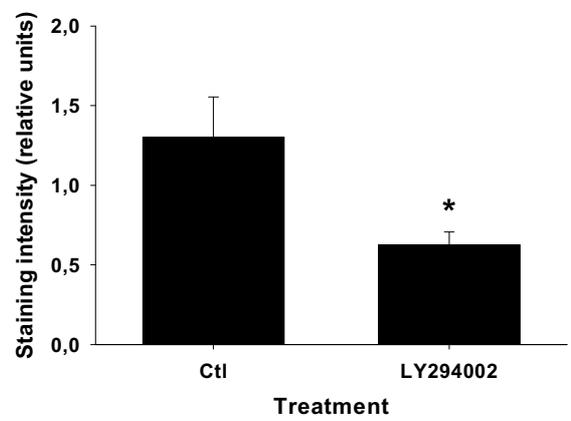
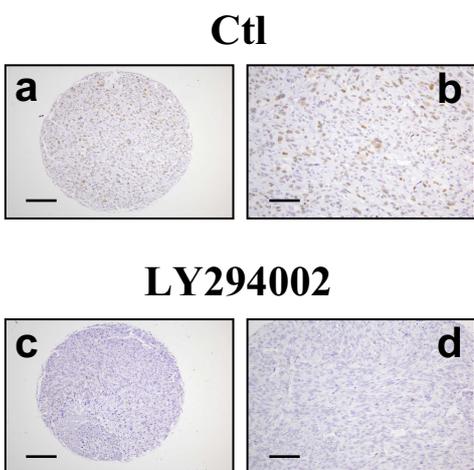
**A**



**B**

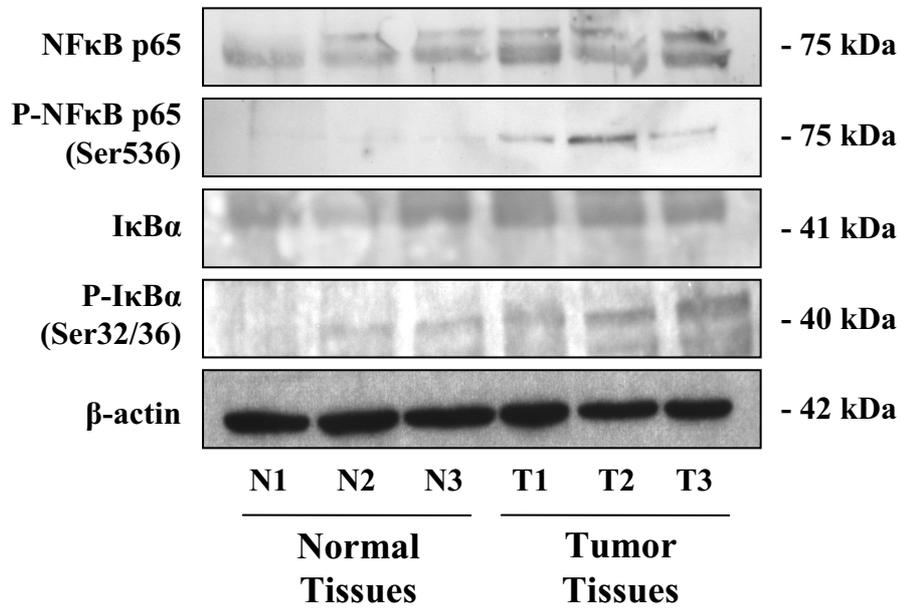


**C**

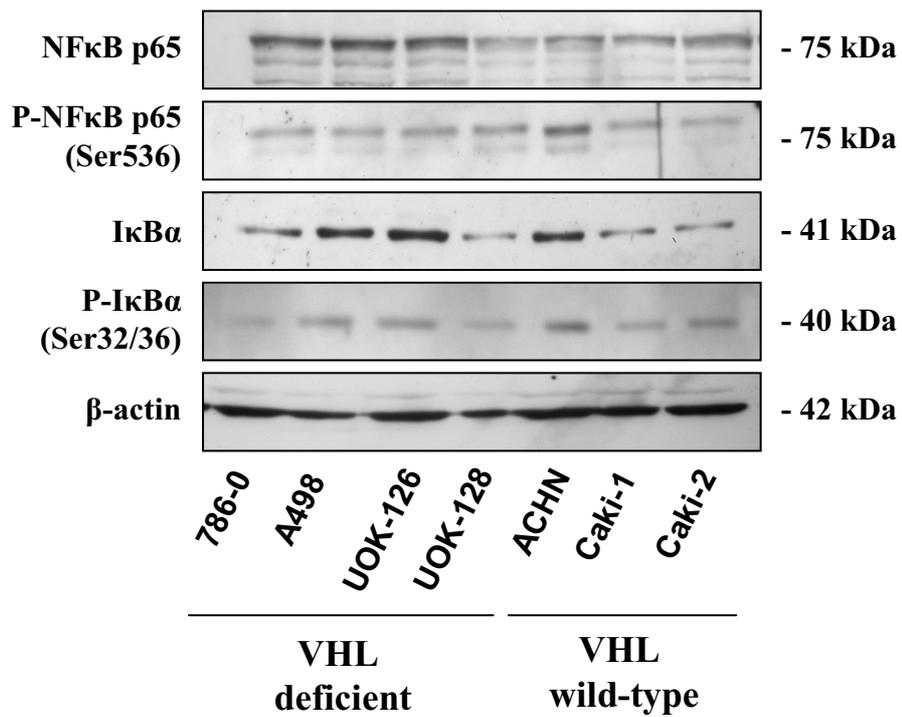


**Figure 1**

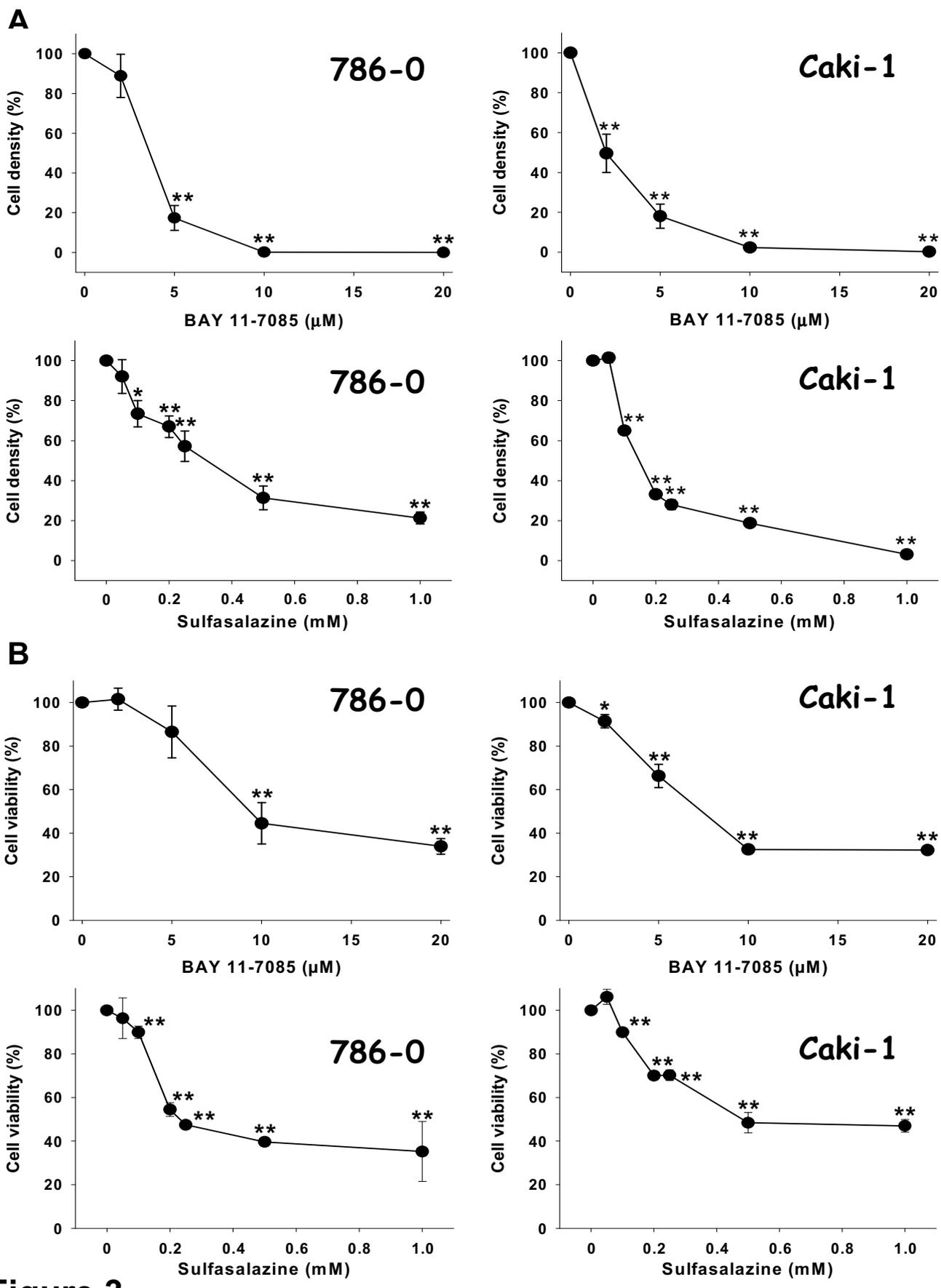
**A**



**B**

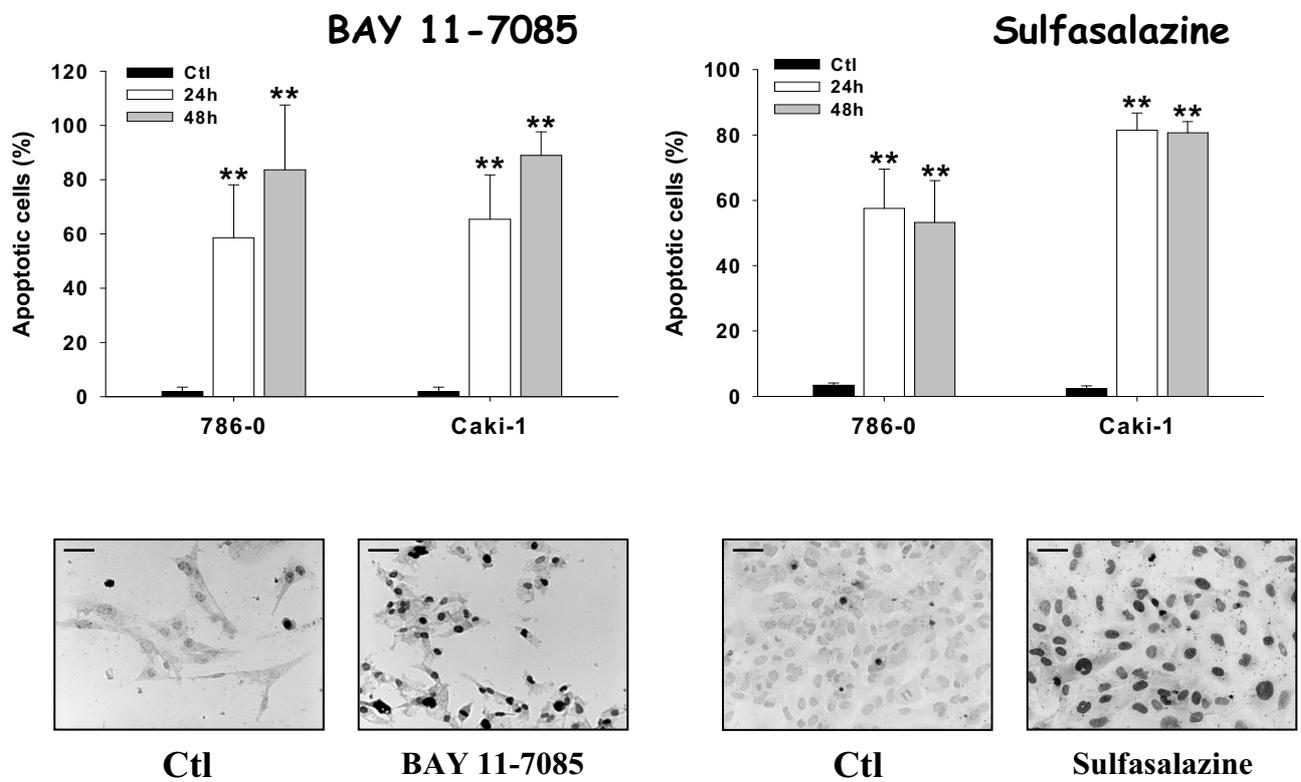


**Figure 2**

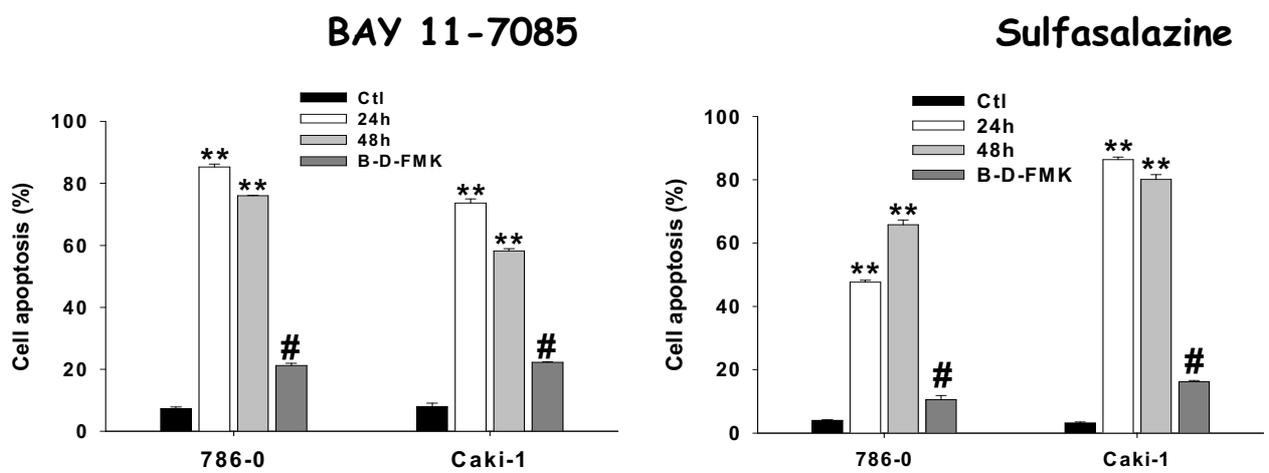


**Figure 3**

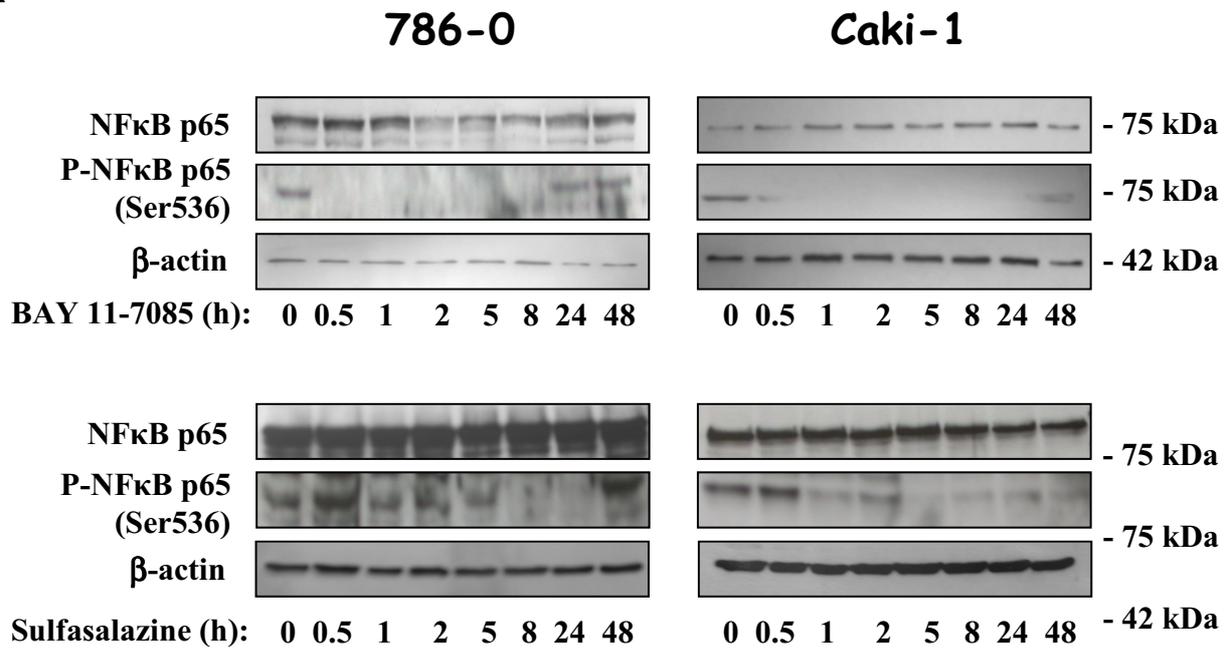
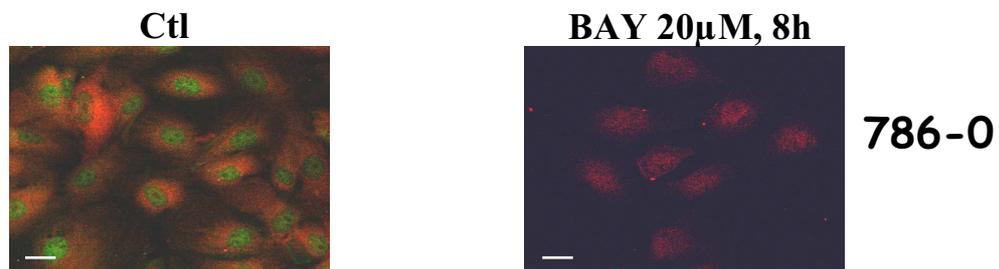
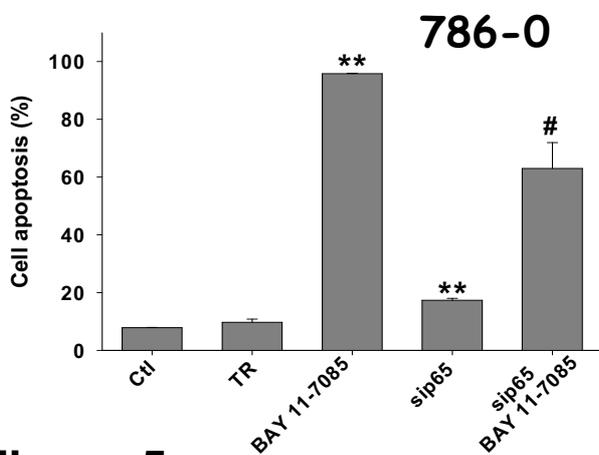
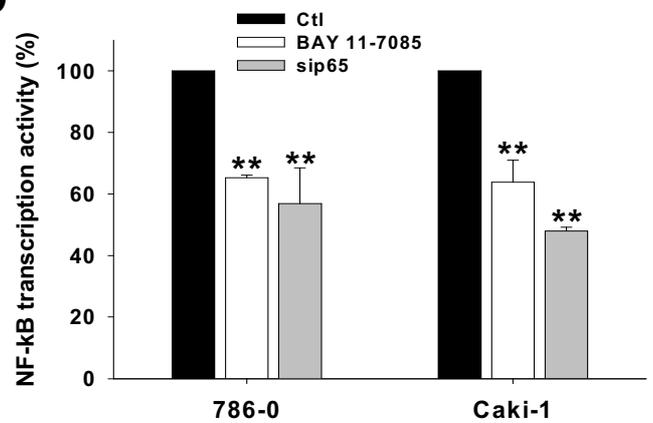
**A**



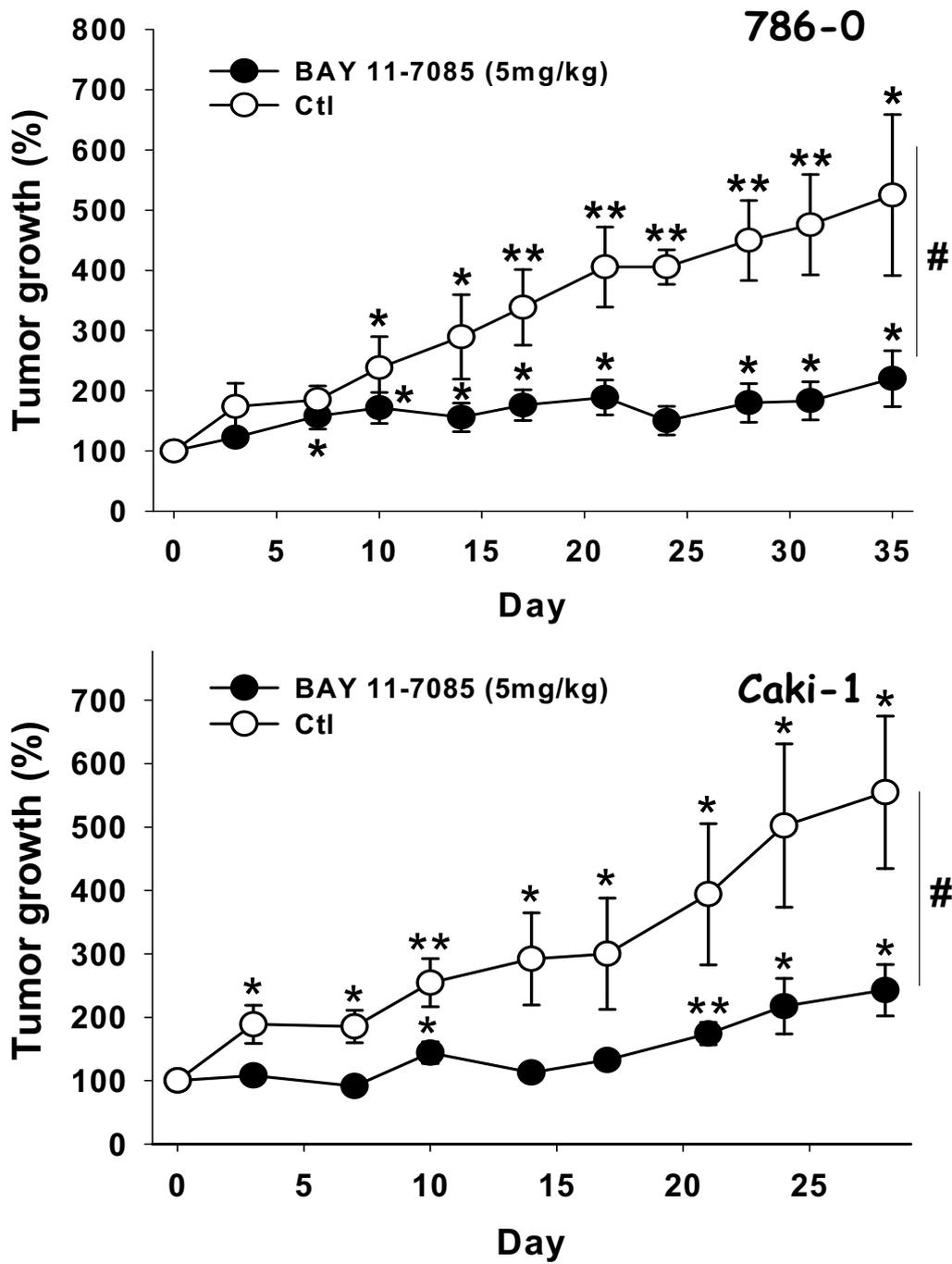
**B**



**Figure 4**

**A****B****C****D****Figure 5**

**A**



**B**

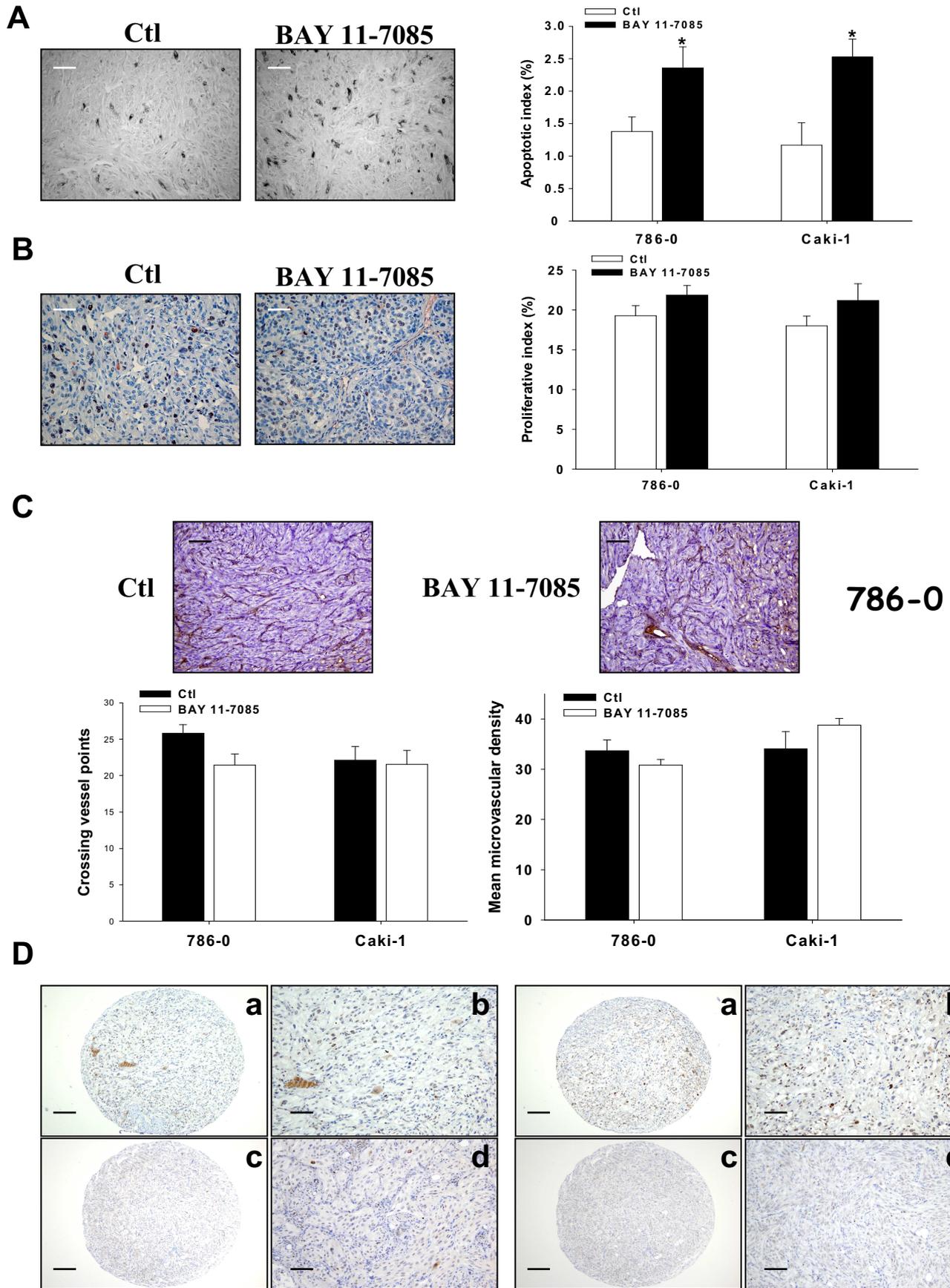


**Figure 6**

**D0**

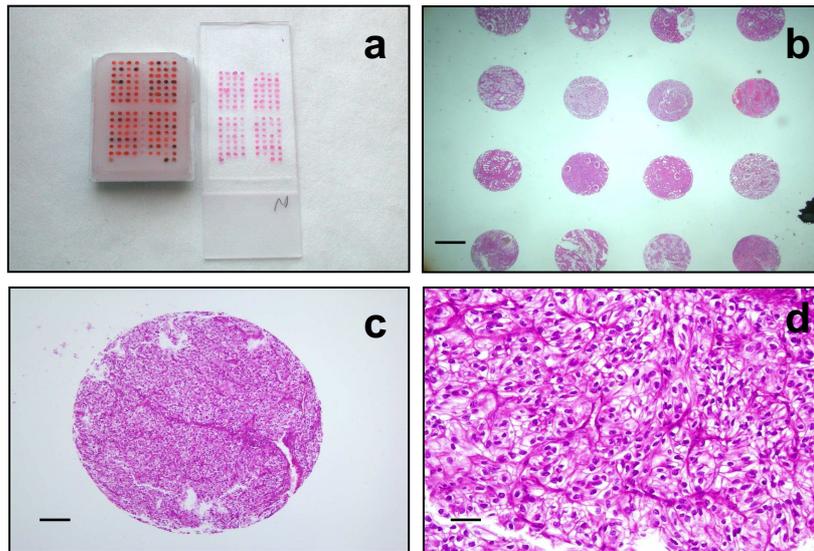
**Ctl**

**BAY**

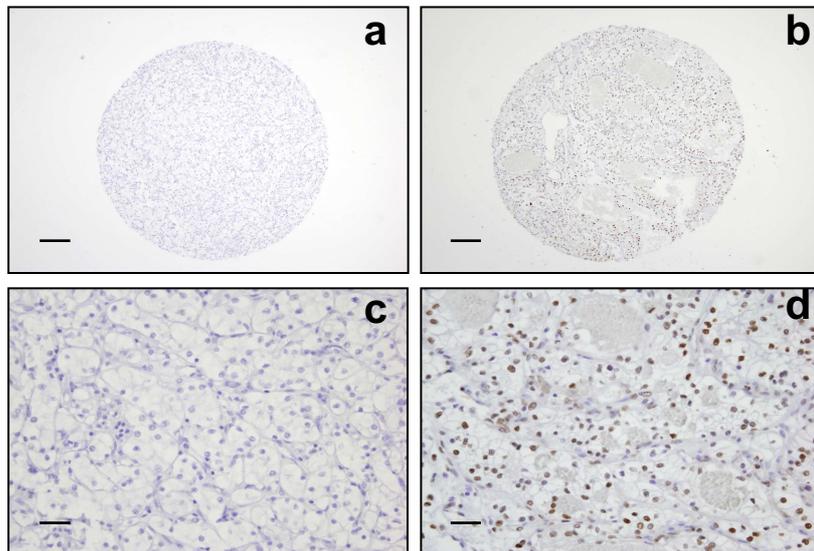


**Figure 7**

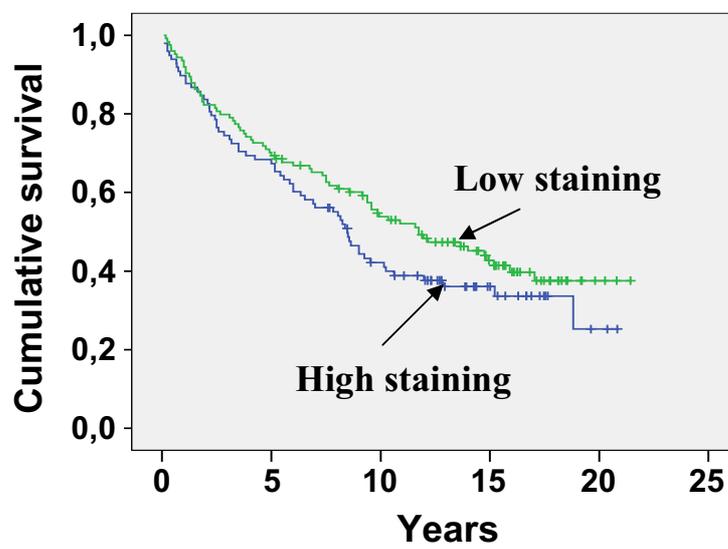
**A**



**B**



**C**



**Figure 8**

### 3.2.Résumé

Dans la première publication, nous avons montré que l'Akt est constitutivement active dans le CCC humain et qu'elle est impliquée dans la croissance et la survie de ce dernier. Parmi les cibles connues de l'Akt, nous avons identifié la GSK3 et le facteur de transcription NFκB comme étant des substrats de cette dernière dans le CCC humain. Le facteur de transcription NFκB est connu pour être impliqué dans la croissance cellulaire, la motilité et la vascularisation. Dans ce travail, nous avons donc étudié NFκB afin de savoir si cette cible en aval de l'Akt pouvait avoir une potentialité thérapeutique et/ou pronostique.

L'activité constitutive de la voie classique de NFκB dans le CCC humain a été évaluée par western blot sur 7 lignées de CCC humain et 3 biopsies de CCC humain pT3 avec le tissu rénal sain correspondant. *In vitro*, nous avons utilisé le BAY11-7085 (BAY) et la sulfazalazine, deux activateurs de IκBα, lui-même inhibiteur endogène de NFκB. Les effets de ces inhibiteurs de NFκB sur la croissance cellulaire ont été mesurés par comptage manuel de la densité cellulaire, par test de viabilité cellulaire, par TUNEL et par FACS. La sélectivité des inhibiteurs vis-à-vis de NFκB a été vérifiée par microscopie confocale, western blot, transfection de siRNA spécifiques de la sous-unité p65 de NFκB, ainsi que par un test d'activité transcriptionnelle de NFκB. *In vivo*, les effets du BAY sur la croissance tumorale de CCC humain ont été étudiés par xéno greffes sur souris nude de lignées tumorales déficientes ou non en VHL. Afin d'évaluer la valeur de NFκB en tant que facteur pronostique indépendant, nous avons utilisé une puce à tissus constituée de 241 cas de CCR humains, avec un recul clinique allant de 12 à 22 ans.

Nous avons montré que NFκB est activé de manière constitutive dans toutes nos lignées cellulaires de CCC humain, quel que soit leur statut en VHL, ainsi que dans les biopsies de CCC de stade pT3, mais pas dans les tissus sains correspondants. *In vitro* et *in vivo*, l'inhibition de NFκB bloque la croissance tumorale par induction de l'apoptose, quel que soit le statut en VHL. Grâce au TMA, nous avons montré que l'activité de NFκB est corrélée au CCR de type conventionnel et à la taille de la tumeur, cependant, elle n'est pas un facteur pronostique indépendant pour la survie des patients.

Ces résultats montrent clairement que le mécanisme responsable de la résistance intrinsèque du CCC à l'apoptose converge vers NFκB, indépendamment du statut en VHL de la tumeur et que NFκB, ou une de ses cibles transcriptionnelles, pourrait avoir une valeur thérapeutique

contre le CCC. Cibler la voie NF $\kappa$ B pourrait, par conséquent, constituer une nouvelle voie thérapeutique chez l'homme.

### 3.3.Discussion

Au début de ce travail, plusieurs publications présentaient des données contradictoires en rapport avec l'implication de cette voie dans la croissance du CCR humain *in vitro*.

En effet, il a été montré en 2000 par Pawlowski et al que NF $\kappa$ B est activé dans 6 lignées de CCR humain (Pawlowski et al., 2000). Cependant, ni l'activation de la voie du NF $\kappa$ B ni son inhibition n'étaient montrées comme impliquées dans la mort cellulaire induite par le TRAIL, une cytokine exprimée par les cellules immunitaires. L'hypothèse est que cette substance pourrait jouer un rôle dans la croissance du cancer du rein, du moins dans les lignées sensibles à ce composé. Dans ces travaux, les auteurs concluent que la voie du NF $\kappa$ B ne joue aucun rôle dans la sensibilité des cellules de CCR humain au TRAIL. Ces résultats contrastent nettement avec ceux décrits par la suite par Oya et al. Ces auteurs ont utilisé 6 lignées de CCR humain pour montrer *in vitro* divers états d'activation du NF $\kappa$ B (Oya et al., 2001). De plus, les lignées avec une forte activation constitutive du NF $\kappa$ B présentaient une résistance à l'effet apoptotique du TRAIL. Dans les cellules résistantes au TRAIL, la transfection par une construction adénovirale codant pour un mutant du I $\kappa$ B $\alpha$  non dégradable diminuait l'activité du NF $\kappa$ B ainsi que la viabilité cellulaire et rendait les cellules sensibles à ce composé. Ces deux publications apportent donc des conclusions contradictoires quant à l'implication de cette voie dans la mort des cellules tumorales de CCR humain.

En 2001, partant du principe que le traitement des patients atteints de CCR par IL2 et IFN $\alpha$  conduit, à côté de leurs effets immunomodulateurs, à un état pro-apoptotique dans certaines tumeurs, Steiner et al., ont montré que cet effet était lié au moins en partie à l'inhibition de l'effet anti-apoptotique de la voie NF $\kappa$ B (Steiner et al., 2001). Leurs résultats, obtenus *in vitro* par transfections de la sous-unité p65 constitutivement active ou d'un dominant-négatif de I $\kappa$ B $\alpha$ , suggèrent que la voie NF $\kappa$ B est impliquée, au moins en partie, dans l'effet pro-apoptotique d'un certain nombre de cytokines immunomodulatrices présentes dans l'environnement tumoral.

Plus récemment et suite à leurs travaux cités ci-dessus, Oya et al. ont étudié l'activité de NF $\kappa$ B chez quarante-cinq patients atteints de CCR, par EMSA et par immunohistochimie (Oya et al., 2003). Sur les cas étudiés, quinze montraient une activité augmentée de plus de

deux fois (jusqu'à 3,4 fois) par rapport aux tissus sains correspondant. Une augmentation d'activité était observée dans 19% des cas localisés ( $\leq$  pT2) et dans 64% des cas localement avancés ( $\geq$  pT3). Les 3 cas métastatiques de leur étude montraient une augmentation d'activité de 2 à 3 fois de NF $\kappa$ B dans la tumeur primaire. Les auteurs arrivent à la conclusion que l'augmentation d'activité de NF $\kappa$ B est corrélée au pouvoir invasif des tumeurs et au développement de métastases dans le CCR et que NF $\kappa$ B pourrait être une cible thérapeutique pour traiter le CCR. Cependant, le nombre de cas (notamment métastatiques) est très insuffisant pour en tirer de telles conclusions, et aucune donnée de croissance et/ou d'invasion métastatique, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, n'est apportée pour étayer de telles hypothèses. En outre, aucune donnée quant à une éventuelle corrélation entre l'activation de NF $\kappa$ B et les données cliniques, comme par exemple la survie des patients, n'est présentée dans ces études.

En 2004, An et al. ont recherché l'efficacité du bortezomib (PS-341), un inhibiteur du protéasome à activité anti-tumorale dans d'autres tumeurs, dans le CCR humain en utilisant 2 lignées cellulaires R11 et 444 (An et al., 2004). Ils ont montré que ces 2 lignées présentent une activation constitutive de NF $\kappa$ B et que l'inhibition de NF $\kappa$ B dépendante du bortezomib participe à l'apoptose induite par ce composé. Ils ont ensuite recherché si l'inhibition de la voie NF $\kappa$ B était suffisante pour induire l'apoptose dans leurs lignées cellulaires. Pour cela, ils ont utilisé, d'une part, un vecteur adénoviral codant pour une forme mutée de I $\kappa$ B qui ne peut pas être dégradée par le protéasome bloquant ainsi l'activation de NF $\kappa$ B, et d'autre part, un inhibiteur chimique de l'IKK, le PS-1145. L'étude réalisée par FACS avec ces 2 approches ne montrait aucun effet ni de la transfection adénovirale, ni de l'inhibiteur chimique sur la mort cellulaire dans les 2 lignées. Les auteurs en ont conclu que le blocage spécifique de l'activité du NF $\kappa$ B n'est pas suffisant pour induire l'apoptose dans le CCR humain. Par la suite, et très récemment, ce même groupe d'investigateurs (An et al., 2005) montrait par transfection que le VHL sensibilise les cellules à l'effet apoptotique du bortezomib. Mais dans ces travaux, ni la transfection par un vecteur adénoviral codant pour un mutant du I $\kappa$ B, ni l'inhibition de NF $\kappa$ B par siRNA n'induisait de diminution de viabilité dans les cellules tumorales humaines de CCR 786-0 (déficientes en VHL) transfectées par le vecteur seul ou par le VHL humain. Encore plus récemment, toujours les mêmes auteurs montrent cette fois en transfectant ces mêmes cellules (lignée 786-0) et toujours avec le même vecteur adénoviral codant pour le même mutant du I $\kappa$ B que la transfection diminue la viabilité de ces cellules en induisant la mort cellulaire (An & Rettig, 2005). Des résultats contradictoires ont ainsi été obtenus par les mêmes auteurs.

L'ensemble de ces résultats montre clairement la controverse quant à l'implication de cette voie signalétique dans la croissance du CCR. En outre, quelle que soit la publication, l'activité de NFκB a le plus souvent été mesurée par EMSA et les résultats (toujours *in vitro*), obtenus le plus souvent par transfections plasmidiques ou adénovirales, hormis dans les travaux de An et al, qui n'ont montré aucun effet sur la mort cellulaire (An et al., 2004). Ainsi, il n'était pas possible dans ce contexte bibliographique extrêmement polémique et contradictoire d'en tirer une quelconque conclusion quant à l'implication de la voie NFκB dans le CCC humain.

Lors de l'étude de la voie de NFκB dans la croissance du CCC, nous avons montré *in vitro*, par diverses techniques que cette voie est impliquée dans la croissance du CCC humain quel que soit le statut en VHL des lignées cellulaires utilisées. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des cellules tumorales implantées en sous-cutanée chez la souris nude. Lors de ces expériences, nous avons montré que l'inhibition de NFκB bloque la progression tumorale par induction de l'apoptose et nous avons même obtenu dans 10% des cas une régression complète des tumeurs. Cela nous laisse supposer que ces résultats peuvent être améliorés par l'utilisation d'une dose d'inhibiteur supérieure ou par une augmentation de la durée du traitement, dans la limite où ces modifications expérimentales n'entraînent pas d'effets secondaires délétères. Il est cependant important de rappeler que les souris nude sont athymiques et par conséquent immunodéficientes. Or la voie NFκB est également impliquée dans des phénomènes biologiques tels que l'inflammation ou l'immunité. Par conséquent, les résultats que nous avons obtenus *in vivo* peuvent s'en trouver limités car il n'y a pas d'implication de ces deux composantes. Nos résultats identifient donc l'inhibiteur endogène de NFκB, IκBα, comme une nouvelle cible thérapeutique du CCC quel que soit le statut des tumeurs en VHL. Cibler IκBα à l'aide d'activateurs spécifiques pourrait ainsi s'avérer une thérapie très efficace contre le CCR chez l'homme. Grâce au TMA, nous avons montré que l'activation de NFκB ne pouvait pas être considérée comme un facteur pronostique indépendant de la survie des patients, bien qu'elle soit corrélée au type conventionnel de CCR et à la taille des tumeurs. NFκB peut donc être considéré comme un marqueur de CCC humain et il est également envisageable qu'il puisse avoir une valeur pronostique dépendante d'autres facteurs. Des études menées par le Dr. Véronique Lindner concernant la valeur pronostique de l'Akt, GSK3 et NFκB sont actuellement en cours au laboratoire sur un TMA multiple.

De récentes publications confirmant nos résultats sont parues concernant l'implication de NFκB dans le CCR. Ainsi, Morais et al. ont montré *in vitro* que NFκB est activé dans

plusieurs lignées de CCR humain et que son inhibition induit une diminution de la croissance et de la viabilité des cellules tumorales (Morais et al., 2006). Ces travaux rejoignent ceux de Oka et al. qui montrent que le parthénolide, un inhibiteur de NFκB généralement utilisé dans le traitement des migraines et pour ses activités anti-inflammatoires, inhibe la croissance cellulaire *in vitro* de deux lignées de CCR humain, ACHN et OUR-10, par induction de l'apoptose (Oka et al., 2007). Ils confirment ces résultats *in vivo*, avec des xéno greffes sur souris nude avec les OUR-10, et montrent que le parthénolide bloque la croissance tumorale par une inhibition de NFκB couplée à une diminution de la production d'IL8 et de VEGF. An et al. ont également publié récemment (An & Rettig, 2007) que NFκB serait activé par la voie de signalisation de l'EGFR dans le CCR. L'inhibition de cette voie couplée au bortezomib, un inhibiteur du protéasome, augmenterait l'efficacité du bortezomib par inhibition de NFκB. Ils concluent de leurs résultats que la voie de signalisation EGFR/PI3K/Akt/NFκB pourrait être cruciale dans la croissance du CCR humain. Etant donné les publications très contradictoires citées précédemment de ces mêmes auteurs, des études supplémentaires seront nécessaires afin de conforter ou non ces résultats.

Considérant le contexte bibliographique ainsi que nos résultats sur l'implication de la voie PI3K/Akt et de la voie NFκB dans la croissance du CCC humain, nous avons décidé de poursuivre ces travaux par l'identification des cibles transcriptionnelles de NFκB dans cette pathologie, ainsi que par l'étude des interactions possibles entre Akt, GSK3 et NFκB. Comme précisé précédemment, GSK3 et NFκB sont les deux principales cibles de l'Akt que nous avons identifiées dans les lignées de CCC humain, déficientes ou non en VHL. Les résultats obtenus, suite à ces hypothèses, sont développés dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

## **Chapitre 4.**

# **IDENTIFICATION D'UNE BOUCLE DE REGULATION ET DES CIBLES DE NFκB**

Manuscrit en préparation

## 1. RESUME

Un des défis actuels concernant le CCR métastatique et le développement de thérapies efficaces est l'identification de cibles moléculaires impliquées dans la résistance à l'apoptose des tumeurs. Nous avons montré que l'Akt ainsi que l'une de ses cibles, le facteur de transcription NFκB, sont constitutivement actifs dans le CCC, indépendamment du statut en VHL de la tumeur. Nous avons également montré que GSK3 est l'un des substrats de l'Akt dans le CCC. L'objectif de ce travail était de mieux comprendre le mécanisme de régulation de cette activation et d'identifier les cibles transcriptionnelles de NFκB potentiellement impliquées dans la survie et la croissance du CCC, toujours en relation avec le statut en VHL de la tumeur.

Nous avons utilisé deux lignées cellulaires de CCC humain, les 786-0 déficientes en VHL et les Caki-1 qui expriment le VHL sauvage. Les cellules ont été mises en présence de différents inhibiteurs seuls ou en combinaison : le LY294002 (LY) qui inhibe la PI3K et donc la voie PI3K/Akt, le SB216763 (SB) qui est un inhibiteur de la GSK3 et le BAY11-7085 (BAY) qui inhibe NFκB. La sélectivité des inhibiteurs a été vérifiée par western blot et leurs effets sur la densité cellulaire ont été mesurés par comptage manuel. La nature de la mort cellulaire induite par les inhibiteurs seuls ou en combinaison a été analysée par fragmentation d'ADN et par FACS. Nous avons également utilisé des tumeurs obtenues chez la souris nude après implantation de 786-0 et de Caki-1 en sous-cutané. Ces souris avaient été traitées auparavant avec le BAY (voir publication 2). Avec ces dernières, nous avons construit un TMA en prélevant des échantillons de 1mm de diamètre, et réalisé des marquages immunohistochimiques (phospho-Akt, phospho-GSK3, phospho-NFκB). Les effets des inhibiteurs sur l'état d'activation de NFκB ont été analysés dans les lignées cellulaires par un test d'activité transcriptionnelle de NFκB. Les cibles transcriptionnelles de NFκB ont été identifiées sur cellules et tumeurs traitées ou non avec BAY par « *Target Gene Array* » (TGA), une puce qui permet d'analyser les variations d'expression au niveau des ARNs. Nous sommes en train de compléter cette analyse sur cellules traitées ou non par 2D-DIGE (« *2D difference gel electrophoresis* ») qui permet d'analyser les variations d'expression au niveau protéique. Cette étape se fait en collaboration avec l'équipe du Pr Olivier Boutaud aux USA (laboratoire de pharmacologie, Université Vanderbilt, Nashville, TN, USA).

Les trois inhibiteurs diminuent la densité cellulaire en induisant l'apoptose des cellules tumorales. De manière très intéressante, nous avons mis en évidence une boucle de régulation entre Akt, GSK3 et NFκB, différente entre les 786-0 et les Caki-1. En effet, dans les 786-0,

l'Akt active NFκB et inhibe GSK3, mais NFκB active lui aussi Akt, augmentant ainsi l'inhibition de GSK3 par phosphorylation, ce qui va également activer NFκB. Cette boucle « activatrice » n'est pas retrouvée dans les Caki-1, bien que dans les deux lignées, les boucles de régulation convergent vers NFκB. Ces résultats ont été confirmés avec le TMA et le test d'activité transcriptionnelle de NFκB. Le TGA nous a permis d'identifier différents gènes régulés par NFκB dans les deux lignées cellulaires ainsi que dans les tumeurs qui en dérivent. Certains de ces gènes cibles sont communs aux deux lignées, comme la chaîne lourde de la ferritine (FTH) ou A20, alors que d'autres sont différents selon les lignées cellulaires, comme la cycline D1 régulée uniquement dans les 786-0 par NFκB, ce qui est en accord avec cette boucle de régulation, ou l'IL6 qui est régulée uniquement dans les Caki-1. Le 2D-DIGE nous a également permis de montrer que 27 protéines étaient régulées par NFκB, et là encore, des différences ont été observées entre les deux lignées. L'identification de ces protéines est en cours, par spectrométrie de masse, séquençage et interrogation de bases de données du type MASCOT. Des expériences sont en cours avec les 786-0 transfectées par le VHL sauvage ou par le vecteur seul afin de vérifier si les différences observées entre les deux lignées sont dépendantes du statut en VHL des lignées cellulaires, comme le laissent suggérer nos résultats, ou si elles sont dues à la nature même des lignées utilisées.

Nous avons donc montré l'existence d'une boucle de régulation impliquant Akt, GSK3 et NFκB qui apparaît dépendante du statut en VHL, mais qui converge dans tous les cas vers une stimulation de l'activité transcriptionnelle de NFκB. Les cibles transcriptionnelles de NFκB identifiées, dépendantes du statut en VHL ou communes, ouvrent de nouvelles perspectives dans le développement de thérapies adaptées au statut en VHL des tumeurs.

## 2. INTRODUCTION

Le CCR est, chez l'homme, un véritable défi clinique. En effet, ce néoplasme développe une résistance, intrinsèque ou induite par les traitements, aux phénomènes d'apoptose des cellules tumorales.

Plusieurs études ont montré que GSK3β pouvait stabiliser NFκB (Demarchi et al., 2003) et réguler voire même orienter son activité transcriptionnelle (Buss et al., 2004; Sanchez et al., 2003; Steinbrecher et al., 2005). Ces études ont montré que GSK3 pouvait augmenter ou diminuer l'activité transcriptionnelle de NFκB, mais aucune explication n'a pu être donnée quant à cet effet paradoxal. Ainsi par exemple, la phosphorylation de p65 en Ser468 par GSK3 diminue l'activité de NFκB (Buss et al., 2004). De plus, il a été montré dans des fibroblastes issus de souris déficientes en gène GSK3β, que l'Akt n'était plus activée et l'apoptose augmentée. Ces résultats suggèrent donc que GSK3β est nécessaire à l'activation de l'Akt (Takada et al., 2004).

Contrairement à d'autres types de cancers, les mécanismes impliqués dans la résistance du CCR à l'apoptose ne sont que peu étudiés. Nous avons précédemment montré que la voie PI3K/Akt est constitutivement active dans le CCC humain et qu'elle joue un rôle important dans la croissance et la survie du CCC, indépendamment du statut en VHL des tumeurs. Nous avons également montré que les deux principales cibles de l'Akt dans le CCC sont GSK3 et NFκB, alors que dans nos lignées cellulaires de CCC humain, mTOR et FKHR n'ont pas été retrouvés à l'état phosphorylé. Nous avons également montré sur des lignées de CCC humain exprimant ou non le VHL, que l'inhibition de NFκB entraîne une mort cellulaire totale par apoptose. De plus, l'inhibition de PI3K/Akt ou de NFκB avec des inhibiteurs sélectifs de ces voies, utilisés à de faibles doses, a bloqué la croissance ou induit des régressions tumorales de xénogreffes implantées en sous-cutanée chez des souris nues, quel que soit le statut en VHL des tumeurs.

Nos objectifs étaient de déterminer si Akt, GSK3 et NFκB pouvaient coopérer dans l'induction de la survie du CCC humain et si la présence d'une protéine VHL fonctionnelle pouvait avoir une influence sur la régulation de ces interactions. De plus, nous voulions identifier les cibles transcriptionnelles de NFκB potentiellement impliquées dans la survie et la croissance du CCC, en relation avec le statut en VHL de la tumeur. Dans ce travail, nous décrivons une boucle de régulation dépendante du VHL impliquant Akt, GSK3 et NFκB qui converge dans tous les cas vers une stimulation de l'activité transcriptionnelle de NFκB. Les

cibles transcriptionnelles de NFκB identifiées, dépendantes du statut en VHL ou non, ouvrent de nouvelles perspectives dans le développement de thérapies adaptées au statut en VHL des tumeurs. Ces résultats soulignent l'importance de l'axe PI3K/Akt/GSK3/NFκB dans la croissance et la survie du CCC et ouvrent de nouvelles voies thérapeutiques en fonction de l'expression du gène suppresseur de tumeur VHL.

### 3. MATERIELS ET METHODES

#### Lignées cellulaires de CCC humain

Nous avons utilisé deux lignées de CCC humain, les 786-0 déficientes en VHL et les Caki-1 qui expriment le VHL normal. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM complété avec 10% de sérum de bœuf foetal et 5% de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont été utilisées à 80% de confluence.

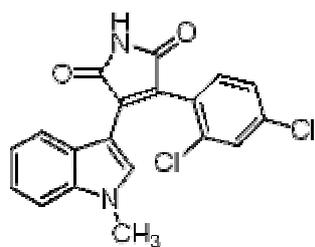
#### Modèles de tumeurs humaines

Nous avons fait des xénogreffes sur souris nude avec les lignées de CCC 786-0 et Caki-1. Les souris ont été traitées pendant 1 mois avec soit un inhibiteur de PI3K, LY, soit un inhibiteur de NFκB, BAY. Après prélèvement des tumeurs et fixation dans un bloc de paraffine, le Dr. Véronique Lindner a construit un TMA en faisant des prélèvements de 1mm de diamètre.

#### Les inhibiteurs utilisés

Nous avons utilisé trois inhibiteurs connus pour leur sélectivité :

- Le LY294002 (LY), qui inhibe la voie PI3K/Akt,
- Le BAY 11-7085 (BAY), qui inhibe la voie NFκB
- Le SB216763 (SB), qui inhibe la GSK3 (Sigma-Aldrich)



#### SB 216763

3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione. Cet inhibiteur sélectif de GSK3 a une IC<sub>50</sub> d'environ 34nM (Cross et al., 2001).

Ce maléimide agit *in vitro* en compétition au niveau du site de liaison de l'ATP sur les deux isoformes de GSK3 (α et β) (Coghlan et al., 2000; Cross et al., 2001).

La sélectivité d'action de cet inhibiteur a été vérifiée par western blot (visualisation de l'état de phosphorylation de GSK3 α/β), et par FACS, en faisant une compétition avec des siRNA dirigés spécifiquement contre GSK3 β.

Ces inhibiteurs ont été utilisés seuls ou en combinaison à des concentrations permettant de visualiser l'effet des autres inhibiteurs et obtenues après établissement d'une courbe dose-réponse sur la mort cellulaire : 20μM (LY), 5μM (BAY), et 20μM (SB).

### **Prolifération cellulaire**

La densité des cellules adhérentes a été comptée manuellement grâce à une cellule de Malassez. Les cellules ont été mises en culture dans des plaques 24 puits (20 000 cellules par puits) pendant 48h, puis traitées pendant 48h avec les différents inhibiteurs LY, BAY, SB, seuls ou en combinaison, à des concentrations respectivement de 20μM, 5μM et 20μM. Tous les inhibiteurs ont été dilués dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO), qui a été utilisé comme contrôle. Dans toutes nos expériences, le volume de DMSO utilisé était inférieur à 2% (v/v) afin d'éviter tout effet toxique (effets observés à partir de 5% de DMSO).

### **Western blot**

Les effets des inhibiteurs sur les différentes voies de signalisation ainsi que leur sélectivité ont été visualisés par western blot. La sélectivité de l'action des inhibiteurs utilisés a également été vérifiée lors des précédents travaux réalisés (Publication n°1 et 2). Les résultats obtenus par TGA et par 2D-DIGE ont, eux aussi, été vérifiés par western blot.

Les extractions de protéines totales et la mesure de leurs concentrations ont été faites comme décrit précédemment (Publication n°1). Les protéines sont alors dénaturées à 100°C puis déposées (10-30μg) sur un gel de SDS-polyacrylamide (10%). Après électrophorèse (SDS-PAGE) et transfert sur membrane de nitrocellulose ECL les membranes sont saturées pendant une heure dans du tampon salin Tris (TBS), pH7,5, contenant 0,1% de tween-20 (TBST) et 5% de lait écrémé, sous agitation et à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées pendant 24h à 4°C, toujours sous agitation, avec les anticorps d'intérêt dilués dans TBST avec 5% de lait écrémé. Les anticorps (Ab) que nous avons utilisés au cours de ce travail reconnaissent les protéines humaines :

Ab de lapin polyclonal anti-Akt1 et anti-phospho Akt1 (S473) à une dilution de 1/250

Ab de lapin polyclonal anti-phospho NFκB p65 (S536) et anti-NFκB p65, 1/250 (Ozyme)

Ab de lapin polyclonal anti-GSK3β à une dilution de 1/250 (Ozyme)

Ab de lapin polyclonal anti-cyclin D1, 1/250 (Ozyme)

Ab de lapin polyclonal anti-stathmine, 1/250 (Ozyme)

Ab de lapin polyclonal anti-FTH, 1/500 (Abcam)

Ab de lapin polyclonal anti-hsp70, 1/200 (BD Biosciences)

Afin de vérifier le dépôt des protéines, nous avons visualisé une protéine domestique : la  $\beta$ -actine avec l'Ab de souris monoclonal anti- $\beta$ -actine (Sigma-aldrich, St Quentin Fallavier, France) à une dilution de 1/5000.

Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites précédemment (chapitre 3).

### **Mort cellulaire**

Le type de mort cellulaire induite par les inhibiteurs a été analysé par FACS en faisant un marquage avec l'annexine V sur cellules non perméabilisées. Nous avons complété cette analyse par l'analyse de la fragmentation d'ADN sur gel d'agarose.

Le protocole pour le FACS est le même que pour le double marquage, avec une incubation uniquement avec de l'annexine V couplée à FITC. L'avantage de ce protocole par rapport au double marquage est que le calibrage du FACS est plus simple. Les résultats restent reproductibles et nous avons toujours le marquage des stades précoces de l'apoptose. Les inconvénients sont les mêmes que pour le double marquage, avec en plus, la nécessité de compléter l'expérience avec une technique permettant de visualiser la nécrose. En effet, lors d'un phénomène nécrotique, les membranes des cellules se sont rompues rendant accessible les PS à l'annexine V. Il n'y a donc pas de certitude quant à l'existence ou non d'un phénomène nécrotique. Nous avons donc complété ces marquages simples par un gel d'agarose. L'apoptose est, en effet, caractérisée par des coupures de l'ADN tous les multiples de 180pb, correspondant à la distance inter-nucléosomique. La nécrose, elle, induit des coupure aléatoires, et donc apparaît sous forme de « *smear* ».

Après avoir été cultivées dans des boites de 25cm<sup>2</sup>, les cellules tumorales sont traitées avec LY, BAY et SB seuls ou en combinaison pendant 48h. Les contrôles sont faits avec le volume maximum de DMSO utilisé (< 2%). Les cellules adhérentes et le surnageant sont récupérés après trypsination, centrifugation (2000g, 5min, 4°C) et resuspension du culot dans du tampon PBS. Après trois lavages avec du PBS, les culots sont resuspendus dans un tampon d'incubation (140mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Hepes) contenant 0,5% d'annexine V couplée à FITC (Roche). Après dix minutes d'incubation à l'obscurité, 400 $\mu$ l de tampon d'incubation sont ajoutés. Les cellules sont alors centrifugées et fixées dans 200 $\mu$ l de formol 1% à 4°C, entre dix minutes et 5 jours. Le jour de l'analyse par FACS, les échantillons sont centrifugés et resuspendus dans 200 $\mu$ l de tampon d'incubation. Les cellules n'ayant pas été perméabilisées, le marquage avec l'annexine V permet une visualisation précoce de l'apoptose. Afin de s'assurer de l'absence de nécrose, nous avons complété cette expérience par une fragmentation d'ADN sur gel d'agarose.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 25cm<sup>2</sup>, puis traitées pendant 48h avec soit du DMSO (contrôle) soit par un mélange des trois inhibiteurs. Après récupération des cellules adhérentes et du surnageant, les cellules sont lysées (EDTA 25mM, SDS 1%, protéinase K 1mg/ml, pH8) pendant une nuit à 50°C. Les échantillons sont alors repris dans un même volume de phénol/chloroforme/IAA (25/24/1). Après centrifugation, le surnageant est repris dans un même volume de chloroforme/IAA (24/1) avant d'être à nouveau centrifugé. Le surnageant est alors complété avec du NaAc 0.3M et de l'éthanol absolu à des volumes respectifs de 10% du volume de l'échantillon et 2,5 fois le volume de l'échantillon. Après une nuit à -20°C, les échantillons sont centrifugés et le culot contenant l'ADN est repris dans de l'eau distillée filtrée. L'ADN est ensuite mélangé à 5% d'une solution de gel loading (Sigma) puis il est déposé sur un gel d'agarose à 2%. Après une migration de trente minutes à 150V, la fragmentation de l'ADN est visualisée grâce à une plaque à UV. Cette méthode permet de faire facilement la distinction entre l'apoptose et la nécrose. Le problème est que cette approche n'est pas quantitative.

### **Immunohistochimie**

Les marquages ont été réalisés avec les mêmes anticorps et dans les mêmes conditions expérimentales que dans les Publications n°1 et n°2. Nous avons visualisé Phospho-Akt, Phospho-GSK3 et Phospho-NFκB. Des photographies de plusieurs champs représentatifs ont été faites.

### **Test d'activité transcriptionnelle de NFκB (Chemicon, Hampshire, Royaume Uni)**

L'activité transcriptionnelle de NFκB a été quantifiée grâce au kit « NFκB Transcription factor assay colorimetric » de Chemicon. Nous avons suivi le protocole fourni dans le kit et expliqué précédemment dans le chapitre 2 de ce mémoire. Nous avons traité les cellules pendant 8h avec LY (20μM), SB (20μM) et BAY (5μM) seuls ou en combinaison. Les protéines nucléaires ont ensuite été extraites grâce au kit de Chemicon « Nuclear extraction kit » et la concentration protéique des échantillons a été dosée avec la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951).

## Identification des cibles transcriptionnelles de NFκB

- **Target Gene array**

Pour réaliser cette expérience nous avons utilisé le kit de Panomics « TransSignal target NFκB human gene array », contenant 111 gènes cibles connus de NFκB. Nous avons effectué cette expérience sur 2 lignées cellulaires, 786-0 et Caki-1, traitées ou non avec BAY 11-7085 à 5μM pendant 24h ; ainsi qu'avec des prélèvements de xéno greffes de ces mêmes lignées, traitées ou non avec le BAY 11-7085.

Afin d'extraire les ARN totaux, les cellules en culture ou les tissus sont lysés par addition de Trizol (Invitrogen) pendant 5 minutes. Du chloroforme est ensuite ajouté (1/5<sup>ème</sup> du volume de l'échantillon). Après agitation et centrifugation, l'ARN contenu dans la phase supérieure incolore est récupéré puis précipité par ajout d'alcool isopropylique (0,5ml par ml de trizol). Après centrifugation, le culot est lavé avec une solution d'éthanol/eau traitée au DEPC (3/1). Le culot est ensuite séché et resuspendu dans de l'eau traitée au DEPC. Afin de vérifier la qualité des ARN extraits, une mesure d'absorbance a été faite (ratio A260/A280 compris entre 1,8 et 2,2), ainsi qu'une électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturante (formaldehyde, BET) permettant de visualiser les bandes 28S et 18S des ARN ribosomiques (à respectivement 5 et 2 kb) avec un ratio 2:1 (28S:18S). Ces ARN totaux sont incubés avec un mélange de primer de NFκB fourni dans le kit puis ils sont transcrits en ADNc par une reverse transcriptase (AMV, Roche Molecular Biochemical) en présence de dUTP biotinylé. Les ADNc biotinylés sont ensuite hybridés avec les membranes « *spotées* » avec les différents gènes cibles (selon le protocole fourni avec le kit). Une solution de streptavidine couplée à une peroxydase permet ensuite de visualiser les complexes « gènes/ADNc » par chimioluminescence (GeneGnôme, Ozyme). Les résultats sont ensuite analysés par le logiciel Adobe Photoshop7.0.

- **2D-DIGE (2-D difference gel electrophoresis)**

Le 2D-DIGE est une technologie qui couple une première migration des protéines selon leur point isoélectrique (première dimension), suivie d'une seconde migration dans une deuxième dimension selon le poids des protéines (dans des conditions dénaturantes). Deux échantillons protéiques (protéines totales) sont marqués avec des fluorophores (Cy3 ou Cy5), puis sont séparés sur le même gel en deux dimensions. Selon la longueur d'onde d'excitation du fluorophore, les échantillons sont visualisés indépendamment l'un de l'autre ou ensemble. Les spots protéiques d'intérêt sont ensuite analysés par spectrométrie de masse (LC/MS/MS) suivie d'un séquençage peptidique et d'une identification, le cas échéant, par interrogation des bases de données de protéines, de type MASCOT par exemple. Ces expériences sont réalisées à l'Université Vanderbilt (Nashville, Tennessee, USA), grâce à une collaboration engagée avec le Pr. Olivier Boutaud (Department of Pharmacology, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA).

## 4. RESULTATS

La sélectivité des inhibiteurs vis-à-vis de leurs cibles respectives a été confirmée par western blot (Figure 1). Les trois inhibiteurs diminuent la densité cellulaire (Figure 2) par induction de l'apoptose dans les deux lignées (Figure 3A et B, schémas du haut). Le SB montre plus d'efficacité pro-apoptotique avec la lignée Caki-1 qu'avec la lignée 786-0. Dans les cellules 786-0, l'apoptose induite par le BAY et le LY est plus grande que celle obtenue avec chacun des inhibiteurs seuls mais l'effet n'est pas additif. Cet effet n'est pas retrouvé dans les Caki-1 (résultat confirmé par western blot, Figure 1) où l'effet des deux inhibiteurs est intermédiaire à ceux obtenus par chacun des inhibiteurs seuls. De plus, dans les 786-0, BAY et LY inhibent fortement l'effet induit par SB, contrairement à la lignée Caki-1. Quand les trois inhibiteurs sont utilisés ensembles, l'apoptose induite correspond à celle obtenue par le SB seul dans les deux lignées.

Les résultats obtenus avec le test d'activité transcriptionnelle de NFκB (Figure 3 A et B, schémas du bas) montrent que dans les deux lignées cellulaires, le SB induit l'apoptose des cellules tumorales par un mécanisme à la fois dépendant mais également indépendant de NFκB. Dans les 786-0, l'activité transcriptionnelle de NFκB est légèrement diminuée dans les cellules traitées par BAY/LY par rapport à chacun des inhibiteurs seuls, alors que dans les Caki-1, l'effet obtenu par BAY/LY sur l'activité de NFκB est intermédiaire. Il faut également noter que l'activité transcriptionnelle de NFκB après traitement avec SB/LY et SB/BAY est inférieure à celle obtenue par le SB et le LY seuls, alors que nous avons montré précédemment que BAY et LY inhibent l'effet pro-apoptotique du SB dans les 786-0.

Ces résultats, confirmés par immunohistochimie du TMA (Figure 4), suggèrent que :

1. Dans les 786-0, NFκB semble activer Akt, mais pas dans les Caki-1,
2. L'inhibition de la PI3K ou de NFκB seule ou ensemble conduit GSK3 à agir essentiellement par un mécanisme indépendant de NFκB, avec un effet plus important dans les cellules 786-0,
3. La forme active de GSK3 induit l'apoptose dans les 786-0 mais pas dans les Caki-1,
4. Cette boucle de régulation entre Akt, GSK3 et NFκB, bien que différente entre les deux lignées, converge dans tous les cas vers une activation de NFκB.

Afin d'identifier les cibles de NFκB nous avons comparé les cellules traitées avec le BAY (5μM) aux cellules contrôles traitées avec du DMSO par TGA (Figure 5). Différentes cibles transcriptionnelles ont été identifiées telles que A20, la chaîne lourde de la ferritine (FTH) ou

hsp70 (Tableau 1). Ces cibles sont connues pour être impliquées dans le métabolisme cellulaire, l'apoptose ou la motilité cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus après analyse par TGA de tumeurs implantées sur des souris nude et traitées avec le BAY ou avec PBS/DMSO (tumeurs traitées dans la Publication n°2). De manière concordante avec la boucle de régulation décrite précédemment, la cycline D1 est régulée par NFκB uniquement dans les cellules 786-0. Des analyses complémentaires sont en cours par 2D-DIGE. Des résultats préliminaires ont montré que NFκB régule plus de 27 protéines, actuellement toujours en cours d'identification par spectrométrie de masse couplée au séquençage et à l'interrogation de bases de données de protéines. Parmi ces protéines, certaines sont communes aux deux lignées alors que d'autres diffèrent selon le type cellulaire (Figure 6). Des expériences sont également en cours au laboratoire afin de déterminer si les cibles de NFκB sont dépendantes du statut en VHL des cellules, ou si les différences observées sont dues aux caractéristiques intrinsèques de chacune des lignées cellulaires. Pour cela, nous avons à notre disposition une lignée de 786-0 (déficiente en VHL) transfectées par le VHL sauvage (1-213) ou par un VHL inactif ( $\Delta$ VHL).

Par western blot (Figure 7), nous avons visualisé l'expression de certaines des cibles identifiées par TGA et 2D-DIGE (hsp70, stathmine, FTH et cycline D1) sur les 786-0 et les Caki-1 traitées pendant 24h avec BAY (5 $\mu$ M) ainsi que sur les 786-0 transfectées avec le  $\Delta$ VHL (786-0  $\Delta$ VHL) ou le VHL sauvage (786-0 VHL). L'expression de hsp70 n'est pas régulée par le VHL et quel que soit le statut en VHL de la lignée, BAY ne modifie pas l'expression de hsp70. L'expression de la stathmine diminue en présence de BAY dans les 786-0 et augmente dans les Caki-1. Elle est également supérieure dans les 786-0 VHL que dans les 786-0  $\Delta$ VHL. La cycline D1 a un profil inverse : son expression augmente dans les 786-0 et diminue dans les Caki-1 après traitement avec le BAY et la réintroduction d'un VHL actif dans les 786-0 augmente l'expression de la cycline D1. La FTH ne présente pas de différence d'expression lors du traitement avec le BAY mais elle augmente dans les 786-0 VHL par rapport aux 786-0  $\Delta$ VHL.

La boucle de régulation impliquant Akt/GSK3/NFκB dans les 786-0 et les Caki-1 est représentée Figure 8.

## 5. DISCUSSION

Les mécanismes signalétiques de la résistance intrinsèque et en réponse aux thérapies du CCR humain n'ont reçu que peu d'attention jusqu'à récemment. Nous avons mis en évidence que la voie PI3K/Akt est activée de manière constitutive dans le CCR humain aussi bien dans les lignées tumorales humaines en culture, et ce indépendamment du statut en VHL, que dans les tumeurs fraîchement prélevées après néphrectomie alors que les tissus sains correspondants ne montrent pas d'activité de cette voie. Parmi les cibles de l'Akt que nous avons mises en évidence dans cette pathologie, nous trouvons GSK3 et le facteur de transcription NFκB. Bien que mTOR ait pu être retrouvé à l'état activé phosphorylé chez certains patients dans d'autres études, nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle activation dans nos études (Pantuck et al., 2007; Robb et al., 2007). Comme cela est présenté dans la discussion de la publication n°1 de ce mémoire, l'activation de mTOR pourrait être liée au stade tumoral et/ou au statut en VHL de la tumeur mais nos résultats nous laissent supposer que cette activation n'est pas dépendante du statut en VHL de la tumeur. De la même manière nous n'avons pas retrouvé FKHR phosphorylé ni dans les lignées cellulaires ni dans les tumeurs.

Dans nos études, l'inhibition de PI3K ou de NFκB induisait une apoptose tumorale presque complète dans les lignées tumorales en culture. Dans le modèle de souris nude implantée avec des lignées cellulaires humaines de CCR, l'inhibition de PI3K ou NFκB conduisait à des inhibitions de croissance et même des régressions tumorales significatives par induction de l'apoptose (voir publications n° 1 et n° 2). L'ensemble de ces effets étaient similaires quel que soit le statut en VHL.

Akt est en amont de GSK3 et NFκB dans la cascade signalétique et la description par d'autres investigateurs d'interaction entre GSK3 et NFκB (Buss et al., 2004; Sanchez et al., 2003; Steinbrecher et al., 2005; Takada et al., 2004) nous a conduit à rechercher l'existence potentielle d'interactions régulatrices entre les 3 composantes Akt, GSK3 et NFκB. L'influence possible du VHL dans ces régulations a également été étudiée malgré le fait qu'aucune différence significative n'ait été observée dans nos études quant à l'effet de l'inhibition de ces voies sur la croissance tumorale. Ainsi, comme précisé en introduction et ci-dessus, il a été montré dans diverses études que l'activité transcriptionnelle et que la spécificité des gènes régulés par NFκB pouvait être influencées par GSK3.

Un challenge pour le développement de thérapies efficaces est d'identifier les cibles moléculaires en aval impliquées dans la résistance des cellules tumorales à l'apoptose et qui

soient spécifiques du phénotype tumoral des cellules de CCR. Etant donné que nos études précédentes ont révélé que l'activation de NFκB est un événement central dans la résistance intrinsèque du CCR à l'apoptose, notre but était également d'identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par l'activité transcriptionnelle de NFκB dans le CCR humain. Dans ce travail, nous avons mis en évidence une boucle de régulation entre Akt, GSK3 et NFκB qui n'a jamais été décrite dans le CCR, et dont l'originalité est de différer selon le statut en VHL des cellules. Un point en suspens est de définir à quel niveau de cette boucle de régulation le VHL intervient. Ainsi, dans les cellules déficientes en VHL, NFκB participe à l'activation de l'Akt, ce qui n'est pas observé dans les cellules exprimant un VHL normal, et qui à notre connaissance n'a jamais été décrite dans la littérature. Le mécanisme de cette activation n'est pas connu mais pourrait être le résultat de l'activité transcriptionnelle de NFκB et notamment de l'augmentation d'expression d'une de ses cibles, HIF1. En effet, il a été montré non seulement que l'Akt stimule l'expression de HIF1 mais également que HIF1 stimule l'expression de la forme activée d'Akt (Tanaka et al., 2006). Le fait d'observer cette régulation de NFκB sur Akt uniquement dans les cellules 786-0 déficientes en VHL (et exprimant donc HIF) est tout à fait en accord avec cette hypothèse, mais nécessitera des expérimentations spécifiques afin de la conforter.

A côté de cet effet stimulateur de NFκB sur Akt dans la régulation décrite dans nos études, Akt inhibe l'activité de GSK3 par phosphorylation empêchant ainsi GSK3 d'exercer son activité inhibitrice sur NFκB quel que soit le statut en VHL des cellules. L'inhibition de GSK3 induit l'apoptose des cellules tumorales partiellement en diminuant l'activité transcriptionnelle de NFκB. Cependant, une autre voie est utilisée parallèlement par GSK3 dans l'induction de l'apoptose. GSK3 régule l'activité de toute une pléiade de molécules (Jope & Johnson, 2004) appartenant non seulement à des voies métaboliques et de signalisation intracellulaire comme la glycogène synthase ou encore les cyclines D1 et E, mais également des protéines de structure comme la « *kinesin light chain* » ainsi que toute une série de facteurs de transcription incluant la β-caténine, CREB, HIF1, NFκB ou encore p53. En outre, GSK3 phosphoryle le facteur d'initiation eucaryote eIF2B, une étape facilitant ainsi l'apoptose (Jope & Johnson, 2004). De la même manière, GSK3 facilite l'activation de la c-Jun kinase qui contribue également à l'apoptose dans certaines conditions (Hongisto et al., 2003; Kim et al., 2003). Cette seconde voie utilisée par GSK3 dans l'induction de l'apoptose pourrait ainsi être liée à divers mécanismes qu'il sera intéressant d'identifier dans un futur proche et qui pourrait conduire à la définition de nouvelles approches thérapeutiques. De

manière très intéressante l'inhibition de PI3K ou NFκB accentue la voie non NFκB-dépendante empruntée par GSK3 dans l'induction de l'apoptose. Ce phénomène semble être dépendant du statut en VHL puisqu'il est observé surtout dans les cellules 786-0.

Bien que cette boucle de régulation diffère entre les 2 lignées, cette voie de signalisation converge dans les 2 cas vers NFκB. Comme précisé ci-dessus, aux vues de nos résultats et sachant que l'activité de GSK3 peut influencer la spécificité génique de NFκB, nous avons bien entendu ensuite recherché quelles sont les cibles transcriptionnelles de NFκB dans les 2 lignées étudiées. Nous avons ainsi mis en évidence par TGA au niveau de l'ARNm, toute une série de gènes cibles (dont l'expression est dépendante de NFκB) impliqués dans le métabolisme cellulaire, la prolifération et la motilité cellulaires, l'apoptose et l'angiogenèse (Tableau 1). La majorité de ces cibles sont communes aux 2 lignées et certaines sont régulées dans le sens d'une stimulation ou d'une inhibition suivant la lignée cellulaire étudiée, et d'autres cibles différent. Ces variations pourraient être dépendantes du statut en VHL et bien entendu aussi de la boucle de régulation décrite ci-dessus. Parallèlement à ces expériences, nous avons également recherché les cibles transcriptionnelles de NFκB au niveau de la protéine par protéomique en utilisant, en collaboration avec le Pr Olivier Boutaud, la 2D-DIGE couplée à l'analyse spectrale, suivie d'un séquençage puis de l'interrogation de bases de données de protéines. Près d'une trentaine de protéines cibles ont pu être mises en évidence et certaines ont déjà pu être identifiées, les autres étant actuellement en cours d'identification.

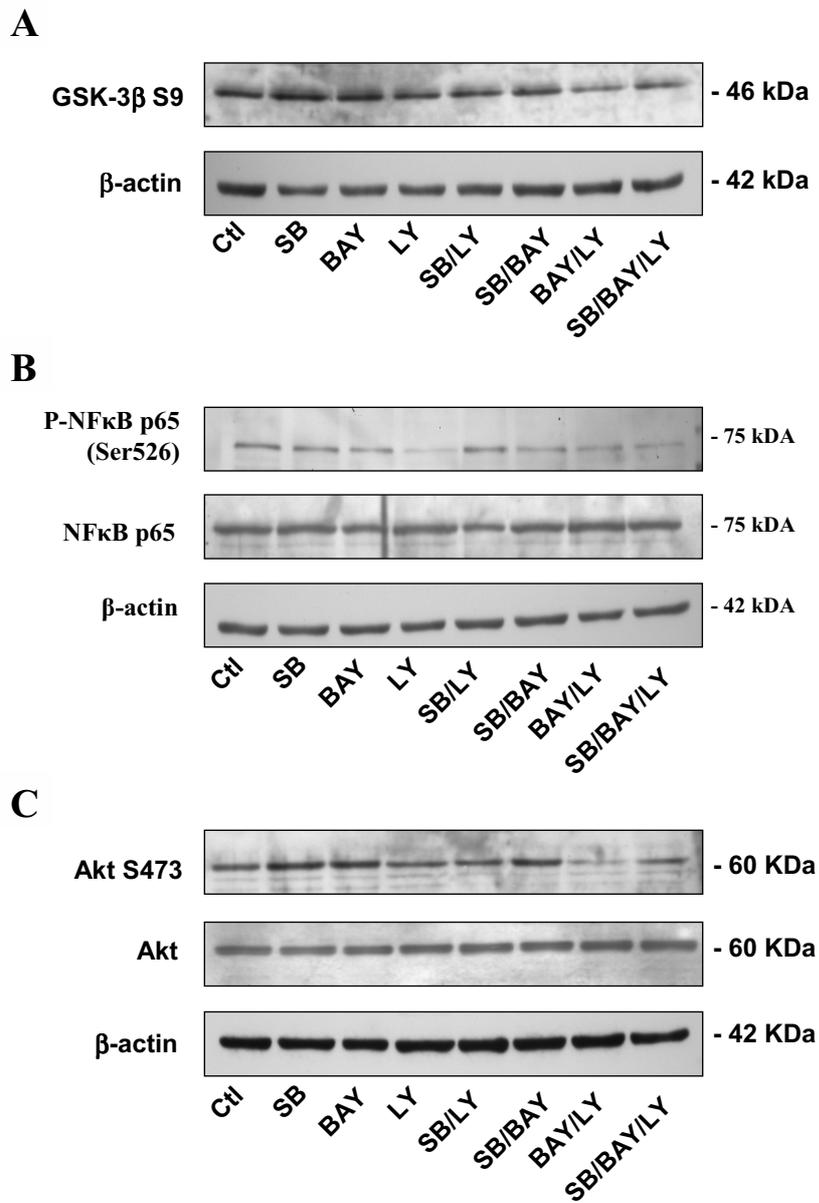
Suite à ces expérimentations, nous avons choisi de vérifier les résultats obtenus par TGA et les résultats préliminaires du 2D-DIGE par western blot sur 4 protéines, à savoir la cycline D1, la chaîne lourde de la ferritine (FTH) (identifiées par TGA) ainsi que la stathmine et hsp70 (identifiées par 2D-DIGE). La cycline D1 est impliquée notamment dans la prolifération cellulaire, inhibe l'apoptose et est régulée, entre autre, par l'activité de GSK3 sur la β-caténine (Perez-Ordenez et al., 2006). La FTH est impliquée dans le développement, le métabolisme du fer, qui est un processus très important de survie cellulaire, et inhibe l'apoptose (Parthasarathy et al., 2002). La stathmine est impliquée notamment dans la motilité cellulaire (Steinmetz, 2006), et hsp70 possède, entre autres, des propriétés anti-apoptotiques (Garrido et al., 2006). Afin de compléter ces expérimentations, nous avons utilisé en plus des cellules 786-0 et Caki-1 traitées en contrôle ou par BAY, les cellules 786-0 transfectées avec le VHL sauvage ou inactif afin de définir sans ambiguïté l'expression de ces protéines suivant le statut en VHL dans la même lignée cellulaire. L'expression de ces protéines a alors été

analysée par western blot. Nous avons ainsi mis en évidence une régulation différente de la cycline D1 dans la lignée cellulaire 786-0 par rapport à la lignée Caki-1, en accord avec la boucle de régulation entre Akt, GSK3 et NFκB que nous décrivons. L'expression de la cycline D1 est supérieure dans les Caki-1 par rapport aux cellules 786-0. En accord avec ce résultat, dans les cellules transfectées par VHL, l'expression de la cycline D1 est augmentée suggérant que HIF est à l'origine d'une dérégulation de la cycline D1. Cette dernière apparaît ainsi comme une cible du système VHL/HIF, en accord avec des études antérieures (Baba et al., 2003). Cependant, Baba et al. montraient que le VHL est nécessaire à la dérégulation de la cycline D1 lorsque les cellules sont en haute densité à travers un mécanisme dépendant de HIF. Mais des transfections par un VHL inactif en contrôle n'ont pas été réalisées dans ces études. Bien que nous n'ayons pas d'explications claires concernant cette observation contradictoire, cela pourrait être lié à la confluence des cellules. Malgré l'observation que FTH est une cible majeure de NFκB au niveau de son ARNm, aucune variation d'expression n'a pu être observée en réponse au traitement au niveau de la protéine par western blot. Ce résultat suggère que des mécanismes compensatoires existent permettant de conserver un taux optimal de FTH, comme par exemple une efficacité de traduction supérieure ou une stabilisation de son ARNm. Nous avons également observé une expression supérieure de FTH dans les cellules Caki-1 par rapport aux cellules 786-0. Là encore, comme la cycline D1, l'expression de FTH est augmentée dans les cellules transfectées par le VHL sauvage et apparaît ainsi comme une nouvelle cible du système VHL/HIF. Nous avons observé également que l'expression de la stathmine est supérieure dans les cellules 786-0 par rapport aux cellules Caki-1, ceci étant dû au VHL comme cela est démontré sur les cellules 786-0 transfectées par le VHL sauvage ou inactif. Là encore, la stathmine apparaît comme une nouvelle cible du système VHL/HIF, la présence de HIF étant à l'origine d'une augmentation d'expression de la protéine. Concernant hsp70, nous n'avons pas observé de différences d'expression dans les diverses lignées traitées en contrôle ou par BAY ainsi que dans les clones cellulaires transfectés par le VHL sauvage ou inactif. Ce résultat est étonnant à la vue des observations par 2D-DIGE, et pourrait constituer une limite de l'utilisation de cette technique. Cependant, ce résultat montre également la nécessité de répéter ces expériences afin d'obtenir une différence d'expression significative.

Il sera intéressant dans un futur proche de rechercher l'implication de ces mécanismes de résistance intrinsèque dans la résistance en réponse aux thérapies. NFκB est montré dans un certain nombre d'études sur divers cancers comme pouvant être activé en réponse à la

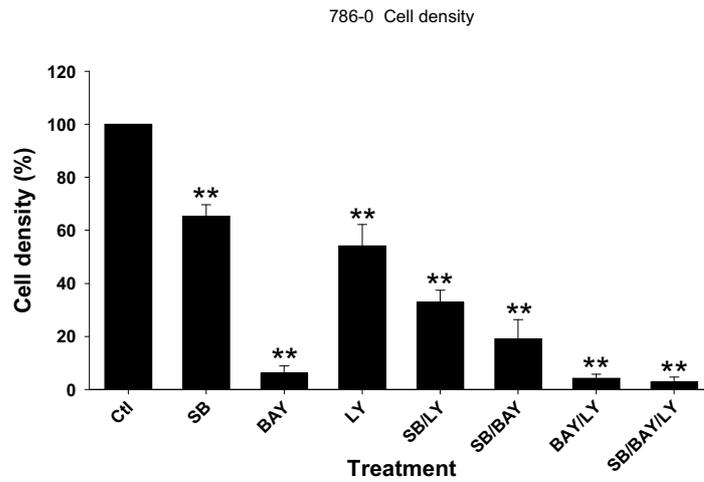
radiothérapie et à la chimiothérapie, ce qui supprime le potentiel apoptotique de ces thérapies (Cusack et al., 1999; Wang et al., 1999a; Wang et al., 1996). Un certain nombre d'études cliniques utilisent la chimiothérapie en combinaison avec des inhibiteurs de NFκB comme la thalidomide afin de déterminer si ces combinaisons augmentent l'efficacité de ces thérapies. Etant donné que des agents thérapeutiques comme la daunorubicine ou la vinblastine ont été montrés comme activant NFκB dans les cellules de CCR humain en culture (Carvalho et al., 2005), la possibilité existe que de telles associations puissent également avoir un potentiel thérapeutique dans cette pathologie. Cette hypothèse est en cours d'étude au laboratoire. L'identification des cibles en aval de NFκB pourrait ainsi s'avérer également très utile dans ce contexte thérapeutique.

L'identification de cibles de NFκB régulées différemment suivant le statut en VHL devrait permettre d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans les tumeurs exprimant ou non le VHL.

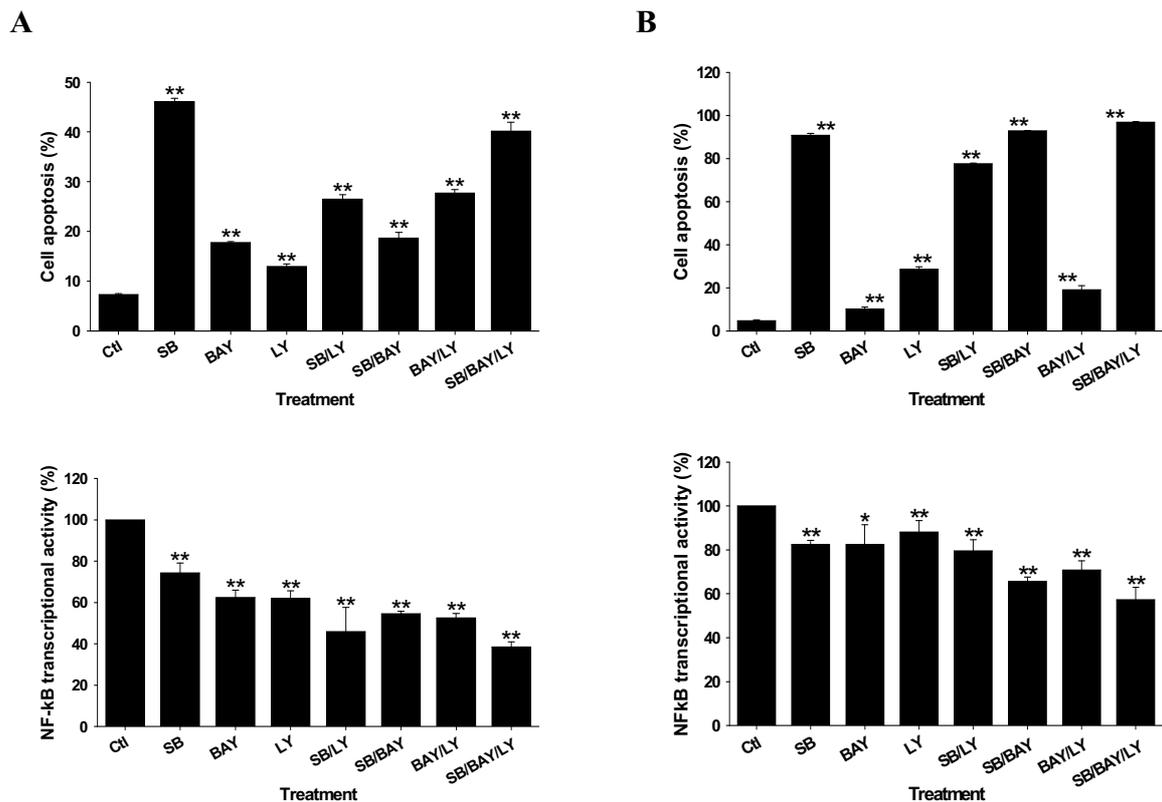


**Figure 1. Spécificité des inhibiteurs utilisés.**

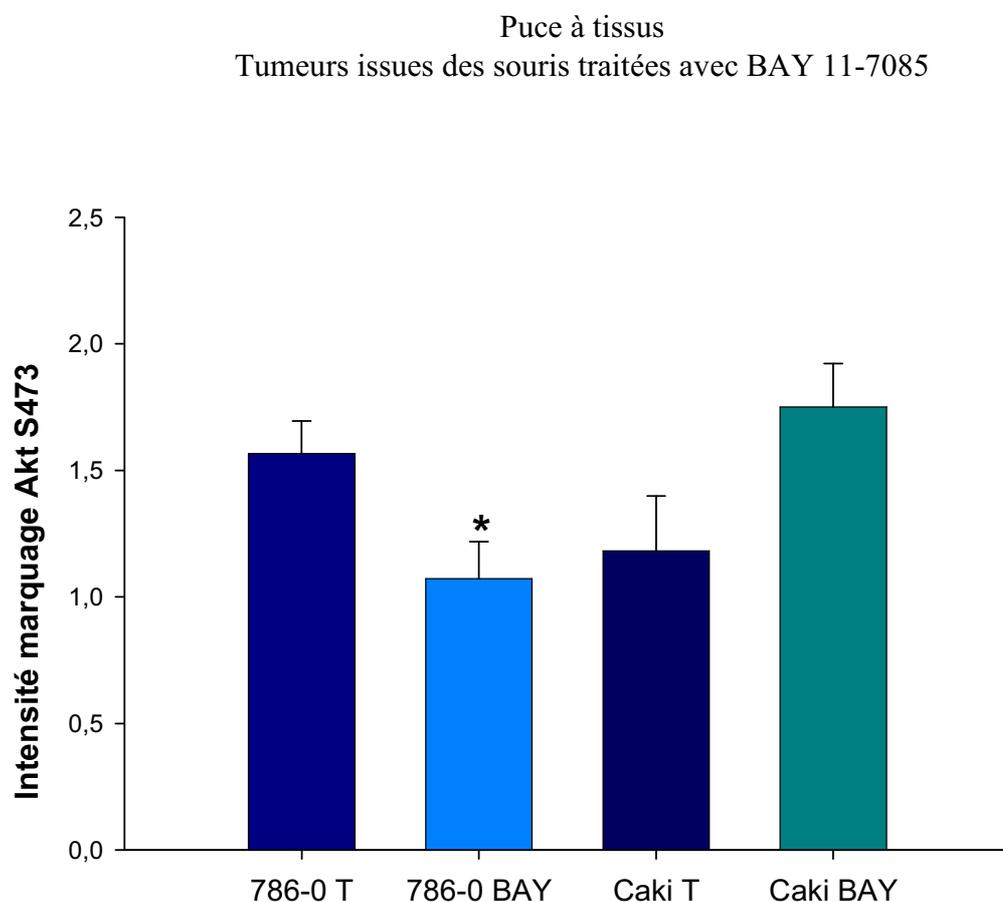
(A) GSK3; (B) NFκB et (C) Akt



**Figure 2.** Effets des inhibiteurs seuls ou en combinaison sur la densité cellulaire (786-0)

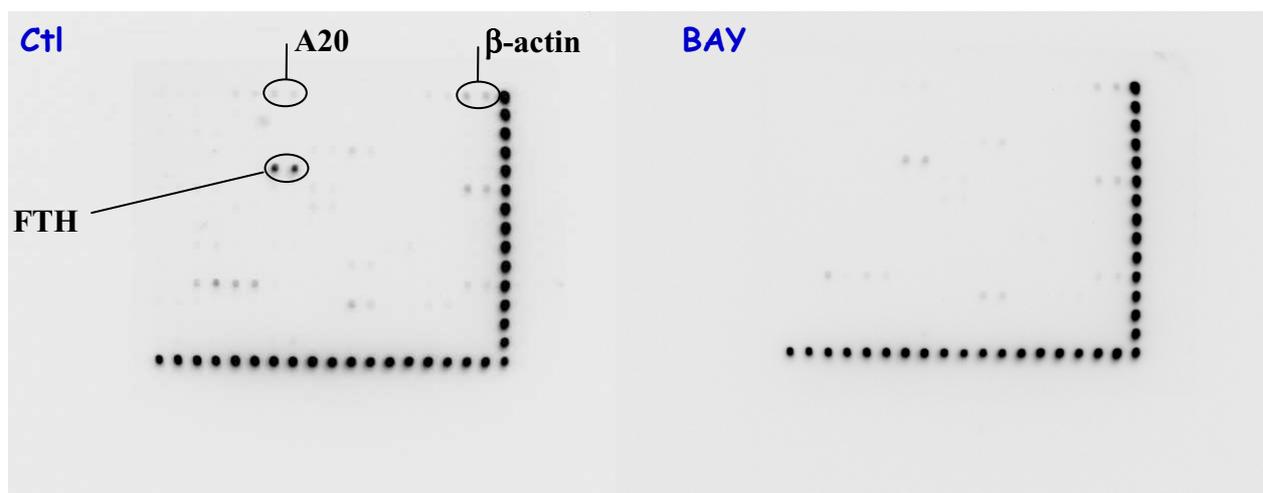


**Figure 3.** Mort cellulaire induite et activité transcriptionnelle de NFκB en réponse aux inhibiteurs seuls ou en combinaison. (A) Cellules 786-0 (B) Cellules Caki-1



**Figure 4. Immunohistochimie d'une puce à tissus construite avec les tumeurs issues des souris nude traitées avec BAY 11-7085 (BAY) ou PBS/DMSO (T).**

Le marquage de l'Akt phosphorylée en S473 montre que dans les tumeurs issues des cellules 786-0, l'inhibition de NFkB induit une diminution significative de la phosphorylation de l'Akt. Ce phénomène n'est pas retrouvé avec les tumeurs issues des cellules Caki-1.



**Figure 5. Cibles transcriptionnelles de NFκB (Target gene array).**

Analyse des cibles transcriptionnelles de NFκB en contrôle ou après traitement avec BAY.

Gènes cibles	Activité biologique
<i>HLA-G1</i>	Evasion de l'immunosurveillance
A1AT	Inhibiteur de protéases
A20	Régulateur négatif de NFκB; anti-apoptotique; angiogenèse
CD48	Différenciation; réponse immunitaire
<i>Cycline D1</i>	Prolifération cellulaire; anti-apoptotique
FTH	Métabolisme du fer; développement; lié à l'hypoxie; anti-apoptotique
<i>CSF2</i>	Réponse immunitaire
GRO1	Facteur de croissance; angiogenèse
<i>MnSOD</i>	Stress oxydatif
IRF2	<i>Interferon regulatory factor-2</i> , bloque les effets des IFN; cytokine
<i>IL11</i>	Réponse immunitaire, Cytokine
<i>NFκB2</i>	Précurseur de NFκB (p100); proto-oncogène; prolifération cellulaire; anti-apoptotique; adhésion cellulaire; chimio-résistance
PRG1	Prolifération cellulaire; anti-apoptotique; réponse au stress

**Tableau 1. Gènes régulés par NFκB (analyse du TGA).**

Il existe des références dans le CCR pour les gènes en italique.

A1AT: alpha-1-antitrypsin; FTH: chaîne lourde de la ferritine; CSF2: colony-stimulating factor 2;

GRO1: melanoma growth-stimulating factor 1; IRF2: interferon regulatory factor 2;

MnSOD: manganese superoxyde dismutase; PRG1: p22/PACAP response gene 1.

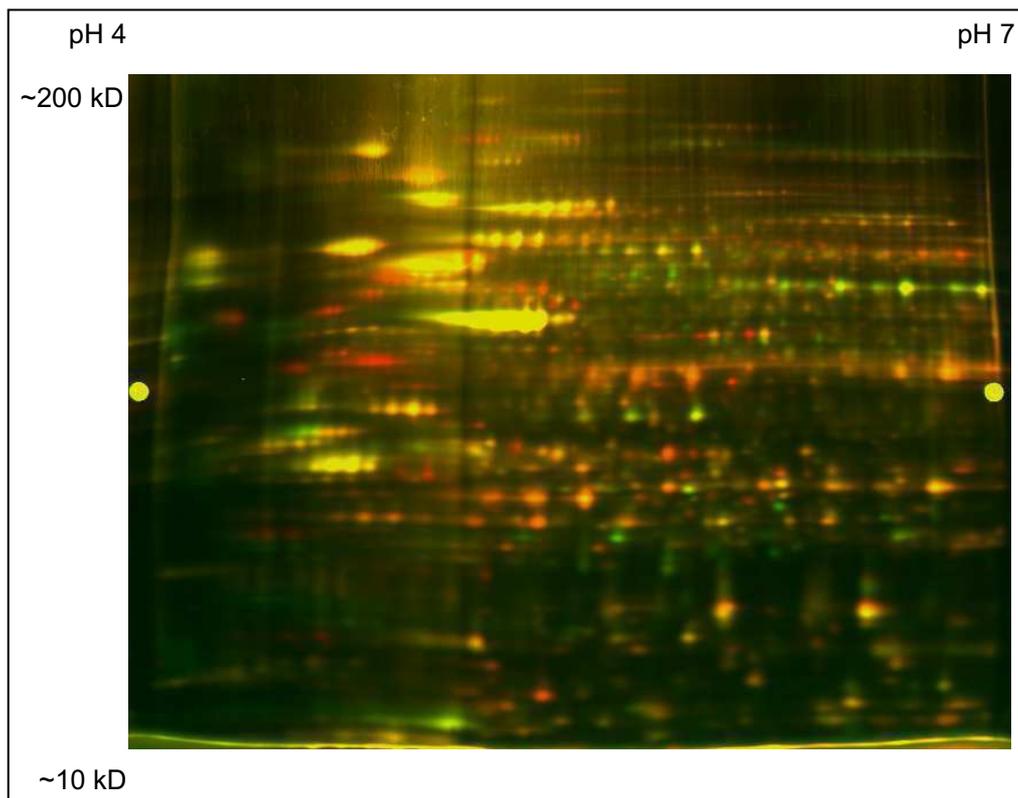


Figure 6. Exemple d'analyse 2D-DIGE.

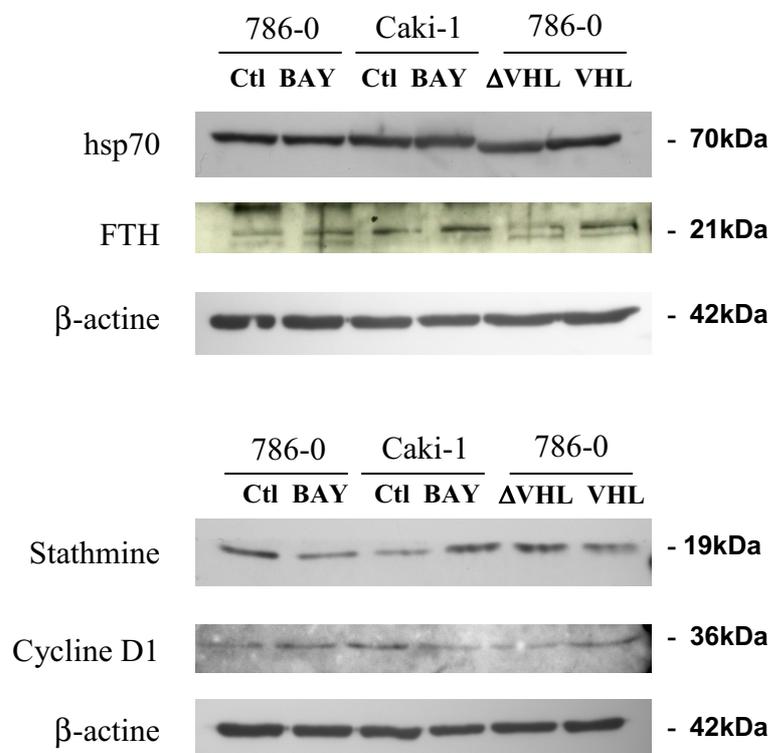
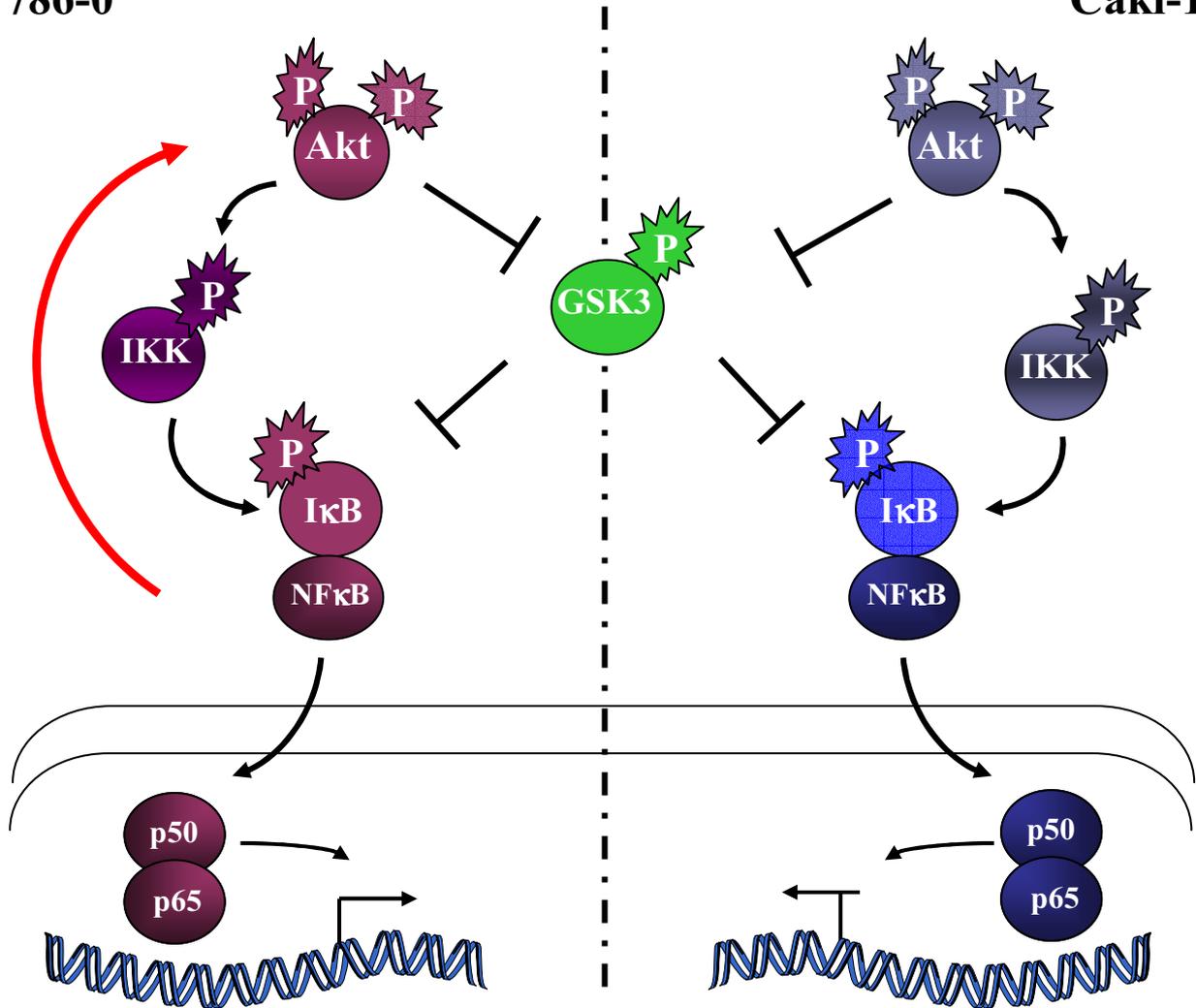


Figure 7. Vérification des résultats obtenus par TGA et 2D-DIGE par western blot.

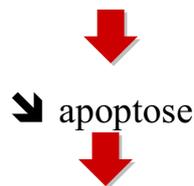
786-0

Caki-1



Transcription de gènes cibles de NFκB:

A20, FTH, NFκB2, hsp70, stathmine...



Croissance tumorale

Figure 8. Mise en évidence d'une nouvelle boucle de régulation impliquant Akt, GSK3 et NFκB, dépendante du statut en VHL, et identification de cibles transcriptionnelles de NFκB.

**Chapitre 5.**

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les travaux présentés dans ce mémoire avaient comme objectif commun l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le CCC humain. Nous nous sommes particulièrement intéressés, de part le contexte bibliographique, à la voie signalétique PI3K/Akt ainsi qu'à la voie du facteur de transcription NFκB.

La voie PI3K/Akt est connue pour jouer un rôle crucial dans la croissance tumorale et la résistance aux traitements de différents cancers. Lorsqu'elle est activée, l'Akt phosphoryle différents substrats impliqués aussi bien dans la prolifération et la mort cellulaire que dans l'adhésion, la motilité cellulaire ou encore la néovascularisation. Nous avons montré que cette voie est activée de manière constitutive dans le CCC humain sur 7 lignées de CCC, déficientes ou non en gène suppresseur de tumeur VHL, ainsi que sur 3 biopsies de CCC humain de stade pT3, alors qu'elle ne l'est pas dans les tissus sains correspondants. Nous avons également montré que, quel que soit le statut en VHL des cellules tumorales, l'Akt joue un rôle important dans la croissance et la survie du CCC humain. Ce résultat a pu être démontré *in vitro* par différentes techniques classiques de biologie moléculaire et cellulaire et de biochimie, et *in vivo*, par implantation de xénogreffes de lignées de CCC humain à des souris nude. De manière surprenante, nous avons montré que mTOR et les facteurs de transcription Forkhead ne sont pas des substrats de l'Akt dans nos différentes lignées de CCC humain alors que GSK3β et NFκB apparaissent comme des substrats privilégiés de l'Akt, étant respectivement inhibé et activé par cette dernière. Les résultats que nous avons obtenus à l'issue de ce premier projet, ainsi que les données bibliographiques apparues depuis, nous laissent entrevoir que l'utilisation d'inhibiteurs de l'Akt, seuls ou en combinaison avec d'autres approches thérapeutiques, pourrait apporter un bénéfice thérapeutique aux traitements actuels du CCC humain.

Nous avons ensuite étudié l'implication de la voie de NFκB dans la croissance du CCC humain. Cette voie, impliquée dans les réponses immunitaires, inflammatoires et la croissance cellulaire, est constitutivement active dans le CCC humain aussi bien dans les lignées cellulaires que dans les biopsies de CCC humain, alors qu'elle ne l'est pas dans les tissus sains correspondants. *In vitro*, par diverses techniques telles que la mesure de la densité, de la viabilité et de la mort cellulaire (FACS, TUNEL), ou la transfection des lignées cellulaires de CCC humain par des siRNA spécifiques de NFκB, nous avons démontré l'implication de cette voie dans la croissance du CCC humain *in vitro*, quel que soit le statut en VHL des cellules tumorales. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur des cellules tumorales implantées en sous-cutanée chez la souris nude. L'inhibiteur endogène de NFκB, IκBα, a été

identifié comme une nouvelle cible thérapeutique du CCC quelle que soit l'expression du gène suppresseur de tumeur VHL. Cibler I $\kappa$ B $\alpha$  à l'aide d'activateurs spécifiques pourrait s'avérer une thérapie très efficace contre le CCC chez l'homme. Grâce au TMA disponible au laboratoire contenant 241 échantillons de CCR (avec les tissus sains correspondants) avec un recul clinique de 12 à 22 ans, nous avons évalué la pertinence de cette voie comme marqueur pronostique du CCR. Bien qu'il y ait une corrélation entre l'activation de NF $\kappa$ B et le CCR de type conventionnel ainsi que la taille de la tumeur, l'activation de ce dernier n'a pas pu être démontrée comme étant un facteur pronostique indépendant de la survie des patients.

Au cours de l'étude de la voie de NF $\kappa$ B, et en particulier de ses cibles en aval, nous avons mis en évidence des régulations particulières de NF $\kappa$ B avec d'autres kinases importantes dans le CCC et en relation avec le statut en VHL des cellules. Tout d'abord, nous avons montré l'existence d'une boucle de régulation entre Akt, GSK3 et NF $\kappa$ B spécifiquement dans la lignée de CCC humain 786-0, qui est déficiente en VHL mais pas dans la lignée Caki-1 qui exprime un VHL sauvage. Bien que cette régulation soit dépendante du statut en VHL, elle converge cependant dans les deux cas vers NF $\kappa$ B. Des cibles de NF $\kappa$ B dépendantes du VHL telles que la cycline D1 et l'IL6 ou des cibles communes aux 2 lignées telles que la FTH ou la stathmine, ont été identifiées par TGA et par 2D-DIGE couplée à la spectrométrie de masse suivie d'un séquençage peptidique et interrogation de bases de données. Leur implication dans la croissance et la survie du CCC est en cours d'étude au laboratoire. Nous avons réalisé des western blot afin de vérifier ces résultats, et, de manière inattendue, cela nous a également permis d'identifier de nouvelles cibles du système VHL/HIF. En effet, dans les cellules 786-0 transfectées par le VHL sauvage, le taux d'expression de la cycline D1 et de la FTH est augmentée. Cela suggère que HIF est à l'origine d'une dérégulation de ces protéines. Nous avons également montré que l'expression de la stathmine est supérieure dans les cellules 786-0 transfectées par le VHL inactif par rapport aux cellules transfectées avec le VHL. La stathmine apparaît donc également comme une nouvelle cible du système VHL/HIF, la présence de HIF étant à l'origine d'une augmentation d'expression de la protéine. Ces cibles de NF $\kappa$ B dépendantes ou non du VHL, peuvent être considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles dans le CCC humain.

En conclusion, nous avons montré l'implication de deux voies de prolifération dans la croissance et la survie du CCC humain, quel que soit son statut en VHL: la voie PI3K/Akt et la voie NF $\kappa$ B. De plus, nous avons décrit une boucle de régulation dépendante du VHL impliquant Akt, GSK3 et NF $\kappa$ B et convergeant vers NF $\kappa$ B et ses cibles transcriptionnelles.

A l'issue de ce travail de nombreuses questions restent en suspens : A quoi est due l'activation constitutive de l'Akt ? Un certain nombre de pistes mériteront d'être suivies comme la dérégulation de PTEN, l'activité de la ou les PDK-2, et bien entendu l'expression de facteurs de croissance agissant par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G ou à des récepteurs à Tyrosine kinase. Quelle est l'implication de la GSK3 dans le CCC humain ? GSK3 est une des cibles de l'Akt et peut également inhiber NFκB, mais le nombre de cibles régulées par GSK3 est en constante augmentation ; cibler spécifiquement une de ses cibles pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans les thérapies visant le CCC chez l'homme. Quel est le lien entre GSK3 et NFκB et leur relation avec le VHL ? Et la question qui en découle : quelle est l'implication du système VHL/HIF dans l'activation et la spécificité génique de NFκB dans le CCC humain ? Comme discuté chapitre 4, cela pourrait être une conséquence de l'augmentation d'expression d'une des cibles transcriptionnelles de NFκB, HIF1 ; le fait d'observer une régulation de Akt par NFκB uniquement dans les cellules 786-0 déficientes en VHL (et exprimant donc HIF) est en effet tout à fait en accord avec cette hypothèse ; Il sera par ailleurs très intéressant de déterminer la spécificité des gènes régulés par NFκB en fonction du statut en VHL. Enfin, une question très importante : l'axe PI3K/Akt/GSK3/NFκB est-il impliqué dans les phénomènes de résistance aux thérapies du CCC humain ? Comme exposé dans ce mémoire, Akt et NFκB sont connus pour être impliqués dans des phénomènes de résistance aux agents chimiothérapeutiques. Une partie de nos études actuelles visent à évaluer leur implication dans les phénomènes de résistance à l'apoptose sur le modèle de souris nude greffées avec des lignées cellulaires de CCC humain déficientes ou non en VHL et traitées avec différents agents chimiothérapeutiques (vinblastine, paclitaxel, cisplatine et 5-FU) suivies par une analyse sur puces à ADNc.

Les résultats obtenus lors de ma thèse (Figure 16) ont donc permis de mettre en évidence le rôle clef de l'axe PI3K/Akt/GSK3/NFκB dans le CCC humain, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour le pronostic et le traitement de cette pathologie réfractaire aux thérapies actuelles.

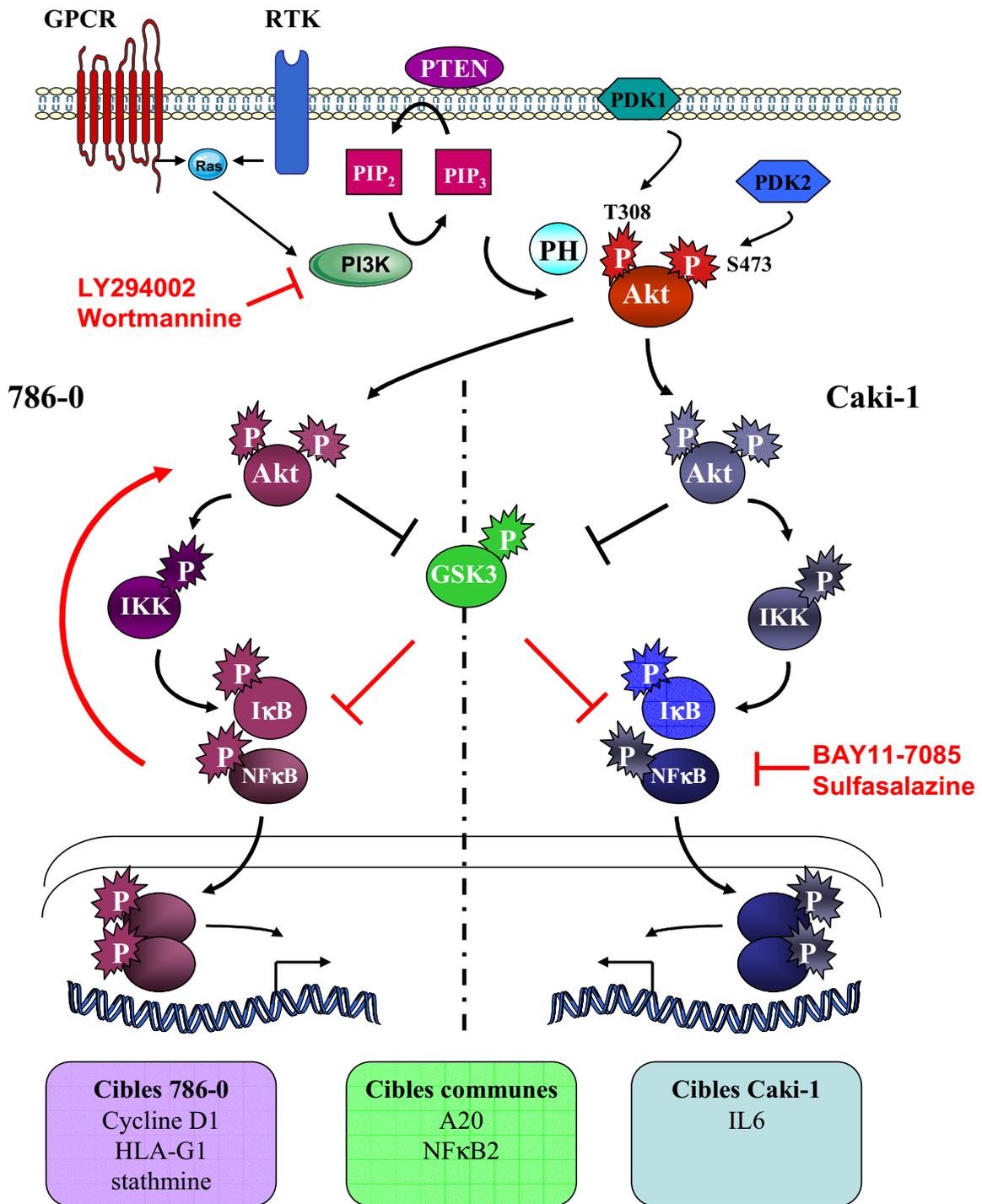


Figure 16. Schéma récapitulatif : Implication de l'axe PI3K/Akt/GSK3/NFκB dans la croissance du CCC humain.

**Chapitre 6.**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**A**

- Ahmed, K.M., Cao, N. & Li, J.J. (2006). *Anticancer Res*, **26**, 4235-43.
- Ahn, J., Ambrosone, C.B., Kanetsky, P.A., Tian, C., Lehman, T.A., Kropp, S., Helmbold, I., von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Wenz, F. & Chang-Claude, J. (2006). *Clin Cancer Res*, **12**, 7063-70.
- Altomare, D.A. & Testa, J.R. (2005). *Oncogene*, **24**, 7455-64.
- An, J., Fisher, M. & Rettig, M.B. (2005). *Oncogene*, **24**, 1563-70.
- An, J. & Rettig, M.B. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 7546-56.
- An, J. & Rettig, M.B. (2007). *Mol Cancer Ther*, **6**, 61-9.
- An, J., Sun, Y., Fisher, M. & Rettig, M.B. (2004). *Mol Cancer Ther*, **3**, 727-36.
- Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y. & Slamon, D.J. (2003). *Cancer Res*, **63**, 196-206.
- Arlt, A., Gehrz, A., Muerkoster, S., Vorndamm, J., Kruse, M.L., Folsch, U.R. & Schafer, H. (2003). *Oncogene*, **22**, 3243-51.
- Asakuma, J., Sumitomo, M., Asano, T. & Hayakawa, M. (2003). *Cancer Res*, **63**, 1365-70.
- Avigan, D. (2004). *Dev Biol (Basel)*, **116**, 161-8; discussion 179-86.

**B**

- Baba, M., Hirai, S., Yamada-Okabe, H., Hamada, K., Tabuchi, H., Kobayashi, K., Kondo, K., Yoshida, M., Yamashita, A., Kishida, T., Nakaigawa, N., Nagashima, Y., Kubota, Y., Yao, M. & Ohno, S. (2003). *Oncogene*, **22**, 2728-38.
- Baeuerle, P.A. (1998). *Cell*, **95**, 729-31.
- Banerjee, D., Chadalavada, R.S., Bourdon, V., Korkola, J.E., Motzer, R.J. & Chaganti, R.S. (2006). *J Interferon Cytokine Res*, **26**, 156-70.
- Bardos, J.I. & Ashcroft, M. (2004). *Bioessays*, **26**, 262-9.
- Bjelogrić, S.K., Srdic, T. & Radulovic, S. (2006). *J Buon*, **11**, 267-76.
- Bleumer, I., Oosterwijk, E., De Mulder, P. & Mulders, P.F. (2003). *Eur Urol*, **44**, 65-75.
- Boyle, R.G. & Travers, S. (2006). *Anticancer Agents Med Chem*, **6**, 281-6.
- Brauch, H., Weirich, G., Brieger, J., Glavac, D., Rodl, H., Eichinger, M., Feurer, M., Weidt, E., Puranakanittha, C., Neuhaus, C., Pomer, S., Brenner, W., Schirmacher, P., Storkel, S., Rotter, M., Masera, A., Gugeler, N. & Decker, H.J. (2000). *Cancer Res*, **60**, 1942-8.
- Burgering, B.M. & Coffey, P.J. (1995). *Nature*, **376**, 599-602.
- Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M.L., Frank, R., Livingstone, M., Resch, K. & Kracht, M. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 49571-4.

**C**

- Carvalho, G., Lefaucheur, C., Cherbonnier, C., Metivier, D., Chapel, A., Pallardy, M., Bourgeade, M.F., Charpentier, B., Hirsch, F. & Kroemer, G. (2005). *Oncogene*, **24**, 737-45.
- Chang, F., Steelman, L.S., Lee, J.T., Shelton, J.G., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R.A. & McCubrey, J.A. (2003). *Leukemia*, **17**, 1263-93.
- Chang, Y.S., Adnane, J., Trail, P.A., Levy, J., Henderson, A., Xue, D., Bortolon, E., Ichetovkin, M., Chen, C., McNabola, A., Wilkie, D., Carter, C.A., Taylor, I.C., Lynch, M. & Wilhelm, S. (2007). *Cancer Chemother Pharmacol*, **59**, 561-74.
- Chautard, D., Dalifard, I., Chassevent, A., Guyetant, S., Daver, A., Vielle, B. & Soret, J.Y. (2004). *Urology*, **63**, 1055-60.
- Cheng, J.Q., Lindsley, C.W., Cheng, G.Z., Yang, H. & Nicosia, S.V. (2005). *Oncogene*, **24**, 7482-92.

- Cheville, J.C., Lohse, C.M., Zincke, H., Weaver, A.L. & Blute, M.L. (2003). *Am J Surg Pathol*, **27**, 612-24.
- Cheville, J.C., Lohse, C.M., Zincke, H., Weaver, A.L., Leibovich, B.C., Frank, I. & Blute, M.L. (2004). *Am J Surg Pathol*, **28**, 435-41.
- Chng, H.W., Camplejohn, R.S., Stone, M.G., Hart, I.R. & Nicholson, L.J. (2006). *Exp Cell Res*, **312**, 2897-907.
- Closse, A., Haefliger, W., Hauser, D., Gubler, H.U., Dewald, B. & Baggiolini, M. (1981). *J Med Chem*, **24**, 1465-71.
- Coghlan, M.P., Culbert, A.A., Cross, D.A., Corcoran, S.L., Yates, J.W., Pearce, N.J., Rausch, O.L., Murphy, G.J., Carter, P.S., Roxbee Cox, L., Mills, D., Brown, M.J., Haigh, D., Ward, R.W., Smith, D.G., Murray, K.J., Reith, A.D. & Holder, J.C. (2000). *Chem Biol*, **7**, 793-803.
- Cohen, D. & Zhou, M. (2005). *Clin Lab Med*, **25**, 259-77.
- Collins, S., McKiernan, J. & Landman, J. (2006). *J Endourol*, **20**, 975-85.
- Corless, C.L., Kibel, A.S., Iliopoulos, O. & Kaelin, W.G., Jr. (1997). *Hum Pathol*, **28**, 459-64.
- Costa, L.J. (2007). *Cancer Treat Rev*, **33**, 78-84.
- Cross, D.A., Culbert, A.A., Chalmers, K.A., Facci, L., Skaper, S.D. & Reith, A.D. (2001). *J Neurochem*, **77**, 94-102.
- Cusack, J.C., Liu, R. & Baldwin, A.S. (1999). *Drug Resist Updat*, **2**, 271-273.
- de Gast, G.C., Klumpen, H.J., Vyth-Dreese, F.A., Kersten, M.J., Verra, N.C., Sein, J., Batchelor, D., Nooijen, W.J. & Schornagel, J.H. (2000). *Clin Cancer Res*, **6**, 1267-72.

## D

- Delahunt, B., Bethwaite, P.B. & Thornton, A. (1997). *Br J Urol*, **80**, 401-4.
- Demarchi, F., Bertoli, C., Sandy, P. & Schneider, C. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 39583-90.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. & Matias-Guiu, X. (2005). *Virchows Arch*, **446**, 475-82.
- Drucker, B.J. (2005). *Cancer Treat Rev*, **31**, 536-45.
- Drysdale, M.J., Brough, P.A., Massey, A., Jensen, M.R. & Schoepfer, J. (2006). *Curr Opin Drug Discov Devel*, **9**, 483-95.

## E

- Eble, J.N. (1998). *Semin Diagn Pathol*, **15**, 77-82.

## F

- Faivre, S., Kroemer, G. & Raymond, E. (2006). *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 671-88.
- Feldman, D.R. & Motzer, R.J. (2006). *Oncology (Williston Park)*, **20**, 1745-53; discussion 1756.
- Filippa, N., Sable, C.L., Filloux, C., Hemmings, B. & Van Obberghen, E. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 4989-5000.
- Finco, T.S., Westwick, J.K., Norris, J.L., Beg, A.A., Der, C.J. & Baldwin, A.S., Jr. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 24113-6.
- Fisher, R.I., Rosenberg, S.A., Sznol, M., Parkinson, D.R. & Fyfe, G. (1997). *Cancer J Sci Am*, **3 Suppl 1**, S70-2.
- Fuhrman S, L.L., Limas C. (1982). *Am J Surg Pathol.*, **6**, 655-63.
- Fyfe, G., Fisher, R.I., Rosenberg, S.A., Sznol, M., Parkinson, D.R. & Louie, A.C. (1995). *J Clin Oncol*, **13**, 688-96.

**G**

- Garcia-Orad, A., Arizti, P., Duran, L., Urcelay, B. & de Pancorbo, M.M. (1994). *Hum Hered*, **44**, 203-8.
- Garg, A. & Aggarwal, B.B. (2002). *Leukemia*, **16**, 1053-68.
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E. & Kroemer, G. (2006). *Cell Cycle*, **5**, 2592-601.
- Gelb, A.B. (1997). *Cancer*, **80**, 981-6.
- Gemmill, R.M., Zhou, M., Costa, L., Korch, C., Bukowski, R.M. & Drabkin, H.A. (2005). *Br J Cancer*, **92**, 2266-77.
- Ghosh, S., May, M.J. & Kopp, E.B. (1998). *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-60.
- Gilmore, T.D. (1999). *Oncogene*, **18**, 6925-37.
- Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.M. & et al. (1994). *Nat Genet*, **7**, 85-90.
- Gnarra, J.R., Ward, J.M., Porter, F.D., Wagner, J.R., Devor, D.E., Grinberg, A., Emmert-Buck, M.R., Westphal, H., Klausner, R.D. & Linehan, W.M. (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9102-7.
- Golby, S.J. & Spencer, J. (2001). *Curr Opin Gastroenterol*, **17**, 568-72.
- Gollob, J.A., Wilhelm, S., Carter, C. & Kelley, S.L. (2006). *Semin Oncol*, **33**, 392-406.
- Green, L.K., Ayala, A.G., Ro, J.Y., Swanson, D.A., Grignon, D.J., Giacco, G.G. & Guinee, V.F. (1989). *Urology*, **34**, 310-5.
- Gurova, K.V., Hill, J.E., Razorenova, O.V., Chumakov, P.M. & Gudkov, A.V. (2004). *Cancer Res*, **64**, 1951-8.

**H**

- Haase, V.H. (2006). *Am J Physiol Renal Physiol*, **291**, F271-81.
- Haase, V.H., Glickman, J.N., Socolovsky, M. & Jaenisch, R. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1583-8.
- Hacker, H. & Karin, M. (2006). *Sci STKE*, **2006**, re13.
- Hainsworth, J.D., Sosman, J.A., Spigel, D.R., Edwards, D.L., Baughman, C. & Greco, A. (2005). *J Clin Oncol*, **23**, 7889-96.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). *Cell*, **100**, 57-70.
- Hara, S., Oya, M., Mizuno, R., Horiguchi, A., Marumo, K. & Murai, M. (2005). *Ann Oncol*, **16**, 928-33.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2004). *Genes Dev*, **18**, 2195-224.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y. & Mills, G.B. (2005). *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 988-1004.
- Herman, J.G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M.I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D.S., Gnarra, J.R., Linehan, W.M. & et al. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9700-4.
- Hinton, C.V., Fitzgerald, L.D. & Thompson, M.E. (2007). *Exp Cell Res*.
- Hoffman, D.M., Gitlitz, B.J., Belldegrun, A. & Figlin, R.A. (2000). *Semin Oncol*, **27**, 221-33.
- Hofmockel, G., Riess, S., Bassukas, I.D. & Dammrich, J. (1997). *Eur Urol*, **31**, 478-84.
- Hongisto, V., Smeds, N., Brecht, S., Herdegen, T., Courtney, M.J. & Coffey, E.T. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 6027-36.
- Horiguchi, A., Oya, M., Uchida, A., Marumo, K. & Murai, M. (2003). *J Urol*, **169**, 710-3.

**I**

- Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S. & Kaelin, W.G., Jr. (1995). *Nat Med*, **1**, 822-6.
- Inoue, J., Gohda, J., Akiyama, T. & Semba, K. (2007). *Cancer Sci*, **98**, 268-74.
- Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mimnaugh, E.G., Martinez, A., Cuttitta, F. & Neckers, L.M. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 29936-44.

**J**

- Jacobsen, J., Grankvist, K., Rasmuson, T., Bergh, A., Landberg, G. & Ljungberg, B. (2004). *BJU Int*, **93**, 297-302.
- Jacobsohn, K.M. & Wood, C.G. (2006). *Semin Oncol*, **33**, 576-82.
- James, S.R., Downes, C.P., Gigg, R., Grove, S.J., Holmes, A.B. & Alessi, D.R. (1996). *Biochem J*, **315 ( Pt 3)**, 709-13.
- Jimeno, A., Kulesza, P., Wheelhouse, J., Chan, A., Zhang, X., Kincaid, E., Chen, R., Clark, D.P., Forastiere, A. & Hidalgo, M. (2007). *Br J Cancer*, **96**, 952-9.
- Joo, H.J., Oh, D.K., Kim, Y.S., Lee, K.B. & Kim, S.J. (2004). *BJU Int*, **93**, 291-6.
- Jope, R.S. & Johnson, G.V. (2004). *Trends Biochem Sci*, **29**, 95-102.

**K**

- Kaelin, W.G., Jr. (2003). *J Am Soc Nephrol*, **14**, 2703-11.
- Kang, G.S., Li, Q., Chen, H. & Costa, M. (2006). *Mutat Res*, **610**, 48-55.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000). *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-63.
- Kato, S., Ding, J. & Du, K. (2007). *Biochem Biophys Res Commun*, **354**, 1061-6.
- Ke, Q. & Costa, M. (2006). *Mol Pharmacol*, **70**, 1469-80.
- Kim, J.W., Lee, J.E., Kim, M.J., Cho, E.G., Cho, S.G. & Choi, E.J. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 13995-4001.
- Kim, L. & Kimmel, A.R. (2000). *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 508-14.
- Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Kuroda, S., Ono, Y. & Kikkawa, U. (1997). *FEBS Lett*, **410**, 493-8.
- Kopper, L. & Timar, J. (2006). *Pathol Oncol Res*, **12**, 5-11.
- Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, B.J., Bugert, P., Cooper, C.S., Delahunt, B., Eble, J.N., Fleming, S., Ljungberg, B., Medeiros, L.J., Moch, H., Reuter, V.E., Ritz, E., Roos, G., Schmidt, D., Srigley, J.R., Storkel, S., van den Berg, E. & Zbar, B. (1997). *J Pathol*, **183**, 131-3.
- Krasilnikov, M., Ivanov, V.N., Dong, J. & Ronai, Z. (2003). *Oncogene*, **22**, 4092-101.
- Krystal, G.W., Sulanke, G. & Litz, J. (2002). *Mol Cancer Ther*, **1**, 913-22.

**L**

- Lang, H., Lindner, V., de Fromont, M., Molinie, V., Letourneux, H., Meyer, N., Martin, M. & Jacqmin, D. (2005). *Cancer*, **103**, 625-9.
- Langner, C., Ratschek, M., Rehak, P., Schips, L. & Zigeuner, R. (2004). *Mod Pathol*, **17**, 180-8.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L. & et al. (1993). *Science*, **260**, 1317-20.
- Lee, S.E., Byun, S.S., Oh, J.K., Lee, S.C., Chang, I.H., Choe, G. & Hong, S.K. (2006). *J Urol*, **176**, 1332-7; discussion 1337-8.
- Lenardo, M. & Siebenlist, U. (1994). *Immunol Today*, **15**, 145-7.
- Lin, F., Zhang, P.L., Yang, X.J., Prichard, J.W., Lun, M. & Brown, R.E. (2006). *Ann Clin Lab Sci*, **36**, 283-93.
- Lin, H.K., Yeh, S., Kang, H.Y. & Chang, C. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7200-5.
- Lin, P.Y., Fosmire, S.P., Park, S.H., Park, J.Y., Baksh, S., Modiano, J.F. & Weiss, R.H. (2007). *Mol Cancer*, **6**, 16.
- Linehan, W.M. (2006). *Cancer Biol Ther*, **5**, 696-9.
- Lipworth, L., Tarone, R.E. & McLaughlin, J.K. (2006). *J Urol*, **176**, 2353-8.
- Liu, G.H., Wang, S.R., Wang, B. & Kong, B.H. (2006). *Int J Gynecol Cancer*, **16**, 1777-82.
- Longley, D.B. & Johnston, P.G. (2005). *J Pathol*, **205**, 275-92.

- Longuemaux S, Rodrigues-Lima F & JM., D. (2003). *Prog Urol.*, **13**, 1194-6.  
 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). *J Biol Chem*, **193**, 265-75.  
 Lyons, J.F., Wilhelm, S., Hibner, B. & Bollag, G. (2001). *Endocr Relat Cancer*, **8**, 219-25.

**M**

- MacKeigan, J.P., Taxman, D.J., Hunter, D., Earp, H.S., 3rd, Graves, L.M. & Ting, J.P. (2002). *Clin Cancer Res*, **8**, 2091-9.  
 MacLennan, G.T. & Bostwick, D.G. (1995). *Urology*, **46**, 27-30.  
 Maher, E.R., Bentley, E., Yates, J.R., Latif, F., Lerman, M., Zbar, B., Affara, N.A. & Ferguson-Smith, M.A. (1991). *Genomics*, **10**, 957-60.  
 Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. & Ghosh, G. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 45225-35.  
 Mancuso, A. & Sternberg, C.N. (2005). *Can J Urol*, **12 Suppl 1**, 66-70; discussion 105.  
 Marten, A., Renoth, S., Heinicke, T., Albers, P., Pauli, A., Mey, U., Caspari, R., Flieger, D., Hanfland, P., Von Ruecker, A., Eis-Hubinger, A.M., Muller, S., Schwaner, I., Lohmann, U., Heylmann, G., Sauerbruch, T. & Schmidt-Wolf, I.G. (2003). *Hum Gene Ther*, **14**, 483-94.  
 Massfelder, T., Lang, H., Schordan, E., Lindner, V., Rothhut, S., Welsch, S., Simon-Assmann, P., Barthelmebs, M., Jacqmin, D. & Helwig, J.J. (2004). *Cancer Res*, **64**, 180-8.  
 McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M. & Franklin, R.A. (2006). *Biochim Biophys Acta*.  
 Medeiros, L.J., Jones, E.C., Aizawa, S., Aldape, H.C., Cheville, J.C., Goldstein, N.S., Lubensky, I.A., Ro, J., Shanks, J., Pacelli, A. & Jung, S.H. (1997). *Cancer*, **80**, 990-1.  
 Midorikawa, Y., Tsutsumi, S., Taniguchi, H., Ishii, M., Kobune, Y., Kodama, T., Makuuchi, M. & Aburatani, H. (2002). *Jpn J Cancer Res*, **93**, 636-43.  
 Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J. & Michiels, C. (1999). *FEBS Lett*, **460**, 251-6.  
 Mitsiades, C.S., Mitsiades, N. & Koutsilieris, M. (2004). *Curr Cancer Drug Targets*, **4**, 235-56.  
 Mochizuki, T., Furuta, S., Mitsushita, J., Shang, W.H., Ito, M., Yokoo, Y., Yamaura, M., Ishizone, S., Nakayama, J., Konagai, A., Hirose, K., Kiyosawa, K. & Kamata, T. (2006). *Oncogene*, **25**, 3699-707.  
 Morais, C., Pat, B., Gobe, G., Johnson, D.W. & Healy, H. (2006). *Nephrol Dial Transplant*, **21**, 3377-88.  
 Morgensztern, D. & McLeod, H.L. (2005). *Anticancer Drugs*, **16**, 797-803.  
 Morin, P.J. (1999). *Bioessays*, **21**, 1021-30.  
 Motzer, R.J., Bander, N.H. & Nanus, D.M. (1996). *N Engl J Med*, **335**, 865-75.  
 Motzer, R.J. & Bukowski, R.M. (2006). *J Clin Oncol*, **24**, 5601-8.  
 Motzer, R.J., Schwartz, L., Law, T.M., Murphy, B.A., Hoffman, A.D., Albino, A.P., Vlamis, V. & Nanus, D.M. (1995). *J Clin Oncol*, **13**, 1950-7.  
 Mounier, N., Vignot, S. & Spano, J.P. (2006). *Bull Cancer*, **93**, 1139-43.  
 Moynagh, P.N. (2005). *J Cell Sci*, **118**, 4589-92.

**N**

- Neckers, L. (2002). *Trends Mol Med*, **8**, S55-61.  
 Negrier, S., Escudier, B., Lasset, C., Douillard, J.Y., Savary, J., Chevreau, C., Ravaud, A., Mercatello, A., Peny, J., Mousseau, M., Philip, T. & Tursz, T. (1998). *N Engl J Med*, **338**, 1272-8.  
 Nicholson, K.M. & Anderson, N.G. (2002). *Cell Signal*, **14**, 381-95.

Nicolini, A., Carpi, A. & Rossi, G. (2006). *Cytokine Growth Factor Rev*, **17**, 325-37.  
 Novara, G., Martignoni, G., Artibani, W. & Ficarra, V. (2007). *J Urol*, **177**, 430-6.

## O

Ohh, M. (2006). *Neoplasia*, **8**, 623-9.  
 Ohta, T., Ohmichi, M., Hayasaka, T., Mabuchi, S., Saitoh, M., Kawagoe, J., Takahashi, K., Igarashi, H., Du, B., Doshida, M., Mirei, I.G., Motoyama, T., Tasaka, K. & Kurachi, H. (2006). *Endocrinology*, **147**, 1761-9.  
 Oka, D., Nishimura, K., Shiba, M., Nakai, Y., Arai, Y., Nakayama, M., Takayama, H., Inoue, H., Okuyama, A. & Nonomura, N. (2007). *Int J Cancer*, **120**, 2576-81.  
 Oya, M., Ohtsubo, M., Takayanagi, A., Tachibana, M., Shimizu, N. & Murai, M. (2001). *Oncogene*, **20**, 3888-96.  
 Oya, M., Takayanagi, A., Horiguchi, A., Mizuno, R., Ohtsubo, M., Marumo, K., Shimizu, N. & Murai, M. (2003). *Carcinogenesis*, **24**, 377-84.

## P

Pantuck, A.J., Belldegrun, A.S. & Figlin, R.A. (2001a). *N Engl J Med*, **345**, 1711-2.  
 Pantuck, A.J., Seligson, D.B., Klatte, T., Yu, H., Leppert, J.T., Moore, L., O'Toole, T., Gibbons, J., Belldegrun, A.S. & Figlin, R.A. (2007). *Cancer*.  
 Pantuck, A.J., Thomas, G., Belldegrun, A.S. & Figlin, R.A. (2006). *Semin Oncol*, **33**, 607-13.  
 Pantuck, A.J., Zisman, A. & Belldegrun, A. (2001b). *Int J Urol*, **8**, S1-4.  
 Pantuck, A.J., Zisman, A. & Belldegrun, A.S. (2001c). *J Urol*, **166**, 1611-23.  
 Parthasarathy, N., Torti, S.V. & Torti, F.M. (2002). *Biochem J*, **365**, 279-86.  
 Patard, J.J., Rioux-Leclercq, N. & Fergelot, P. (2006). *Eur Urol*, **49**, 633-43.  
 Patel, P.H., Chaganti, R.S. & Motzer, R.J. (2006). *Br J Cancer*, **94**, 614-9.  
 Pawlowski, J.E., Nesterov, A., Scheinman, R.I., Johnson, T.R. & Kraft, A.S. (2000). *Anticancer Res*, **20**, 4243-55.  
 Perez-Garcia, M.J., Cena, V., de Pablo, Y., Llovera, M., Comella, J.X. & Soler, R.M. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 6132-42.  
 Perez-Ordóñez, B., Beauchemin, M. & Jordan, R.C. (2006). *J Clin Pathol*, **59**, 445-53.  
 Peterson, R.T. & Schreiber, S.L. (1999). *Curr Biol*, **9**, R521-4.  
 Pierce, J.W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S.A., Collins, T. & Gerritsen, M.E. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 21096-103.

## R

Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L. & Sellers, W.R. (2002). *Cancer Cell*, **2**, 81-91.  
 Ramsey, S. & Aitchison, M. (2006). *Nat Clin Pract Urol*, **3**, 478-84.  
 Richard, S., David, P., Marsot-Dupuch, K., Giraud, S., Beroud, C. & Resche, F. (2000). *Neurosurg Rev*, **23**, 1-22; discussion 23-4.  
 Richards, F.M., Phipps, M.E., Latif, F., Yao, M., Crossey, P.A., Foster, K., Linehan, W.M., Affara, N.A., Lerman, M.I., Zbar, B. & et al. (1993). *Hum Mol Genet*, **2**, 879-82.  
 Rini, B.I. (2006). *Curr Oncol Rep*, **8**, 85-9.  
 Rini, B.I. & Small, E.J. (2005). *J Clin Oncol*, **23**, 1028-43.  
 Rini, B.I., Sosman, J.A. & Motzer, R.J. (2005). *BJU Int*, **96**, 286-90.  
 Robb, V.A., Karbowniczek, M., Klein-Szanto, A.J. & Henske, E.P. (2007). *J Urol*, **177**, 346-52.  
 Roviezzo, F., Cuzzocrea, S., Di Lorenzo, A., Brancaleone, V., Mazzon, E., Di Paola, R., Bucci, M. & Cirino, G. (2007). *Br J Pharmacol*.

**S**

- Sagalowsky, A.I. (2002). *Curr Opin Urol*, **12**, 371-3.
- Sanchez, J.F., Sniderhan, L.F., Williamson, A.L., Fan, S., Chakraborty-Sett, S. & Maggirwar, S.B. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 4649-62.
- Scheidereit, C. (2006). *Oncogene*, **25**, 6685-705.
- Schlegel, J., Piontek, G. & Mennel, H.D. (2002). *Anticancer Res*, **22**, 2837-40.
- Semenza, G.L. (2003). *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-32.
- Shelton, J.G., Steelman, L.S., Lee, J.T., Knapp, S.L., Blalock, W.L., Moye, P.W., Franklin, R.A., Pohnert, S.C., Mirza, A.M., McMahon, M. & McCubrey, J.A. (2003). *Oncogene*, **22**, 2478-92.
- Shimazui, T., Yoshikawa, K., Uemura, H., Hirao, Y., Saga, S. & Akaza, H. (2004). *Cancer*, **101**, 963-8.
- Shorts, L., Weiss, J.M., Lee, J.K., Welniak, L.A., Subleski, J., Back, T., Murphy, W.J. & Wiltrout, R.H. (2006). *J Immunol*, **176**, 6543-52.
- Skinner, H.D., Zheng, J.Z., Fang, J., Agani, F. & Jiang, B.H. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 45643-51.
- Smith, R.A., Dumas, J., Adnane, L. & Wilhelm, S.M. (2006). *Curr Top Med Chem*, **6**, 1071-89.
- Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. (2005). *J Cell Mol Med*, **9**, 59-71.
- Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R. & Franke, T.F. (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11345-50.
- Srigley, J.R., Hutter, R.V., Gelb, A.B., Henson, D.E., Kenney, G., King, B.F., Raziuddin, S. & Pisansky, T.M. (1997). *Cancer*, **80**, 994-6.
- Steinbrecher, K.A., Wilson, W., 3rd, Cogswell, P.C. & Baldwin, A.S. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 8444-55.
- Steiner, T., Junker, U., Henzgen, B., Nuske, K., Durum, S.K. & Schubert, J. (2001). *Eur Urol*, **39**, 478-83.
- Steinmetz, M.O. (2006). *J Struct Biol*.
- Straight, A.M., Oakley, K., Moores, R., Bauer, A.J., Patel, A., Tuttle, R.M., Jimeno, J. & Francis, G.L. (2006). *Cancer Chemother Pharmacol*, **57**, 7-14.
- Stumm, G., Eberwein, S., Rostock-Wolf, S., Stein, H., Pomer, S., Schlegel, J. & Waldherr, R. (1996). *Int J Cancer*, **69**, 17-22.

**T**

- Takada, Y., Fang, X., Jamaluddin, M.S., Boyd, D.D. & Aggarwal, B.B. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 39541-54.
- Takahashi, Y. & Childs, R.W. (2004). *Clin Cancer Res*, **10**, 6353S-9S.
- Tanaka, H., Yamamoto, M., Hashimoto, N., Miyakoshi, M., Tamakawa, S., Yoshie, M., Tokusashi, Y., Yokoyama, K., Yaginuma, Y. & Ogawa, K. (2006). *Cancer Res*, **66**, 11263-70.
- Thompson, F.H., Nelson, M.A., Trent, J.M., Guan, X.Y., Liu, Y., Yang, J.M., Emerson, J., Adair, L., Wymer, J., Balfour, C., Massey, K., Weinstein, R., Alberts, D.S. & Tactile, R. (1996). *Cancer Genet Cytogenet*, **87**, 55-62.
- Tourani, J.M., Pfister, C., Tubiana, N., Ouldacaci, M., Prevot, G., Lucas, V., Oudard, S., Malet, M., Cottu, P., Ferrero, J.M., Mayeur, D., Rixe, O., Sun, X.S., Bernard, O., Andre, T., Tournigand, C., Muracciole, X. & Guilhot, J. (2003). *J Clin Oncol*, **21**, 3987-94.

**V**

- van Spronsen, D.J. & De Mulder, P.H. (2006). *Onkologie*, **29**, 394-402.

- van Spronsen, D.J., de Weijer, K.J., Mulders, P.F. & De Mulder, P.H. (2005a). *Anticancer Drugs*, **16**, 709-17.
- van Spronsen, D.J., Mulders, P.F. & De Mulder, P.H. (2005b). *Crit Rev Oncol Hematol*, **55**, 177-91.
- Verra, N., Jansen, R., Groenewegen, G., Mallo, H., Kersten, M.J., Bex, A., Vyth-Dreese, F.A., Sein, J., van de Kastele, W., Nooijen, W.J., de Waal, M., Horenblas, S. & de Gast, G.C. (2003). *Br J Cancer*, **88**, 1346-51.
- Virtanen, I. & Lehto, V.P. (2004). *Scand J Surg*, **93**, 112-7.
- Vogelzang, N.J. & Stadler, W.M. (1998). *Lancet*, **352**, 1691-6.

## W

- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G. & Schmid, R.M. (1998). *J Clin Invest*, **101**, 1163-74.
- Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T., Wymann, M.P. & Williams, R.L. (2000). *Mol Cell*, **6**, 909-19.
- Wang, C.Y., Cusack, J.C., Jr., Liu, R. & Baldwin, A.S., Jr. (1999a). *Nat Med*, **5**, 412-7.
- Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W. & Baldwin, A.S., Jr. (1999b). *Mol Cell Biol*, **19**, 5923-9.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W. & Baldwin, A.S., Jr. (1996). *Science*, **274**, 784-7.
- Weber, C.K., Liptay, S., Wirth, T., Adler, G. & Schmid, R.M. (2000). *Gastroenterology*, **119**, 1209-18.
- Wei, L., Sandbulte, M.R., Thomas, P.G., Webby, R.J., Homayouni, R. & Pfeffer, L.M. (2006). *J Biol Chem*, **281**, 11678-84.
- West, K.A., Castillo, S.S. & Dennis, P.A. (2002). *Drug Resist Updat*, **5**, 234-48.
- Wiesinger, D., Gubler, H.U., Haefliger, W. & Hauser, D. (1974). *Experientia*, **30**, 135-6.
- Woo, J.H., Kim, Y.H., Choi, Y.J., Kim, D.G., Lee, K.S., Bae, J.H., Min, D.S., Chang, J.S., Jeong, Y.J., Lee, Y.H., Park, J.W. & Kwon, T.K. (2003). *Carcinogenesis*, **24**, 1199-208.
- Woods, Y.L. & Rena, G. (2002). *Biochem Soc Trans*, **30**, 391-7.
- Woodward, E.R. & Maher, E.R. (2006). *Endocr Relat Cancer*, **13**, 415-25.

## Y

- Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B. (2004). *Trends Biochem Sci*, **29**, 72-9.
- Yildiz, E., Gokce, G., Kilicarlan, H., Ayan, S., Goze, O.F. & Gultekin, E.Y. (2004). *BJU Int*, **93**, 1087-93.
- Yu, K., Lucas, J., Zhu, T., Zask, A., Gaydos, C., Toral-Barza, L., Gu, J., Li, F., Chaudhary, I., Cai, P., Lotvin, J., Petersen, R., Ruppen, M., Fawzi, M., Ayril-Kaloustian, S., Skotnicki, J., Mansour, T., Frost, P. & Gibbons, J. (2005). *Cancer Biol Ther*, **4**, 538-45.

## Z

- Zbar, B. (1995). *Cancer Surv*, **25**, 219-32.
- Zhou, J., Schmid, T., Frank, R. & Brune, B. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 13506-13.
- Zhou, Y., Eppenberger-Castori, S., Eppenberger, U. & Benz, C.C. (2005). *Endocr Relat Cancer*, **12 Suppl 1**, S37-46.
- Zidi, I., Guillard, C., Marcou, C., Krawice-Radanne, I., Sangrouber, D., Rouas-Freiss, N., Carosella, E.D. & Moreau, P. (2006). *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2669-81.
- Zigeuner, R., Ratschek, M., Rehak, P., Schips, L. & Langner, C. (2004). *Urology*, **63**, 651-5.
- Zimmermann, S. & Moelling, K. (1999). *Science*, **286**, 1741-4.

**Chapitre 7.**

**ANNEXES**

## 1. Publications

1. **SOURBIER C**, MASSFELDER T. Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2006 Aug 28;240(2):170-82. Epub 2005 Oct 11.
2. **SOURBIER C**, LINDNER V, AGOUNI A, TALON I, DANILIN S, SCHORDAN E, ROTHHUT S, LANG H, HELWIG JJ, MASSFELDER T. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res.* 2006 May 15;66(10):5130-42.
3. **SOURBIER C**, DANILIN S, LINDNER V, STEGER J, MEYER N, JACQMIN D, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. Targeting the NF-kappaB rescue pathway: the ultimate avenue for renal cell carcinoma therapy ?. *Sousmis dans cancer research.*
4. **SOURBIER C**, DANILIN S, LINDNER V, BOUTAUD O, MEYER N, JACQMIN D, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. A New Regulatory Loop between Akt and its Downstream Targets Induces Cell Survival in Human Renal Cell Carcinoma: Identification of New Therapeutic Candidates. *Manuscrit en préparation.*
5. TALON I, LINDNER V, **SOURBIER C**, SCHORDAN E, ROTHHUT S, BARTHELMEBS M, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. Antitumor effect of parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Carcinogenesis.* 2006 Jan;27(1):73-83. Epub 2005 Aug 4.
5. AGOUNI A, **SOURBIER C**, DANILIN S, ROTHHUT S, LINDNER V, BARTHELMEBS M, JACQMIN D, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. Parathyroid Hormone-Related Protein Induces Cell Survival in Human Renal Cell Carcinoma Through the PI3K/Akt pathway: Evidence for a Critical Role for Integrin-Linked Kinase and Nuclear Factor kappa B. *Carcinogenesis.* En Révision.
7. DANILIN S, **SOURBIER C**, ROTHHUT S, LINDNER V, JACQMIN D, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. Differential Expression of Alternatively Spliced mRNA Forms of the Survival Factor Parathyroid Hormone-Related Protein in Human Renal Cell Carcinoma: Evidence for a von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene-Dependent Stabilization. *Manuscrit en préparation.*

## 2. Posters, présentations, cours

### Posters discutés

1. **SOURBIER C**, RODRIGUEZ-SARMLENTO R, FLOHR A, JOLLDON S, NETTEKOVEN M, MARTIN R, ROCHE O, GATTI-McARTHUR S. Characterization of agonists and inverse agonists at the human histamine receptor H3R. *Basel Neuroscience Symposium.* September 12<sup>th</sup> 2003. **Poster Discuté. Abstract 33.**
2. **SOURBIER C**, LINDNER V, TALON I, ROTHHUT S, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Pathway Blockade has Potent Anti-Tumor Effects in Human Renal Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo. *XX Congress of the European Association of Urology, Istanbul, March 16-19, 2005. Poster Discuté (Abstract enlevé pour cause de brevet).*
3. **SOURBIER C**, LINDNER V, TALON I, ROTHHUT S, LANG H, HELWIG JJ, MASSFELDER T. Anti-Tumor Effect of Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Pathway Blockade in Human Renal Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo. *Annual Meeting of the American Urological Association (AUA), May 21-26, 2005, San Antonio (USA). Poster Discuté. (Abstract enlevé pour cause de brevet).*
4. **SOURBIER C**, STEGER J, LINDNER V, DANILIN S, ROTHHUT S, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. Inhibition of the Nuclear factor-kappaB pathway has Potent Anti-Tumor Effect in Human Renal Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo. *Annual Meeting of the American Urological Association (AUA), May 20-25, 2006, Atlanta (USA). Poster Discuté, Abstract 379.*

5. **SOURBIER C**, DANILIN S, LINDNER V, ROTHHUT S, HELWIG JJ, JACQMIN D, LANG H, MASSFELDER T.  
Nuclear Factor kappa B is the Main Downstream Target of the Akt Survival Pathway in Human Renal Cell Carcinoma (RCC): Evidence for a new Regulatory Loop with Glycogen Synthase Kinase-3 and Identification of Potential Therapeutic Candidates. Annual Meeting of the European Association of Urology (EAU), Mars 21-24, 2007, Berlin (Allemagne). *Poster discuté, Abstract AM07-0660.*
6. AGOUNI A, **SOURBIER C**, DANILIN S, ROTHHUT S, LINDNER V, BARTHELMEBS M, JACQMIN D, HELWIG JJ, LANG H, MASSFELDER T. Parathyroid Hormone-Related Protein Induces Cell Survival in Human Renal Cell Carcinoma Through the PI3K/Akt pathway: Evidence for a Critical Role for Integrin-Linked Kinase and Nuclear Factor kappa B. Annual Meeting of the European Association of Urology (EAU), Mars 21-24, 2007, Berlin (Allemagne). *Poster discuté, Abstract AM07-0667.*

### Présentations orales

1. **SOURBIER C**. Anti-Tumor Effect of Phosphatidylinositol 3<sup>o</sup>-Kinase/Akt Pathway Blockade in Human Renal Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo. 3<sup>ème</sup> Echange des écoles doctorales de Strasbourg et de Pragues. 12-14 Décembre 2005
2. **SOURBIER C**. Targeting the NF-kappaB rescue pathway: the ultimate avenue for renal cell carcinoma therapy? Tuesday Seminars in Molecular Medicine. Fondation Recherche sur le Cancer et les Maladies du Sang. Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC). Hôpital Kirchberg. Luxembourg, September 26, 2006.
3. **SOURBIER C**. Targeting the NF-kappaB rescue pathway: the ultimate avenue for renal cell carcinoma therapy? 4<sup>ème</sup> Echange des écoles doctorales de Strasbourg et de Pragues. 9-12 Mai 2007

### Cours

1. **SOURBIER C**. Etude d'une voie anti-apoptotique : exemple en cancérologie. Formation DEPULP Décembre 2005
2. **SOURBIER C**. Etude d'une voie anti-apoptotique : exemple en cancérologie. Formation DEPULP Décembre 2006

## ABREVIATIONS

Ab	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHD	Birt-Hogg-Dubé
CCC	Carcinome à cellules rénales de type conventionnel
CCR	Carcinome à cellules rénales
DMEM	<i>Dulbecco's modified-Eagle's medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FKHR	Forkhead
5-FU	5-fluoruracil
GSK3	Kinase glycogène synthase 3
HIF	Facteur induit par l'hypoxie, <i>Hypoxia Induced Factor</i>
hsp	<i>Heat-shock protein</i>
IKK	Kinase d'I $\kappa$ B
I $\kappa$ B	Inhibiteur de NF $\kappa$ B
IL	Interleukine
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IFN	Interféron
i.p.	Intra-péritonéal
IP	Iodure de propidium
kDa	KiloDalton
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycine</i>
MTT	Bromure de 3-(4-5 diméthylthiazol-2-yl)-diphényl tétrazolium
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
pb	Paires de bases
PBS	Solution tamponnée à pH 7,4 ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )

PDGF $\beta$	Platelet-derived growth factor $\beta$
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent kinase</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate
PM	Poids moléculaire
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
PTHrP	<i>Parathyroïde hormone-related protein</i>
s.c.	Sous-cutanée
TUNEL	<i>Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
TMA	Tissue microarray
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau

## Summary

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 3% of adult malignancies and more than 90% of adult renal neoplasms. The aim of my PhD project was the identification of signalletic pathways, or survival pathways, involved in the growth of human RCC. Particularly, we have studied the implication of both PI3K/Akt and NF $\kappa$ B pathways and we have evaluated whether targeting these pathways could be of therapeutic value against human RCC.

The PI3K/Akt signaling cascade induces cell growth, cell transformation, and neovascularization by regulating the function of a broad array of intracellular proteins. We have demonstrated that Akt is constitutively activated in human RCC and that it is involved in the growth and the survival of these tumors *in vitro* and *in vivo* independently of von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene expression. Biallelic inactivating mutations of the VHL occur in the majority of RCC. We have shown that GSK3 $\beta$  and NF $\kappa$ B are the two major targets of the Akt kinase in this pathology, being respectively inhibited and activated by Akt.

We have then studied the implication of the NF $\kappa$ B transcriptional pathway in human RCC growth. This pathway is involved in many fundamental biological processes including immunity, inflammation, angiogenesis, cell migration, cell proliferation and apoptosis. We have demonstrated that NF $\kappa$ B is implicated in human RCC growth *in vitro* and *in vivo*, regardless of the VHL status. Our results identified I $\kappa$ B $\alpha$ , the NF $\kappa$ B endogenous inhibitor, as a new target for human RCC therapy. Using a tissue microarray containing 241 cases of human RCC with 12-22 years of clinical follow-up and corresponding normal tissues, we have shown that NF $\kappa$ B activation is correlated to conventional RCC type and tumor dimension, but did not appear as an independent prognostic factor for patient survival.

In the course of these studies, we also identified a new regulatory loop between Akt, GSK3 and NF $\kappa$ B specifically in human RCC cells expressing inactive VHL (786-0 cells) but not in Caki-1 cells that are expressing wild-type VHL. However, in both cases, these regulatory loops converge to NF $\kappa$ B. Interestingly, combining NF $\kappa$ B target gene array and 2D-difference gel electrophoresis coupled to mass spectrometry and sequencing, we identified NF $\kappa$ B downstream targets involved in tumor cell survival that appear to be expressed as a function of the VHL status.

Overall, our results demonstrate the ultimate role of the PI3K/Akt/GSK3/NF $\kappa$ B axis in the growth and the survival of human RCC and pave the way for new therapeutic targets depending or not of the VHL status of the tumors.

## Résumé

Le cancer du rein représente 3% des cancers de l'adulte et est la sixième cause de décès par cancer dans les pays industrialisés. Le carcinome à cellules rénales (CCR) est la forme la plus fréquente des tumeurs rénales (>90%). Dans le cadre de cette thèse, nous avons recherché les voies signalétiques impliquées dans la croissance du CCR humain. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation PI3K/Akt et NFκB.

La voie de la PI3K/Akt joue un rôle crucial dans la croissance et la survie cellulaire en phosphorylant tout un panel de protéines impliquées dans des processus aussi variés que la prolifération cellulaire, la mort cellulaire ou l'adhésion et la motilité cellulaire. Nous avons montré que cette voie est activée de manière constitutive dans le CCR humain et qu'elle joue un rôle important dans la croissance et la survie de ces tumeurs *in vitro* et *in vivo* quel que soit le statut en gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL) qui est inactivé dans la majorité des CCR. Nous avons identifié GSK3β et NFκB comme étant les cibles majeures de Akt et qui sont respectivement inhibés et activés par celle-ci. Nous avons alors étudié l'implication de la voie de NFκB dans la croissance du CCR humain. Cette voie joue un rôle central dans les réponses immunitaires, les réactions inflammatoires et la croissance cellulaire. Nous avons démontré son implication dans la croissance du CCR humain *in vitro* et *in vivo*, quel que soit le statut en VHL. Nos résultats identifient l'inhibiteur endogène de NFκB, IκBα, comme une nouvelle cible thérapeutique du CCR humain. Grâce à une puce à tissus que nous avons construite à partir de 241 cas de CCR humain (recul clinique 12-22 ans), nous montrons que l'activation de NFκB est corrélée au CCR de type conventionnel et à la taille de la tumeur mais que NFκB n'est pas un facteur pronostique indépendant de la survie des patients. Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une boucle de régulation entre Akt, GSK3 et NFκB spécifiquement dans la lignée 786-0 humaine de CCR (déficiente en VHL) mais pas dans la lignée Caki-1 (exprimant un VHL sauvage). Bien que cette régulation soit dépendante du statut en VHL, elle converge cependant dans les deux cas vers NFκB. Suite à ces études, nous avons pu identifier, par des approches transcriptomique et protéomique, diverses cibles transcriptionnelles de NFκB intervenant dans le métabolisme cellulaire, la croissance cellulaire et l'apoptose.

Ces résultats soulignent l'importance de l'axe PI3K/Akt/GSK3/NFκB dans la croissance et la survie du CCR humain et ouvrent de nouvelles voies thérapeutiques en fonction de l'expression du gène suppresseur de tumeur VHL.