

Biologie du cancer bronchique à petites cellules

Rafaël LEVY

L'incidence du cancer bronchique, toujours en augmentation, est en France de l'ordre de 65/100 000 habitants par an. Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC) représente de 15 à 25 % de ces cas. Il est responsable d'au moins 5000 décès par an, soit de 10 à 15 décès/100 000 habitants. Ce chiffre proche de celui de son incidence souligne son très mauvais pronostic. En effet en dépit des progrès thérapeutiques réalisés au cours des 20 dernières années moins de 10 % des patients atteints peuvent en être guéris.

Au début de la décennie 80, simultanément aux progrès de la biologie moléculaire, la mise au point de techniques de culture cellulaire spécifiques a permis l'établissement de nombreuses lignées de CBPC. Ces deux facteurs ont permis des avancées notables dans la compréhension de la biologie de cette tumeur. Les progrès portent sur l'origine de la cellule du CBPC, les liens ontogéniques CBPC/cancer bronchique non-CBPC, les propriétés neuro-endocrines de cette tumeur, l'activation d'oncogènes de la famille myc définissant un profil de malignité particulier, le rôle fondamental et quasi-constant de l'inactivation de plusieurs anti-oncogènes (dont TP53, RB1 et un troisième anti-oncogène putatif localisé sur le bras court du chromosome 3) dans la survenue de cette tumeur, enfin la caractérisation au sein de cette tumeur du fonctionnement autocrine et paracrine de plusieurs facteurs de croissance.

Toutes ces découvertes outre qu'elles éclairent d'un jour nouveau de nombreuses particularités cliniques, anciennement connues du CBPC (temps de doublement clinique rapide, syndromes paranéoplasiques fréquents et variés, chimiosensibilité initiale importante et acquisition rapide de chimiorésistance, formes mixtes CBPC/non CBPC de cancer bronchique) ont, ou auront, leurs applications diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques.

Biologie des facteurs de risques (exogènes, génétiques, et combinaison des deux)

La consommation de tabac est le facteur de risque principal du CBPC, comme d'ailleurs de tous les types histologiques de cancer bronchique (1). En effet d'une part il existe une corrélation positive entre l'importance du tabagisme et la survenue d'un cancer bronchique, d'autre part 5 % seulement des patients atteints de CBPC n'ont pas d'habitudes tabagiques. Il se pourrait que la fréquence du CBPC (versus autres types histologiques) soit tout particulièrement dépendante de l'intensité du tabagisme (1). Parmi le millier de substances identifiées dans la fumée du tabac, les principaux carcinogènes ou pro-carcinogènes sont le benzo(a)pyrène, le dibenzo(a)anthracène, l'hydrazine, le formaldéhyde, et la nitrosodiéthylamine. Le cadmium, le nickel, le ²¹⁰polonium contenus dans la fumée du tabac ont également été incriminés. D'autres agents carcinogènes minoritaires dans la fumée de tabac ont aussi un rôle prouvé au moins expérimentalement : l'arsenic, le fer, le chrome, le beryllium, l'amiante. L'exposition de la muqueuse bronchique aux radiations ionisantes (radon en particulier) est également un facteur de risque. Le cancer bronchique survenant lors de l'exposition professionnelle à l'arsenic, au nickel, à l'amiante, aux oxydes de fer, aux radiations ionisantes et au bis-chlorométhyle éther (qui favoriserait, avec le radon, pour des raisons inconnues, particulièrement le type CBPC) est au tableau des maladies professionnelles.

Si le tabac apparaît comme le facteur de risque principal il est cependant certain qu'un facteur génétique intervient dans la susceptibilité à développer un cancer bronchique chez un fumeur. La plupart des études estiment que le risque de cancer bronchique chez les proches parents d'un sujet ayant un tel cancer est multiplié d'une valeur de 2 à 4 (2).

Une étude récente portant sur 337 familles précise cette donnée et suggère que dans près de 30 % des cas de cancer bronchique survenant chez les sujets de moins de 50 ans un gène de susceptibilité autosomique dominant pourrait être en cause (3). Ce facteur génétique serait d'ailleurs même plus important pour le CBPC que pour les types histologiques non-CBPC (4).

Le tabac étant épidémiologiquement le principal facteur de risque on s'est demandé si le facteur génétique d'augmentation du risque ne pouvait pas s'expliquer par des capacités particulières à métaboliser les carcinogènes et les pro-carcinogènes de la fumée du tabac. De façon générale il faut savoir que les carcinogènes de la fumée du tabac peuvent donner naissance, lors des réactions de métabolisation qui visent à les rendre éliminables par l'organisme, à des métabolites plus réactifs (plus carcinogènes) que le produit initial. Le meilleur exemple est celui du benzo(a)pyrène, beaucoup moins mutagène et cancérigène que son métabolite, un diol-époxyde, le 7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α epoxy-7,8,9,10-tetra-hydro- benzo(a)pyrène, que l'on appelle pour cette raison carcinogène ultime. Pour tous les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), la formation de composés diol-époxydes, composés particulièrement réactifs avec l'ADN (Alkylants), est justement l'élément important de leur carcinogénicité.

De fait deux activités enzymatiques (toutes deux liées aux cytochromes P-450), qui permettent la métabolisation des substances carcino et pro-carcinogènes de la fumée du tabac et dont le niveau d'activité est en partie génétiquement déterminé ont (statistiquement) un niveau différent chez les fumeurs atteints d'un cancer bronchique. Il s'agit de l'activité enzymatique contrôlant le métabolisme de la débrisoquine et de l'activité Aryl- hydrocarbon- hydroxylase (ahh).

Les sujets métaboliseurs forts de la débrisoquine ont un risque de 4 à 10 fois plus élevé de développer un cancer bronchique que les sujets métaboliseurs intermédiaires ou faibles (5). Cette augmentation du risque est du même ordre que celle notée en épidémiologie descriptive pour le risque familial.

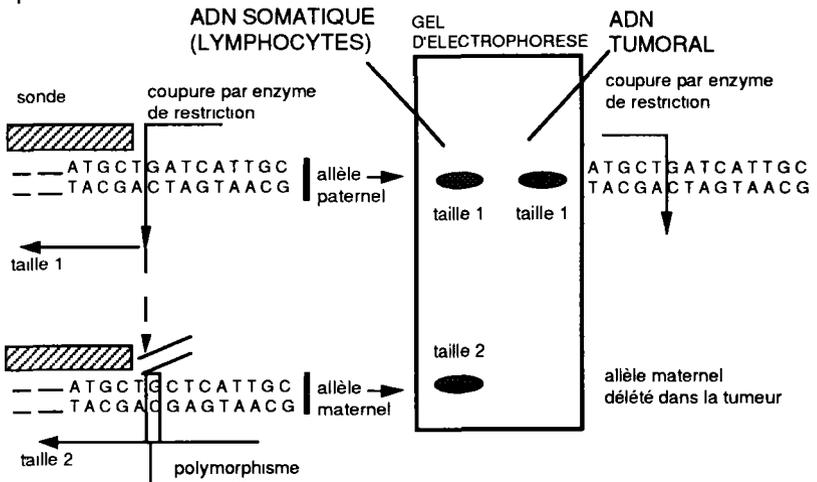
Le métabolisme de la débrisoquine est contrôlé le gène codant pour le cytochrome P-450 DB1, gène appelé CYP2D6, localisé sur le bras long du chromosome 22. Si l'on pense que l'activité enzymatique correspondant à celle du métabolisme de la débrisoquine pourrait être celle du métabolisme d'un carcinogène contenu dans la fumée du tabac celui-ci n'est pour l'instant pas identifié. On ne sait donc pas si un phénotype de fort hydroxylateur est réellement un facteur de risque ou à l'inverse si un phénotype de faible hydroxylateur est un facteur protecteur. Enfin il est possible que ces constatations ne reflètent qu'un phénomène de liaison génétique et que le gène réellement responsable de l'augmentation de risque ne soit un gène très proche, mais distinct, de CYP2D6. Pour répondre à ces interrogations des études sont en cours,

***Rappel méthodologique sur les polymorphismes de fragments de restriction (RFLP):**

Le génome humain est naturellement polymorphe: pour une même localisation chromosomique il existe des différences de nature de bases de l'ADN entre les individus. On estime qu'entre deux individus non apparentés une base toute les 200 est différente. Ces différences n'ont aucune conséquence, soit qu'elles siègent en des régions non codantes (cas le plus fréquent), soit que leurs conséquences au niveau protéique soit neutre (ce qui explique dans les deux cas qu'elles ne sont pas soumises à une pression de sélection).

Ces Polymorphismes se transmettent selon les lois de la génétique mendélienne. On les met en évidence en utilisant la capacité d'enzymes (enzymes de restriction) de couper l'ADN en reconnaissant des alignements de base très précis. Ainsi une enzyme peut couper l'ADN au niveau d'une région précise (révélée plus tard par une sonde spécifique) si il possède cette séquence. L'ADN d'un autre individu possédant une séquence différente (polymorphisme) ne sera pas coupé. Ceci entrainera des tailles d'ADN coupé différentes que l'on pourra mettre en évidence. On appelle donc ces polymorphismes "Polymorphismes de taille de fragments de restriction" (RFLP en anglais). Cette approche permet par exemple de mettre en évidence une délétion au niveau de l'ADN tumoral. Si l'ADN non tumoral (lymphocytes ou fibroblastes par exemple) d'un locus chez un patient est hétérozygote (un polymorphisme hérité du père, un polymorphisme hérité de la mère) pour un RFLP, le patient est informatif pour ce RFLP. Dans un cas informatif si l'analyse du tissu tumoral montre la disparition d'un des allèles du RFLP (disparition d'une bande en Southern-blot) on peut conclure à la disparition du matériel génétique correspondant au niveau tumoral. Pour peu que l'on dispose d'un nombre suffisant de couples sondes/RFLP cette approche est particulièrement puissante. Elle permet de plus de s'affranchir des cultures de lignées et d'étudier directement le tissu tumoral.

Exemple:



utilisant non plus la détermination phénotypique de cette activité enzymatique (par injection de débrisoquine) mais, de façon plus sûre la détermination génotypique. En effet des Polymorphismes de fragment de restriction (RFLP*) du gène CYP2D6 correspondant au phénotype de faible hydroxylateur ont été identifiés (6).

La seconde activité enzymatique dont le niveau d'activité, génétiquement déterminé, est associé au risque de cancer bronchique est l'activité ahh. A l'inverse du métabolisme de la débrisoquine, le mécanisme reliant le niveau d'activité ahh et l'augmentation de risque est connu. L'activité ahh contrôle le métabolisme des amines aromatiques et des PAH (dont le benzopyrène), principaux agents carcinogènes de la fumée du tabac. Ces carcinogènes lorsqu'ils sont métabolisés par l'ahh donnent naissance à des composés diols-époxydes encore plus carcinogènes que le produit parent. Aussi plus l'activité ahh est élevée (génétiquement) plus il y a production de carcinogènes réactifs (alkylants en l'occurrence) avec l'ADN. De fait les sujets développant un cancer bronchique ont (statistiquement) une activité ahh élevée (7).

Enfin parmi les autres mécanismes génétiques envisageables, mais non prouvés, il est possible, que dans une petite proportion de cas, une des deux copies d'un anti-oncogène (TP53, RB1, autre non identifié dont ceux situés en 3p) soit constitutivement altérée. Le tabac pourrait alors réaliser le second événement inactivateur au niveau des cellules bronchiques. A ce jour peu d'arguments sont en faveur de cette hypothèse : de façon générale il n'y a pas de forme familiale indiscutable de CBPC. En ce qui concerne spécifiquement l'anti-oncogène TP53 il n'y a pas d'augmentation nette du risque de CBPC dans le syndrome de Li-Fraumeni ou une copie de TP53 est constitutionnellement mutée. En ce qui concerne RB1 il n'y a pas d'augmentation connue du risque de survenue d'un CBPC chez les personnes atteintes dans leur enfance d'un rétinoblastome de type héréditaire (8) ni d'ailleurs de survenue simultanée de tumeurs multifocales-multiclonales sur l'arbre bronchique comme c'est le cas des tumeurs oculaires lors des rétinoblastomes qui surviennent dans un contexte héréditaire. Seules deux observations de CBPC chez des personnes ayant eu un rétinoblastome dans l'enfance sont, pour l'instant à mettre au crédit de cette vue (9, 10). L'autre piste, tout à fait ténue et discutable, est celle de l'observation de tumeurs secondaires de type neuro-ectodermiques

(Leu 7 positives, NSE positives) chez des survivants de rétinoblastomes héréditaires (11). Le CBPC ayant pu être considéré comme d'origine neuro-ectodermique (cf *infra*) il y a la une analogie, peut-être au-delà du simple hasard.

Cependant ce type de prédisposition, hors syndrome génétique identifié, par mutation constitutive d'une copie d'un anti-oncogène est en au début de son évaluation (12). Cette hypothèse n'est pas à rejeter, même si en ce qui concerne le CBPC elle ne paraît en première approche concerner qu'un petit nombre de cas (13).

En effet la ré-analyse, selon le modèle des anti-oncogènes à deux étapes, des données de la grande enquête réalisée chez les médecins anglais montre, de façon globale, que les données sont compatibles avec ce modèle mais seulement si les deux mutations sont acquises somatiquement (14). En fait seules des investigations systématiques du statut constitutif d' anti-oncogènes chez les patients atteints d'un CBPC (et particulièrement ceux atteints pour une exposition tabagique modeste, voire nulle où bien ceux atteints à un âge jeune), permettront de répondre à cette question. De telles études sont actuellement en cours.

Lignées cellulaires, origine du CBPC, liens avec les autres types histologiques

Lignées cellulaires

Depuis la mise au point de milieux de culture sans sérum, supplémentés en hormones (milieu HITES) on peut établir assez aisément des lignées de CBPC à partir de matériel métastatique. Les lignées de CBPC ainsi établies poussent en suspension (à la différence des lignées non CBPC poussant en monocouche adhérente). On peut catégoriser les lignées de CBPC en deux groupes : les lignées variantes et les lignées classiques (15).

Les lignées de type classique (70 %) produisent en grandes quantité des marqueurs neuro-endocrines tels que le Gastrin-releasing peptide (GRP), la neuron-specific enolase (NSE), l'isoenzyme BB de la creatine kinase(CKBB), et la L-Dopa Decarboxylase (DDC). Elles sont radiosensibles et chimiosensibles. Leur temps de doublement *in vitro* est long et leur efficacité de clonage est faible. Ces deux derniers paramètres reflètent un phénotype de malignité faible.

Les lignées variantes n'expriment ni DDC ni GRP mais continuent de produire de la NSE et de la CKBB. Leur temps de doublement est plus court, et leur efficacité de clonage élevée. Enfin elles sont plus radio-résistantes et plus chimiorésistantes que les lignées classiques. Morphologiquement les lignées classiques ressemblent au type intermédiaire (small cell/large cell) de la classification internationale, alors que les lignées variantes se présentent comme des grandes cellules indifférenciées. L'autre différence notable entre les deux types de lignées concerne l'oncogène c-myc. Il est très fréquemment amplifié et sur-exprimé dans les lignées variantes. La transfection des lignées classiques avec un gène c-myc hyperexprimé leur confère alors la majorité des caractéristiques phénotypiques des lignées variantes (temps de doublement *in vitro*, radiorésistance, morphologie) prouvant la causalité de l'hyperexpression de c-myc dans ce phénotype (16).

TABLEAU I
Caractéristiques des lignées de CBPC variantes classiques et obtenues après transfection d'oncogènes

	Classique	Variante	Classique transfectée c-myc	Variante transfectée V-Has-Ras
DDC	++	-	++	-
GRP	++	-	+	-
NSE	++	+	+	?
CKBB	++	+	+	-
Temps de doublement	71 h	32 h	?	26 H
Indépendance FCX	non	oui	Oui	?
Radiosensibilité	oui	non	?	?
Chimiosensibilité	oui	diminuée	?	?
Morphologie	typique CBPC	atypique grandes cellules	atypique grandes cellules	grandes cellules
C-myc Ampli/Surex	rare	fréquent	oui	oui
Efficacité de clonage	2 %	13 %	?	7 %
del 3p	oui	oui	oui	oui

DDC : L-Dopa-décarboxylase, GRP : gastrin-releasing-peptide ; NSE : Neurone-specific-enolase ; CKBB : iso-enzyme BB de la créatine kinase ; ampli : amplification ; surex : surexpression ; del : délétion ; ++ : présence forte ; + : présence faible ; - : absence.

La valeur pronostique de la capacité d'établir des lignées à partir de la tumeur d'un patient est actuellement débattue. Pour schématiser l'on a constaté assez souvent que plus une cellule possède un phénotype de malignité élevé, plus il est facile de l'établir en culture *in vitro* (par exemple il est plus facile d'établir une lignée à partir de matériel métastatique). Si l'on suppose que plus le phénotype de malignité est élevé moins bon est le pronostic on peut en inférer que plus on peut établir une lignée moins bon sera le pronostic. L'application de ces visions simplistes a donné, concernant le CBPC, des résultats contradictoires et délicats à interpréter (stades, nature des prélèvements, nombre de cas, étude rétrospective ou prospective). Il semblerait que, concernant les malades au stade disséminé il n'y ait pas de valeur pronostique à l'établissement d'une lignée (17). Pour les patients au stade localisé dans l'étude de Masuda (la plus solide sur le plan méthodologique), dans laquelle sont utilisées essentiellement des biopsies de tumeur primitive, la survie des patients chez qui une lignée est établie est significativement plus courte (26 semaines vs 73 semaines, 18). L'élément de confusion possible avec l'autre facteur pronostic (amplification d'un membre de la famille myc), non étudié dans cette étude, est discuté en *infra*.

Origine du CBPC

En ce qui concerne l'origine de la cellule de CBPC la nature des peptides produits par les cellules de CBPC (parfois responsables de syndromes paranéoplasiques), la présence de grains neurosécrétoires et de neurofilaments ont fait classer cette tumeur assez tôt comme de type neuro-endocrine (système APUD de Pearse). Cependant l'origine précise de la cellule des CBPC a longtemps été un sujet de débat. Une origine neuroectodermique a été proposée sur la constatation de d'analogies structurales et biochimiques : présence des granules neuro-sécrétoires et des neuro-filaments en microscopie électronique, activité biochimique du système APUD comme la présence de la Dopa-décarboxylase (DDC), de la Neurone-specific-enolase (NSE), du Gastrin-releasing peptide (GRP), de l'iso-enzyme BB de la créatine kinase (CKBB) et de la Chromogranin A. Cette proposition d'une origine neuro-ectodermique a été valable tant que l'origine endodermique des cellules neuro-endocrines bronchiques (et digestives) ne fut pas établie (19). On a également constaté l'expression de marqueurs de différenciation de la lignée macrophagique (antigène Leu 7) à la surface des cellules de CPBC

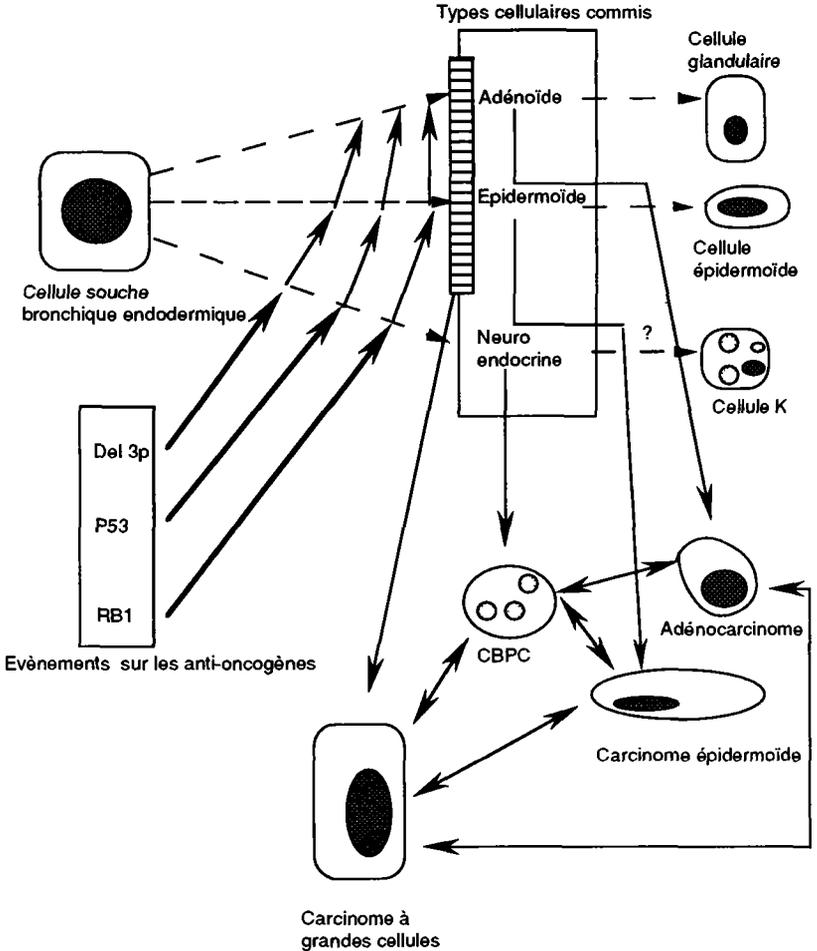
(20, 21) et une origine hématopoïétique avait été également envisagée (20, 22). Celle-ci est maintenant définitivement écartée. Notamment il s'est avéré que l'antigène Leu 7 est régulièrement exprimé par les cellules neuro-endocrines (22). Une observation récente reste cependant troublante dans ce contexte : celle d'un patient japonais atteint d'un CBPC ayant des taux, tant sériques que de son épanchement pleural spécifique, élevés de récepteurs solubles à l'interleukine 2 (IL-2) et de NSE. Dans ce cas l'analyse montre que les cellules tumorales expriment le récepteur à l'IL-2 et leurs gènes α et β du récepteur pour l'antigène sont en position réarrangée. De plus les cellules tumorales possèdent le génome HTLV1 (connu pour son tropisme lymphocytaire) intégré de façon clonale (23).

Quoiqu'il en soit le consensus est maintenant fait pour considérer qu'il y a une cellule souche bronchique phénotypiquement multipotente dont l'origine est endodermique. La cellule de CBPC représenterait la version transformée d'une cellule engagée dans une voie de différenciation neuro-endocrine dérivant de cette cellule souche. A l'état physiologique l'aboutissement de cette voie de différenciation pourrait être la cellule de Kutchilsky-Masson. Sur cette base d'une cellule souche bronchique phénotypiquement multipotente on peut expliquer pourquoi on peut retrouver dans une cellule de CBPC, outre les marqueurs neuro-endocrines, des marqueurs de différenciation épidermoïdes et/ ou glandulaires (24). Inversement on explique aussi ainsi comment certains cancers bronchiques épidermoïdes ou glandulaires expriment des marqueurs neuro-endocrines (GRP, DDC, NSE). Enfin on explique ainsi également l'existence de CBPC composites ou se trouvent au sein de la même tumeur des cellules à différenciation épidermoïde et glandulaire (Fig. 1).

Liens avec les autres types histologiques

Ils peuvent encore être mieux précisés en termes d'oncogenèse grâce aux techniques de biologie moléculaire. En introduisant un gène V-Ha-ras dans les lignées variantes ces dernières acquièrent une morphologie identique d'un type histologique « non-CBPC » (indifférencié à grandes cellules), ainsi que des capacités d'adhérence plutôt caractéristiques des lignées non-CBPC. Elles perdent également l'activité neuro-endocrine CKBB. De plus leur temps de doublement diminue encore et leur efficacité de clonage augmente (25). Les lignées classiques

Figure 1 : Origine du CBCP



- : compartiments de cellules commisés dans une voie de différenciation
- : voie de différenciation normale;
- : perte de tsg (tumor suppressor gene) survenant dans 100 % des cas;
- : perte de tsg dans 10 à 50 % des cas;
- : liens entre les différents compartiments de cellules commisés et les pathologies néoplasiques et entre les différentes pathologies néoplasiques;
- : granules neuro-sécrétoires.

transfectées ne présentent aucune modification de leurs caractéristiques morphologiques, culturelles et biochimiques. Cet exemple de coopération myc-ras fait penser qu'un événement supplémentaire (activation d'un gène Ras dont on sait qu'il s'agit d'un événement fréquent dans les carcinomes bronchiques non-CBPC (26)) survenant dans une cellule de CBPC possédant une amplification de c-myc serait associée à la transition vers un autre type histologique et, peut-être, des capacités d'agressivité supérieure et de résistance thérapeutique (27). Rappelons que les formes histologiques de CBPC possédant un contingent important de grandes cellules ont un pronostic moins bon que les formes purement CBPC (28). Cependant à ce jour peu de mutations de gènes de la famille ras ont été détectées dans le CBPC (mais d'une part il s'agissait justement de formes « pures » et d'autre part de tumeurs primitives opérées, ce biais expliquant probablement ces résultats négatifs) (26).

Par ailleurs quand on transfecte des lignées de cellules bronchiques épithéliales normales (immortalisées par l'antigène T du virus SV40) simultanément avec les oncogènes c-myc et c-raf1 on obtient des cellules dont la morphologie est celle de type « grandes cellules », qui sont tumorigènes chez la souris athymique, et qui transcrivent la NSE. Il semble donc qu'en utilisant quatre oncogènes (c-myc, v-Ha-Ras, c-raf-1) on réussisse à obtenir un continuum phénotypique entre les différents types histologiques de cancers bronchiques (29, 30, Tableau I).

Anti-oncogènes et CBPC

Depuis le travail théorique de Knudson sur le rétinoblastome (31), on sait qu'une des voies de la cancérogénèse, au moins aussi importante que celle de l'activation d'oncogène, est celle qui passe par l'inactivation du produit de gènes contrôlant de façon négative le cycle cellulaire. Ces gènes sont exprimés dans toute cellule normale. Dans les cellules malignes leur fonction est très fréquemment perdue (par des mécanismes divers). Ces gènes sont appelés pour cette raison, et par opposition aux oncogènes, « anti-oncogènes » ou bien gènes suppresseurs de tumeurs (TSG) (32, 33). Deux TSG, dont le mode d'action anti-oncogène commence à être connu, et dont l'implication dans différentes tumeurs humaines a été prouvée, sont également impliqués dans le CBPC. Il s'agit du gène

de prédisposition au rétinoblastome RB1 et du gène TP53. Par ailleurs il existe constamment dans les cellules de CPBC une délétion soit cytogénétique, soit détectée par biologie moléculaire au niveau du bras court du chromosome 3. L'existence d'un, ou de plusieurs, TSG à ce niveau a toujours été suspectée. Très récemment un gène : le gène PTPy a été localisé à ce niveau. Compte tenu de son type d'action il pourrait bien être l'un de ces TSG.

CBPC et RB1

Le gène de susceptibilité au rétinoblastome (RB1) est localisé en 13q 14. Sa taille est très importante (200 kb) ainsi que la complexité de son organisation (27 exons), soulignant son aptitude à subir des mutations (34). Exprimé dans la plupart des tissus, il code pour une phosphoprotéine (la P-105) de localisation nucléaire qui joue un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire (35). La disparition de la forme active (par mutations ponctuelles et/ou délétions) de la forme active de la P-105 dans les cellules de rétinoblastome (formes héréditaires et sporadiques) est parfaitement démontrée. Le mécanisme de son action anti-oncogène commence à être connu. Dans les cellules en G0/G1 du cycle cellulaire la P-105 est sous une forme non-phosphorylée. Dans cet état elle possède une action suppressive. Lors des phases ultérieures de la mitose elle est sous forme phosphorylée. Quand elle n'est pas phosphorylée la P-105 peut se complexer à des protéines contrôlant la transcription de gènes cellulaires et jouer un rôle inhibiteur de l'activation transcriptionnelle de ces gènes (36). Certaines protéines connues pour antagoniser l'action anti-oncogène de la P-105 (protéine E1A d'adénovirus, protéine E7 des papillomavirus, et T du virus SV40) empêchent la formation du complexe avec les protéines contrôlant la transcription (37). Il semble donc que la liaison de la P-105 avec des facteurs de contrôle de transcription soit responsable de son action de TSG (36). Alors un événement empêchant cette liaison (phosphorylation induite par des kinases, présence de protéines empêchant la formation du complexe et, a fortiori, absence par délétion de la P-105) aboutirait ainsi à la perte de l'activité suppressive de la P-105.

Outre les cas du rétinoblastome, l'inactivation du gène RB1 a été constatée, avec une faible fréquence, dans plusieurs types de tumeurs de l'adulte : prostate, sein, vessie, ovaire (37). Les seules tumeurs de l'adulte pour lesquelles il semble exister fréquemment une inactivation

tumorale sont les ostéosarcomes et les sarcomes des tissus mous (38).

Dans le CBPC l'analyse par RFLP* du bras long du chromosome 13 (13q) montre l'existence dans 90 % des cas étudiés d'une perte d'hétérozygotie tumorale de locus situés dans cette région (39). La délétion touche constamment la région 13q12-22 dans laquelle est situé le gène RB1. L'analyse spécifique du locus RB1 de lignées et de tumeurs fraîches de CBPC retrouve des anomalies structurales (délétions homo ou hétérozygotes de portions du gène) dans 10 à 25 % des cas (40). Ce type d'anomalies n'est pratiquement jamais retrouvé dans les autres types de cancers bronchiques, sauf, et la signification en est importante, dans le cas des tumeurs carcinoïdes (40). Il faut savoir que la technique avec laquelle cette fréquence d'anomalies structurales est caractérisée (Southern Blot) ne peut mettre en évidence que des anomalies de structure de grande taille. En fait la fréquence de telles anomalies majeures, détectées par Southern Blot, dans le CBPC est identique à celle observée dans le rétinoblastome, soit 20 % des cas (41). Ceci ne peut permettre d'estimer réellement la fréquence d'anomalies plus petites de RB1 (mutations ponctuelles) dont on sait qu'elles sont suffisantes pour faire disparaître ses propriétés de TSG (41, 42).

Par ailleurs des mutations dans des régions non codantes du gène, mais qui sont nécessaires à son expression, peuvent également participer à son inactivation (43). Cette situation n'est pas non plus, pour l'instant, évaluée dans le CBPC. Dans un cas analysé le séquençage de RB1 d'une lignée de CBPC possédant une protéine mutée (défective pour la phosphorylation) n'a retrouvé effectivement qu'une mutation ponctuelle dans l'exon 21. Cette mutation entraîne la substitution d'une cystéine par une phénylalanine et abolit la capacité de la P-105 de se lier aux protéines E1A d'adénovirus 5 et T de SV40 (44, 45). Dans une autre lignée de CBPC (H69) il existe une mutation de type transversion (base 2379) entraînant le changement d'un codon pour l'acide glutamique en codon stop (41).

La transcription de l'ARNm de RB1 est absente dans 70 à 80 % des lignées de CBPC. Elle est par contre présente dans la majorité des lignées d'autre type histologique de cancer bronchique. Sur un petit nombre de cas étudiés 95 % des lignées n'expriment pas de P-105 immunologiquement réactive (46). Par contre l'activité enzymatique estérase D, codée par un gène très proche de RB1 reste présent, montrant que l'inactivation ne concerne que RB1 (47).

TABLEAU II

Fréquence des anomalies des anti-oncogènes dans les CBPC, les tumeurs bronchiques non CBPC, les carcinoïdes bronchiques et les tumeurs neuroendocrines non-bronchiques

(compilation de la littérature, étude de tumeurs fraîches et de lignées)

Anti-oncogène	CBPC	Bronchique non CBPC	Petite cellule non pulmonaire	Carcinoïde pulmonaire
TP-53	80-100 %	50 %	50 %*	50 %*
RB1	80-100 %	10 %	?	80-100 %
Del 3 p	100 %	20-50 %	0 %	?

TP53 : anti-oncogène TP53, RB1 : gène de susceptibilité au rétinoblastome, Del3p : anti-oncogènes putatifs situés sur le bras court du chromosome 3, * : très peu de cas analysés.

Ainsi les études concernant RB1 dans le CBPC montrent que l'inactivation de cet anti-oncogène est un événement très fréquent, peut-être même constant. Cette situation met le CBPC tout a fait à part des autres tumeurs bronchiques (à l'exception des tumeurs carcinoïdes), et de toutes les autres tumeurs solides courantes de l'adulte ou une telle implication de RB1 est bien moins fréquente. Les raisons et les conséquences d'une telle fréquence d'implication de RB1 dans le CBPC restent hypothétiques et sont discutées en *infra*. (Tableau II).

P-53 et CBPC

La protéine P-53, de localisation nucléaire est, parmi d'autres effets, également impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Elle est capable de se fixer à l'ADN (48). Le gène P-53 qui la code est localisé en 17p13. Il possède cinq domaines hautement conservés entre les espèces, dont quatre codent pour la portion centrale de la molécule. Des mutations qui touchent l'un de ces cinq domaine conservé abrogent certaines des propriétés de la P-53, notamment sa liaison aux protéines T du virus SV40, E1A de l'adénovirus 5, E6 des papillomavirus humains 16 et 18. De telles mutations lui font acquérir de nouvelles propriétés comme celle de s'associer avec la protéine de choc thermique HSP 70. De nombreuses mutations ponctuelles survenant dans l'un des quatre

domaines centraux conservés (changeant un des acides aminés compris entre 156 et 288) confèrent à la P-53 des propriétés immortalisantes ou transformantes (en coopération avec l'oncogène Ha-Ras activé). Le gène P-53 peut donc être considéré comme un proto-oncogène activable par mutation ponctuelle.

De façon surprenante P-53 est également un TSG. Quand il n'est pas muté (P-53 sauvage) il empêche, dans différents systèmes, la coopération entre P-53 mutée et Ha-ras activé, E1A et Ha-ras, ou bien encore myc et Ha-ras. Certaines mutations, affectant sa conformation spatiale, peuvent faire perdre ses capacités suppressives à la P-53. De telles mutations sont détectables au niveau génomique par des techniques de type PCR et au niveau protéique par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. L'une des hypothèses reliant ces deux facettes de la P-53 (oncogène et anti-oncogène) est que la P-53 mutée oncogène complexerait (par dimérisation) la P-53 sauvage empêchant ainsi son action régulatrice du cycle cellulaire. Les mécanismes d'action de la P-53 commencent à être précisés : la P-53 sauvage est capable d'augmenter la transcription de gènes adjacents à son site de fixation au niveau de L'ADN. Non seulement une P-53 mutée n'est pas capable d'un tel effet mais qui plus est elle empêche alors cette action d'une P-53 sauvage (49). Quoiqu'il en soit une simple mutation de la P-53 aboutit simultanément à l'acquisition par la cellule d'un produit transformant et à la perte d'un produit suppresseur de tumeur.

Les constatations qui font jouer un rôle crucial à la perte d'activité de la P-53 sauvage dans le CBPC sont les suivantes : la localisation du gène en 17p13 région où une perte d'hétérozygotie tumorale est notée dans tous les cas de CBPC étudiés (39) ; l'existence de mutations de petite taille, ou de mutations ponctuelles, dans 40 % des cas de lignées ou de tumeurs fraîches étudiées (mises en évidence par technique de Polymérase Chain Réaction (PCR) ou par RNase protection assay) (50, 51), ces mutations pouvant siéger sur les deux copies du gène ; la présence très fréquente d'ARNm de taille anormale ou en quantité réduite ; l'analyse immunohistochimique de tumeurs fraîches avec des anticorps monoclonaux (Acm) anti-P-53 qui montre dans 44 à 67 % des cas une expression importante de la protéine ainsi qu'une localisation cytoplasmique inhabituelle (52). L'expression élevée de la protéine est due à sa demie-vie augmentée quand elle est mutée et sa localisation cytoplasmique à sa capacité de s'associer, lorsqu'elle est mutée, à la protéine HSP 70 (53). L'augmentation de l'expression de la protéine

observée dans la moitié des cas de CBPC est donc celle d'une protéine mutée. Cette technique de détection de P-53 mutée par Acm est cependant assez peu sensible, plusieurs mutations n'entraînant pas de modifications de conformation détectables (54). Le chiffre de 67 %, déjà très élevé, n'est vraisemblablement qu'une sous-estimation. En fait il est probable que dans la quasi totalité des cas de CBPC il existe une P-53 mutée (26).

De façon intéressante dans les 5 cas où la mutation ponctuelle a été caractérisée il s'agit d'une mutation par transversion de base (50, 51, 55). La transversion paraît être un type de mutation associée à la mutagenèse chimique (56) à l'inverse de la mutation par transition qui est plutôt associée aux mutations spontanées (57). Dans le cas du CBPC les mutations siègent entre les codons 110 à 307, comme dans les autres types tumoraux ou existent des mutations de P-53 (58). Il n'y a, de ce point de vue pas de particularité du CBPC. Deux cas particuliers de mutations dans le CBPC méritent d'être signalés : une fois il s'agit de la caractérisation d'une mutation ponctuelle intronique sur un des allèles associée à une délétion de l'autre allèle. Cette mutation intronique aboutit à la perte d'un site d'épissage de l'ARNm, qui n'est plus traduit (59). Dans une autre étude il s'agit également d'une mutation intronique modifiant le site d'épissage de l'exon 4 (60).

L'ensemble des résultats montre que les anomalies de TP53 sont, a priori, constantes dans le CBPC. Elle sont multiples (double délétion, double mutation ponctuelle, délétion et mutation ponctuelle) mais toutes aboutissent à la disparition d'une P-53 sauvage. Cependant une étude particulière faite sur 9 cas de CBPC survenant chez des personnes exposées au radon ne retrouve pas une telle implication de TP53. En effet 5 cas sur 9 n'ont pas d'expression de la protéine (donc de localisation cytoplasmique témoignant d'une forme mutée) ni de mutations au sein des exons analysés (exons 5 à 9) (55). Ces résultats soit remettent en question l'implication constante de TP53 dans le CBPC soit sont du domaine du biais technique (tous les exons n'ont pas été examinés à la recherche de mutations), soit enfin, et c'est le plus probable, identifient une forme particulière de CBPC : forme épidémiologique particulière liée à l'exposition au radon associée à une épidémiologie moléculaire particulière (absence d'anomalies de TP53).

Les anomalies de TP53 sont retrouvées dans tous les types histologiques de tumeur bronchique et ne sont donc pas caractéristiques du CBPC. Elles

sont cependant alors moins fréquentes, de l'ordre de 50 % des cas étudiés (61). Rappelons que d'une part des souris transgéniques surexprimant un allèle muté de la P-53 introduit dans leur génome ont une très haute incidence de tumeurs bronchiques (adénocarcinomes) (62). Ces tumeurs apparaissent après une longue période de latence suggérant que d'autres événements oncogènes sont nécessaires. D'autre part des souris transgéniques totalement déficiente en gène P-53 développent tôt de nombreuses tumeurs (lymphomes en majorité) mais aucune tumeur pulmonaire (ou extra-pulmonaire de type neuro-endocrine) n'est constatée (63).

CBPC, délétion 3p et TSG putatifs

Caractéristiques de la délétion

Une délétion (del) d'une partie du bras court du chromosome 3 est constante dans les cellules de CBPC. L'étude caryotypique initiale de lignées cellulaires de CBPC et de tumeurs fraîches a retrouvé une del 3p(14-23) dans tous les cas étudiés (64). Cette anomalie, qui ne peut être due au hasard, n'était, en analyse caryotypique, pas retrouvée dans des lignées cellulaires de cancer bronchique d'autre type histologique. Pheng et al (64) ont alors émis l'hypothèse que la del 3p (14-23) était caractéristique du CBPC et qu'il y avait un lien de causalité entre cette délétion et la survenue d'un CBPC. Cette del 3p a été retrouvée depuis dans de nombreuses autres études caryotypiques de CBPC. Au début des études la fréquence de la del 3p avait été diversement appréciée à cause de la difficulté de l'analyse des caryotypes (tumeurs fréquemment aneuploïdes). L'étude de l'activité Aminoacylase 1 (enzyme codée par un gène localisé en 3p21) des lignées de CBPC montrait cependant une diminution fréquente, voir une disparition de cette activité enzymatique dans la plupart des cas (65). Cette situation est analogue à celle de la perte de l'activité estérase D dans le cas de la délétion 13q du rétinoblastome.

Les travaux utilisant la méthodologie des RFLP avec des sondes anonymes de locus du bras court du chromosome 3 ont précisé la situation et définitivement levé la controverse de la del 3p dans le CBPC. Dans tous les cas de CBPC étudiés on constate une perte d'hétérozygotie pour au moins un des RFLP de locus situés dans la région 3p (14-21) (39, 66-72). Dans les cas où l'analyse du tissu non tumoral n'a pas été effectuée on note une fréquence d'homozygotie tumorale pour ces mêmes RFLP

beaucoup plus élevée que celle attendue compte tenu de leur fréquence de distribution dans la population générale. Le nombre et la nature (tumeurs fraîches primitives avant tout traitement) des cas analysés par cette méthode permettent maintenant d'affirmer qu'il existe une délétion constante, précoce dans la tumorigenèse, touchant la région 3p (14-21) dans les CBPC. L'étendue exacte et la localisation fine de cette délétion commencent à être précisés. L'analyse caryotypique montre que le minimum constamment concerné est la région 3p(14-23). La compilation des différentes études par RFLP de cette région localise la plus petite région commune délétée en 3p21. L'étude la plus exhaustive (53 tumeurs analysées 19 RFLP étudiés) rapporte sans ambiguïté que la région distale (télomérique) à 3p21-1 fait partie du « minimum constamment délété » qui peut s'étendre jusqu'à 3p26 (71, 72). Dans une seule étude on retrouve une délétion exclusivement plus proximale que 3p21 (dans un cas sur six tumeurs analysées) (73). La limite « supérieure » (télomérique) de la délétion est variable. Elle ne dépasse pas souvent, en tous cas le locus *THRB/c-ERB-A2* (codant pour un récepteur aux hormones thyroïdiennes et localisé en 3p(22-24), qui après avoir été décrit comme constamment délété l'est en fait tout a fait inconstamment (74, 75). Certaines observations telle celle faite par Ibson (76) qui a décrit un cas de CBPC sans délétion mais avec un simple translocation 3p24 suggèrent que le TSG pourrait se situer à ce niveau. La synthèse des études permet en fait de penser : (i) qu'au sein de la très grande délétion 3p14-23 il pourrait y avoir plusieurs types de délétions impliquant des TSG différents (72, 26). (ii) qu'une délétion touchant la région 3p21-24 serait en tout état de cause la plus commune (Fig. 2).

Mécanismes

Le mécanisme de cette perte d'hétérozygotie 3p(14-21) n'est pas univoque : délétion interstitielle ou délétion terminale. La perte d'hétérozygotie par non disjonction chromosomique, suivie ou non de reduplication, est peu fréquente puisque pour les cas étudiés la perte d'hétérozygotie de locus situés sur le bras long du chromosome 3 est rare. Le point de cassure centromérique de la délétion (3p14) est souvent proche de celui d'un site fragile connu localisé en 3 p 14,2. Dans les cas étudiés le point de cassure de la délétion est plus proximal que celui de ce site fragile. Comme il a été démontré d'une part que la localisation des sites fragiles peut varier selon les tissus et d'autre part que les

fumeurs ont un site fragile 3p14.2 induit par le tabac il est tentant de penser que l'action des carcinogènes de la fumée de tabac facilite grandement la survenue de la délétion 3p14-21 via le site fragile. Un travail récent, mais réalisé alors que les patients ont arrêté de fumer, ne semble cependant pas aller dans ce sens (77). Par ailleurs on a constaté au niveau de l'ADN non tumoral des sujets ayant développé un CBPC une fréquence particulièrement élevée, par rapport aux sujets n'ayant pas développé un CBPC, d'un allèle d'un RFLP situé en 3p14 (66, 78). Parmi les multiples hypothèses reliant l'existence de ce RFLP et le risque de survenue d'un CBPC on peut retenir celle que ce RFLP témoigne d'une aptitude particulière à déléter cette région génique.

Gènes candidats

Les gènes connus pour se situer dans cette région et dont le mécanisme d'action du produit permettrait de suspecter une action de nature TSG (dénommés pour cette raison gènes candidats) sont :

– Le gène *PTP γ*

Une famille d'enzymes a activité tyrosine-phosphatase a été récemment caractérisée (79). Cette famille d'enzymes « protéine-phosphatase » (PTPs) présente un intérêt considérable en termes d'oncologie moléculaire. En effet leur action est de déphosphoryler un résidu tyrosine qui a été préalablement phosphorylé par une tyrosine-kinase. Il existe deux classes de PTPs. L'une correspond à de petites molécules solubles de localisation cytoplasmique, l'autre a des protéines trans-membranaires (RPTPs). On sait l'importance des protéines-tyrosines-kinases dans le contrôle positif de la multiplication cellulaire (revue en 80) ainsi que l'analogie, parfois l'identité, de ces enzymes avec des oncogènes. Il a même été proposé que tout gène dont le produit possédait une telle activité était potentiellement un oncogène (81). La découverte d'une famille d'enzyme dont l'action est exactement opposée à donc ouvert théoriquement le champ d'une nouvelle classe d'anti-oncogènes. C'est justement un gène, *PTP γ* , codant pour une de ces enzymes (de la classe des RPTPs) qui vient d'être localisé en 3p21(82). Si approximativement la moitié des tumeurs pulmonaires examinées ont une délétion d'un des allèles de *PTP γ* , aucune tumeur de type CBPC n'a pour l'instant été examinée. Une seule lignée de CBPC a été étudiée (lignée H69) ; elle possède une délétion de *PTP γ* . Des études complémentaires sont donc nécessaires avant de pouvoir affirmer que *PTP γ* est un des TSG du CBPC.

- Le gène RAR β

Isolé initialement à partir d'un hépatocarcinome et dénommé HAP (pour hepatoma) (83), il s'agit d'un deuxième récepteur à l'acide rétinoïque (84). En conséquence il a été rebaptisé récepteur β à l'acide rétinoïque (RAR β). Sa structure est celle des membres de la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires avec quatre domaines conservés : A, B, C (domaine de liaison à l'ADN), D, E (domaine de liaison à l'acide rétinoïque). Il code pour un protéine de 448 acides aminés de poids moléculaire prédit de 51 kd. L'action du RAR β est essentiellement celle d'un régulateur transcriptionnel. Après fixation de l'acide rétinoïque il est capable de se fixer à certaines séquence d'ADN. C'est cette fixation qui régule la transcription des gènes adjacents au site de fixation.

Le RAR β est exprimé dans les cellules du tissu épithélial pulmonaire. Le RAR β sous l'angle de la carcinogenèse serait plutôt considéré comme un proto-oncogène potentiel par analogie avec l'oncogène *erbA* dont il est très proche. Mais la diversité tant des mécanismes qu'il est susceptible de réguler, que de sa propre régulation de modificateur transcriptionnel (85) ne permettent pas d'écarter un rôle d'anti-oncogène. De fait c'est, une telle hypothèse qui commence à être envisagée (33), et ce d'autant plus que maintenant *erbA* est également considéré comme un anti-oncogène (33). Très récemment on a mis en évidence l'existence de messagers de taille anormale ou bien en quantité réduite par rapport au tissu pulmonaire sain dans des lignées et des tumeurs fraîches de CBPC (86). D'autre part des anomalies structurales majeures du gène ont été caractérisées en Southern Blot dans trois lignées de CBPC examinées (sur un total de 33). Dans ces conditions il est possible que le RAR β soit un des anti-oncogènes situé sur le bras court du chromosome 3. Un argument supplémentaire provient des études de transfection avec un gène RAR β normal de lignées de carcinome épidermoïde ayant une *del3p* impliquant le RAR β . On sait que ce type d'expérience, quand on peut observer une reversion du phénotype transformé, est le test « fonctionnel » permettant de définir un anti-oncogène. C'est effectivement ce que l'on observe tant en culture, que dans un modèle de xénotransplantation en souris athymique (87). Le RAR β serait alors le TSG commun au carcinomes épidermoïdes et au CBPC. Enfin il faut rappeler les effets, médiés par le RAR β , des dérivés de la vitamine A tant prophylactiques (prévention des seconds cancers pulmonaire chez les patients ayant eu un carcinome des VADS), que,

associés à l'interféron, thérapeutiques de carcinomes épidermoïdes. Même si le lien éventuel avec une action TSG du RAR β n'est absolument pas faite et que les dérivés de la Vitamine A ont, dans ces indications, de telles actions par d'autres voies, le fait mérite d'être signalé (88a).

Région 3p21 distale, gène « D8 » homologue d'une enzyme du système ubiquitine

Très récemment une région de 2 mégabases située en 3p21 distal (3p21-22), porteuse d'une gène suppresseur de tumeur vient d'être isolée par technique d'hybride somatique interspécifiques (la technique consiste à transférer des cellules malignes avec une portion du chromosome trois sélectionnée par hybrides somatiques, à les injecter à des souris athymiques, puis à observer une diminution de la tumorigénicité). Cette région du chromosome 3p porteuse de cette activité TSG est située en 3p21-22 (88b). Cette région dont la transfection dans des cellules transformées est capable de réverser le phénotype transformé, ne contient pas, en tous cas, le RAR β . La présence du gène PTP γ n'a pas été testée. Il se trouve que c'est justement dans cette région 3p21 distale qu'une équipe vient de cloner un gène dont l'expression est quasi absente de la lignée de CBPC H69 (Buys CH : données non publiées). La séquence de ce gène appelé pour l'instant « D8 » révèle une très grande homologie de séquence avec un gène codant pour une enzyme du système ubiquitine. L'ubiquitine est impliquée probablement dans les phénomènes de réparation de l'ADN, du contrôle du cycle cellulaire, et de condensation/décondensation de l'ADN.

Signification diagnostique

La sensibilité diagnostique de la del 3p dans le cas du CBPC est de 100 % : aucune tumeur bronchique de type CBPC n'en est dépourvue. Sa spécificité est de l'ordre de 50 à 80 %. En effet de 20 % à 50 % de tumeurs broncho-pulmonaires d'autre type histologique ont également une perte d'hétérozygotie de la région 3p (14-21) (89), ce qui peut être un argument en faveur de l'origine cellulaire commune des cancers bronchiques. A l'inverse, des tumeurs de type histologique anaplasique à petites cellules ayant des caractéristiques neuro-endocrine, mais d'origine extra-pulmonaire, n'ont pas la del 3p (14-21) (90, 67, Tableau II). Ceci pose la question de la nature du lien spécifique entre cette délétion, les carcinogènes aériens, et la capacité des cellules

bronchiques à faire cette délétion (structure chromatinienne de la région et rôle des gènes de cette région dans la physiologie du tissu pulmonaire).

Physiopathologie

Le mécanisme par lequel la del3p (14-21) participe à la tumorigenèse reste pour l'instant hypothétique. On a vu qu'elle pourrait démasquer l'existence d'un allèle muté (récessif) sur le locus restant selon le modèle classique des anti-oncogènes. Cependant d'autres mécanismes comme l'activation ou l'inactivation, par le changement d'environnement régulateur (effet de position), d'un gène adjacent à la délétion sont également possibles. La variabilité importante de la taille de la délétion invite plutôt à penser que le ou les gènes en cause sont dans la région délétée donc à privilégier l'hypothèse « anti-oncogène ». Les événements se succéderaient alors selon la séquence proposée par Knudson : une mutation inactivatrice (somatique acquise ou éventuellement transmise héréditairement) serait présente sur l'un des allèles de l'anti-oncogène. L'action de carcinogènes provoquerait (avec ou sans susceptibilité transmise) la délétion de l'allèle non muté fonctionnel aboutissant à la disparition complète du produit du gène dans la cellule. En l'absence de sa caractérisation, de son clonage et de son séquençage la fonction (régulation du cycle cellulaire, rôle dans la stabilité chromosomique, rôle dans la différenciation) de cet anti-oncogène restent putatives. Si un tel anti-oncogène était finalement caractérisé on pourrait espérer inverser le phénotype transformé *in vitro* en réintroduisant dans la cellule soit sa séquence codante soit son produit protéique lui-même. D'autre part la détection de sujets, s'ils existent, ayant un allèle muté constitutionnellement permettrait la caractérisation de sujets à haut risque de développer un CBPC.

Remarques concernant les TSG et le CBPC

Il apparaît donc que la perte d'au moins trois anti-oncogènes soit un événement précoce et constant dans la tumorigenèse du CBPC. Le ou les anti-oncogènes putatifs situés en 3p seraient en cause dans tous les cas. L'inactivation de RB1 et TP53 est également quasi constante. Si un tel tableau d'inactivation de TSG peut sembler impressionnant, il n'est pas exclusif au CBPC. Dans plusieurs autres tumeurs (sein, colon par exemple) la perte simultanée de plusieurs TSG (soit prouvés tels les

TSG : MCC et DCC dans le colon, soit suspectés sur des pertes récurrentes d'hétérozygotie) a été constatée. Le cas du CBPC illustre bien en fait une oncogenèse par paliers durant laquelle il y a tout au long du processus une sélection continue des cellules ayant subi des événements géniques tels la perte de TSG. Cependant le CBPC se distingue de ce point de vue de tous les autres types histologiques de cancer bronchique d'une part mais aussi des tumeurs de type petite cellules non bronchiques (Tableau II). Cette situation doit être envisagée sous deux angles :

Nature des événements entraînant de telles mutations de TSG

Si en épidémiologie classique le tabac est le facteur principal il semble bien que l'épidémiologie moléculaire apporte des arguments supplémentaires, tant pour la nature induite par le tabac, que pour la précocité de l'altération des TSG. On a pu récemment noter que les zones de dysplasie bronchique proche de la tumeur chez des fumeurs ayant un cancer bronchique possèdent des altérations du locus 3p dans tous les cas étudiés (6/6) et des mutations du gène TP53 (5/6 cas), les dysplasies bronchiques de fumeurs n'ayant pas de cancer bronchique ont des altérations de 3p systématiques (3/3) et de P-53 deux fois sur trois (91a). De plus les anomalies de 3p semblent clonales entre dysplasie et cancer. Il existe un lien spécifique entre ces altérations, le tabac et l'épithélium bronchique cible : dans les cancers de la vessie ou le tabac est un carcinogène reconnu on retrouve, d'un point de vue mutationnel, d'une part des altération des gènes ras qu'on ne retrouve quasi jamais dans le CBPC d'autre part beaucoup moins souvent des altérations de TP53 et RB1. De plus les tumeurs à petites cellules non bronchiques (pour lesquelles le tabac n'est pas connu comme un facteur de risque) n'ont pas la del 3p. Autrement dit l'implication de tel ou tel TSG ne serait pas due au hasard et serait liée à la physiologie du tissu et de la cellule cible. Un argument dans ce sens serait d'observer une corrélation entre la del 3p, des anomalies de TP53 et/ ou RB1 et la présence d'éléments de différenciation neuro-endocrines (NSE, granules neuro-sécrétoires, expression de leu 7...) pour les autres types de cancer bronchique (épidermoïdes, grandes cellules). Si certaines observations permettent de suspecter une telle relation, aucun travail systématique ne permet à ce jour de conclure sur ce point. Au niveau des gènes eux-mêmes à une multiplicité de carcinogènes contenus dans le tabac pourrait correspondre un multiplicité de cibles (spectre de mutation dans les gènes). A cet égard le tableau des mutations dans le CBPC est

intéressant. L'épidémiologie moléculaire montre qu'un carcinogène donné entraîne semble-t-il des mutations précises et assez reproductibles. Ainsi l'aflatoxine entraîne assez spécifiquement des mutations du codon 249 de TP53. Si l'hypothèse de spécificité mutationnelle d'un carcinogène est valide il faut admettre que la multiplicité des anomalies constatées au niveau des TSG dans le CBPC correspond à une multiplicité de carcinogènes. De fait l'ouverture de l'arbre respiratoire sur le milieu extérieur permet une exposition non sélective à de multiples carcinogènes aériens, d'autre part cette hypothèse cadre parfaitement avec la multiplicité des carcinogènes de la fumée du tabac.

Conséquences de telles mutations

Aucune tumeur solide de l'adulte autre que le CBPC ne présente simultanément, et de façon constante, une inactivation de TP53, de RB1, et la del 3p. Si l'on a envisagé comment le CBPC pouvait présenter un tel tableau ses conséquences ne sont pas évaluables. Il n'est pas impossible cependant que la perte d'activité de trois anti-oncogènes ne soit un facteur intervenant dans le très mauvais pronostic, la très haute agressivité clinique (temps de doublement clinique court et un potentiel métastatique élevé) de cette tumeur. De fait dans plusieurs types de tumeurs des anomalies de tel ou tel TSG possèdent une valeur pronostique. Par exemple les sarcomes et les cancers de vessie dont la fonction RB est altérée ont un bien moins bon pronostic que les autres (91b, 91c). Les tumeurs du col utérin à P-53 mutée semblent particulièrement agressives (91d).

Ainsi le tableau si particulier de perte de TSG dans le CBPC s'expliquerait par la nature de la cellule transformée (cellule située dans la muqueuse bronchique et engagée dans une voie de différenciation neuro-endocrine) et pourrait être responsable en partie du comportement biologique particulier de cette tumeur.

Oncogènes et CBPC

L'analyse cytogénétique de lignées de CBPC a montré, l'existence de structures caractéristiques d'amplification génique : chromosomes double minutes (DM) et régions HSR (Homogenous staining régions). On s'est demandé si ces amplifications géniques ne concernaient pas des proto-oncogènes. Effectivement certains proto-oncogènes

(principalement des membres de la famille Myc) sont amplifiés et hyperexprimés dans des lignées ou des tumeurs fraîches de CBPC. Parfois ces proto-oncogènes sont surexprimés sans être amplifiés. Les études sont hétérogènes, (matériel étudié : lignées dérivées de tumeurs primaires ou métastatiques, tumeurs fraîches primaires ou métastatiques, réalisation d'une chimiothérapie : avant l'établissement de la lignée ou l'analyse du tissu tumoral, méthodologie pour mettre en évidence l'amplification (southern blot, dot blot), critères de l'amplification : contrôles de duplications chromosomiques, contrôle de la ploïdie, contrôle de la localisation dans les régions HSR par hybridation in situ). Le nombre de cas analysés reste pour l'instant assez faible. L'hétérogénéité méthodologique des études rend difficile une interprétation globale de leurs résultats. Le moment et le rôle exact de l'amplification et de l'activation de tel ou tel proto-oncogène dans l'initiation ou l'évolution de la tumeur sont impossibles à affirmer. Il est également délicat d'affirmer, pour l'instant, que l'amplification de tel ou tel proto-oncogène possède une valeur pronostique.

Famille MYC

De nombreuses anomalies concernant des membres (c-myc, N-myc, L-myc) de la famille Myc ont été décrites dans les CBPC. Quand un membre de la famille Myc est amplifié ou sur-exprimé dans une cellule de CBPC les autres ne le sont pas. La signification de ce fait reste encore incomprise. Elle pourrait faire intervenir une régulation croisée de l'expression des membres de la famille Myc.

C-myc

Localisé en 8q24 c-myc est le premier membre de la famille Myc à avoir été retrouvé amplifié dans des lignées de CBPC (92).

– Amplification

Le niveau de l'amplification dans les lignées varie de 4 à 80 et environ 40 % des lignées possèdent une amplification de c-myc. L'étude de tumeurs fraîches primitives et métastatiques (93-95) retrouve une fréquence d'amplification moindre (entre 10 et 20 %). Les données des études ne permettent pas de distinguer clairement le facteur expliquant cette différence : sélection par la mise en culture ou par la

chimiothérapie. Lorsque c-myc est amplifié dans les métastases il est également retrouvé amplifié, grossièrement au même niveau, dans la tumeur primitive suggérant que l'amplification de c-myc n'est pas un événement tardif dans la progression tumorale. L'assez faible proportion de tumeurs primitives possédant une amplification de c-myc autorise également à penser que l'amplification de c-myc n'est pas un événement indispensable à la transformation. Dans les lignées de CBPC quand c-myc est amplifié il est sur-exprimé mais des cas de surexpression sans amplification ont été notés. L'activation de c-myc peut donc survenir, dans le CBPC, par d'autres mécanismes que l'amplification.

– *Valeur pronostique de l'amplification de c-myc*

L'amplification préférentielle de c-myc dans les lignées variantes qui ont des caractéristiques phénotypiques de plus grande agressivité (haute capacité clonogène, diminution des besoins en facteurs de croissance, temps de doublement plus court, croissance chez les souris athymiques) et l'acquisition d'un phénotype agressif des lignées classiques après transfection et expression d'un gène c-myc (16) soulève la question de la valeur pronostique, dans les tumeurs fraîches, de l'amplification de c-myc. Les résultats sont peu probants. Un travail (96) montre que l'amplification de c-myc dans les lignées établies à partir du matériel tumoral des patients en rechute possède une valeur pronostique. Dans ce groupe de patients la possibilité d'établir une lignée est associée à une survie plus courte, survie encore plus courte si c-myc est amplifié dans la lignée. Pour l'instant il est impossible d'assigner à l'amplification de c-myc une valeur pronostique certaine. Cependant les travaux réalisés in vitro suggèrent très fortement que la surexpression de c-myc confère un phénotype particulièrement agressif aux cellules de CBPC. Ce phénomène n'est pas restreint au CBPC puisque des tumeurs bronchiques d'autre type histologique possédant une amplification de c-myc sont aussi plus facilement transplantables chez les souris athymiques (97).

N-myc

Caractérisé à partir d'un neuroblastome son activation de proto-oncogène en oncogène ne semble liée qu'à son amplification et sa surexpression. Physiologiquement N-myc n'est exprimé que dans certains tissus embryonnaires notamment le tissu nerveux. Dans les neuroblastomes son amplification, corrélée au stade de la tumeur, possède une forte valeur pronostique.

– Amplification

N-myc a été retrouvé amplifié (niveau de 5 à 150) dans certaines lignées de CBPC (variantes et classiques) et dans des tumeurs fraîches primitives et métastatiques (93, 94, 96, 98, 99). Dans ce cas la fréquence de l'amplification de N-myc n'est que de 10 à 25 %. L'amplification de N-myc dans le CBPC est un des arguments en faveur de l'origine neurale de ces tumeurs. Quand N-myc est amplifié dans la tumeur primitive il est retrouvé amplifié dans les métastases, et inversement si il n'est pas amplifié dans les métastases il n'est pas amplifié dans la tumeur primitive. Il semble donc que l'amplification de N-myc soit un événement assez précoce dans l'histoire de la tumeur. En étudiant des tumeurs fraîches on ne note pas d'amplification de N-myc après chimiothérapie alors qu'en étudiant des lignées dérivées il semble que N-myc soit plus souvent retrouvé amplifié lorsque les lignées sont établies après chimiothérapie. Il est possible cependant que les cultures ne sélectionnent que les clones ayant une amplification de N-myc. L'amplification de N-myc dans les lignées est stable mais on peut penser que la culture maintient une pression de sélection (dont la nature n'est pas connue) vis à vis de l'amplification de N-myc. A cet égard l'observation exceptionnelle de Noguchi, d'une amplification de N-myc dans une métastase de rechute, après chimiothérapie, alors que la tumeur initiale n'avait pas d'amplification mais que la rechute au site tumoral initial possédait l'amplification, même si elle ne permet pas de faire la différence entre amplification secondaire à la progression tumorale et amplification secondaire à la chimiothérapie, est très intéressante (94).

– Expression

L'amplification de N-myc s'accompagne toujours d'une augmentation de sa transcription. Dans un cas étudié l'ARNm de N-myc est retrouvé en abondance alors que le gène n'est pas amplifié (99). Deux études en hybridation in situ confirment la valeur des constatations faites en Northern blot et l'absence de co-expression dans une même cellule de CBPC de c, L, et N-myc (100, 101). Une de ces études corrèle, sur un petit nombre de cas, l'expression de N-myc, la chimio-résistance et le pronostic péjoratif (100).

L-myc

Ce troisième membre de la famille Myc a été identifié grâce à son homologie de séquence avec c-myc et N-myc dans une lignée de CBPC (L

pour Lung) (102). Il est localisé chez l'homme en 1p32. A la différence de c-myc, mais comme N-myc, L-myc n'est pas exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus adultes. Son expression est restreinte à certains tissus embryonnaires (cerveau, glandes surrénales, et poumon), et au tissu pulmonaire adulte.

– *Amplification*

L'étude des lignées de CBPC montre qu'il est amplifié dans 30 % des cas d'un niveau de 10 à 20 fois. Il est également amplifié dans les tumeurs fraîches mais avec une fréquence moindre : 5 à 10 %, plus fréquemment cependant lorsque les tumeurs proviennent de patients en rechute. L'amplification s'accompagne toujours d'une surexpression mais L-myc peut être sur-exprimé sans être amplifié. L'amplification de L-myc dans une lignée de CBPC augmente sa xénotransplantabilité (97).

– *Lien avec les capacités métastatiques*

L'APC, à la différence des autres carcinomes bronchiques, est une tumeur quasi-constamment métastatique. L-myc possède un RFLP EcoR1 bi-allélique générant des bandes de 6,6 (S) et 10 (L) Kb. Les deux allèles peuvent être indifféremment amplifiés. Il existe une corrélation, pour l'ensemble des cancers bronchiques, entre la possession (au niveau somatique) d'un allèle S et la présence de métastases (103). Cinq cas de CBPC seulement ont été analysés mais aucun des patients n'avait le génotype LL. Le mécanisme de cette relation n'est pas connu (responsabilité directe d'un des allèles de L-myc, liaison avec un gène proche?).

D'autre part dans certaines tumeurs le défaut d'expression des antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) a été relié aux capacités métastatiques (104). La non expression des molécules HLA de classe I, nécessaires à l'activité immune des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et peut être NK, faciliterait ainsi la dissémination métastatique. Les lignées de CBPC expriment très peu de molécules de classe I (105). Dans les neuroblastomes l'amplification de N-myc est corrélée à la diminution de la transcription des gènes de classe I du CMH, comme le montrent les expériences de transfection de cellules de neuroblastomes de rat par N-myc (106). Dans le cas du mélanome malin la transfection de cellules par c-myc entraîne une diminution de l'expression des molécules de classe I du CMH (107). Aucun travail sur ce sujet n' a été réalisé dans le CBPC mais l'extraordinaire potentiel métastatique de cette tumeur pourrait être

dû pour partie, au défaut d'expression d'antigènes de classe I. Celui-ci pourrait relever à la fois d'une délétion des gènes codant pour les Interférons (dont certains sont localisés sur le chromosome 9 en une région assez souvent délétée dans le CBPC) et à la fois à une hyper-expression d'un des membre de la famille Myc.

Liens entre l'augmentation de l'expression des membres de la famille Myc et les pertes d'anti-oncogènes

Dans le CBPC ils sont obscurs. En ce qui concerne N-myc on sait que dans tous les rétinoblastomes il existe une augmentation de l'expression de N-myc et que dans les neuroblastomes, où la perte d'activité d'un anti-oncogène probable situé sur le bras court du chromosome (1p(36,1-36,3)) est fréquente, N-myc est souvent amplifié. Dans le rétinoblastome on a fait l'hypothèse que RB1 participait au contrôle de l'expression de N-myc mais en fait l'inactivation de RB1 et l'augmentation d'expression de N-myc semblent indépendantes (108). Par contre dans le cas du neuroblastome où certaines tumeurs seulement ont une amplification de N-myc (situation proche du CBPC) la perte d'hétérozygotie 1p paraît être liée à l'amplification de N-myc (109). Pour c-myc on a noté que dans le cancer du sein, où une délétion tumorale 3p existe dans 30 % des cas, l'amplification de c-myc est beaucoup plus fréquente en cas de délétion 3p qu'en son absence (110).

L'interprétation à donner aux anomalies de c, N, et L-myc retrouvées dans les lignées et les tumeurs fraîches de CBPC n'est pas claire. Globalement une anomalie (amplification, surexpression, réarrangement) d'un de ces trois proto-oncogènes est retrouvée dans 25 à 50 % des lignées et 10 à 20 % des tumeurs fraîches. On peut considérer qu'une amplification est plus fréquemment retrouvée après chimiothérapie (et est peut être d'ailleurs dépendante du type de chimiothérapie(26,95)). Ces anomalies décrites dans le CBPC sont retrouvées, avec des fréquences moindres cependant, dans les autres types de cancers bronchiques. Il n'y a donc pas de spécificité totale de ces anomalies pour le CBPC. L'amplification ou la surexpression d'un gène de la famille Myc bien que relativement précoce, n'est pas un événement capital dans la tumorigenèse du CBPC mais elle peut contribuer à la progression tumorale, conférer un avantage sélectif, et participer à un comportement plus agressif comme le montrent(*i*)les résultats de transfection des lignées classiques,*(ii)*la valeur pronostique

de l'amplification retrouvée par certains (94, 96), (iii) la sélection probable par la chimiothérapie, constatée lors des rechutes, de clones possédant ces anomalies. La relation entre la capacité d'établir une lignée à partir d'un prélèvement, la valeur pronostique d'un tel établissement de lignée et la présence d'une amplification d'un membre de la famille Myc n'a pas été étudiée spécifiquement. L'étude de Johnson (96) laisse penser qu'il existe une relation entre les deux et que la valeur pronostique attribuée tantôt à l'un ou à l'autre, ne relève en fait que d'un mécanisme unique. Un exemple des limites de l'interprétation à donner de ces anomalies est illustrée par le suivi longitudinal de prélèvements d'un même patient. Les cellules d'un ganglion métastatique possédaient une amplification de N-myc avant tout traitement. Lors d'une rechute, après la rémission complète, la biopsie de la tumeur primitive montrait une amplification de c-myc (111).

Autres proto-oncogènes (raf, myb)

L'activation d'autres proto-oncogènes a été notée, occasionnellement dans des lignées de CBPC. Une surexpression de l'oncogène nucléaire Myb a été constatée (112a).

De par sa localisation en 3p25 située parfois en bordure de la délétion 3p ou inclus dedans en cas de délétion terminale une dérégulation de l'expression de l'oncogène c-raf1 est possible. Le produit de c-raf1 est une sérine thréonine kinase activée lors de l'action de nombreux facteurs de croissance. Le substrat de c-raf1, impliqué dans le signal mitogénique, vient d'être identifié : il s'agit d'une MAP (mitogen activated protein) kinase kinase (112b). Une expression plus élevée de ce proto-oncogène dans les lignées variantes et classiques de CBPC a été constatée par rapport aux cellules épithéliales bronchiques normales (70). La transfection simultanée par c-myc et c-raf1 de lignées bronchiques épithéliales normales, immortalisée par T de SV40, leur fait acquérir la morphologie du type « grandes cellules » et leur permet de devenir tumorigènes chez la souris athymique (29).

Facteurs de croissance et leurs récepteurs

Les lignées de CBPC produisent et sécrètent de très nombreux peptides. Il en est probablement de même *in vivo* ou plusieurs peptides sécrétés sont responsables de syndromes paranéoplasiques. Certains de ces peptides ainsi produits sont des facteurs de croissance (FCX). Pour plusieurs des peptides sécrétés par les cellules de CBPC, les cellules sécrétrices possèdent elles mêmes des récepteurs spécifiques au facteur qu'elles produisent. L'interaction du FCX avec son récepteur induit une réponse cellulaire, le plus souvent proliférative (notion d'autocrinie). Parmi la douzaine (au moins) de peptides sécrétés par les cellules de CBPC, deux ont un mode d'action autocrin démontré. Ils font l'objet d'investigations thérapeutiques. Il s'agit du GRP et de l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1). Il existe de nombreux autres facteurs de croissance, jusqu'ici non caractérisés, fonctionnant de façon autocrine ou paracrine dans le CBPC. En effet le milieu de culture de lignées de CBPC dont on a neutralisé l'IGF1 et le GRP reste mitogène vis à vis des mêmes lignées (ou bien d'autres) de CBPC cultivées sans sérum.

Le GRP est un peptide de 27 acides aminés. Il n'est pas produit par les cellules épithéliales bronchiques (sauf par quelques cellules neuroendocrines). Sa production dans le CBPC peut donc être considérée comme ectopique. Le GRP est produit *in vitro* par des lignées de CBPC qui, de plus, expriment à leur surface des récepteurs de haute affinité pour le GRP (113, 114). L'analyse de sa transcription dans les tumeurs montre que le gène codant pour le pro-GRP est transcrit dans toutes les tumeurs examinées. Cependant au sein d'une tumeur toutes les cellules ne transcrivent pas le gène (possibilité de paracrinie intra-tumorale) (115). le GRP est mitogène pour les cellules épithéliales bronchiques normales, mais aussi pour les cellules de CBPC dont il stimule la croissance (116, 117). Cette stimulation de croissance est inhibée en culture *in vitro*, mais aussi dans un modèle de xénogreffe murin, de façon dose-dépendante par un anticorps anti-GRP. Le récepteur de haute affinité du GRP (Rc GRP), dont le clonage vient d'être réalisé, semble être un transducteur de signal utilisant la voie de transduction indirecte (couplage du récepteur à une protéine G, activation de la phospholipase C puis de protéines kinases aboutissant à la mobilisation du calcium intracellulaire). Le système autocrin GRP/Rc GRP dans le CBPC est donc bien défini. De plus des taux élevés de GRP

ont été retrouvés dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire de sujets fumeurs indemnes de cancer (118), et l'on a pu mettre en évidence des taux sériques élevés de GRP circulant chez des patients atteints de CBPC. le GRP sérique (très peu stable et donc de dosage délicat) pourrait peut être servir de marqueur tumoral (119).

Compte tenu de toutes ces données le GRP a été, en ce qui concerne le CBPC, le premier facteur de croissance sur lequel des tentatives thérapeutiques ont été développées. Plusieurs approches sont testées : anticorps anti-GRP dont le site de reconnaissance est dirigé contre la partie carboxyterminale (ce qui masque la partie bioactive permettant la fixation au Rc GRP (120, 121), analogues peptidiques bloquant le Rc GRP sans entraîner l'activation du récepteur (antagonistes). *In vitro* de tels peptides inhibent de façon dose-dépendante la croissance de cellules de CBPC (122, 123).

L'IGF1 (et probablement l'IGF2 (124)) est également un FCX important du CBPC. A la différence du GRP, l'IGF1 est normalement produit par les cellules épithéliales bronchiques. les lignées de CBPC tant de type classique que variantes produisent de l'IGF1 (125-127). Il semble bien que cette production soit anormalement élevée puisque les taux intratumoraux d'IGF1 sont plus élevés que dans le tissu sain(128). Les cellules de CBPC expriment des Rc à l'IGF1 dont la régulation négative habituelle est probablement altérée. La croissance *in vitro* de lignées de CBPC est augmentée par l'IGF1 ; ce phénomène est inhibé de façon dose-dépendante par des anticorps anti-IGF1 (127). Toutes les données expérimentales concordent donc pour penser que l'IG1 est un facteur de croissance autocrine du CBPC. Au niveau thérapeutique on ne possède pour l'instant qu'une façon de jouer sur l'IGF1 : les analogues de la somatostatine. La somatostatine est un peptide hypothalamique qui contrôle négativement, de façon physiologique, la sécrétion de GH hypophysaire et donc la production endocrine de l'IGF1 hépatique. L'administration de somatostatine, ou d'analogues, permet d'abaisser l'IGF1 endocrine. De plus la somatostatine, où ses analogues, possède par elle-même un effet cytostatique sur les cellules de CBPC qui possèdent des récepteurs pour cette hormone (129, 130). En fait, concernant la somatostatine et l'IGF1 les données expérimentales sont encore peu claires : par exemple plusieurs lignes de CBPC produisant de l'IGF1 cultivées en présence de somatostatine n'ont pas de diminution de leur index mitotique, alors qu'en modèle de xélogreffe murin la

somatostatine entraîne indiscutablement une diminution de croissance des tumeurs greffée, particulièrement quand elle est administrée en péri-tumoral (131). Quelques essais préliminaires ont eu lieu chez l'homme. Il est encore trop tôt pour conclure.

De nombreux autres facteurs de croissance (le plus souvent des neuropeptides), mais à la différence de l'IGF1 et du GRP non produits par les cellules de CBCPC, peuvent stimuler la croissance du CBPC : la bradykinine, la neurotensine, la cholecystokinine, la vasopressine par exemple (132). A l'inverse, des substances produites par les cellules de CBPC (ACTH, calcitonine, substance P) n'ont pas d'effet stimulateur de croissance. Il a été également mis en évidence dans plusieurs lignées de cellules de CBPC des récepteurs aux androgènes (testostérone notamment) ainsi qu'une activité 5α réductase permettant la production de dihydrotestostérone. Une action mitogène de la testostérone, antagonisée par le flutamide, a été observée vis-à-vis de ces lignées (133). Cette observation pourrait expliquer la survie plus courte des patients de sexe masculin. Enfin des récepteurs aux opioïdes (type μ , δ et κ) et à la nicotine ont été mis en évidence à la surface des cellules de CBPC qui produisent d'ailleurs plusieurs peptides opioïdes (β endorphine, dynorphine). Ces peptides opioïdes ont un effet inhibiteur de croissance des lignées (boucle autocrine négative). De façon tout à fait intéressante, et perverse, cet effet inhibiteur de croissance disparaît si de la nicotine est adjointe et ce à des doses équivalentes à celles des taux sériques observés chez les fumeurs (134).

Le dernier point à mentionner concernant les FCX et le CBPC est celui des récepteurs de facteurs de croissance hématopoïétiques. Plusieurs lignées de CBPC expriment des récepteurs au GM-CSF et au G-CSF (135, 136). Jamais il n'a été montré que les lignées de CBPC produisaient de tels facteurs. Le CBPC étant très chimio sensible et l'effet dose y ayant été bien documenté une des tendances actuelles est à l'intensification des traitements. Dans ce contexte l'usage de facteurs de croissance hématopoïétique, qui permet d'éviter les retards thérapeutiques dus à une mauvaise reconstitution hématologique, est très intéressant. Cet usage permet de garder une intensité relative de dose élevée. Se pose alors la question d'une éventuelle stimulation de croissance des cellules par les facteurs utilisés et du rapport bénéfique de l'intensification/effet stimulant de croissance potentiel. En fait le problème est plus théorique que pratique : en ce qui concerne le GM-CSF il a par exemple été montré

que celui-ci *in vitro* pouvait même être inhibiteur de croissance (137), en ce qui concerne le G-CSF plusieurs essais chez l'homme n'ont montré aucune différence en termes de survie entre les patients en recevant par rapport à ceux n'en recevant pas (138).

Remarques concernant les FCX et le CBPC

De façon générale l'approche thérapeutique consistant à jouer sur des boucles autocrines et paracrines de facteurs de croissance se heurte dans le CBPC à deux écueils :

Le premier est qu'il existe un grand nombre de facteurs de croissance différents impliqués. Interrompre une boucle n'a donc qu'un effet relativement modeste, le problème se compliquant encore puisqu'il semble bien que l'action d'un FCX puisse entraîner, en sus de son effet mitogène propre, la synthèse et le relargage d'autres FCX (139). Une solution pourrait être d'utiliser une substance agissant sur une voie commune d'action de plusieurs FCX, où sur plusieurs types de récepteurs. Un analogue de la substance P ($1'Arg^6, DTRP^{79}MePhe^8$) est effectivement capable de bloquer l'effet mitogène induit par plusieurs FCX différents (140).

Le deuxième écueil est qu'une intervention thérapeutique sur un ou plusieurs FCX ne peut espérer qu'avoir un effet cytostatique et en aucun cas cytolytique. Ce type de traitement ne peut donc s'adresser qu'à des situations soit de prévention, soit où la masse tumorale est très faible (thérapie adjuvante).

Si l'on essaie de résumer le rôle des FCX et de leurs récepteurs dans la genèse et la maintient de la transformation de la cellule de CBPC on peut considérer de façon simpliste que le tabac (ou tout autre état inflammatoire ou d'agression du parenchyme broncho-pulmonaire) induit une hypersécrétion de différents FCX (118, 141). Ceux-ci entraînent à la fois une expansion polyclonale des cellules de l'épithélium bronchique, qui favorise statistiquement par le nombre accru de cellules « cibles » et par l'activité mitotique la probabilité de mutations, et à la fois une pérennisation de l'agression créant un cercle vicieux (142). Une fois différents événements géniques, immortalisants puis transformants, accumulés au niveau d'un clone cellulaire les cellules conservent (et sont peut être sélectionnées de cette manière) un fonctionnement autocrin et paracrine vis a vis de certains FCX dont elles tirent avantage pour leur croissance. Si, à ce jour, aucun rôle

transformant *per se* d'un FCX n'a été documenté dans le CBPC il semble néanmoins théoriquement possible que l'IGF1 puisse participer directement à la transformation(143).

Chimiorésistance

Le CBPC est une tumeur initialement chimiosensible qui devient assez rapidement chimiorésistante. En dépit de sa chimiosensibilité initiale elle n'est actuellement pas chimio-curable. Les investigations concernant les phénomènes de chimiorésistance dans le CBPC sont assez décevantes. Initialement il avait été considéré que l'hyperexpression du gène MDR1 (gène la glycoprotéine transmembranaire gpP170 responsable de l'extrusion cellulaire accélérée des drogues cytotoxiques) n'était pas responsable de la chimiorésistance dans le CBPC. une hyperexpression n'était pas trouvé, il n'y avait pas de relation entre l'expression de MDR1 et la chimiosensibilité *in vitro* à diverse drogues (dont certaines pGP dépendantes) ni avec la réponse clinique à la chimiothérapie ni enfin avec l'existence préalable de chimiothérapie (144). Une autre étude rétrospective, utilisant une méthodologie différente (PCR) retrouve, elle, une corrélation entre le niveau d'expression de MDR1 et la chimiorésistance. Cependant le seuil d'expression de MDR1 pour lequel on observe une chimiorésistance reste très bas (145). Il est en fait très probable que l'hyperexpression de MDR1 ne soit pas le mécanisme expliquant la chimiorésistance acquise des CBPC. Le fait nouveau est que très récemment, à partir de la lignée de CBPC résistante à l'adriamycine (H69R), une équipe canadienne a isolé un gène qui est 200 fois plus exprimé dans cette lignée que dans la lignée parentale sensible à l'adriamycine. Ce gène(appelé MRP), localisé sur le chromosome 16 bande p13.1, code pour une protéine transmembranaire liant l'ATP (ATP binding cassette). Ce type de protéine est de la même famille que pGP. Il ne semble pas cependant que le produit de MRP agisse en extrudant les drogues cytotoxiques hors de la cellule. Il est amplifié dans la lignée H69. La disparition de son amplification est corrélée avec la réapparition d'une chimiosensibilité à l'adriamycine. A ce jour aucune autre lignée de CBPC n'a été testée. Il est possible que l'amplification de ce gène puisse expliquer la chimiorésistance du CBPC (146).

Proposition de modèle de tumorigénèse du CBPC

Sur les bases biologiques exposées on peut proposer maintenant un modèle de la genèse et de la progression du CBPC (147).

Le tabac, facteur causal principal jouerait un double rôle. En entraînant la sécrétion par l'épithélium bronchique de facteurs de croissance qui fonctionnent de manière autocrine et paracrine et qui sont habituellement impliqués dans le développement normal du poumon le tabac faciliterait la survenue de mutations mitotiques. Sans nécessairement contribuer directement à la transformation cellulaire ce fonctionnement autocrin conférerait également un avantage sélectif aux cellules subissant des événements géniques transformants ou immortalisants. Les agents procarcinogènes et carcinogènes contenus dans la fumée du tabac, dont le niveau de production pourrait être en partie génétiquement déterminé, contribueraient aussi à l'accumulation de mutations portant à la fois sur des anti-oncogènes (RB1, TP53 et au moins un troisième anti-oncogène putatif situé sur le bras court du chromosome 3) et sur des proto-oncogènes (principalement de la famille Myc). Il y a peut être là aussi la possibilité de détecter des sujets à risque de développer un CBPC, le rôle d'une hémizygotie génétiquement transmise d'un de ces anti-oncogènes restant à évaluer. Les proto-oncogènes activés sont principalement ceux de la famille myc. Leur activation pourrait correspondre à l'apparition de clones cellulaires au comportement agressif indépendants de facteurs de croissance, chimiorésistants et plus métastasiants. Le CBPC se distingue des autres tumeurs malignes bronchiques par un tableau assez caractéristique de perte d'anti-oncogènes et d'activation de proto-oncogènes. Les liens avec l'origine et les propriétés neuro-endocrines de cette tumeur et ce tableau caractéristique sont en train d'être précisés et contribueront à une meilleure compréhension des relations entre les différents types de tumeurs bronchiques. De ces connaissances biologiques découlent à la fois des applications thérapeutiques en cours de réalisation (blocage de boucle autocrine par des neuropeptides antagonistes et des anticorps anti-GRP) ou potentielles (portant sur les produits des anti-oncogènes) et des applications possibles de prévention orientée par le dépistage de sujets à haut risque.

Références

1. MORABIA A, WINDER EL. Cigarette smoking and lung cancer cell types. *Cancer* 1991;68:2074-8.
2. LYNCH HT, KIMBERLING WJ, MARKVICKA SE, et al. Genetics and smoking-associated cancers A study of 485 families. *Cancer* 1986;57:1640-6 .
3. SELLERS TA, BAILEY-WILSON JE, ELSTON RC, et al. Evidence for a Mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J Nat Cancer Inst* 1990;15:1272-9.
4. SELLERS TA, ATWOOD LD, ROTSCCHILD H. Lung cancer histologic type and family history of cancer. *Cancer* 1992;69:86-91.
5. CAPORASO NE, TUCKER MA, HOOVER RN, et al. Lung cancer and the debrisoquine metabolic phenotype. *J Nat Cancer Inst* 1990;82:1264-71.
6. HEIM M, MEYER UA. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet* 1990;336:529-32.
7. KOURY R. Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res* 1982;42:5030-7.
8. DRAPER GJ, SANDERS BM, KINGSTON JE. Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 1986;53:661-71.
9. LEONARD RCF, MAC KAY BROWN A, GREGOR A, CROMPTON GK, SMYTH JF. Small-Cell Lung cancer after Retinoblastoma. *Lancet* 1988;i:1503.
10. MESSMER E, RICHTER HJ, OPPING HAVEES W, ALBERTI W. Nicht-okulärer maligner Zweitumor nach spontanheilung eines Retinoblastoms (« Retinom, Retinozytom »). *Klin Mbl Augenheilk* 1987;191:299-303.
11. KLEIN EA, ANZIL AP, MEZZACAMPA P, BORDERON M, HO V. Sinonasal Primitive Neuroectodermal Tumor arising in a Long-term survivor of heritable unilateral reinoblastoma. *Cancer* 1992;70:423-31.
12. TOGUICHIDA J, YAMAGUCHI T, DAYTON SH, et al. Prevalence and spectrum germline mutations of the P53 gene among patients with sarcomas. *N Engl J Med* 1987;326:1301-8.
13. NORES JM , DALAYEUN JF, CHEBAT J, DIEUDONNE P, NENNA A. Carcinome bronchique a petites cellules chez des frères jumeaux. *Presse Med* 1988;17:1214.
14. MOOLGAVKAR SH, DEWANJI A, LUEBECK G. Cigarette smoking and lung cancer: Reanalysis of the British Doctor's Data. *J Nat Cancer Inst* 1990;81:415-21.

15. GAZDAR AF. Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res* 1985;45:2924-30.
16. JOHNSON BE. Changes in the phenotype of human small cell lung cancer cell lines after transfection and expression of the c-myc proto-oncogene. *J Clin Invest* 1986;78:525-32.
17. STEVENSON BC, LINNOILA RI, RUSSEL EK, et al. Lack of relationship between in vitro tumour cell growth and prognosis in extensive-stage small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1989;113:923-31.
18. MASUDA N, MATSUI K, KUSUNOKI Y, et al. Establishment of tumor cell lines as an independent prognostic factor for survival time in patients with small cell lung cancer. *J Natl Can Inst* 1991;83:1743-8.
19. SIDHU G. The endodermal origin of digestive and respiratory tract APUD cells. *Ann J Pathol* 1979;96:5-20.
20. RUFF MR, PERT CB, FARRAR WL. Small-cell carcinoma of the lung: macrophages specific antigens suggest hematopoietic stem cell origin. *Science* 1984;225:1034-6.
21. MICHELS S, SWANSON PE, ROBB JA, WICK MR. Leu-7 in small cell neoplasms an immunohistochemical study with ultrastructural correlations. *Cancer* 1987;60:2958-64.
22. GAZDAR A, BUNN PA, MINNA JD, BAYLIN SB. Origin of human small cell lung cancer. *Science* 1985;229:679-80.
23. MATSUZAKI H, KAWAGUCHI Y, HATA H, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 associated with SCLC. *Cancer* 1990;66:1763-8.
24. BLOBEL GA, HOLL R, LEE I, et al. Coexpression of neuroendocrine markers and epithelial cytoskeletal proteins in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Lab Invest* 1985; 52:39-51.
25. MABRY M, NAKAGAWA T, NELKIN BD, et al. v-Ha-Ras oncogene insertion A model for tumor progression of human small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1988;85:6523-7.
26. GAZDAR AF. Molecular markers for the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Cancer* 1992;69:1592-9 .
27. BONFIL R, REDDEL RD, URA H, et al. Invasive and metastatic potential of a v-Ha-ras-transformed human bronchial epithelial cell-line. *J Nat Cancer Inst* 1989;81:587-94.
28. FUSHIMI H, MORINO H, HOSONO Y, et al. Detection of Large Cell Component in Small Cell Lung carcinoma by combined cytologic and histologic examinations and its clinical implication. *Cancer* 1992;70:599-605.

29. PFEIFER AM, MARK III GE, MALAN-SHIBLEY L, et al. Cooperation of c-raf1 and c-myc protooncogenes in the neoplastic transformation of simian virus 40 large tumor antigen-immortalized human bronchial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1989;86:1075-9.
30. MABRY N, NELKIN BD, FALCO JP, BARR LF, BAYLIN SB. Transitions between lung cancer phenotypes: implications for tumour progression. *Cancer Cells* 1991;3:53-8.
31. KNUDSON AG. Mutation and cancer statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1971;68:820-3.
32. SAGER R. Tumor Suppressor Genes: The Puzzle and the Promise. *Science* 1989;246:1406-11.
33. WEINBERG RA. Tumor Suppressor genes. *Science* 1991;254:1138-45.
34. LEE WH, HONG F, YOUNG LJ, LEE EH. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987;235:1394-1349.
35. WEINBERG RA. The Rb gene and the negative regulation of cell growth. *Blood* 1991;74:529-32.
36. BANDARA LR. Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 1991;351:494-6.
37. HOROWITZ JM, PARK SH, BOGENMANN E, et al. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990;87:275-9.
38. WEICHSELBAUM RR, DIAMON D. Some retinoblastomas, osteosarcomas, and soft tissue sarcomas may share a common etiology. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1988;85:2106-9.
39. YOKOTA J, WADA M, SHIMOSATO Y, TERADA M, SUGIMURA T. Loss of Heterozygosity on chromosomes 3;13;and 17 in small-cell carcinoma and chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1987;84:9252-6.
40. HARBOUR JW, LAI SL, WHANG-PENG J, et al. Abnormalities in Structure and expression of the human Retinoblastoma Gene in SCLC. *Science* 1988;241:353-7.
41. YANDELL DW, DAYTON SH, PETERSEN R, et al. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counselling. *N Eng J Med* 1989;321:1689-95.
42. HOROWITZ JM, YANDELL DW, PARK SH, et al. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 1989;243:937-40.
43. BOOKSTEIN R, MADREPERLA SA, HONG F, et al. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990;87:7722-66.

44. KAYE FJ, KRATZKE RA, GERSTER JL, HOROWITZ JM. A single aminoacid substitution results in a retinoblastoma protein defective in phosphorylation and oncoprotein binding. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990;87: 6922-6.
45. KRATKE R, HOROWITZ J, KAYE F. Characterization of a mutant retinoblastoma protein from a small-cell lung cancer line reveals a single amino-acid change. *AACR Proceed*,1990;31:320.
46. YOKOTA J, AKIYAMA T, FUNG YK, et al. Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene product in small cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988;3:471-5 .
47. RYGAARD K, SORENSON GD, PETENGILL OS, et al. Abnormal expression of the retinoblastoma gene in small cell lung cancer *AACR. Proceed* 1990;31:319.
48. KERN SE, BRUSKIN A, JAROSZ D, ET AL. Identification of P-53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991;252:1708-10.
49. KERN SE, THIAGALINGAM S, SEYMOUR A, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Oncogenic forms of P-53 inhibit P-53-regulated gene expression. *Science* 1992;256:827-30 .
50. TAKASHI T, NAU MM, CHIBA I, et al. P-53 : A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246: 491-4.
51. NIGRO, JM, BAKER SJ, PREISINGER AC, et al. Mutations in the P53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342: 705-8.
52. IGGO R, GATTER K, BARTK J, et al. Increased expression of mutant forms of P-53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990;ii: 675-9.
53. FINLAY CA, HINDS PW, TAN TH, et al. Activating mutations for transformtion by P-53 produce a gene product that forms an hsc70-P-53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988;8: 531-9 .
54. GANNON JV, GREAVES R, IGGO R, LANE DP. Activating mutations in P-53 produce a common conformational effect: a monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990;9:1595-602.
55. VÄHAKANGAS KH, SAMET JM, METCALF RA, et al. Mutations of P-53 and ras in radon-associated lung cancer from uranium miners. *Lancet* 1992;i:576-80.
56. MAZUR M, GLICKMAN BW. Sequence specificity of mutations induced by benzo(a)pyrène-7;8-diol-9,10 epoxide at endogenous apt gene in CHO cells. *Som Cell Mol Gen* 1988;14:393-400.
57. JOHN P, GROSOVSKY AP, GLICKMAN BW. Spectrum of spontaneous mutation at the APRT locus of chinese hamster ovary cells: an analysis at the DNA sequence level. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1988;85:3499-503.
58. HOLLSTEIN M, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, HARRIS CC. P-53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:9-53.

59. SAMESHIMA Y, MORI N, MIZOGUCHI H, ET AL. Point mutation of the P-53 gene resulting in splicing inhibition in small cell lung carcinoma. *Biochem Bioph Res Comm* 1990;173:697-70. .
60. TAKAHASHI T, CHIBA I, BUCHHAGEN DL, MINNA JD. Identification of intronic point mutation as an alternative mechanism for P-53 inactivation in lung cancer *J Clin Invest* 1990;86:363-9.
61. CHIBA I, TAKAHASHI T, NAU MM, et al. Mutations in the P-53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancers *Oncogene* 1990;5:1603-10.
62. LAVIGUEUR A, MALTBY V, MOCK D, et al. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the P-53 oncogene. *Mol Cell Biol* 1989;9:3982-91.
63. DONEHOWER LA, SLAGLE BL, MC ARTHUR MJ, et al. Mice deficient for P-53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992;356:215-21
64. WHANG-PENG J, KAO-SHAN CS, LEE EC, et al. Specific Chromosome defect Associated with Human Small-cell lung Cancer: Deletion 3p(14-23). *Science* 1981;215:181-2.
65. MILLER YE, SULLIVAN, GAZDAR A. Reduced or absent Amino-acylase-1 activity in small cell lung cancer Evidence for inactivation of genes encoded by chromosome 3p. *Clin Res* 1986;34:568 (Abstract).
66. BRAUCH H, JOHNSON B, HOVIS J, et al. Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in Small-cell and Non-small cell carcinoma of the lung *N Eng J Med* 1987;317:1109-13.
67. JOHNSON BE, SAKAGUCHI AY, GAZDAR AF, et al. Restriction fragment length polymorphism studies show consistent loss of chromosome 3p alleles in small cell lung cancer patient's tumors. *J Nat Cancer Inst* 1988;82:502-7.
68. KOK K, OSINGA J, CARRITT B, et al. Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature* 1987;330:578-81.
69. NAYLOR SL, JHONSON BE, MINNA JD, SAKAGUCHI AY. Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature* 1987;329:451-4.
70. GRAZIANO SL, COWAN BY, CARNEY DN, et al. Small cell lung cancer cell line derived from a primary tumor with a characteristic deletion 3p. *Cancer Res* 1987;47:2148-55.
71. BRAUCH B, TORY K, GAZDAR AF, MINNA JD, ZBAR B. Molecular mapping of the chromosome 3p deletion sites in lung cancer AACR. *Proceed* 1990;31:320 (Abstract).
72. BRAUCH H, TORY K, KOTZLER F, et al. Molecular mapping of deletion sites in the short arm of chromosome 3 in human lung cancer. *Genes Chrom Cancer* 1990;1:240-6.

73. DALY MC , MLEEHEEN NM, HASTELTON P, et al. An unusual proximal deletion on the short arm of chromosome 3 in a patient with small cell lung cancer. *Genomics* 1991;9:113-9.
74. DRABKIN H, KAO FT, HARTZ J, ET AL. Localization of human ERBA2 to the 3p22-3p241 region of chromosome 3 and variable deletion in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1987;85:9258-62 .
75. LEDUC F, HAJJ C, DOBROVIC A, et al. Loss of heterozygosity in a gene coding for a thyroid hormone receptor in lung cancers. *Amer J Hum Genet* 1989;44:282-7.
76. IBSON JM, TWENTYMAN PR, BLEEHEEN NM, RABBITS PH. Oncogene amplification and chromosomal abnormalities in small cell lung carcinoma. *J Cell Biochem* 1987;33:267-8 .
77. GLISSON B, NAYLOR S, LOEWY J, STEIN C. Fragile site expression in patients with small cell lung cancer (SCLC). *Proc Am Ass Cancer Res* 1990;31:42 (Abstract).
78. GERBER MJ. Genetic predisposition to small-cell lung cancer is defined by a chromosome 3p14 restriction fragment length polymorphism. *Clin Res* 1986;34:536.
79. MARX J. Biologists turn on to "off-enzymes". *Science* 1991;251:744-6. .
80. AARONSON SA. Growth factors and cancer. *Science* 1992;254:1146-52.
81. MARTIN-ZANCA D, HUGHES SH, BARBACID M A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986;319:743-.
82. LA FORGIA S, MORSE B, LEVY J, et al. Receptor protein-tyrosine phosphatase is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1991;88:5036-40.
83. DE THE H, TIOLLAIS P, DEJEAN A. A novel steroid thyroid hormone receptor related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1987;30:667-70.
84. BENBROOK D, LENHARDT E, PFAHL M. A new retinoic acid receptor identified from an hepatocellular carcinoma. *Nature* 1991;333:669-72.
85. BARTSCH D, BOYE B, BAUST C, ZUR HAUSEN H, SCHWARZ E. Retinoic acid mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor β gene in non tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells *EMBO J* 1992;11:2283-91.
86. GERBERT JF, MOGHAL N, FRANGIONI JV, SUGARBAKER DJ, NELL BG. High frequency of retinoic acid receptor beta abnormalities in human lung cancer. *Oncogene* 1991;6:1859-68 .
87. JOSS RA. Sixth World conference on lung cancer. *Ann Oncol* 1991;3:193-5.

- 88a. BOLLAG W, HOLDENER EE. Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann Oncol* 1992;3:513-26 .
- 88b. MC NEILL AK, WOLF M, GIAMBERNARDI TA, NAYLOR SL. Definition of a tumor suppressor locus within chromosome 3p21-p22. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1992;89:10877-81.
89. WESTON A, MODALI R, SUGIMURA H, et al. Differential DNA sequence deletions from chromosome 3;11;3;and 17 in squamous-cell carcinoma, large-cell carcinoma, and adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1989;86:5099-103.
90. JOHNSON BE, WHANG-PENG J, NAYLOR S, et al. Retention of chromosome 3 in extra-pulmonary small-cell lung cancer shown by molecular and cytogenetic studies. *J Nat Cancer Inst* 1989;81:q1223-8.
- 91a. SUNDARESAN V, GANLY P, HASLETON P, et al. P-53 and chromosome 3p abnormalities characteristic of malignant lung tumours are detectable in preinvasive lesion of the bronchus. *Oncogene* 1992;7:1889-97.
- 91b. CORDON-CARDO C, PETRYLAK D, DALBAGNI G, FAIR WR, FUKS Z, REUTER VE. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl cancer Inst* 1992;84:1251-6.
- 91c. CANCE WG, BRENNAN MF, DUDAS ME, HUANG CM, CORDON-CARDO C. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N Eng J Med* 1990;323:1457-62 .
- 91d. CROOK T, VOUSDEN KH. Properties of P-53 mutations detected in primary and secondary cervical cancers suggest mechanisms of metastasis and involvement of environmental carcinogens. *EMBO J* 1992;11:3935-40 .
92. LITTLE CD, NAU MM, CARNEY DN, GAZDAR AF, MINNA JD. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 1983;306:194-6.
93. WONG AJ, RUPPERT JM, EGGLESTON J, et al. Gene amplification of c-myc and N-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science* 1986;233:461-4.
94. NOGUCHI M, HARA F, KOJIMA A, et al. Heterogenous amplification of myc family oncogenes in small cell lung carcinoma. *Cancer* 1990;66:2053-8.
95. BRENNAN J, O'CONNOR T, MAKUCH RW, et al. Myc family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small-cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. *J Clin Invest*, 1991;51:1708-12.
96. JOHNSON BE, IHDE DC, MAKUCH RW, et al. Myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course. *J Clin Invest* 1987;79:1629-34.
97. GEMMA A, NAKAJIMA T, SHIRAISHI M, et al. Myc family gene abnormality in Lung cancers and its relation to xenotransplantability. *Cancer Res* 1988;48:6025-8.

98. JOHNSON BE, MARUCH RW, SIMMONS AD, et al. Myc family dna amplification in small cell lung cancer patients and corresponding cell-lines. *Cancer Res*, 1988;48:5163-6.
99. NAU MM, BURKE BJ, CARNEY DN, et al. Human small cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1986; 83:1092-6.
100. FUNA K, STEINHOLTZ L, NOU E, et al. Increased expression of N-myc in human small-cell lung cancer biopsies predicts lack of response to chemotherapy and poor prognosis. *Am J Clin Pathol* 1987; 88:216-20.
101. GU J, LINNOILA RI, SEIBEL NL, et al. A study of myc-related gene expression in small cell lung cancer by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1988; 132:13-7.
102. NAU MM, BROOKS BJ, BATTEY J, et al. Myc, a new myc related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 1985;318:69-73.
103. KAWASHIMA K, SHIKAMA H, IMOTO K, et al. Close correlation between restriction fragment length polymorphism of the L-myc gene and metastasis of human lung cancer to the lymph nodes and other organs. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1988;85:2353-6.
104. DUINEN SG, RUITER DJ, BROECKER EB, et al. Level of HLA antigens in locoregional metastases and clinical course of the disease in patients with melanoma. *Cancer Res* 1988;48:1019-25 .
105. DOYLE A, MARTIN WJ, FUNA K, et al. Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small cell lung cancer. *J Exp Med* 1985;161:1135-51 .
106. BERNARD SR, DESSAIN SK, WEINBERG RA. N-myc amplification causes down-modulation of MHC class I antigen expression in neuroblastoma. *Cell* 1986;47:667-74 .
107. VERSTEEG R, NOORDERMEER IA, KRUSE-WOLTER M, RUITER DJ, SCHRIER PI. c-myc down-regulates class I HLA expression in human melanoma. *EMBO J* 1988;7:1023-29.
108. SQUIRE J, GODDARD ADW, CANTON MW, et al. Tumour induction by the retinoblasma mutation is independent of N-myc expression. *Nature* 1986;322:555-7.
109. FONG CT, DRACAPOLI NC, WHITE PS, et al. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: Correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1989;86:3753-7.
110. ALI IU, LIDEREAU R, CALLAHAN R. Presence of two members of c-erba receptor gene family (c-erbaB and c-erba2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1989;81:1815-20.

111. KOK K, OSINGA J, SCHOTANUS DC, ET AL. Amplification and expression of different myc-family genes in a tumor specimen and 3 cell lines derived from one small-cell lung cancer patient during longitudinal follow-up. *Int J Cancer* 1989;44:75-8.
- 112a. GRIFFIN CA, BAYLIN SB. Expression of the c-Myb oncogene in human small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1985;45:272-5.
- 112b. DENT P, HASER W, HAYSTEAD TAJ, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 1992;257:1404-6.
113. MOODY TW, PERT CB, GAZDAR AF, CARNEY DN, MINNA JD. High levels of intra cellular bombesin characterize human small cell lung carcinoma. *Science* 1981;214:1246-8.
114. CUTTITTA F, CARNEY DN, MULSHINE J, ET AL Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature* 1985;316:823-6.
115. HAMID QH, BISHOP AE, SPRINGALL DR, et al. Detection of human probombesin mRNA in Neuroendocrine (Small cell) carcinoma of the Lung in situ hybridization with cRNA Probe *Cancer* 1989;63:266-71.
116. WILLEY JC, LECHNER JR, HARRIS CC. Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide is a selective mitogen for normal human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res* 1984;153:245-9.
117. WEBER S, ZUCKERMAN JE, BOSTWICK DG, et al. Gastrin-releasing peptide is a selective mitogen for small cell carcinoma in vitro. *J Clin Invest* 1985;75:306-9.
118. AGUAYO S SCHWARTZ MI. Bombesin-like immunoreactivity in bronchoalveolar lavage from smokers and interstitial lung disease. *Clin Res* 1987;35:530.
119. PERT CB. Plasma bombesin concentrations in patients with extensive small cell lung carcinoma of the lung. *Lancet* 1982;i:509.
120. AVIS IL, KASPRZYK PG, TRESTON AM, et al. Preclinical evaluation of an anti-autocrine growth factor monoclonal antibody for treatment of patients with small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1470-6.
121. MULSHINE J, AVIS J, CARRSQUILLO B, et al. Phase I study of an anti gastrin releasing peptide (GRP) monoclonal antibody in patients with lung cancer. *Proc Asco* 1990;9:230 .
122. THOMAS F, ARVELO F, ANTOINE E, JACROT M, POUPON MF. Antitumoral activity of bombesin analogues on small cell lung cancer xenografts relationship with bombesin receptors expression. *Cancer Res* 1992;52:4872-7 .
123. MAHMOUD S, STALEY J, TAYLOR J, et al. Inhibition of lung tumour growth by bombesin analogues. *Cancer Res* 1991;51:1798-1802.

124. REEVE JG, HUGHES S, MITCHELL J, SCHWANDER J, BLEEHEEN NM. Expression of insulinlike growth factor (IGF) and IGF-binding protein genes in human lung tumor cell lines. *J Natl Cancer Institute* 1992;84:628-34.
125. JAQUES G, ROTSCH M, WEGMANN C, et al. Production of immunoreactive insulin-like growth factor I and response to exogenous IGF I in small cell lung cancer cell lines. *Exp Cell Res* 1988;176:336-43.
126. MACAULAY VM, TEALE JD, EVERARD MJ, et al. Somatomedin C/ Insulin like growth factor I is a mitogen for human small cell lung cancer. *Brit J Cancer* 1988;58:91-3.
127. NAKANISHI Y, MULSHINE JL, KASPRYSZ PG, et al. Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer lines in vitro. *J Clin Invest* 1988;82:354-9.
128. MINUTO F, DEL MONTE P, BARRECA A, et al. Evidence for an increased somatomedin C/ Insulin like growth factor I in primary human lung tumors. *Cancer Res* 1986;46:985-8.
129. SAGMAN U, KOVACS K, KERBEL R, GINSBERG R, REUBI JC. Identification of somatostatin receptors in human small cell lung carcinoma. *Cancer* 1990;66:2129-33.
130. MACAULEY VM, SMITH IE, EVERARD MJ, et al. Effect of long-acting somatostatin analogue on the growth of human lung cancer cell lines. *Brit J Cancer* 1991;64:451-5.
131. THOMAS FP, TAYLOR JE, KIM SH, BOGDEN AE. In vivo response of human small cell lung cancer (SCLC) xenografts to the smomatostatin (SRIF) analog somatomulin. *Proc Asco* 1990;9:228 .
132. SETHI T. Multiple neuropeptides stimulate clonal growth of small cell lung cancer: effects of bradikinin, vasopressin, cholecystokinin, galanin and neurotensin. *Cancer Res* 1991;51:3621-3.
133. MAASBERG M, ROTSCH M, JAQUES G, et al. Androgen receptors, androgen dependant proliferation and 5 α reductase activity of small cell lung cancer cell lines. *Int J cancer* 1989;43:685-91 .
134. MANECKJEE R, MINNA JD. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990;87:3294-8.
135. AVALOS BR, GASSON JC, HEDVAT C, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hemapoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood* 1990;75:851-7.
136. BALDWIN GC, GASSON JC, KAUGFFMAN SE, et al. Nonhematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. *Blood* 1989;73:1033-7.

137. RUFF MR, FARRAR WL, PERT CB. Interferon gamma and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibit growth and induce antigens characteristic of myeloid differentiation in small-cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1986;83:6613-7 .
138. CRAWFORD J, OZER H, STOLLER R, et al. Reduction by granulocyte colony stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N Eng J Med* 1991;325:164-70 .
139. MOODY T, KORMAN LY. Regulation of the release of bombesin-like peptides from lung tumors *Reg Peptides* 1987;19:128-31.
140. WOLL PJ, ROZENGURT E. A neuropeptide antagonist that inhibits the growth of small cell lung cancer in vitro. *Cancer Res* 1990;50:3968-73.
141. KELLEY J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:765-88.
142. AGUAYO SM, MILLER YD, WALDRON JA, et al. Idiopathic diffuse hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells and airway disease. *N Eng J Med* 1991;327:1285-8.
143. GAI X, RIZZO MG, LEE J, ULLRICH A, BASERGA R. Abrogation of the requirements for added growth factors in 3T3 cells constitutively expressing the P-53 and IGF1 genes. *Oncogene Res* 1988;3:377-86.
144. LAI SL, GOLDSTEIN LJ, GOTTESMAN MM, et al. MDR1 expression in lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1144-50.
145. HOLZMAYER TA, HILSENBECK S, VON HOFF DD, ROBINSON IB. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1486-91.
146. COLE SPC, BHARDWAJ G, GERLACH JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258:1650-4.
147. LEVY R, ANDRIEU JM, EVEN P. Biologie du cancer bronchique à petites cellules: progrès récents. *Bull Cancer* 1992;79:25-46.

