



Identification et vectorisation de combinaisons de traitements pour la thérapie des tumeurs pulmonaires résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR

Victor Jeannot

► To cite this version:

Victor Jeannot. Identification et vectorisation de combinaisons de traitements pour la thérapie des tumeurs pulmonaires résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. ⟨NNT : 2015GREAV061⟩. ⟨tel-01684212⟩

HAL Id: tel-01684212

<https://theses.hal.science/tel-01684212v1>

Submitted on 15 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Victor JEANNOT

Thèse dirigée par le **Dr Amandine HURBIN**

préparée au sein du **Laboratoire INSERM/UJF U823**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Identification et vectorisation de combinaisons de traitements pour la thérapie des tumeurs pulmonaires résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR

Thèse soutenue publiquement le **1 octobre 2015**,
devant le jury composé de :

Pr Elias, FATTAL

Professeur, Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612 Institut Galien,
Châtenay-Malabry (Rapporteur)

Dr, Nathalie, HEUZE-VOURC'H

Chargé de recherche, INSERM U1100, Faculté de Médecine, Tours
(Rapporteur)

Pr, Rachel, AUZELY

Professeur, Université Joseph Fourier, CERMAV-CNRS, Grenoble
(Président du Jury)

Pr, Sébastien, LECOMMANDOUX

Professeur, Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, CNRS
UMR5629, Pessac (Examineur)

Dr, Amandine, HURBIN

Chargé de recherche, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, Grenoble
(Directeur)



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la région Rhône-Alpes qui a financé ces trois années de thèse.

Au directeur de thèse, Madame le Docteur Amandine HURBIN. Je te remercie de m'avoir permis d'intégrer l'Institut Albert Bonniot. Tu m'as fait découvrir le monde de la recherche, tu as formé mon esprit scientifique et su m'enseigner la méthodologie et la rigueur. Je te remercie également pour ton aide dans la rédaction de ce manuscrit et tout au long de la thèse, ta disponibilité, ton soutien et pour la confiance que tu m'as témoignée pendant ces 5 ans. Tu resteras un exemple dans ma carrière de chercheur.

A Monsieur le Docteur Jean-Luc COLL, responsable de l'équipe 5 de l'IAB. Je te remercie de m'avoir accueilli dans l'équipe. Je te remercie pour ta disponibilité et pour tes conseils tant sur le plan scientifique que sur mon orientation professionnelle. J'ai apprécié le soutien et la confiance que tu m'as témoignés quand j'en ai eu besoin.

A Monsieur le Professeur Elias Fattal. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur Heuzé-Vourc'h. Je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur d'être rapporteur afin de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Madame le Professeur Rachel Auzély. Je vous remercie d'avoir eu la gentillesse d'accepter immédiatement de faire partie de mon jury en tant qu'examineur.

A Monsieur le Professeur Sébastien Lecommandoux. Pour avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineur, je te remercie également ainsi que le Dr. Silvia Mazzaferro et le Pr. Christophe Schatz pour ces 3 années de collaboration fructueuses qui nous ont permis d'obtenir ces résultats.

A tous les membres de l'équipe 5 et de l'équipe 2. Chercheurs, techniciens, ingénieurs, étudiants, vous avez tous contribué directement et indirectement à la réussite technique et scientifique de ce projet grâce à vos nombreux conseils et coups de main. Un merci tout particulier à Laetitia Falcon et Mélanie Arboléas qui ont travaillé sur ce sujet.

A tous les membres de la plate-forme Optimal pour leur bonne humeur, pour la qualité de la formation technique et scientifique qu'ils m'ont apportée, pour leur disponibilité et pour leur regard critique sur les résultats.

Merci à Yoon, Julien, Clément, Blaise, Maxime, Benoit, Jonathan...

Merci à mes parents qui m'ont donné les clés pour devenir ce que je suis aujourd'hui. Merci pour leur soutien et pour l'aide qu'ils m'ont apporté au cours de ces études.

Merci à mes frères Matthieu et Anatole pour leur présence. Pour tous les moments passés ensemble et les moments que nous avons encore à partager.

Merci à Maya ma nièce, Arsène mon neveu et Lucie ma belle-sœur.

A mes deux familles Jeannot et Martinez, pour l'exemple de diversité qu'elles m'ont offert et qui me permet de trouver les réponses dont j'ai besoin pour avancer. J'espère rester fidèle aux valeurs que vous m'avez enseignées.

A la famille Mouhib et Tourron pour l'accueil et la place qu'ils m'ont réservés.

Je remercie Patrick Fillon et Philippe Gouttard pour m'avoir formé pendant 15 ans et amené jusqu'au 4^{ème} Dan. La réussite de mes études et de cette thèse n'aurait pas été possible sans vous. En espérant passer encore de nombreuses années avec vous sur les tatamis.

A mes amis : Jonas, Rémy, Mathias, Anne-Sophie, Riadh, Raphael, Chop, Mat-Mat, Pascal, Pierrot...

A Myriam pour le bonheur et l'équilibre qu'elle m'apporte au quotidien.

Avant-propos

Ce travail a été effectué à l'Institut Albert Bonniot (INSERM/UJF U823), au sein de l'équipe 5 « Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer ». Il a donné lieu aux manuscrits et communications suivants :

Articles dans des revues internationales à comité de lecture :

Articles acceptés:

- The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism." Jeannot V, Busser B, Brambilla E, Wislez M, Robin B, Cadranet J, Coll JL, Hurbin A. International Journal of Cancer, 2014. 134(11):2560-71.
- «Use of endogenous and exogenous fluorescence in oncology. Karageorgis A, Jeannot V, Coll JL. Molecular Imaging Techniques: New Frontiers, October 2013, Pages 98-111. www.future-science.com

Articles en cours de soumission:

- Synergistic combination of vorinostat with gefitinib, and not sorafenib, in wild-type EGFR human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. Jeannot V, Busser B, Vanwonterghem L, Ferroudj S, Cokol M, Coll JL, Ozturk M, Hurbin A.
- Targeting lung tumors using polysaccharide-based nanocarriers targeting the CD44 receptor: influence of the nanoparticles size, shape and administration route. Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Arboléas M, Josserand V, Coll JL, Lecommandoux S, Schatz C, Hurbin A.

Communications orales:

- Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Josserand V, Henry M, Schatz C, Lecommandoux S, Coll JL, Hurbin A. Glycopolyptide based-nanocarriers targeting CD44 for non-small cell lung cancer therapy. EMIM 2015, Tübingen, Germany (2015)
- Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Josserand V, Henry M, Schatz C, Lecommandoux S, Coll JL, Hurbin A. Glycopolyptide-based nanocarriers targeting CD44 for lung cancer therapy. SFNano 2014 Annual Meeting, Nancy, France (2014).
- Jeannot V, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Dufort S, Gravier J, Coll JL, Hurbin A. CD44 receptor, a potential target for drug delivery system in lung cancer therapy. 1st ERC BIOMIM Meeting, Grenoble, France (2013).

Communications affichées :

- Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Henry M, Schatz C, Lecommandoux S, Coll JL, Hurbin A. Polysaccharide-based nanocarriers targeting CD44 for lung cancer treatment. Journées du CLARA, Lyon, France (2015).
- Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Henry M, Schatz C, Lecommandoux S, Coll JL, Hurbin A. Polysaccharide-based nanocarriers targeting CD44 for lung cancer treatment. Journées de Recherche Respiratoire, Bordeaux, France (2014). **Rev Mal Respir 2014.**
- Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Henry M, Schatz C, Lecommandoux S, Coll JL, Hurbin A. Polysaccharide-based nanocarriers targeting CD44 for lung cancer treatment. 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. Munich, Germany (2014).
- Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Henry M, Schatz C, Lecommandoux S, Coll JL, Hurbin A. Glycopolyptide-based nanocarriers targeting CD44 for lung cancer treatment. Journée de la recherche médicale, Grenoble, France (2014).
- Mazzaferro S, Jeannot V, Schatz C, Hurbin A, Coll JL, Lecommandoux S. Glycopeptide-based nanocarriers for lung cancer therapy. Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation, Orléans, France (2013).
- Jeannot V, Busser B, Brambilla E, Wislez M, Robin B, Cadranel J, Coll JL, Hurbin A. The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism. Journées de Recherche Respiratoire, Montpellier, France (2013). **Prix du poster**
- Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Henry M, Schatz C, Lecommandoux S, Coll JL, Hurbin A. *In vivo* biological evaluation of polysaccharide-based nanocarriers targeting CD44 for lung cancer therapy. Journées de Recherche Respiratoire, Montpellier, France (2013).
- Jeannot V, Busser B, Brambilla E, Wislez M, Robin B, Cadranel J, Coll JL, Hurbin A. The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism. 1st international congress “resistance to targeted therapies”, Grenoble Cancer Research Institute, Grenoble, France (2013).
- Jeannot V, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Dufort S, Gravier J, Coll JL, Hurbin A. CD44 receptor, a potential target for drug delivery system in lung cancer therapy. Journée scientifique ARC1-Santé, L’Isle d’Abeau, France (2013).
- Jeannot V, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Dufort S, Gravier J, Coll JL, Hurbin A. CD44 receptor, a potential target for drug delivery system in lung cancer therapy. 1st ERC BIOMIM Meeting, Grenoble, France (2013).

- Jeannot V, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Dufort S, Gravier J, Coll JL, Hurbin A. Ciblage du CD44 pour la vectorisation de drogues dans le cancer du poumon. Journées de Recherche Respiratoire, Lille, France (2012). Rev Mal Respir 2012; 4:38.
- Jeannot V, Lavaud J, Josserand V, Guidetti M, Dufort S, Gravier J, Coll JL, Hurbin A. CD44 receptor, a potential target for drug delivery system in lung cancer therapy. Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation, Paris, France (2012).

Prix et distinctions honorifiques :

- Prix Sanofi de la meilleure communication orale - congrès SFnano 2014, Nancy
- Prix de la meilleure communication affichée - congrès J2R 2013, Montpellier

Sommaire

Remerciements.....	1
Avant-propos	5
Index des illustrations	14
Liste des abréviations.....	16
Introduction	20
PARTIE I : LE CANCER DU POUMON.....	22
1. Données épidémiologiques et facteurs de risque	22
1.1. Données épidémiologiques	22
1.2. Facteurs de risque.....	24
1.2.1. Le tabac	24
1.2.2. Exposition professionnelle	24
2. Classification histologique et pathologique des cancers pulmonaires	25
2.1. Classification selon l’OMS	25
2.2. Classification pathologique TNM	27
3. Les cancers bronchiques non à petites cellules	29
3.1. Physiopathologie des cancers bronchiques	29
3.1.1. Mécanismes de transformation tumorale	29
3.1.2. Anomalies moléculaires dans le cancer bronchique non à petites cellules	31
3.2. Prise en charge thérapeutique des CBNPC	34
3.2.1. Diagnostic des cancers bronchiques non à petites cellules	34
3.2.2. Stades I et II	35
3.2.3. Stade III.....	35
3.2.4. Stade IV	36
4. La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l’EGFR (EGFR-TKI) dans les cancers bronchiques non à petites cellules	38
4.1. Le récepteur au facteur de croissance épidermique : l’EGFR.....	38
4.1.1. La famille des récepteurs ERBB et leurs ligands.....	38
4.1.2. Activation des récepteurs ERBB et signalisation cellulaire	41
4.1.3. Rôles l’EGFR dans les cancers du poumon	44
4.1.3.1. Rôles physiologiques	44
4.1.3.2. Rôles de l’EGFR dans les cancers du poumon.....	44

4.2. Les thérapies anti-EGFR : les EGFR-TKI	45
4.2.1. Les anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR	45
4.2.2. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI),.....	46
4.2.2.1. Les EGFR-TKI de 1 ^{er} génération	46
4.2.2.2. Les EGFR-TKI de 2 ^{ème} génération.....	49
4.2.2.3. Les EGFR-TKI de 3 ^{ème} génération.....	50
4.3. Mécanismes de résistance aux EGFR-TKI	52
4.3.1. Les mutations de résistance de l'EGFR	52
4.3.2. Contribution d'autres récepteurs tyrosine kinase	52
4.3.3. Activation des voies de signalisation	53
4.3.4. Inhibition des voies essentielles à l'apoptose.....	53
4.3.5. Transformation histologique	53
4.4. Coopération amphiréguline/IGF1R et résistance aux EGFR-TKI	54
5. Acétylation et cancer.....	57
5.1. Les différentes classes d'histones déacétylases	57
5.2. Histones déacétylases et le cancer du poumon.....	58
5.2.1. Les HDACs de classe I et II.....	58
5.2.2. Les sirtuines	60
5.3. Les inhibiteurs d'histones déacétylases et des sirtuines.....	61
5.3.1. Mécanisme d'action des HDACi de la classe I et II.....	61
5.3.2. Mécanisme d'action des inhibiteurs des sirtuines	62
5.3.3. L'inhibition des HDACs dans la thérapie du CBNPC	63

PARTIE II : LES NANOVECTEURS CIBLANTS ET LEUR UTILISATION EN ONCOLOGIE... 65

1. Nanovecteurs et ciblage tumoral	66
1.1. Définition	66
1.2. Nanoparticules et ciblage tumoral.....	66
1.2.1. Ciblage tumoral passif.....	66
1.2.2. Ciblage tumoral actif.....	67
1.3. Les différentes générations de nanoparticules	68
1.4. Les différentes nanoparticules développées.....	69
1.4.1. Les liposomes.....	69
1.4.2. Les nanoparticules lipidiques	70
1.4.3. Les nanoparticules inorganiques	71
1.4.4. Les nanoparticules polymériques	71
1.4.4.1. Les différents types de nanoparticules polymériques.....	71
1.4.4.2. Les micelles polymériques	72
1.5. Encapsulation et libération des molécules thérapeutiques	74
1.5.1. Chargement en molécules thérapeutiques	74

1.5.2. Libération des molécules thérapeutiques	74
2. Administration et suivi <i>in vivo</i> des nanoparticules	77
2.1. Modes d'administration des nanoparticules	77
2.1.1. La voie intraveineuse	77
2.1.2. La voie pulmonaire	78
2.2. Suivi du devenir biologique des nanoparticules et imagerie optique <i>in vivo</i>	80
2.2.1. Principe de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge	80
2.2.2. l'épi-illumination.....	82
2.2.3. La transillumination	83
3. Ciblage actif et interaction hyaluronane récepteur CD44	85
3.1. L'Acide hyaluronique.....	85
3.1.1. Métabolisme du hyaluronane	86
3.1.2. Rôles physiologiques et implication dans le cancer	86
3.2. Les récepteurs du hyaluronane.....	87
3.2.1. Le récepteur CD44	88
3.2.1.1. Structure et expression du récepteur CD44.....	88
3.2.1.2. Rôles physiologiques du CD44.....	90
3.2.1.3. Implication du récepteur CD44 dans la tumorigénèse	91
3.2.2. RHAMM.....	93
3.2.3. LYVE-1	93
3.2.4. HARE.....	94
3.2.5. Autres récepteurs liant le hyaluronane	94
3.3. Stratégie de ciblage du récepteur CD44	95
3.3.1. Anticorps CD44	95
3.3.2. Liaison covalente de molécules thérapeutiques au hyaluronane	96
3.3.3. Encapsulation au sein de nanovecteurs	96
Objectifs	98
Résultats	101
I. IDENTIFICATION DE CIBLES THERAPEUTIQUES ET DE COMBINAISONS DE TRAITEMENTS.	102
1. Résistance aux thérapies ciblées impliquant la voie PI3K/AKT et les mécanismes dépendant de l'acétylation dans les adénocarcinomes pulmonaires.....	102
1.1. Présentation de l'étude et des principaux résultats	102
1.2. Article 1	103
1.3. Conclusion	115

2.	Résistance aux TKI dans les cancers pulmonaires et les carcinomes hépatocellulaires.....	116
2.1.	Présentation de l'étude et principaux résultats	116
2.2.	Article 2	117
2.3.	Conclusion.....	149
II.	VECTORISATION DE COMBINAISONS DE TRAITEMENTS DANS LA THERAPIE DES CBNPC	150
1.	Ciblage des tumeurs bronchiques pulmonaires avec des nanoparticules polymériques.....	150
1.1.	Présentation de l'étude et principaux résultats.....	150
1.2.	Articles 3	151
1.3.	Résultats complémentaires.....	184
1.3.1.	Spécificité de la liaison des nanoparticules sur le CD44	184
1.3.2.	Ciblage des métastases par les nanoparticules	186
1.3.3.	Rétention pulmonaire des nanoparticules après nébulisation	188
1.3.4.	Conclusion	189
2.	Ciblage du récepteur CD44 dans des tumeurs bronchiques pulmonaires.....	190
2.1.	Nébulisation d'anticorps anti-CD44.....	190
2.2.	Administration de hyaluronane	192
2.3.	Conclusion.....	195
	Discussion.....	196
1.	Mécanismes de résistance aux EGFR-TKI dans les CBNPC.....	197
2.	Cibles thérapeutiques et combinaisons de traitements	199
3.	Utilisation de vecteurs pour le traitement des CBNPC	201
3.1.	Choix du nanovecteur	201
3.2.	Impact de la forme et de la taille et spécificité pour les récepteurs CD44	201
3.3.	Ciblage du récepteur CD44 dans les tumeurs pulmonaires <i>in vivo</i>	202
3.4.	Mode d'administration des nanoparticules.....	204
3.5.	Perspective d'amélioration du ciblage	205
3.6.	Effet thérapeutique des nanoparticules chargées avec la combinaison EGFR-TKI/ HDACi.....	206
	Conclusion.....	208
	Références bibliographiques	210
	Annexes	240

Index des illustrations

Figure 1 : Nombre de nouveaux cas et de décès par cancer en fonction du sexe et du niveau de développement économique du pays.....	23
Figure 2 : Correspondance entre la classification TNM et les stades anatomiques.	28
Figure 3 : Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse: exemple des CBNPC.	30
Figure 4 : Fréquence des différents types d'anomalies moléculaires dans les CBNPC.	31
Figure 5 : Structure générale des récepteurs ERBB.	39
Figure 6 : Les différents récepteurs ERBB et leurs ligands.	40
Figure 7 : Modifications conformationnelles des récepteurs ERBB conduisant à la formation des dimères actifs.....	41
Figure 8 : Représentation des différents hétérodimères de récepteurs ERBB.....	42
Figure 9 : Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR.....	43
Figure 10 : Présentation de la relation structure-activité des 4-anilinoquinazolines.	47
Figure 11 : Mécanisme de résistance aux EGFR-TKI, impliquant l'AREG et l'IGF1R, dans les adénocarcinomes mucineux.	56
Figure 12 : Présentation des principales caractéristiques, des partenaires cellulaires et des rôles physiologiques des différentes histones déacétylases.	59
Figure 13 : Exemple d'inhibiteurs des histones déacétylases et présentation de leur pharmacophore commun.	62
Figure 14 : Présentation des principales caractéristiques des inhibiteurs d'histones déacétylases utilisés durant l'étude	63
Figure 15 : Illustration du ciblage tumoral passif et actif réalisé par les nanoparticules.....	68
Figure 16 : Représentation schématique des principaux types de nanoparticules polymériques.	72
Figure 17 : Profil cinétique des concentrations sanguines en molécules thérapeutiques au cours du temps.	75
Figure 18 : Principales données pharmacologiques des nanovecteurs utilisées dans la thérapie du cancer.	76
Figure 19 : Diagramme de Jablonski.....	81
Figure 20 : Principe de l'imagerie optique de fluorescence	82
Figure 21 : Présentation des systèmes d'épi-illuminations	83
Figure 22 : Présentation de la Tomographie Optique de Fluorescence en milieux diffus.....	84
Figure 23 : Schéma d'une molécule de hyaluronane.....	85
Figure 24 : Représentation schématique du récepteur CD44	89
Figure 25 : Représentation schématique du rôle du récepteur CD44 dans la signalisation cellulaire..	91
Figure 26 : Fixation des nanoparticules sur les cellules A549, après inhibition du CD44.....	185
Figure 27 : Biodistribution des Np30 et Np300 dans des souris atteintes de tumeurs pulmonaires A549 et de métastases osseuses	187
Figure 28 : Rétention pulmonaire des Np30 et Np300 dans des poumons de souris saines.....	188
Figure 29 : Ciblage du récepteur CD44 par nébulisation d'un anticorps anti-CD44	191
Figure 30 : Biodistribution des hyaluronanes dans les souris, après injection intraveineuse	193
Figure 31 : Biodistribution des hyaluronanes dans les souris, après nébulisation.....	194

Liste des abréviations

2D	2 dimensions
3D	3 dimensions
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase domain
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (ou Protein kinase B)
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AREG	Amphiréguline
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BAD	Bcl2-antagonist of cell death
BAX	Bcl2-associated X protein
BCL-2	B-Cell lymphoma protein 2
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson
BIM	BLC2-Like 11
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
BTC	Betacelluline
CBPC	Cancer bronchique à petites cellules
CBNPC	Cancer bronchique non à petites cellules
CCD	charge coupled device
CD44	Cluster of differentiation 44
CRK	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
CSC	Cancer stem cell
CYP	Cytochrome P
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFR-TKI	Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor
EML4-ALK	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 -anaplastic lymphoma kinase
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
EPR	Epiréguline
EPR	Enhanced permeability retention
ERBB	v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
fDOT	Fluorescence Diffuse Optical Tomography
FGF-2	Basic fibroblast growth factor
FHIT	Fragile histidine triad gene
GAG	glycosaminoglycanes
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine
GlcUA	Acide D-glucuronique
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
HADC	Histone déacétylase
HARE	Hyaluronan receptor for endocytosis
HAS	Hyaluronan synthase
HAT	Histone acétyltransférase
HB-EGF	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor

HCC	Hépatocarcinome
HDACi	Inhibiteurs d'histones déacétylases
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte growth factor
HNSCC	Carcinome de la tête et du cou
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HYAL	Hyaluronidases
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule
IGF1	Insulin-like Growth Factor-1
IGF1R	Insulin-like Growth Factor-1 receptor
IL-1β	Interleukin-1 beta
JAK2	Janus kinase 2
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Ku70	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
LMW- HA	Hyaluronane de faible poids moléculaire
LYVE-1	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase
MET	Met proto-oncogene tyrosine kinase (hepatocyte growth factor receptor)
MMP	Matrix Metalloprotease
NaBu	Sodium butyrate
NAD	Nicotine adenine dinucleotide
NAM	Nicotinamide
NFκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells)
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NRG	Neuregulin
Np30	Nanosphère de 30nm de diamètre
Np300	Nanodisque de 300nm de diamètre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p53	Protein 53
PBLG	Poly-benzyl-L-glutamate
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PEG	Polyéthylène glycol
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PI3KCA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PKC	Protéines kinases C
PLCγ	Phospholipase C-gamma
PTB	Phospho Tyrosine Binding
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RARβ	Retinoic acid receptor
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RASSF1	Ras association domain family member 1
RHAMM	Receptor for hyaluronan-mediated motility expressed protein
ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS

SHC	Src homology 2 domain containing
SiRNA	Small interfering ARNs
SIRT	Sirtuine
SH2	Src Homology domain 2
SRC	Sarcoma, Rous sarcoma oncogene
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TA	Tubastatine A
TGF-α	Transforming growth factor-alpha
TKI	Inhibiteur de tyrosine kinase
TLRs	Toll like receptors
TNM	Tumor, Node, Metastasis
TSA	Trichostatine A
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Introduction

Le cancer est une des principales causes de mortalité sur la planète avec 14,2 millions de nouveaux cas en 2012 et 8,2 millions de décès [1]. La principale raison d'une telle épidémie est l'adoption de modes de vie connus pour augmenter le risque de cancer tels que la consommation de tabac, un régime alimentaire inadapté, l'absence d'activité physique...

A l'échelle mondiale les cancers du poumon et du sein sont les plus fréquemment diagnostiqués et sont, respectivement, les premières causes de décès par cancer chez l'homme et la femme. Pour pallier au manque d'efficacité du diagnostic précoce et des thérapies du cancer du poumon, de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées doivent être mises en œuvre et atteindre spécifiquement les tumeurs. Dans ce contexte, notre équipe s'attache à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou combinaisons de thérapies et à les vectoriser jusqu'à la tumeur.

PARTIE I : LE CANCER DU POUMON

Dans ce chapitre dédié au cancer bronchique, nous présenterons les principales données épidémiologiques, les facteurs de risque, et la classification des cancers bronchiques. Nous nous attacherons ensuite à décrire les mécanismes cellulaires responsables de la formation des cancers bronchiques non à petite cellules (CBNPC) et leur prise en charge thérapeutique. Enfin, nous détaillerons les mécanismes impliqués dans la résistance aux traitements, en particulier les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI), en lien avec l'acétylation et nous présenterons les moyens de les contourner.

1. Données épidémiologiques et facteurs de risque

1.1. Données épidémiologiques

Tous sexes confondus le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer, avec environ 1,5 million de décès par an, soit environ 20% des décès par cancer dans le monde [2]. En 2012 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués chez l'homme était de 1,241 million et 0,583 million chez la femme. La même année, on recensait 1,098 million de morts par cancer du poumon chez l'homme et 0,491 million chez la femme [1].

A l'échelle mondiale, le cancer du poumon est en seconde position en terme de mortalité chez la femme, derrière les cancers du sein mais passe en première position dans les pays en voie de développement [1]. Le nombre de cas estimés de cancer du poumon sur la planète a augmenté de 51% depuis 1985 (avec une augmentation de 44% chez les hommes et de 76% chez la femme) [3]. La figure 1 résume les principales données mondiales sur l'incidence et la mortalité des cancers et met en lumière des différences en fonction de l'origine géographique et du sexe. Malgré les efforts menés dans la prise en charge thérapeutique et la prévention des cancers du poumon, le taux de survie à 5 ans n'est toujours que de 15% [3].

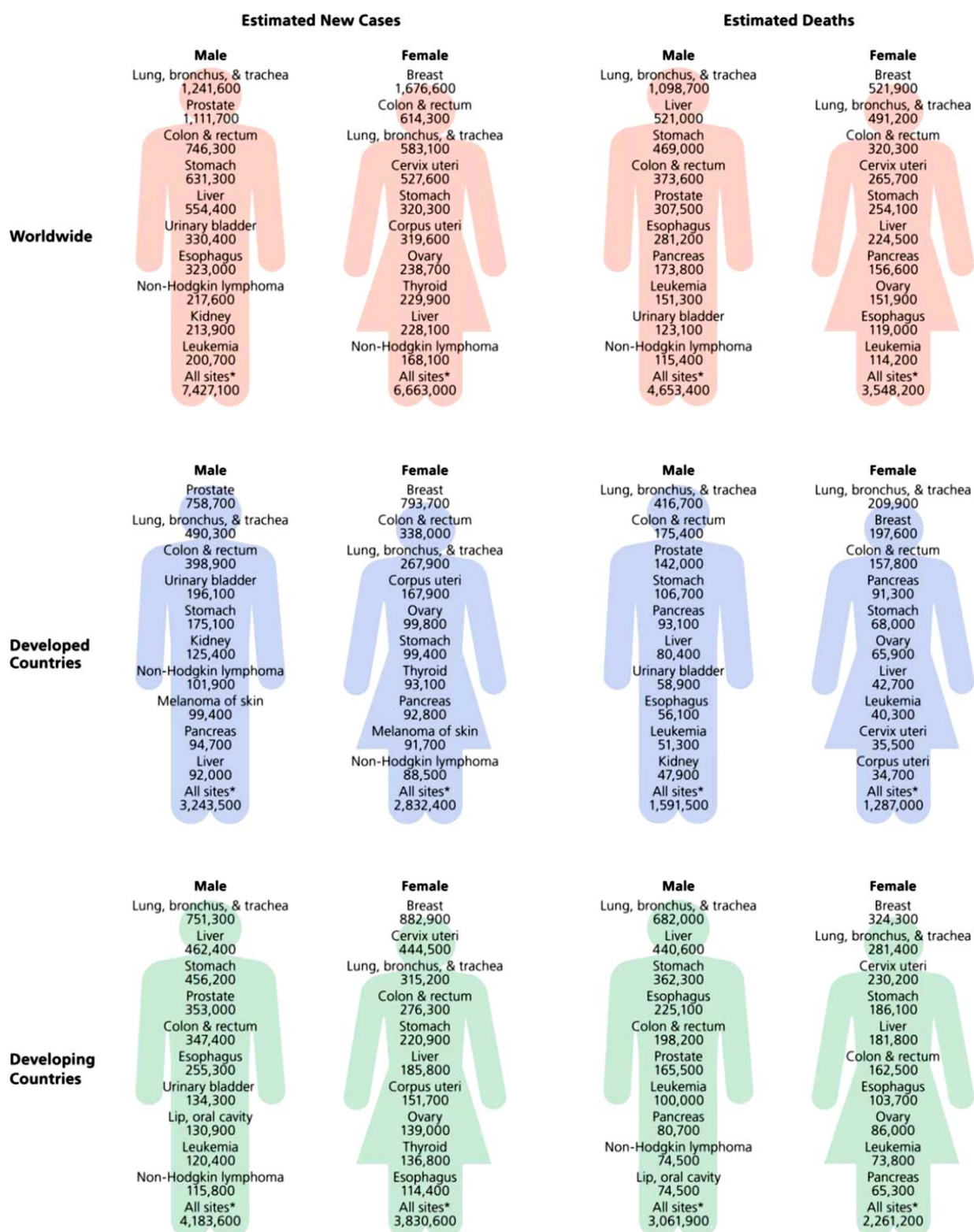


Figure 1 : Nombre de nouveaux cas et de décès par cancer en fonction du sexe et du niveau de développement économique du pays.
(Torre et al. 2015).

1.2. Facteurs de risque

Divers facteurs de risque de développer un cancer du poumon sont décrits, et leur responsabilité dans le développement des tumeurs pulmonaires est inégale, le tabagisme étant en tête.

1.2.1. Le tabac

Le lien de causalité entre la consommation de tabac et les cancers broncho-pulmonaires a été établi il y a de nombreuses années. Le tabagisme est responsable à lui seul de plus de 90% des cancers broncho-pulmonaires [4]. De plus, on observe que l'augmentation de l'incidence des cancers du poumon chez la femme est corrélée à l'augmentation du tabagisme dans cette population, tandis que la diminution de la consommation de tabac entraîne une diminution des cas chez l'homme [5]. La durée du tabagisme, la consommation cumulée, l'âge, ainsi que la qualité du tabac sont autant de facteurs à prendre en compte dans le risque de développement des cancers pulmonaires [3].

De très nombreuses particules entrant dans la composition de la fumée de cigarette sont responsables de sévères dommages au niveau pulmonaire notamment à cause du stress oxydatif qu'elles produisent [6].

Hormis la consommation active de tabac, il est à noter que le tabagisme passif est responsable d'une élévation du risque de cancer bronchique de 20 à 30 % chez les conjoints de fumeurs [7]. Dans un tel contexte, la lutte contre le tabagisme, ainsi que le sevrage sont des enjeux majeurs en termes de prévention des cancers pulmonaires.

Toutefois seuls 10 à 20 % des fumeurs développent un cancer au niveau pulmonaire. Des facteurs génétiques, le sexe, l'origine ethnique et l'âge, jouent vraisemblablement un rôle dans la survenue de ce type de cancer [3, 8].

1.2.2. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle à des substances cancérigènes est la seconde cause de cancers bronchiques. Les agents mis en cause sont variables et leur implication dans le développement de la maladie peut être gradée en agents cancérigènes certains ou agents probablement cancérigènes. L'amiante, le nickel, le chrome, l'arsenic, les produits à base de pétrole ainsi que le radon sont fréquemment impliqués dans le développement de cancers bronchiques [9].

D'autre part l'implication de facteurs environnementaux dans le développement de cancers du poumon, tels que la pollution de l'air intérieur avec des fumées d'hydrocarbure mais aussi la pollution de l'air extérieur, ont été mis en évidence. La pollution de l'air extérieur augmenterait de 10% à 40% le risque de développer un cancer pulmonaire [3, 9].

2. Classification histologique et pathologique des cancers pulmonaires

La dénomination cancer pulmonaire regroupe une grande variété de contextes physiopathologiques différents tant sur le plan histologique que du point de vue de l'extension de la maladie (forme localisée ou métastatique). Des classifications permettant de préciser le contexte ont donc été développées. Elles servent à choisir les protocoles thérapeutiques à mettre en place, à préciser le pronostic et permettent aussi la formation de groupes de malades homogènes utilisés lors d'études cliniques. Les deux principaux organismes proposant une classification sont :

- L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : classification basée sur les caractéristiques histologiques des tumeurs.
- Union for International Cancer Control (UICC) : classification TNM basée sur des caractéristiques pathologiques des tumeurs.

2.1. Classification selon l'OMS

La classification de l'OMS est basée sur les résultats des examens anatomopathologiques. Elle permet de caractériser les différents cancers pulmonaires selon des critères histologiques simples, de manière à être reproductible et donc utilisable par tous les pathologistes [10]. Ces données seront ensuite associées et exprimées sous forme de grades de différenciation tumorale :

- GRADE I : tumeur peu différenciée
- GRADE II : tumeur moyennement différenciée
- GRADE III : tumeur fortement différenciée

Concernant les tumeurs pulmonaires, la classification de l'OMS de 2004 (ANNEXE I) [10] définit toutes les entités histologiques ainsi que les critères diagnostiques. Deux catégories de tumeurs pulmonaires malignes sont reconnues :

- les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC, 15% des cas de cancers bronchiques), fortement liés au tabagisme, se développent à partir des cellules neuroendocrines dispersées à l'état normal dans l'épithélium bronchique. Ces tumeurs sont hautement métastatiques et leur pronostic médiocre [11].
- les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC 85% des cas de cancers bronchiques) [12, 13]. Cette catégorie regroupe plusieurs sous-types histologiquement définis : les carcinomes épidermoïdes (25% à 35% des CBNPC), les adénocarcinomes (40% des CBNPC) et les carcinomes à grandes cellules (20% des CBNPC).

Depuis 2011, l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) propose une nouvelle classification spécifique aux adénocarcinomes pulmonaires, ces derniers représentant le type histologique le plus fréquemment rencontré [14, 15]. Les adénocarcinomes invasifs sont ainsi décrits en fonction de leur architecture : acinaire (formation de tubes ou de glandes), papillaire (formation de papilles), micropapillaire (formation de papilles mais sans axes conjonctivo-vasculaires), solide (massif de cellules de grandes tailles), lépidique (prolifération cellulaire le long des parois alvéolaires et bronchiolaires sans modification de l'architecture pulmonaire sous-jacente). Des variantes existent également, telles que les adénocarcinomes mucineux à prédominance lépidique, le cystadénocarcinome mucineux, l'adénocarcinome colloïde, les adénocarcinomes fœtaux et les adénocarcinomes entériques.

2.2. Classification pathologique TNM

La classification TNM repose sur l'évaluation de 3 critères (ANNEXE II):

- **T** : **T**aille de la tumeur primitive ou envahissement tissulaire local (grosse bronche, paroi, nerfs, plèvre, diaphragme...)
- **N** : atteinte locorégionale ganglionnaire (« **N**ode »)
- **M** : présence ou absence de **M**étastase(s) pleuro-pulmonaire(s) ou à distance

Elle permet d'apprécier le stade histopathologique d'extension d'une tumeur (pTNM) grâce à des examens anatomopathologiques de la pièce tumorale et des ganglions, ainsi que des examens d'imagerie obtenus lors du bilan d'extension. Elle associe donc des éléments microscopiques et macroscopiques.

Contrairement à la classification OMS basée uniquement sur des critères du site primaire de la tumeur, la classification pTNM intègre l'atteinte tumorale à échelle de l'organisme. Dans le but de simplifier son utilisation, les catégories peuvent être regroupées, ce qui donne lieu à une classification par stade anatomique. (Figure 2)

- **Stade 0** : Cancer in situ (non invasif)
- **Stade I** : Invasion très localisée, sans métastase à distance
- **Stade II** : Extension limitée localement et/ou atteinte ganglionnaire satellite minime
- **Stade III** : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
- **Stade IV** : Tumeur avec métastase(s)

		Pas d'invasion ganglionnaire	ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux	ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou souscarinaux	ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou controlatéraux
		N0	N1	N2	N3
≤ 2cm	T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
2 à 3 cm	T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
3 à 5 cm	T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
5 à 7 cm	T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
≥ 7cm ou envahissement ^{*1}	T3	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
Toute taille et envahissement ^{*2}	T4	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
Présence de métastases	M1		IV	IV	IV

Figure 2 : Correspondance entre la classification TNM et les stades anatomiques.

Adapté d'après (Goldstraw et al. 2007) * le détail des caractéristiques est présenté en ANNEXE II.

Cette classification a évolué au fil des années. Sa 7^{ème} édition datant de 2009 a permis de réviser la distribution des sous-groupes et d'en créer de nouveaux, permettant une meilleure approche des données épidémiologiques. Elle définit mieux les différents groupes pronostiques et doit ainsi conduire à une amélioration de la prise en charge en fonction du stade [16]. A l'heure actuelle des groupes réfléchissent à une 8^{ème} édition intégrant des paramètres histologiques, biochimiques mais aussi démographiques [17].

3. Les cancers bronchiques non à petites cellules

Dans cette partie nous allons nous concentrer sur les CBNPC, détailler les mécanismes physiopathologiques conduisant à la formation de ces tumeurs et présenter les acteurs de la transformation et de la progression tumorale. Nous détaillerons ensuite la prise en charge thérapeutique des CBNPC en fonction des différents stades anatomiques.

3.1. Physiopathologie des cancers bronchiques

3.1.1. Mécanismes de transformation tumorale

La transformation d'une cellule épithéliale bronchique normale en cellule cancéreuse résulte de l'accumulation d'anomalies génétiques et épigénétiques aboutissant à une rupture d'équilibre entre l'expression de gènes "prolifératifs", favorisant le déroulement de la division ou la différenciation cellulaire (proto-oncogènes), et de gènes "antiprolifératifs" (gènes suppresseurs de tumeurs), freinant le cycle cellulaire ou induisant la mort cellulaire programmée (apoptose). Ces anomalies génétiques et épigénétiques peuvent être causées par des agents extérieurs contenus dans le tabac par exemple. L'accumulation se fait sur une période longue et aboutit à la formation de cellules tumorales. Les anomalies génétiques accumulées sont responsables de l'acquisition par la cellule bronchique normale, des six propriétés élémentaires qui vont faire d'elle une cellule tumorale [18] (Figure 3) :

- L'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance : les mutations génétiques sur les proto-oncogènes impliqués dans les voies de prolifération permettent aux cellules tumorales de rester dans un état de prolifération active.
- L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs : La délétion des allèles ou l'inactivation de gènes par mutation ponctuelle, permet aux cellules tumorales de bloquer le contrôle de la prolifération.

- L'acquisition d'une résistance à l'apoptose : cette propriété découle de la délétion ou de l'inactivation de gènes inducteurs de l'apoptose (Tumor Protein p53 : TP53) ou de l'expression de gènes inhibiteurs de l'apoptose tel que BCL2 (B-Cell lymphoma protein 2) et permet aux cellules tumorales d'échapper à la mort cellulaire programmée.
- Le potentiel réplcatif illimité : par le maintien des télomères.
- La stimulation de l'angiogénèse : qui conduit à la formation d'un réseau de néovaisseaux permettant l'apport en nutriments et oxygène aux cellules tumorales.
- L'acquisition d'un phénotype invasif et métastasant : conséquence de modifications des propriétés d'adhésion des cellules entre elles par inactivation des protéines d'adhésion ou par expression d'enzymes protéasiques qui dégradent la matrice extracellulaire. Les cellules tumorales ont ainsi la capacité d'envahir l'organisme.

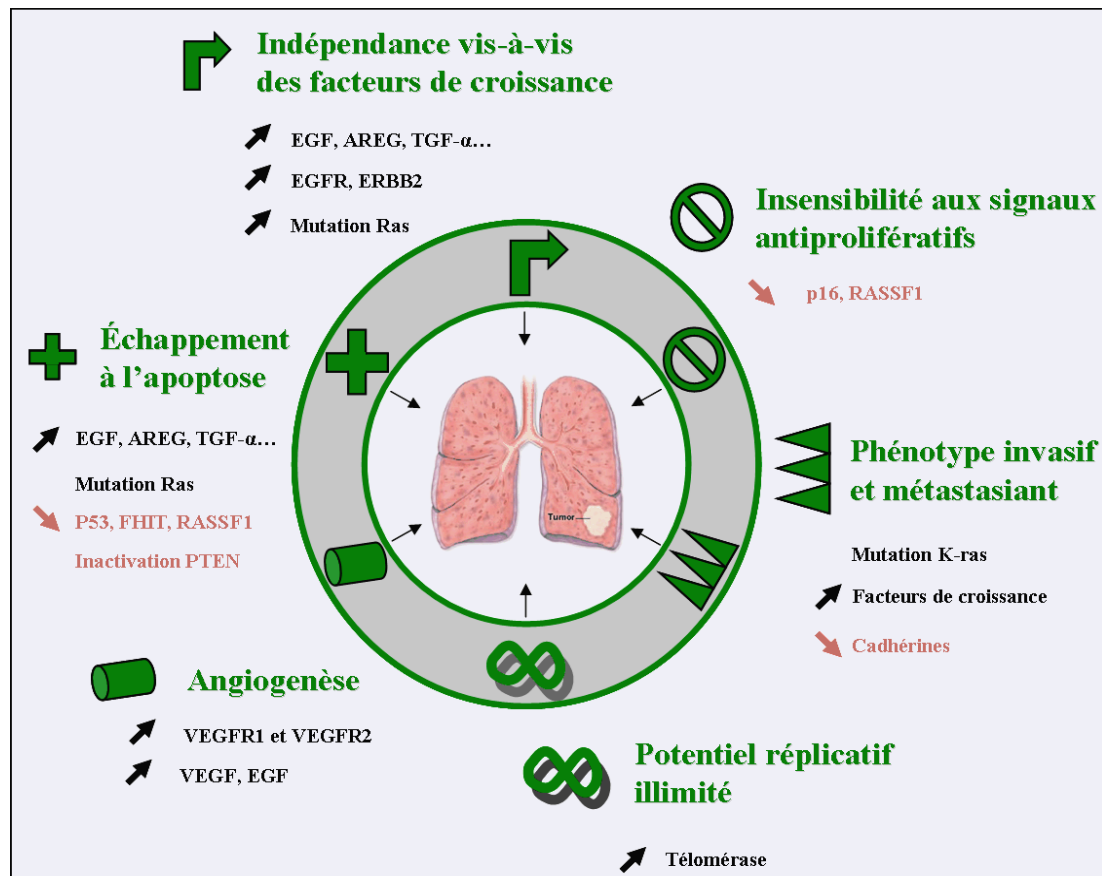


Figure 3 : Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse: exemple des CBNPC.

Il est suggéré que la plupart des tumeurs acquièrent le même ensemble de capacités fonctionnelles au cours de leur développement. En vert apparaissent les oncogènes, et en rouge les gènes suppresseurs de tumeurs. Adaptée d'après (Hanahan et al. 2000).

3.1.2. Anomalies moléculaires dans le cancer bronchique non à petites cellules

Les oncogènes responsables de l'acquisition par les cellules de propriétés tumorales ont été largement étudiés. L'analyse génétique de plus de 10000 CBNPC dans l'étude « Biomarqueurs France » a permis de déterminer qu'environ la moitié des CBNPC était porteur d'une signature moléculaire oncogénique identifiable et de mettre en évidence les mutations les plus fréquemment retrouvées (Figure 4) [19]. Dans la population générale comme chez les patients fumeurs, l'anomalie la plus fréquente est la présence d'une mutation *KRAS* (27% des cas). Chez les non-fumeurs, l'anomalie la plus fréquemment retrouvée est la mutation de l'*EGFR* (35.2% des cas).

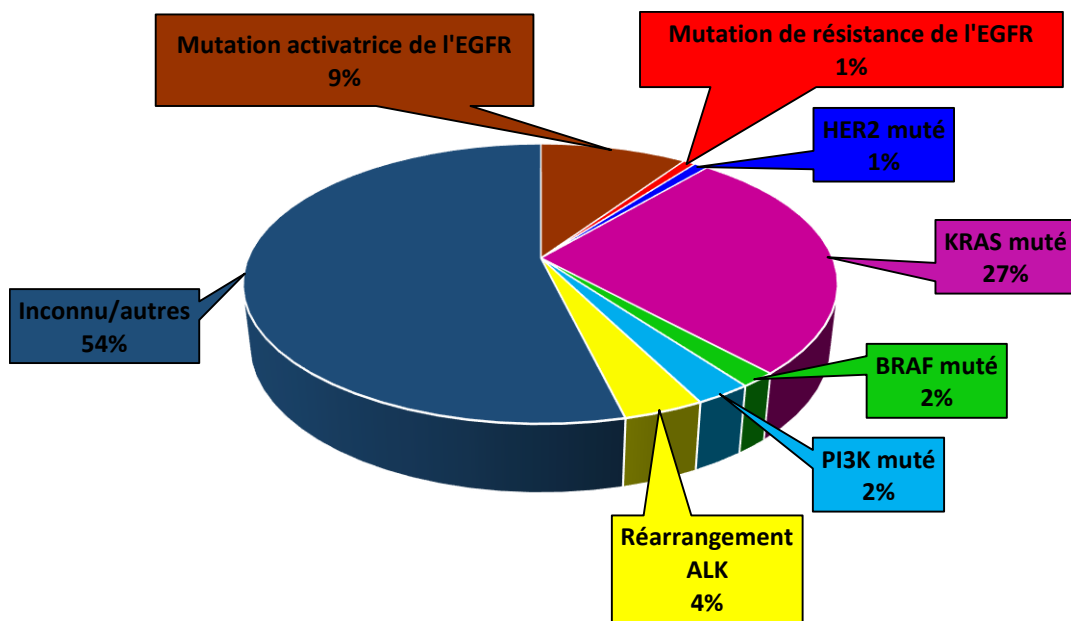


Figure 4 : Fréquence des différents types d'anomalies moléculaires dans les CBNPC.
d'après (Barlesi et al. 2013).

Mutation KRAS :

La famille *RAS* (Rat sarcoma viral oncogene homolog) comprend les gènes *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), *HRAS* (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) et *NRAS* (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) [20]. Ces protéines interviennent dans la transduction des signaux de croissance cellulaire suite à l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase membranaires (EGFR, IGF1R...) et activant en aval la voie de prolifération RAS-RAF-MEK-ERK aussi appelée voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) [21]. Les mutations de *KRAS* sont présentes dans 27% des CBNPC [19] et conduisent à une activation constitutive de la voie des MAPK et à la prolifération cellulaire [19]. Ces mutations sont associées à un mauvais pronostic [22] et prédisent la résistance aux EGFR-TKI [23]. Il est à noter que les mutations de *KRAS* sont exclusives des mutations de l'*EGFR* et de la translocation *ALK* (Anaplastic lymphoma kinase). De nombreuses stratégies thérapeutiques visant à inhiber les effecteurs situés en aval sont étudiées. On retiendra le Selumetinib, inhibiteur de MEK1/MEK2, à l'heure actuelle en phase III (SELECT-1 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01933932).

Mutation BRAF:

BRAF (B-Raf proto-oncogène, serine/threonine kinase) est une protéine de la famille des protéines RAF kinases qui, comme *KRAS*, intervient dans la voie de signalisation RAS – RAF – MEK – ERK (MAPK). La mutation de *BRAF* induit une activation constitutive de la voie MAPK. Ces mutations sont retrouvées dans 2% des CBNPC [19] et principalement dans les adénocarcinomes. Des inhibiteurs de BRAF (comme le dabrafenib ou le vemurafenib) ont été développés et sont utilisés en clinique dans le mélanome chez les patients porteur de la mutation. Une étude de phase II (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01336634) évalue l'effet des inhibiteurs de BRAF dans les CBNPC *BRAF* mutés.

Mutation des récepteurs de la famille ERBB :

La famille récepteurs ERBB (v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), encore appelé HER (Human epidermal growth factor receptor), comprend quatre récepteurs à activité tyrosine kinase : ERBB1/HER1 ou EGFR, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 et ERBB4/HER4.

L'activation de ces récepteurs par leurs ligands induit la signalisation cellulaire à travers les voies de prolifération et de survie MAPK, PI3K (phosphoinositide 3-kinase), STAT (Signal transducer and activator of transcription) et PLC γ (phospholipase C-gamma).

Les mutations de l'*EGFR* portent sur le domaine tyrosine kinase du récepteur et conduisent à l'autophosphorylation, l'activation constitutive du récepteur et ainsi à l'activation des voies de signalisation en aval [24, 25]. Les mutations activatrices de l'*EGFR* sont présentes dans environ 10%-15% des CBNPC. Elles sont le plus souvent retrouvées chez la femme, les non-fumeurs (dans 30% des cas), chez les patients d'origine asiatique et dans les adénocarcinomes [19, 26]. Les deux mutations activatrices les plus fréquentes sont une délétion touchant la séquence conservée de 4 acides aminés LREA dans l'exon 19 et la séquence L858R de l'exon 21 [27-29]. Les mutations de l'*EGFR* sont exclusives des mutations de *KRAS* et de la translocation *ALK*. On retrouve également des mutations de résistance telle que la mutation T790M retrouvée d'emblée chez 5 % des patients et dans 50 à 60% des cas de résistances acquises aux EGFR-TKI [30]. Nous présenterons dans les paragraphes 3 et 4 les EGFR-TKI utilisés pour inhiber l'activité de l'*EGFR* dans le CBNPC. Aujourd'hui 3 EGFR-TKI sont sur le marché (gefitinib, erlotinib, afatinib).

HER2 a la capacité de former des dimères avec l'*EGFR*. On retrouve une mutation d'*HER2* dans environ 2% des CBNPC, plus généralement chez la femme, le patient non-fumeur et dans les adénocarcinomes [19]. Les mutations d'*HER2* conduisent à une activation constitutive du domaine tyrosine kinase du récepteur et une activation des voies de signalisation en aval (PI3K, MAPK). L'hétérodimère EGFR/ERBB2 possède la plus grande capacité à induire la transformation cellulaire et la mitose [31]. Des inhibiteurs inhibant plusieurs membres de la famille HER (panHER) sont en cours d'évaluation (clinicalTrials.gov Identifiers: NCT01121575)

Translocation ALK:

ALK est un récepteur membranaire à domaine tyrosine kinase. La translocation d'*ALK* consiste généralement en une inversion du bras court du chromosome 2, aboutissant à la formation du gène de fusion *EML4-ALK* (echinoderm microtubule-associated protein-like 4 -anaplastic lymphoma kinase) et à l'activation constitutive de la protéine ALK, avec stimulation des voies de signalisation en aval (PI3K, STAT3, JAK2) [32]. Cette translocation est impliquée dans la croissance et la prolifération dans 3 à 7% des CBNPC. [19, 33, 34]. On la retrouve de manière

préférentielle chez les patients jeunes, non-fumeurs et dans les adénocarcinomes [34]. Un inhibiteur (le crizotinib) est aujourd'hui indiqué dans la prise en charge des patients porteurs de cette translocation [33].

Autres anomalies moléculaires:

D'autres anomalies généralement retrouvées dans moins de 1% des cas, ont été décrites dans les CBNPC. On retrouve les translocations de *ROS1* (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS), des mutations de *PI3K*, une amplification de *MET* (Met proto-oncogene tyrosine kinase (hepatocyte growth factor receptor), ou des mutations de *NRAS*. [19]. Des essais cliniques évaluant des molécules agissant sur ces cibles sont en cours (clinicalTrials.gov Identifiers: NCT01911325, NCT01820325, NCT01121575).

Des modifications de gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes conduisant à une perte d'expression normale sont également impliquées dans le développement des tumeurs malignes [35]. Ces gènes sont responsables de la régulation négative du cycle cellulaire et induisent l'apoptose. Leur inactivation va entraîner un dérèglement de ces mécanismes et une évolution tumorale. Contrairement aux proto-oncogènes, une altération des 2 allèles est nécessaire à l'obtention d'une perte d'activité. Parmi les principaux gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans les CBNPC on retrouve *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog), *P53* (protein 53), *P16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *FHIT* (Fragile histidine triad gene), *RASSF1* (Ras association domain family member 1), *RAR β* (Retinoic acid receptor) [36] (Figure 3).

3.2. Prise en charge thérapeutique des CBNPC

3.2.1. Diagnostic des cancers bronchiques non à petites cellules

Les signes cliniques rencontrés chez les patients atteints de cancers ne sont pas toujours présents, ni spécifiques de la pathologie cancéreuse pulmonaire. Le diagnostic peut parfois se faire de manière fortuite lors d'examens médicaux ou biologiques. Le diagnostic se fait en général sur la recherche de facteurs de risque (tabac, exposition professionnelle...), l'examen clinique et le bilan d'imagerie (radiographie du thorax et scanner thoracique avec injection). Le plus souvent, le cancer broncho-pulmonaire sera évoqué devant la présence ou la persistance

de symptômes respiratoires (toux, dyspnée, hémoptysie, etc.), en particulier chez un fumeur ou un ancien fumeur. D'autres signes doivent également faire penser à un cancer broncho-pulmonaire comme les signes liés à la présence des métastases, l'altération de l'état général, une douleur thoracique, la dysphonie, un œdème de la base du cou...

Le diagnostic final de cancer broncho-pulmonaire repose sur l'examen anatomopathologique de la tumeur après biopsie. Il précisera le type histologique de la tumeur (CBPC ou CBNPC) et le sous-type histologique dans le cas des CBNPC (adénocarcinome, carcinome épidermoïde, et carcinomes à grandes cellules). En cas de carcinome non épidermoïde les mutations de l'*EGFR*, les translocations ou inversions du gène codant pour l'*EML4 - ALK* ou la présence de mutations *KRAS*, *BRAF*, *HER2*, *PI3KCA* seront recherchées.

Enfin un bilan d'extension, qui précisera la taille et l'extension locorégionale de la tumeur (T), la présence de métastases ganglionnaires (N) ou de métastases thoraciques ou extra-thoraciques (M), sera réalisé et permettra de préciser le stade. La prise en charge thérapeutique variera en fonction du stade et des mutations retrouvées :

3.2.2. Stades I et II

La prise en charge des stades I et II repose sur la chirurgie d'exérèse quand celle-ci est possible. Un bilan préopératoire est réalisé. Le geste repose au minimum sur la lobectomie avec curage ganglionnaire hilair et médiastinal. L'étendue de l'exérèse variera en fonction de la topographie de la tumeur, de sa taille et de l'envahissement ganglionnaire. Dans le cas d'une exérèse complète, la chirurgie pourra être complétée par une chimiothérapie adjuvante ou une radiothérapie médiastinale. Le taux de survie à 5 ans après résection complète de la tumeur est de 70%.

En cas d'exérèse incomplète, une reprise chirurgicale ou un traitement par radiothérapie et/ou chimiothérapie est indiqué.

Dans le cas des patients non opérables, le plus souvent du fait de comorbidité, la radiothérapie est indiquée et peut être associée à la chimiothérapie.

3.2.3. Stade III

L'attitude thérapeutique dépendra de la possibilité de résection complète de la tumeur. La discussion de résécabilité ne concerne que les stades IIIa, les stades IIIb étant jugés inopérables, et se fera sur l'étude de l'envahissement ganglionnaire (T3/4- N0/1).

Chez les patients opérables, la prise en charge consiste en 2 à 4 cycles de chimiothérapie à base de sels de platine suivis d'une chirurgie d'exérèse avec un curage ganglionnaire hilair et médiastinal complet ou en la chirurgie suivie d'une chimiothérapie postopératoire.

Chez les patients non opérables, la prise en charge consiste en une association de chimiothérapie et de radiothérapie (2 à 4 cures à base d'un sel de platine, associée à une radiothérapie à une dose totale de 66 Gy). Les protocoles de chimiothérapie retrouvés sont classiquement cisplatine et vinorelbine, cisplatine et étoposide, ou carboplatine et paclitaxel.

3.2.4. Stade IV

La prise en charge des CBNPC métastatiques a considérablement évoluée ces dernières années. La première étape consiste aujourd'hui à rechercher une signature moléculaire sensible à une thérapie ciblée : les mutations de l'*EGFR*, de *KRAS*, la translocation d'*ALK*, les mutations de *BRAF*, les mutations d'*HER2*, les mutations de *PI3K*. Dans la prise en charge on distingue les carcinomes non épidermoïdes des carcinomes épidermoïdes

Pour les carcinomes non épidermoïdes, en cas de mutations de l'*EGFR* le traitement de première intention sera des EGFR-TKI (gefitinib, erlotinib, afatinib). Ces traitements sont aussi indiqués en cas de contre-indication à la chimiothérapie, lorsque la recherche de mutations est impossible et en présence de facteurs pronostics des mutations activatrices de l'*EGFR* (femme, non-fumeur, d'origine asiatique, adénocarcinome). En absence de mutation de l'*EGFR*, plusieurs schémas de chimiothérapie sont possibles. Il s'agit généralement de 4 à 6 cures d'une bithérapie à base de sels de platine.

Pour les carcinomes épidermoïdes, la prise en charge sera systématiquement la chimiothérapie. Là encore, une bithérapie à base de sels de platine est généralement proposée. A l'issue de ces protocoles, l'évaluation de l'état d'avancement de la maladie aura lieu.

Pour les patient stabilisés ou ayant répondu, un traitement de maintenance sera proposé basé sur le fait que le nombre de cycles possibles en 1^{ière} ligne est limité par la toxicité des sels de platine. Deux stratégies sont envisageables :

- Chez les patients avec une bonne condition physique (score de performance 0 ou 1) un des médicaments utilisés en première ligne sera poursuivi.
- Pour les autres, une autre molécule de chimiothérapie que celle utilisée lors de l'induction sera utilisée

Les molécules utilisées en traitement de maintenance sont le bevacizumab (un anticorps anti-VEGF, si utilisé en première ligne) l'erlotinib (dans les formes stabilisées) et le pemetrexed (agent antinéoplasique antifolate). Ces molécules sont utilisées jusqu'à la toxicité ou la progression.

Pour les patients en progression après la première ligne de traitement, une deuxième ligne de traitement sera proposée.

- En l'absence de mutation activatrice de l'*EGFR* et de réarrangement d'*ALK* la chimiothérapie dépendra des molécules utilisées auparavant. On utilisera du docetaxel, du pemetrexed (uniquement pour les cancers bronchiques non épidermoïdes) ou de l'erlotinib.
- En présence de mutations activatrices de l'*EGFR* la deuxième ligne consistera en une chimiothérapie à base de sel de platine.
- En cas de translocation *ALK* une chimiothérapie par sels de platine et pemetrexed suivie d'une maintenance par pemetrexed est le standard en première ligne. En cas d'évolution ou de toxicité, un traitement par crizotinib est indiqué à partir de la deuxième ligne.

4. La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) dans les cancers bronchiques non à petites cellules

Aujourd'hui les EGFR-TKI sont des molécules clés dans la prise en charge des CBNPC métastatiques chez les patients porteurs d'une mutation activatrice de l'*EGFR*. Toutefois même si ces molécules représentent un réel progrès, seulement 10 à 15% des patients sont porteurs de mutation de l'*EGFR*, les autres patients restant insensibles à ces thérapies [19, 26]. De plus, après 10 mois tous les patients ayant répondu aux EGFR-TKI développeront une résistance acquise à ces traitements [37]. Devant ce constat, de nombreuses équipes cherchent à comprendre les mécanismes cellulaires mis en jeu dans la résistance aux EGFR-TKI de manière à améliorer la réponse et le pronostic des CBNPC.

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser à l'EGFR et son implication dans le développement tumoral pulmonaire. Nous présenterons les thérapies ciblées anti-EGFR, en nous focalisant sur les EGFR-TKI, leur mode d'action ainsi que les principaux mécanismes impliqués dans la résistance à ces traitements.

4.1. Le récepteur au facteur de croissance épidermique : l'EGFR

4.1.1. La famille des récepteurs ERBB et leurs ligands

L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDaltons à activité enzymatique de type tyrosine kinase faisant partie des récepteurs de la famille HER, encore appelé ERBB. Chez les mammifères, cette famille comprend quatre récepteurs: ERBB1/HER1 ou EGFR, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 et ERBB4/HER4.

L'EGFR fut le premier représentant de cette famille découvert [38]. Les récepteurs ERBB sont composés de trois domaines (Figure 5) :

Un domaine extracellulaire contenant le site de liaison pour le ligand [39]. Ce domaine extracellulaire est composé de 4 sous-domaines (I à IV) répétés 2 à 2, se succédant en alternance. Les domaines I et III sont analogues à ceux de l'IGF1R (l'Insulin-like Growth Factor type-1 Receptor) et sont le siège de la fixation du ligand, d'où leur dénomination L1 et L3. Les domaines II et IV augmentent l'affinité de liaison entre deux récepteurs de la famille ERBB pour former un dimère stable.

Un domaine transmembranaire hydrophobe de 24 acides aminés qui permet l'encrage dans la membrane cellulaire [40].

Un domaine intracellulaire (ou cytoplasmique) qui contient le domaine catalytique tyrosine kinase très conservé entre les différents récepteurs de la famille ERBB (59 à 81% d'homologie), un domaine juxta-membranaire et une longue queue C-terminale [41]. Le domaine juxta-membranaire joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité des récepteurs ERBB [40]. La queue c-terminale possède cinq sites de phosphorylation liant spécifiquement les protéines contenant les domaines SH2 (Src Homology domain 2) ou PTB (Phospho Tyrosine Binding), au moins trois motifs d'internalisation, et également des sites pour l'activation protéolytique et la dégradation [40].

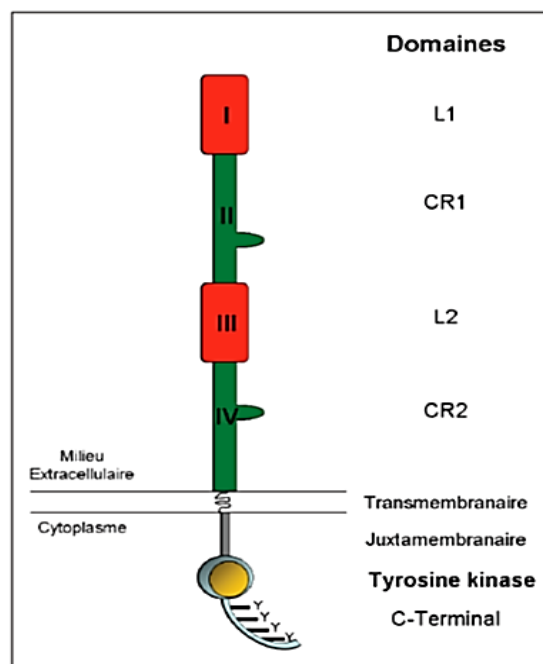


Figure 5 : Structure générale des récepteurs ERBB.

Les récepteurs ERBB comportent une partie extracellulaire composée de 4 domaines, homologues deux à deux, (les domaines L1 et L2 (I et III), sont le siège de la fixation du ligand). On retrouve ensuite un domaine transmembranaire, un domaine juxtamembranaire suivi du domaine tyrosine kinase et le domaine C-terminal qui peut être phosphorylé sur plusieurs résidus tyrosine (Y). Adaptée d'après (Burgess et al. 2003).

L'activation des récepteurs de la famille ERBB se fait par fixation de ligands spécifiques sur le domaine extracellulaire. Ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires, qui sont clivés par des métalloprotéases de la famille ADAM (A Disintegrin and Metalloproteinase domain) en réponse à divers stimuli [42]. Dix ligands partageant une séquence EGF-like de 55 acides aminés ont été recensés [43]. Ils sont regroupés en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs de la famille ERBB [44, 45] (Figure 6):

- *Les ligands spécifiques de l'EGFR* : l'EGF (Epidermal growth factor), le TGF- α (Transforming growth factor-alpha) et l'AREG (Amphiréguline)
- *Les ligands de l'EGFR et ERBB4* : la BTC (Betacelluline), le HB-EGF (l'Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) et l'EPR (l'Epiréguline)
- *Les neurégulines (NRG)* : divisées en deux sous-groupes
 - NRG-1 et NRG-2 qui lient ERBB3 et ERBB4
 - NRG-3 et NRG-4 qui lient seulement ERBB4.

A l'heure actuelle aucun ligand de ERBB2 n'a été identifié [46].

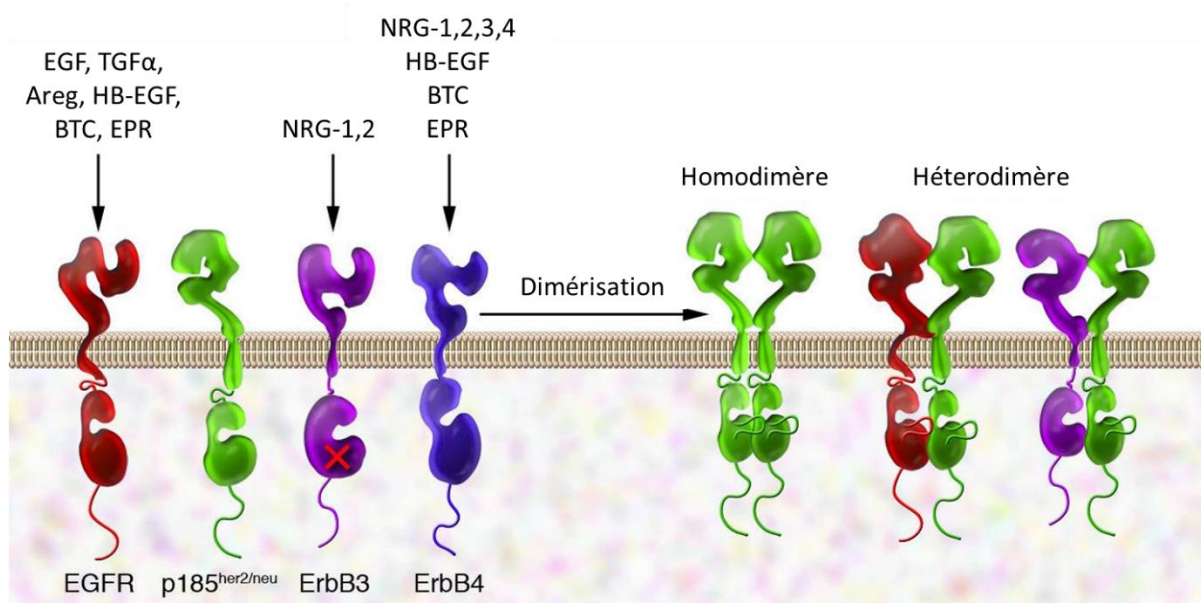


Figure 6 : Les différents récepteurs ERBB et leurs ligands.

Les récepteurs de la famille ERBB présentent des homologies de structure sur leur domaine extracellulaire et tyrosine kinase. Aucun ligand d'ERBB2 n'a été identifié et le domaine tyrosine kinase d'ERBB3 n'est pas actif. Des exemples d'homodimères et d'hétérodimères sont également présentés. Adaptée d'après (Zhang et al. 2007).

4.1.2. Activation des récepteurs ERBB et signalisation cellulaire

En absence des ligands, les récepteurs ERBB sont sous forme de monomères inactifs repliés sur eux par liaison entre les domaines II et IV. La fixation des ligands sur les domaines I et III entraîne une modification de conformation. Le domaine II se lie à un homologue d'un autre monomère et forme un dimère actif [48](Figure 7).

On distingue plusieurs types de dimères : les homodimères composés de deux sous-unités ERBB identiques et les hétérodimères composés de deux monomères différents (Figure 6). Dix dimères différents, dont 8 hétérodimères, ont ainsi été recensés (Figure 8). L'hétérodimère EGFR/ERBB2 possède la plus grande capacité à induire la transformation cellulaire et la mitose [31]. L'EGFR peut aussi s'hétérodimeriser avec d'autres types de récepteurs. L'hétérodimère EGFR/IGF1-R a été décrit comme étant impliqué dans la résistance aux EGFR-TKI [49, 50].

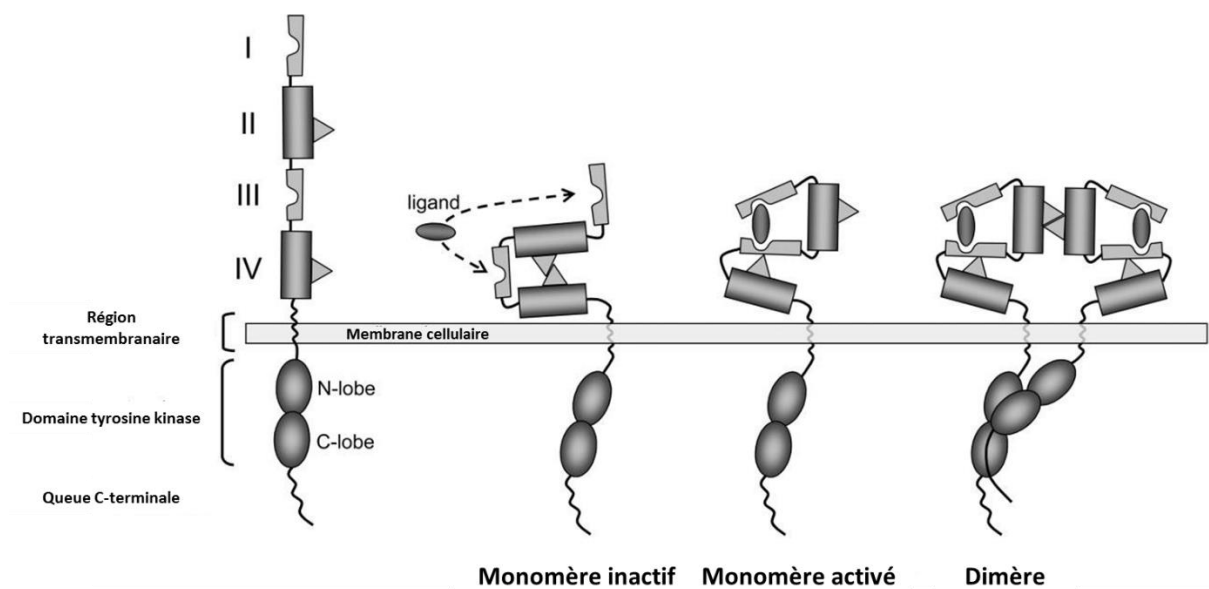


Figure 7 : Modifications conformationnelles des récepteurs ERBB conduisant à la formation des dimères actifs. En l'absence de ligand le domaine extracellulaire est replié sur lui-même par interaction entre les domaines II et IV (monomère inactif). Les ligands des récepteurs HER lient les domaines I et III entre eux conduisant à l'exposition du domaine II (monomère actif) qui pourra ainsi interagir avec son homologue sur un autre monomère et provoquer la formation d'un dimère. Adaptée d'après (Sergina et al. 2007).

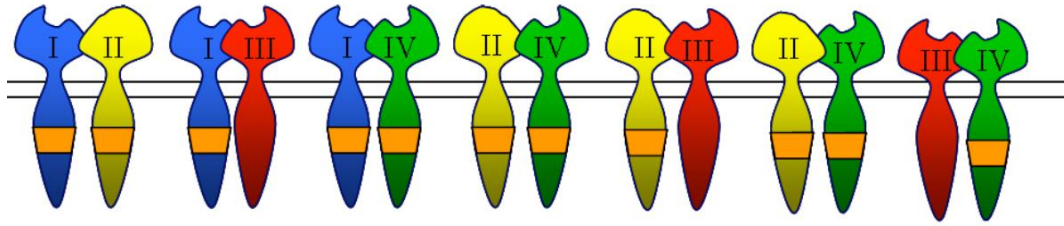


Figure 8 : Représentation des différents hétérodimères de récepteurs ERBB.

La dimérisation des récepteurs entraîne l'autophosphorylation des résidus tyrosine au niveau de leur extrémité C-terminale intracellulaire, qui permet le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs protéiques [45, 51]. Ces effecteurs sont des protéines adaptatrices (SHC (Src homology 2 domain containing), CRK (v-crck sarcoma virus CT10 oncogene homolog), GRB2 (Growth factor receptor bound protein 2)) ou des kinases (SRC (Sarcoma, Rous sarcoma oncogene)) qui, grâce à leurs domaines SH2 ou PTB, se lient au site d'autophosphorylation des récepteurs ERBB, où elles seront à leur tour phosphorylées. Ceci est le point de départ de l'activation de voies de signalisation intracellulaires *via* des cascades de phosphorylation [51] (Figure 9). L'activation de ces voies de signalisation cellulaires induit des facteurs de transcription, régulant ainsi l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la mobilité cellulaire, la différenciation, l'adhésion ou la prolifération [52]. La voie de signalisation engagée dépend de la durée d'activation du récepteur, du ligand et du dimère formé. Les principales voies mises en jeu par l'EGFR sont :

- La voie RAS/MAPK, impliquée dans la prolifération et différenciation cellulaire, et activée par le recrutement de la protéine adaptatrice GRB2 ou SHC
- la voie PI3K qui joue un rôle dans la régulation de l'apoptose *via* AKT, activée par le recrutement de p85
- La voie STAT3, impliquée dans la prolifération, l'apoptose et l'angiogenèse [45]

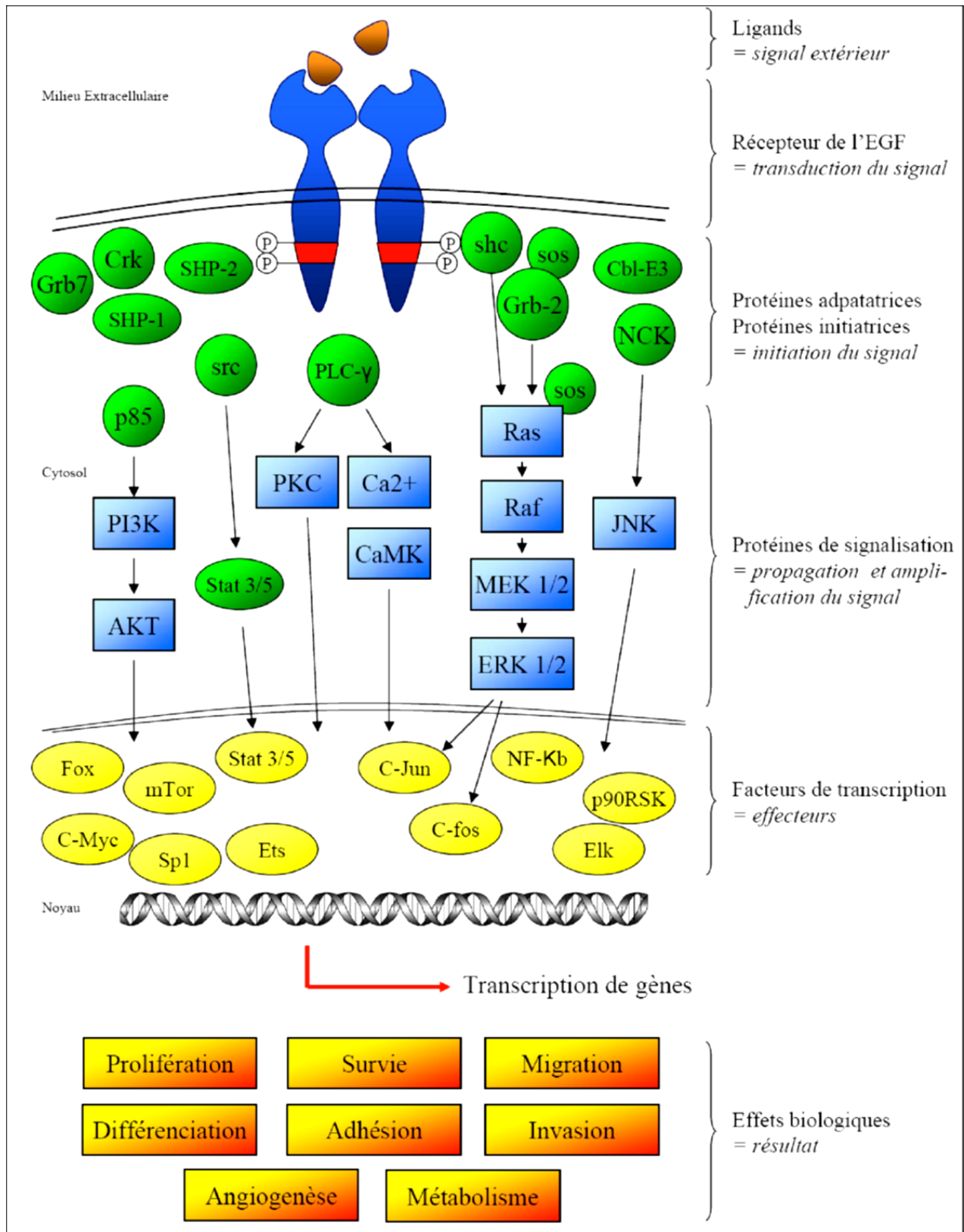


Figure 9 : Représentation schématique de la distribution de l'information issue de l'activation de l'EGFR.

4.1.3. Rôles l'EGFR dans les cancers du poumon

4.1.3.1. Rôles physiologiques

Les voies de signalisation activées par l'EGFR jouent un rôle dans la différenciation, la croissance ou encore le contrôle du métabolisme cellulaire. Des effets anti-apoptotiques ont également pu être mis en évidence [53]. L'EGFR intervient également dans le renouvellement de cellules souches de tissus tels que le foie, la peau ou les intestins.

D'autre part, son rôle dans le développement embryonnaire a été mis en évidence. Une perte de l'EGFR entraîne une mort embryonnaire ou périnatale avec des malformations dans divers organes comme le cerveau, la peau, les poumons, les intestins [51]. Des souris Knock Out (KO), pour le gène de l'EGFR présentent un retard du développement embryonnaire et un taux de mortalité élevé souvent dû à des problèmes respiratoires entre 8 et 21 jours après la naissance. Elles présentent également des signes de prématurité, des dysfonctionnements cérébraux, ainsi que de nombreuses anomalies épithéliales de la peau, des poumons, du tractus gastro-intestinal et des reins [54-56].

4.1.3.2. Rôles de l'EGFR dans les cancers du poumon

L'EGFR contribue au développement tumoral *via* ses effets sur la progression dans le cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et l'induction de l'angiogenèse [57]. Des dérégulations des voies de l'EGFR sont fréquemment retrouvées dans différentes formes de cancer humain [58, 59] et font intervenir plusieurs mécanismes :

- *La surexpression de l'EGFR* : présente dans 60 à 80% des cas de CBNPC [60, 61], est le fait d'une amplification génique (dans 30 à 50% des cas) ou de phénomènes post-traductionnels, et est à l'origine d'une prolifération et une migration cellulaire incontrôlées. Dans les CBNPC, la surexpression de l'EGFR a été mise en relation avec l'agressivité tumorale [62, 63], une plus grande incidence des métastases ganglionnaires et un mauvais pronostic [64, 65].

- *La surexpression autocrine des ligands de l'EGFR* (le TGF α , l'EGF, l'AREG) par la tumeur, aboutit à une activation constitutive du récepteur [66]. Ce mécanisme est fréquemment retrouvé dans les tumeurs solides, y compris du poumon [67]
- *L'activation constitutive de l'EGFR indépendamment de ses ligands par l'intermédiaire de mutations de l'EGFR*. Ces mutations, peuvent toucher indifféremment le domaine extracellulaire, le domaine intracellulaire ou encore le domaine tyrosine kinase. Comme nous l'avons vu, dans les CBNPC les deux mutations les plus fréquentes touchent le domaine tyrosine kinase (une délétion touchant la séquence conservée de 4 acides aminés LREA dans l'exon 19 et une mutation ponctuelle L858R de l'exon 21) [27-29] et sont responsables de son activation constitutive [24, 25]. Elles sont présentes chez 10 % des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire [19].

4.2. Les thérapies anti-EGFR : les EGFR-TKI

Devant le rôle clé que joue l'EGFR dans la carcinogénèse bronchique, des thérapies visant à bloquer sa signalisation ont été développées. A l'heure actuelle deux grandes familles de molécules ciblant l'EGFR sont disponibles sur le marché: les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de la tyrosine kinase du récepteur.

4.2.1. Les anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR

Les anticorps monoclonaux anti-EGFR, avec le cetuximab (ERBITUX®) et le panitumumab (VECTIBIX®), se fixent sur la partie extracellulaire de l'EGFR et entrent en compétition avec la fixation du ligand. Ils bloquent ainsi la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur et par conséquent inhibent les voies de signalisation [68] et induisent l'internalisation du récepteur.

Le cetuximab et le panitumumab sont indiqués dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique avec gène *RAS* de type sauvage et exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Le cetuximab est également indiqué dans le traitement des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou. Pour l'instant ces molécules n'ont pas obtenu l'AMM (autorisation de mise sur le marché) dans le traitement de CBNPC. Le bénéfice de l'association des anticorps monoclonaux anti-EGFR aux chimiothérapies dans la prise en charge de CBNPC est en cours d'évaluation.

4.2.2. Les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI),

La famille des TKI (inhibiteurs de tyrosine kinase) englobe une grande quantité de molécules qui sont aujourd'hui utilisées dans différents cancers. Le premier TKI utilisé pour la thérapie du cancer était l'imatinib dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, ciblant la kinase de la protéine de fusion BCR-ABL (Breakpoint cluster region-Abelson), née de la translocation (9;22) [69].

Dans le CBNPC 4 TKI sont aujourd'hui disponibles : l'erlotinib, le gefitinib, l'afatinib ciblant l'EGFR et le crizotinib utilisé en deuxième ligne de traitement chez les patients porteurs de la translocation *ALK*. Ces traitements ont apporté un réel bénéfice thérapeutique et toutes les études comparant leur utilisation aux chimiothérapies ont montré une amélioration de la survie sans progression de 3 à 9 mois [70, 71]. L'afatinib augmenterait de 10 mois la survie globale [72]. De plus ces thérapies améliorent grandement la qualité de vie des patients du fait de leur moindre toxicité et de leur action anti-tumorale rapide. La prise du traitement en ambulatoire évite également une hospitalisation souvent lourde pour les patients.

Les EGFR-TKI empêchent la fixation de l'ATP au sein de la poche à ATP du récepteur. L'ATP sert de fournisseur de groupements phosphate dans l'étape de phosphorylation des différents substrats. La phosphorylation de l'EGFR et des molécules adaptatrices est bloquée ainsi que les cascades de signalisation conduisant à un arrêt du cycle cellulaire, voire à l'apoptose des cellules tumorales. On distingue aujourd'hui 3 générations d'EGFR-TKI. La fixation à la poche à ATP des molécules de première génération est réversible tandis que pour la deuxième et la troisième génération la fixation est covalente et irréversible [73].

4.2.2.1. Les EGFR-TKI de 1^{er} génération

Les EGFR-TKI de première génération ont pour structure commune le pharmacophore 4-anilinoquinazolines. Les premières études menées *in vitro* sur ce noyau montraient la capacité du pharmacophore à inhiber l'activité tyrosine kinase de l'EGFR ainsi que la prolifération cellulaire [74]. Par la suite des études de relation structure/activité du noyau quinazoline permirent d'améliorer les propriétés physico-chimiques, l'activité pharmacologique et de réduire l'instabilité métabolique des molécules (Figure 10). Cependant, la spécificité pour la kinase de l'EGFR n'est pas parfaite, une centaine d'autres tyrosine kinases intracellulaires pouvant être ciblées [75, 76].

Ces travaux ont conduit au développement du gefitinib (IRESSA®) et de l'erlotinib (TARCEVA®)

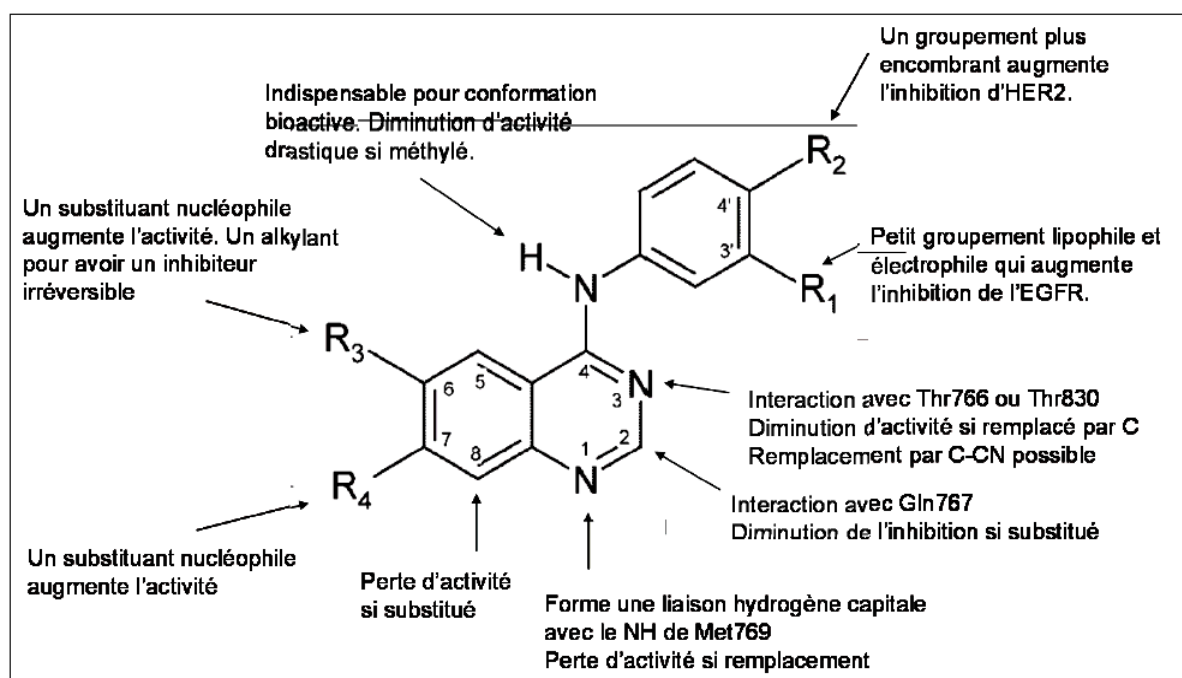


Figure 10 : Présentation de la relation structure-activité des 4-anilinoquinazolines.

Adaptée d'après (Fry et al. 2003).

- Le gefitinib

Mok et al. démontraient en 2009, dans un essai de phase III comparant une chimiothérapie par carboplatine/paclitaxel à un traitement par gefitinib en première ligne chez une population de CBNPC de stade IV, que chez les patients avec mutation d'*EGFR* la survie sans progression était plus longue dans le bras gefitinib que dans le bras chimiothérapie. A l'inverse chez les patients sans mutation, la survie sans progression était plus longue dans le bras chimiothérapie [78].

Le gefitinib (ZD 1839, IRESSA®) est maintenant indiqué en première ligne de traitement chez l'adulte dans le traitement du CBNPC localement avancé ou métastatique avec une mutation activatrice de l'*EGFR*. La posologie recommandée d'IRESSA® est de un comprimé de 250 mg une fois par jour.

Les études pharmacocinétiques chez le volontaire sain âgé de 18 à 62 ans ont montré un pic plasmatique (C_{max}) entre 3 et 7h après l'administration, avec une élimination complète à 28 h [79]. La biodisponibilité absolue moyenne de cette molécule prise par voie orale est de 59 % chez les patients cancéreux. Le gefitinib est majoritairement excrété *via* les fèces, sous forme

métabolisée avec une élimination rénale de seulement 4% de la dose administrée. Le gefitinib est métabolisé au niveau hépatique par le CYP450 (cytochrome P450) (principalement par CYP3A4, avec un rôle mineur des CYP3A5 et CYP2D6) [80].

Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés sont chez plus de 20% des patients, une diarrhée et des réactions cutanées (éruption cutanée, acné, sécheresse cutanée et prurit). Environ 8% des patients ont eu un événement indésirable de grade 3 (menace vitale immédiate) ou 4 (décès) comme des affections pulmonaires interstitielles.

- L'erlotinib

L'erlotinib a obtenu l'AMM en première ligne de traitement suite à l'essai de phase III comparant l'effet de l'erlotinib à la chimiothérapie standard en première ligne de traitement chez les patients atteints de CBNPC stade IV et porteurs d'une mutation activatrice [81]. Les résultats montrent que l'erlotinib double la survie sans progression chez ces patients. L'erlotinib est aussi indiqué dans le traitement des formes localement avancées ou métastatiques du CBNPC chez les patients présentant une mutation activatrice, ou en monothérapie dans le traitement de maintenance des patients avec une maladie stable après 4 cycles d'une première ligne de chimiothérapie standard à base de sels de platine, ou après échec d'au moins une ligne de chimiothérapie. L'erlotinib est aussi indiqué en association à la gemcitabine, dans le traitement du cancer du pancréas métastatique.

Comme le gefitinib, l'erlotinib est métabolisé par le foie par les CYP3A4 et, à un moindre degré, par le CYP1A. L'élimination se fait aussi principalement par les fèces (> 90 %), avec une faible élimination rénale de l'ordre de 9 % de la dose administrée par voie orale. La demi-vie d'élimination est de 36,2 heures. La posologie quotidienne recommandée d'erlotinib est de 150 mg.

Les effets indésirables les plus fréquemment observés sont des éruptions cutanées (75%) et des diarrhées (54%), dont 9% des éruptions cutanées et 3% des diarrhées de grade 3/4.

4.2.2.2. Les EGFR-TKI de 2^{ème} génération

La seconde génération d'EGFR-TKI a été développée dans le but d'améliorer l'efficacité des EGFR-TKI de première génération et de surmonter les problèmes de résistance acquise (voir chapitre 4 « Mécanismes de résistance aux EGFR-TKI »). Les EGFR-TKI de seconde génération se lient de manière covalente et irréversible à l'EGFR. Ceci a pour effet une inhibition prolongée et irréversible du récepteur dans un contexte de cellules tumorales dépendantes de la voie de l'EGFR. L'autre caractéristique majeure de cette famille est sa capacité à inhiber plusieurs récepteurs de la famille ERBB à la fois [82]. Cette stratégie offrirait une meilleure réponse au traitement par rapport aux EGFR-TKI de première génération [73, 83]. Les principales molécules de seconde génération sont l'afatinib (GIOTRIF®), le dacomitinib et le neratinib

- L'afatinib

L'afatinib se lie de manière covalente à tous les homo - et hétérodimères formés par les membres de la famille ERBB. Une activité antitumorale significative a été démontrée *in vitro* et/ou *in vivo* dans des modèles tumoraux avec des mutations de résistances de l'EGFR (mutations T790M ou T854A) [84].

Suite à l'essai de phase III mené par Sequist et al. qui montrait la supériorité de l'afatinib par rapport à la chimiothérapie par cisplatine plus pemetrexed chez les patients porteurs de mutation activatrice de l'*EGFR*, l'afatinib a obtenu l'AMM [85]. Il est aujourd'hui indiqué en monothérapie dans le traitement des patients adultes n'ayant pas reçu préalablement d'EGFR-TKI et atteints de CBNPC localement avancé ou métastatique, qui présentent une mutation activatrice de l'*EGFR*. En l'absence d'étude comparative, sa place vis-à-vis des autres inhibiteurs de tyrosine kinase disponibles (gefitinib, erlotinib) reste à déterminer.

La posologie est de 40 mg par jour par voie orale. L'afatinib est excrété à 85,4 % dans les fèces et 4,3 % dans les urines. La demi-vie de l'afatinib est d'environ 37 heures. Les événements indésirables les plus fréquemment rapportés sont d'ordre digestif (diarrhée et stomatite de grade 3) et cutané (rash de grade 3)

- Le dacomitinib

Le dacomitinib inhibe de manière irréversible l'EGFR, ERBB2 et ERBB4, et présente une meilleure efficacité que le gefitinib ou l'erlotinib dans les cellules portant une mutation activatrice de l'*EGFR* et la mutation de résistance T790M [86]. Une étude de phase II menée sur 188 patients et comparant le dacomitinib à l'erlotinib a montré une meilleure survie sans progression dans le groupe dacomitinib que dans le groupe erlotinib (12.4 semaines contre 8.3), ainsi que dans le sous-groupe avec *KRAS* sauvage (16.1 semaines versus 8.3) [87]. Deux études de phase III sont actuellement en cours pour clarifier la supériorité du dacomitinib par rapport aux EGFR-TKI de première génération (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01774721 et NCT01360554).

- Le neratinib

Le neratinib est aussi un inhibiteur irréversible de l'EGFR et HER2 [88]. Dans les études précliniques menées sur des lignées cellulaires avec une mutation activatrice de l'*EGFR* ou une mutation de résistance T790M, le neratinib a montré une efficacité supérieure à celle du gefitinib [89]. Cependant dans l'étude de phase II menée sur 167 patients seulement 3% des patients avec un *EGFR* muté ont répondu au traitement, concluant ainsi sur un faible bénéfice du neratinib chez les patients ayant répondu ou n'ayant pas reçu précédemment d'EGFR-TKI de première génération. Aucun patient porteur de la mutation de résistance T790M n'a répondu au traitement [88]. D'autres essais évaluant l'effet du neratinib chez les patients porteurs de mutation *HER2* sont actuellement en cours (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01827267).

4.2.2.3. Les EGFR-TKI de 3^{ème} génération

Les EGFR-TKI de deuxième génération ne permettent pas de surmonter les résistances liées au développement de la mutation T790M [90, 91], ou à des doses trop toxiques pour pouvoir être utilisées en clinique [92]. De plus ces inhibiteurs peuvent conduire au développement de cette résistance *in vitro* [92] et chez les patients [93]. Ainsi les EGFR-TKI de troisième génération ont été spécifiquement développés pour le traitement de patients porteurs de la mutation de résistance acquise T790M.

Ces EGFR-TKI se fixent également de manière irréversible à l'EGFR, sont actifs sur les *EGFR* mutés et ont une faible activité chez les patients porteurs d'un *EGFR* sauvage [94]. Trois molécules sont actuellement à l'étude :

- AZD9291

Des tests précliniques *in vitro* montrent une plus forte activité de l'AZD9291 dans les cellules avec un *EGFR* muté (L858R/T790M) que dans les cellules avec un EGFR sauvage [95]. Les études menées chez la souris montrent une meilleure réponse aux EGFR-TKI de troisième génération qu'aux EGFR-TKI de première génération dans les tumeurs porteuses de mutation activatrice de l'*EGFR* [95]. La preuve de concept chez deux patients porteurs de la mutation T790M a également été apportée [95]. Une étude de phase I réalisée sur des patients ayant déjà reçu des EGFR-TKI de 1^{er} génération et étant en progression, a montré que l'AZD9291 était bien toléré avec un taux de réponse de 51%. Le taux de réponse chez les patients avec une mutation T790M est de 64% avec un taux de contrôle de la maladie de 96% [96]. Des essais de phase II et III sont en cours pour montrer l'efficacité de l'AZD9291 chez les patients en progression sous EGFR-TKI et porteurs de la mutation T790M (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02151981 ; NCT02094261)

- rociletinib

Des études précliniques ont montré une efficacité du rociletinib par rapport à l'afatinib sur les mutations L858R/T790M [97]. Des essais de phase I et II ont été réalisés. Ils n'ont pas mis en évidence de dose maximum tolérée. Les principaux effets indésirables étaient des hyperglycémies et des éruptions cutanées. La réponse chez les patients porteurs de la mutation T790M était de 58% [98]. Des essais comparant le rociletinib à l'erlotinib (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT02186301) et chez des patients porteurs de la mutation T790M (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT02147990) sont en cours.

- HM61713

Le HM61713 a montré son efficacité *in vivo* dans les modèles ayant la mutation T790M. Un essai clinique a montré une réponse totale de 21%, et de 29% chez les patients porteurs de mutation T790M [98].

4.3. Mécanismes de résistance aux EGFR-TKI

Des mécanismes de résistance primaire, ainsi que des mécanismes de résistance acquise chez les patients qui ont initialement répondu aux thérapies anti-EGFR ont été décrits :

4.3.1. Les mutations de résistance de l'*EGFR*

Les mutations T790M (sur l'exon 20), D761Y (sur l'exon 19) et les insertions dans l'exon 20 sont associées à la résistance aux EGFR-TKI [23, 24, 99-102]. La mutation T790M est située à une position clé de la poche à ATP. Cette mutation augmente l'affinité des récepteurs pour l'ATP, atténuant ainsi celle des EGFR-TKI [103]. Cette mutation est retrouvée dans 60% des patients ayant rechuté après une réponse initiale aux EGFR-TKI [100]. La fréquence des autres mutations reste assez faible.

4.3.2. Contribution d'autres récepteurs tyrosine kinase

L'amplification de MET (Met proto-oncogene tyrosine kinase), un récepteur de haute affinité pour le HGF (Hepatocyte Growth Factor), est observée dans les CBNPC [104, 105]. Elle est retrouvée chez 21% des patients présentant une résistance acquise, et 3% des patients non traités [104].

Des mutations du domaine tyrosine kinase de HER2 sont également impliquées dans la résistance aux EGFR-TKI et sont retrouvées chez 2% des patients (généralement des femmes, non-fumeurs, d'origine asiatique) [106]. Elles sont responsables d'une activation constitutive de l'EGFR, et de HER2 [107].

Le récepteur HER3 et son rôle dans l'activation de la voie PI3K interviennent également dans la résistance aux EGFR-TKI [108]. Enfin, l'IGF1R intervient également dans la résistance aux EGFR-TKI. Les mécanismes mis en jeu sont complexes et seront développés dans le paragraphe

4.3.3. Activation des voies de signalisation

La perte du gène suppresseur de tumeur *PTEN* inhibe l'apoptose chez les patients porteurs d'une mutation de l'*EGFR*, par activation d'AKT (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) et de l'EGFR. La survie sans progression et la survie totale sont significativement inférieures chez les patients porteurs d'une perte de *PTEN* [109, 110].

Des études ont également montré que les mutations de la protéine PI3K (mutation *PI3KCA*) conduisant à l'activation de la voie PI3K/AKT sont pronostiques d'une mauvaise réponse aux EGFR-TKI [110, 111].

Les mutations de *KRAS* sont retrouvées chez 20~30% des patients atteints d'un CBNPC, et induisent une activation constitutive de la protéine KRAS [112, 113]. Ces mutations sont responsables d'une mauvaise réponse au traitement et d'une faible survie après un traitement par EGFR-TKI [114]. D'autres mutations de cette voie sont impliquées dans la résistance aux EGFR-TKI comme les mutations de *BRAF* [115].

4.3.4. Inhibition des voies essentielles à l'apoptose

BIM (BCL2-Like 11) est un membre proapoptotique de la famille des protéines BCL-2 (B-Cell lymphoma protein 2) nécessaire à l'induction de l'apoptose induite par les EGFR-TKI. Des mutations de *BIM* sont responsables d'une perte d'activité proapoptotique des isoformes générées, rendant ainsi les cellules résistantes aux EGFR-TKI [116]. Cette mutation est retrouvée uniquement dans les populations originaires de l'est asiatique [117].

4.3.5. Transformation histologique

La transformation phénotypique EMT (epithelial to mesenchymal transition) fait référence à un mécanisme où les cellules épithéliales perdent leur polarité et leur pouvoir d'adhésion pour évoluer vers la cellule mésenchymateuse avec une augmentation de la mobilité, du pouvoir d'invasion et la résistance à l'apoptose [118]. Des études cliniques ont montré que ce mécanisme n'était responsable que de 5% des résistances aux EGFR-TKI [119].

Un autre mécanisme décrit est l'évolution des CBNPC en CBPC. Une étude rapporte que 14% des patients atteints de CBNPC résistent aux EGFR-TKI après transformation histologique en CBPC [119]

4.4. Coopération amphiréguline/IGF1R et résistance aux EGFR-TKI

L'équipe travaille depuis de nombreuses années sur la caractérisation des mécanismes de résistance dans les CBNPC et a mis en évidence d'importants mécanismes de résistance à l'apoptose développés par les cellules de CBNPC [120-124] mettant en jeu l'AREG, un ligand de l'EGFR et l'IGF1R. En particulier, l'équipe a montré la séquestration cytoplasmique sous une forme inactive de la protéine pro-apoptotique BAX (Bcl2-associated X protein) [125]. De plus, une voie originale de coopération entre deux facteurs de croissance : l'AREG et l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor-1) et leurs récepteurs (respectivement l'EGFR et l'IGF1R) a été identifiée dans les CBNPC [120-124]. L'AREG active l'IGF1R indépendamment de son propre récepteur l'EGFR. En retour, l'IGF1R induit la sécrétion d'IGF1 et d'AREG. Cette coopération met en jeu une voie de transduction dépendante des PKC (protéines kinases C) aboutissant à l'inactivation des protéines pro-apoptotiques BAD (Bcl2-antagonist of cell death) et BAX [120-124].

L'AREG est un facteur de mauvais pronostic dans les CBNPC de stades avancés [126]. L'AREG joue aussi un rôle autocrine anti-apoptotique dans plusieurs pathologies comme les carcinomes du sein [127], du foie [128] et du poumon [123, 124]. Elle a également été décrite comme participant à la résistance à la chimiothérapie conventionnelle (cisplatine) [129], ou à un traitement d'hormonothérapie anticancéreuse comme l'exemestane [130], dans les cancers du sein. Dans les cancers du poumon, un niveau élevé d'AREG est retrouvé chez les patients porteurs de CBNPC résistants aux EGFR-TKI [131, 132].

Sur la base de ces résultats, le laboratoire a émis l'hypothèse que l'AREG pourrait participer à la résistance aux thérapies anti-EGFR, notamment en inhibant l'apoptose induite par les EGFR-TKI. En effet, l'inhibition de l'expression de l'AREG par siRNA (Small interfering ARN) contrecarre la résistance au gefitinib et induit l'apoptose dans des adénocarcinomes pulmonaires exprimant un EGFR sauvages, qui sécrètent de grandes quantités d'AREG *in vitro* et *in vivo* [133, 134]. L'AREG contrebalance l'activité anti-tumorale du gefitinib en séquestrant la protéine proapoptotique BAX sous une forme inactive dans le cytoplasme [133, 134].

L'équipe a montré que l'AREG inactive BAX dans le cytoplasme des cellules en augmentant son interaction avec la protéine Ku70 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6) [135]. Ku70 est une protéine principalement impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, mais de nombreuses études rapportent l'implication de Ku70 dans différents processus cellulaires, y compris la résistance à l'apoptose [136]. L'AREG inhibe l'acétylation de Ku70 induite par le gefitinib, favorisant ainsi son interaction avec BAX et l'inhibition de l'apoptose [135]. Les siARN anti-AREG augmentent l'acétylation de Ku70 en réponse au gefitinib, ce qui libère BAX qui peut alors aller déclencher l'apoptose. L'utilisation d'inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi), comme le vorinostat ou la trichostatine A (TSA), potentialise l'activité anti-tumorale du gefitinib *in vitro* et *in vivo* dans des tumeurs établies chez la souris Nude, suggérant de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les CBNPC en combinant des HDACi aux EGFR-TKI [135]. (Figure 11).

Enfin, une hétérodimérisation entre EGFR et IGF1R est observée dans les cellules de CBNPC résistantes aux EGFR-TKI [49]. Au sein du laboratoire, cette interaction est observée en réponse au gefitinib uniquement dans les cellules résistantes et exprimant des taux élevés d'AREG [137], suggérant une coopération des voies de signalisation AREG/EGFR/IGF1R dans l'inhibition de l'apoptose induite par le gefitinib. En collaboration avec les cliniciens du CHU de Grenoble et de l'Hôpital Tenon (AP-HP Paris), l'équipe a étudié l'implication des voies de l'AREG et de l'IGF1R dans la résistance aux EGFR-TKI chez les patients porteurs de CBNPC. Les résultats montrent une surexpression d'IGF1R associée à la progression de la maladie chez les patients traités par gefitinib [138]. De plus, les patients avec un adénocarcinome de type mucineux, qui résiste aux EGFR-TKI [139], surexpriment l'IGF1R et l'AREG, suggérant que la surexpression d'IGF1R et AREG est associée avec la résistance des tumeurs mucineuses au gefitinib [138].

Le laboratoire a donc montré que l'AREG et l'IGF1R mettent en œuvre une voie originale de résistance aux EGFR-TKI dans les cellules de CBNPC, via des mécanismes épigénétiques, et en particulier l'acétylation. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les CBNPC en combinant des anti-AREG [133, 138], anti-IGF1R [138] ou HDACi [134] aux EGFR-TKI, notamment chez les patients résistants aux EGFR-TKI.

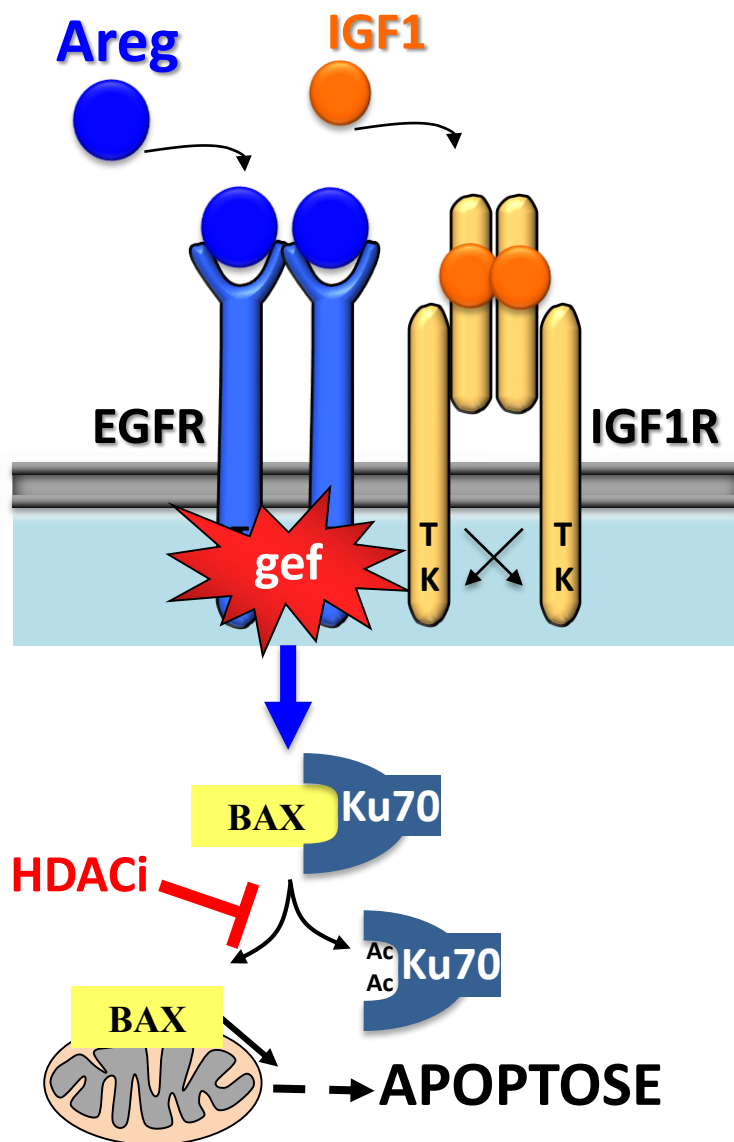


Figure 11 : Mécanisme de résistance aux EGFR-TKI, impliquant l'AREG et l'IGF1R, dans les adénocarcinomes mucineux.

Nous venons de voir que l'acétylation joue un rôle majeur dans la résistance aux EGFR-TKI induite par l'AREG et l'IGF1R. L'acétylation est impliquée dans la tumorigénèse et des HDACi sont indiqués dans la thérapie de certains cancers. Dans la partie suivante nous allons nous intéresser au rôle de l'acétylation et des HDACs (Histone déacétylase) dans la tumorigénèse, au potentiel thérapeutique des HDACi en particulier dans la prise en charge des CBNPC.

5. Acétylation et cancer

L'architecture locale de la chromatine est un facteur important de la régulation de l'expression des gènes. En effet, les changements de conformation de la chromatine, *via* des modifications post-traductionnelles des histones du nucléosome, rendent possible la fixation sur l'ADN des protéines nécessaires à la transcription. Parmi les modifications post-traductionnelles subies par les histones, on retrouve l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination et l'ADP-ribosylation [140, 141].

L'état d'acétylation du cœur d'histones résulte d'un équilibre entre l'action des HATs (histones acétyltransférases), responsable de l'acétylation des histones, et des HDACs responsables du retrait du groupement acétyle [142]. D'une manière générale, une augmentation du niveau d'acétylation des histones est corrélée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle, tandis qu'une hypo-acétylation est souvent associée à une inhibition de l'expression des gènes. [143]. La tumorigénèse est étroitement liée à des modifications épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones et les HDACs sont des acteurs majeurs de ces processus, participant ainsi au développement de la pathologie cancéreuse. Hormis les histones, ces enzymes possèdent une variété d'autres substrats intervenant dans différents processus cellulaires, tels que l'induction de l'apoptose, la réparation des dommages de l'ADN, ou le contrôle du cycle cellulaire.

Des altérations de l'acétylation et des modifications de l'expression des HDACs sont décrites dans de nombreuses lignées cellulaires et tissu tumoraux [144, 145].

5.1. Les différentes classes d'histones déacétylases

Les HDACs sont présentes chez tous les eucaryotes et catalysent le clivage du groupement acétyle des résidus ϵ -N-acétyl-lysine disposé précédemment par les HATs. Cette réaction est responsable du retour des charges positives à la surface des lysines ce qui provoque une conformation plus compacte de la chromatine par augmentation des interactions électrostatiques. Dix-huit HDACs ont été identifiées et sont divisées en 4 classes en fonction de leurs homologies de séquence avec celles de la levure et du cofacteur de la réaction.

Pour les HDACs de classes I, II et IV (HDAC1 à 11) le retrait du groupement acétyle s'opère *via* un système de transfert de charge constitué de deux histidines adjacentes, deux acides aspartiques et d'une tyrosine. L'élément essentiel de ce transfert de charge est un atome de zinc

(Zn²⁺), qui sera immobilisé sur un site de fixation du zinc en dessous de la poche catalytique [146, 147]. Les HDACs de classe I sont ubiquitaires et sont localisées dans le noyau. L'expression des HDACs de classes II et IV dépend du tissu. Ces enzymes sont localisées à la fois dans le noyau et le cytoplasme pour les classes I, IIa et IV, ou uniquement dans le cytoplasme pour la classe IIb [145].

Les HDACs de classe III, aussi appelées sirtuines (SIRT1 à 7), font intervenir le clivage d'une liaison de haute énergie du nicotinate adénine dinucléotide (NAD). Une molécule de NAD et une molécule d'acétyl-lysine sont catalysées en une molécule de lysine déacétylée, une molécule de nicotinamide et un O-acétyl-ADP-ribose [148]. Le profil d'expression tissulaire des sirtuines est complexe et leur localisation cellulaire varie en fonction des membres [145].

Les principales classes d'HDAC, leurs rôles physiologiques ainsi que leurs partenaires cellulaires sont résumés dans la figure 12.

5.2. Histones déacetylases et le cancer du poumon

Nous présenterons ici les principales données de la littérature reliant les HDACs à la tumorigénèse pulmonaire.

5.2.1. Les HDACs de classe I et II

Les HDAC1, HDAC3 ou HDAC6 sont surexprimées dans les CBPNC [149-151] en corrélation avec un mauvais pronostic. A l'inverse, HDAC5 et HDAC10 sont sous-exprimées dans les CBNPC, et cette diminution d'expression est corrélée avec un mauvais pronostic [152, 153].

Des HDACs sont impliquées dans les processus de tumorigénèse. Par exemple, l'expression d'HDAC9 dans des lignées cellulaires de CBNPC inhibe la croissance cellulaire [154]. A l'inverse la suppression d'HDAC2 induit *in vitro* l'apoptose et *in vivo* inhibe la croissance tumorale [155].

Classe de HDAC et localisation tissulaire		Homologue chez la levure	Cofacteur de la réaction	membres	Localisation subcellulaire	Partenaires non histones connus	Rôles physiologiques
Classe I (Ubiquitaire)		Rpd3	Zn2+	HDAC1	Noyau	P53, STAT3, YY1, récepteur à l'androgène et à l'œstrogène, SHP, MyoD, E2F	Survie cellulaire et prolifération
				HDAC2		STAT3, YY1	Survie cellulaire, résistance à l'insuline
				HDAC3		SRY, STA3, YY1, SHP, GATA1, GATA2, RelA	Survie cellulaire et prolifération
				HDAC8			Prolifération cellulaire
Classe II (Tissu spécifique)	IIa	Hda1	Zn2+	HDAC4	Noyau et cytoplasme	GATA1	Régulation de la néoglucogenèse
				HDAC5		GATA1	Régulation de la néoglucogenèse, fonctionnement cardiovasculaire, métabolisme des cardiomyocytes et des cellules endothéliales
				HDAC7			Différentiation des thymocytes, fonctionnement des cellules endothéliales, glycogenèse
				HDAC9			Recombinaison homologue, différenciation des thymocytes fonctionnement cardiovasculaire
	IIb			HDAC6	Cytoplasme	SHP,α-tubuline, Hsp90, Ku70, cortactine, p21WAF1	Mobilité cellulaire, contrôle de la dynamique du cytosquelette
				HDAC10			Recombinaison homologue, survie cellulaire
Classe IV (Tissu spécifique)		Rpd3	Zn2+	HDAC11	Noyau et cytoplasme		Immunomodulation, réplication de l'ADN
Classe III (variable)		Sir2	NAD	SIRT1	Noyau	P53, NF-κB, FOXO1 MyoD, Ku70, p300	Apoptose, Vieillessement, survie cellulaire, régulation du système immunitaire
				SIRT2	Cytoplasme	α-tubuline, NF-κB, FOXO, phosphoenolpyruvate carboxykinase	Survie cellulaire, migration cellulaire, invasion
				SIRT3	Noyau et mitochondrie	Acetyl-coA synthétase, l'isocitrate dehydrogenase 2, Ku70	Apoptose, métabolisme énergétique, cycle de l'urée, signalisation cellulaire, ATP
				SIRT4	mitochondrie	Glutamate déshydrogénase	Métabolisme énergétique, apoptose, signalisation cellulaire, ATP
				SIRT5	mitochondrie		Cycle de l'urée, métabolisme énergétique, respiration cellulaire, apoptose signalisation cellulaire
				SIRT6	Noyau	DNA polymerase	Régulation métabolique, réparation du génome.
				SIRT7			Apoptose

Figure 12 : Présentation des principales caractéristiques, des partenaires cellulaires et des rôles physiologiques des différentes histones déacétylases.

Adaptée d'après (Robert et al. 2012 ; Mottamal et al. 2015 ; Zhang et al. 2014).

L'implication des HDACs dans les résistances aux thérapies anticancéreuses a aussi été mise en évidence. HDAC4 participe à la résistance à l'étoposide dans les lignées cellulaires de CBPNC [158].

L'inhibition d'HDAC6 sensibilise les cellules de CBNPC au cisplatine [159]. Les HDACs de classes I et II sont impliquées dans la sensibilité au gefitinib [135, 160].

HDAC6 régule le recyclage de l'EGFR dans le cancer du poumon [161] et est impliqué dans la résistance aux inhibiteurs de la voie des MAPK [162]. De plus HDAC6 et SIRT2 régulent l'état d'acétylation de KRAS [135]. Enfin le rôle d'HDAC6 dans la régulation de l'acétylation de Ku70 a été mis en évidence dans le neuroblastome [163].

5.2.2. Les sirtuines

Les Sirtuines jouent un rôle dans la tumorigénèse pulmonaire. SIRT1 et 2 jouent un rôle dans la prolifération des cellules tumorales, et sont associées à un mauvais pronostic dans le CBNPC [164]. SIRT1 régule également l'apoptose induite par le pemetrexed dans les cellules de CBNPC [165]. Son expression est augmentée par les composés réactifs de l'oxygène (ROS) produits par la fumée de cigarette. SIRT1 régule l'acétylation de KRAS, conduisant à l'activation de la voie MAPK [166]. Enfin, une relation entre SIRT1 et métastases dans le cancer du poumon a aussi été établie [167].

SIRT2 régule l'acétylation de p53 et des inhibiteurs de SIRT2 sont en cours d'évaluation et ont montré leur capacité à sensibiliser les lignées cellulaires de CBPNC à l'étoposide [168].

SIRT3 agit sur la prolifération et l'inhibition de l'apoptose des cellules de CBNPC [169]. Enfin, SIRT6 et sa relation avec la voie des MAPK, sont également impliquées dans le CBNPC [170].

5.3. Les inhibiteurs d'histones déacetylases et des sirtuines

Devant le nombre croissant de données reliant les HDACs au cancer, un intérêt particulier a été porté sur le développement d'inhibiteurs de ces enzymes. Dans des conditions pathologiques où les HDACs sont surexprimées, les HDACi montrent un intérêt thérapeutique.

5.3.1. Mécanisme d'action des HDACi de la classe I et II

Le domaine catalytique des HDACs de classe I et II est formé de 390 acides aminés conservés parmi les différentes espèces formant une légère poche tubulaire courbée [147]. De manière générale les inhibiteurs des HDACs de classe I et II fonctionnent par déplacement de l'atome de zinc rendant ainsi impossible le transfert de charge nécessaire à la déacétylation [147]. La plupart des inhibiteurs des HDACs dépendant du Zn^{2+} ont un pharmacophore commun consistant en 3 domaines distincts (Figure 13):

- une coiffe qui interagit avec le bord du site actif
- Un domaine de liaison du zinc qui chélate le Zn^{2+} au fond du site actif
- Un domaine liant les deux premiers groupements qui permet l'insertion du domaine de liaison au niveau du site actif tubulaire [171].

Ces HDACi sont d'origine naturelle ou synthétique et peuvent être regroupés en plusieurs classes : les dérivés de l'acide hydroxamique, les dérivés du benzamide, les acides gras à courtes chaînes, les peptides cycliques (Figure 13).

Les HDACi peuvent être spécifiques d'une HDAC, d'une famille, ou d'une classe de HDAC. Plus de 40 molécules sont en cours d'évaluation à l'heure actuelle. Les principales caractéristiques de chaque molécule, l'état d'avancement de leur développement, ainsi que les principaux essais cliniques sont résumés dans [156, 172].

Des études cliniques ont montré l'activité anticancéreuse des HDACi [173-176] et 3 HDACi, le Vorinostat (SAHA, Zolima®)[177], la romidepsin (Despsipeptide, ISTODAX®), le Belinostat (Beleodaq), sont déjà disponibles sur le marché et indiqués dans les lymphomes cutanés à cellules T et dans les lymphomes périphériques à cellules T.

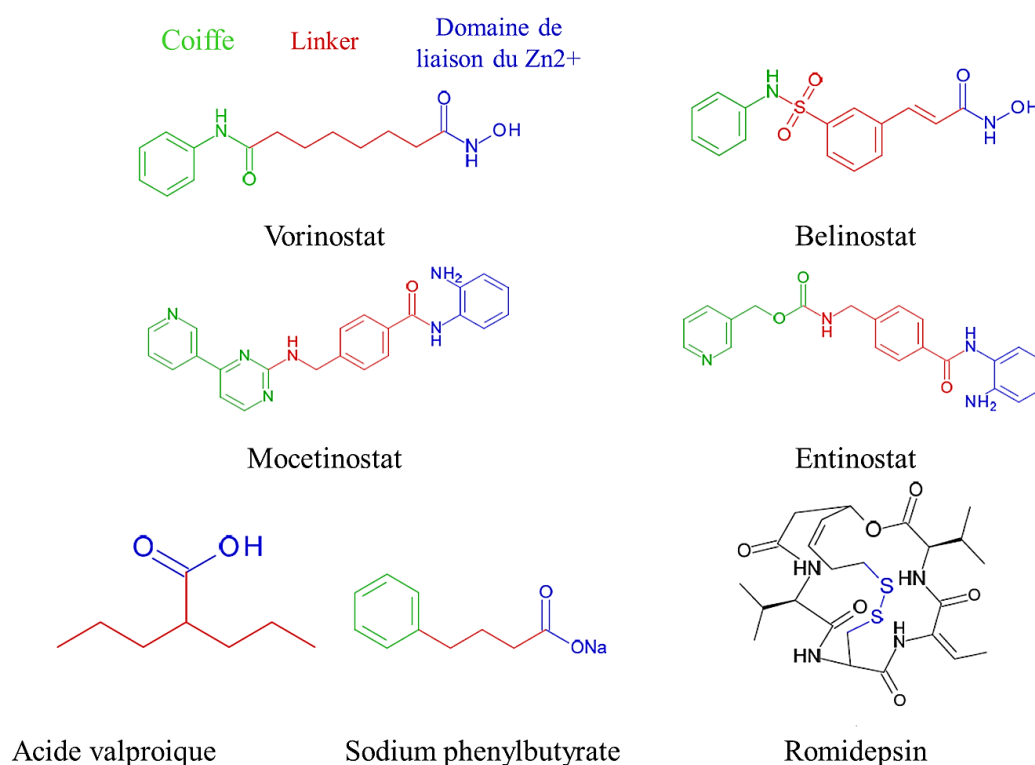


Figure 13 : Exemple d'inhibiteurs des histones déacétylases et présentation de leur pharmacophore commun. Exemple d'HDACi de classe I et II appartenant aux familles : des dérivés de l'acide hydroxamique (vorinostat et belinostat), des dérivés benzamides (mocetinostat et entinostat), des acides gras à courte chaîne (acide valproïque et sodium phenylbutyrate) et des peptides cycliques (Romidepsin). Les inhibiteurs d'histones déacétylases ont un pharmacophore commun constitué d'une coiffe (vert) d'un linker (rouge) et d'un domaine de liaison du Zn²⁺ (blue) Adaptée d'après (Mottamal et al. 2015).

5.3.2. Mécanisme d'action des inhibiteurs des sirtuines

La réaction que catalysent les sirtuines fait intervenir le clivage d'une liaison de haute énergie du nicotinate adénine dinucléotide (NAD). Une molécule de NAD et une molécule d'acétyllysine sont catalysées en une molécule de lysine déacétylée, un nicotinamide (NAM) et un O-acetyl-ADP-ribose [148]. L'absence de Zn²⁺ dans la réaction enzymatique explique l'inefficacité des HDACi conventionnels vis-à-vis de cette classe. Environ 60 composés existent dans cette famille. Ils sont classés en fonction de leur structure chimique. Ils présentent des spectres d'inhibition différents inhibant une ou plusieurs sirtuines. Les principales familles sont le Nicotinamide et ses analogues qui agissent par attaque d'un intermédiaire de réaction bloquant ainsi le déroulement de la réaction enzymatique [178], les dérivés de la thioacétyllysine qui lient avec l'ADP-ribose lors de la réaction de déacétylation, formant un intermédiaire stable bloquant la réaction catalytique [179], les dérivés du β -naphthol, les dérivés de l'indole, les

analogues de la sumarine, les analogues de la tevonine et une dernière classe regroupant les molécules ne répondant pas à ces structures [179]. Ces dernières familles inhiberaient l'activité enzymatique par liaison non covalente sur le site actif bloquant ainsi la liaison du substrat [179]. La figure 14 résume les principales caractéristiques des inhibiteurs d'HDAC et inhibiteurs de sirtuines utilisés lors de ces travaux de thèse.

Inhibiteur	Familles	HDACs ciblées	Status	Essais clinique
Vorinostat	Dérivé de l'acide hydroxamique	Classes I, II et IV	Approuvé lymphomes cutanés à cellules T	Phase II/III
Trichostatine A (TSA)	Dérivé de l'acide hydroxamique	Classes I, II et IV		
Sodium butyrate (NaBu)	Acide gras à courte chaîne	Classes I, IIa		Phase II
Tubastatine A (TA)	Benzamide	HDAC6		
Nicotinamide (NAM)	Nicotinamide	Classe III / Sirtuine		Phase I/II/III

Figure 14 : Présentation des principales caractéristiques des inhibiteurs d'histones déacétylases utilisés durant l'étude

5.3.3. L'inhibition des HDACs dans la thérapie du CBNPC

Les HDACi ont la capacité d'interférer avec diverses voies de signalisation, d'inhiber la croissance tumorale et d'induire l'apoptose. Par l'intermédiaire des substrats non histone, les HDACi agissent également sur des processus cellulaires tels que, l'angiogenèse, la modulation de système immunitaire, l'apoptose [144, 180].

De nombreuses études cliniques cherchent à évaluer, ou ont évalué, l'intérêt des HDACi. Deux études de phase II évaluant l'effet du vorinostat en monothérapie dans les cancers du poumon, du sein et du colon en rechute [181, 182] n'ont pas mis en évidence de bénéfice de ce traitement chez les patients. Au vu de ces résultats décevants les études suivantes se sont concentrées sur l'utilisation des HDACi en association aux chimiothérapies dans la prise en charge des CBNPC. Les études de phase I ont montré, chez des patients atteints de CBNPC de stade IIIB ou IV, que l'association vorinostat + cisplatine + gemcitabine était bien tolérée. Une réponse ou une stabilisation était observée chez 6 patients sur 7 [183]. L'association vorinostat + docetaxel a montré une trop forte toxicité et l'absence de réponse chez les patients [184]. Enfin une étude

de phase I/II, associant l'erlotinib au vorinostat, a montré une bonne tolérance du traitement chez des patients avec un EGFR muté et en rechute sous traitement par erlotinib, mais aucune réponse au traitement [185].

L'étude de phase II évaluant la trithérapie carboplatine + paclitaxel + vorinostat, a montré un meilleur taux de réponse, un allongement de la survie sans progression et de la survie totale, par rapport à la bithérapie carboplatine + paclitaxel [186].

D'autres HDACi ont été évalués dans les CBNPC comme le pivanex ou entinostat et ont montré une activité en monothérapie chez les patients ayant déjà reçu une chimiothérapie [187, 188] ou en association avec l'Azacitidine (analogue de la cytidine) sur la survie sans progression et la survie totale [189].

Ces données mettent en évidence le potentiel des HDACi utilisés en combinaison dans le traitement des tumeurs solides. A l'heure actuelle la combinaison vorinostat + gefitinib chez les patients en rechute (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01027676) ou la trithérapie vorinostat + cisplatine + pemetrexed chez les patients porteurs de la mutation *BIM* (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01059552) sont en cours d'évaluation.

Peu d'essais cliniques utilisant des inhibiteurs de sirtuine ont été réalisés. Un essai de phase II/III évaluant le nicotinamide dans les CBNPC avec un *EGFR* muté et recevant du gefitinib ou de l'erlotinib est en cours (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02416739).

PARTIE II : LES NANOVECTEURS CIBLANTS ET LEUR UTILISATION EN ONCOLOGIE

De nombreux efforts ont été faits ces dernières années pour proposer des thérapies capables d'améliorer le pronostic du cancer du poumon. Les résultats sont prometteurs mais certains obstacles restent à surmonter. En effet, les EGFR-TKI de deuxième génération ayant montré durant les études précliniques leur potentiel à agir contre les résistances T790M, ne se sont pas révélés efficaces en clinique. Les doses devant être injectées pour obtenir un effet provoquaient de nombreux effets indésirables [92]. Les stratégies thérapeutiques impliquant des combinaisons de traitements à base HDACi se sont révélées efficaces dans la prise en charge des CBNPC [183, 190], cependant les toxicités étaient également trop fortes limitant leur utilisation [184].

L'utilisation de nanovecteurs ciblant permettrait de surmonter ces obstacles. En effet les nanovecteurs permettent de délivrer massivement de larges doses de molécules thérapeutiques au niveau du site tumoral [191] et de les protéger de la dégradation. Ceci a pour effet de diminuer les effets indésirables des chimiothérapies tout en augmentant leur efficacité [192]. L'utilisation de nanovecteurs dans la thérapie des CBNPC pourrait ainsi améliorer le pronostic, en permettant d'amener sur le site tumoral des combinaisons de molécules ayant prouvé leur efficacité en plus grande quantité.

Dans ce paragraphe nous allons décrire les mécanismes permettant aux nanovecteurs d'atteindre la tumeur (ciblage passif et actif) et nous présenterons les principales familles de nanoparticules, les approches possibles pour leur administration dans le cancer du poumon, les principales données sur l'encapsulation et la libération des molécules thérapeutiques, ainsi que les techniques de fluorescence permettant le suivi de leur devenir biologique. Dans un deuxième temps nous présenterons l'interaction du hyaluronane avec le récepteur CD44 (cluster of differentiation 44) ainsi que les possibilités de ciblage tumoral qu'elle offre.

1. Nanovecteurs et ciblage tumoral

Ces dernières années de nombreux vecteurs de macromolécules capables d'atteindre des cibles cellulaires tels que les vecteurs viraux, les vecteurs synthétiques lipidiques ou polymériques, les nanoparticules, les systèmes peptidiques ont été développés. Pour être utilisables en clinique, ces vecteurs doivent être biodégradables et biocompatibles, ne pas présenter de toxicité, permettre une libération efficace des molécules chargées et être facilement utilisables pour des applications thérapeutiques. Dans ce chapitre, nous allons présenter les nanoparticules.

1.1. Définition

Une nanoparticule est un objet dont la plus petite dimension est comprise entre 1 et 100 nm [193]. En taille, les nanoparticules sont du même ordre de grandeur que les anticorps, les récepteurs membranaires, les acides nucléiques et les protéines. L'appellation nanoparticule regroupe une multitude d'objets, de formes (sphère, tube, disque...) et de compositions (lipide, carbone polymère métal...) différentes [194]. De nombreuses particules ont été développées ces dernières années pour cibler les tumeurs.

1.2. Nanoparticules et ciblage tumoral

1.2.1. Ciblage tumoral passif

Les nanoparticules ont la particularité de s'accumuler naturellement dans les tumeurs. Ce ciblage passif peut être expliqué grâce à l'effet EPR (enhanced permeability retention) qui est dû d'une part à l'architecture particulière des vaisseaux sanguins tumoraux et d'autre part à une altération du drainage lymphatique tumoral. En effet, l'angiogenèse tumorale conduit à la formation de vaisseaux tortueux, avec un déficit en péricytes (cellules entourant les capillaires sanguins), et dont la membrane basale est altérée. Ceci est responsable de la présence de pores dans la paroi des vaisseaux allant de 100nm à 2 μ m en fonction du type tumoral. Les tumeurs présentent également une diminution du drainage lymphatique du fait de la plus forte pression interstitielle au centre de la tumeur par rapport à la périphérie. La conjugaison du faible drainage

lymphatique et de la fenestration des vaisseaux entraîne une accumulation passive des nanoparticules dans les tumeurs [191].

L'effet EPR est très hétérogène au sein et entre les différentes tumeurs. Les principaux facteurs d'hétérogénéité sont :

- *Les facteurs liés à la tumeur* : les variations structurales des vaisseaux et de la taille des pores entre les différents types tumoraux et au sein de la même tumeur, la taille, le type et la localisation de la tumeur, la prise de traitements qui modifient la pression sanguine et le flux sanguin tumoral, influencent l'effet EPR [195].
- *Les facteurs liés au vecteur* : Le poids moléculaire, la demi-vie plasmatique et la charge influent sur l'effet EPR. Celui-ci est augmenté pour des molécules de taille supérieure à 40kDa, ayant une longue demi-vie plasmatique et une charge faiblement négative ou neutre [196].

Des vecteurs nanoparticulaires sont aujourd'hui utilisés en clinique comme l'amphotéricine B (Ambisome®) utilisé pour le traitement des infections fongiques, la doxorubicine (Doxil®) employée pour le traitement des cancers ovariens ou du myélome multiple et le paclitaxel (Abraxane®) indiqué dans la prise en charge des adénocarcinomes du pancréas.

1.2.2. Ciblage tumoral actif

Un ciblage actif peut être réalisé par greffage sur les vecteurs d'un motif de ciblage (anticorps, peptide polysaccharide) qui reconnaîtra sa cible au niveau des tissus d'intérêt. Les nanoparticules seront ensuite captées par les cellules d'intérêt. Une cible tumorale doit être accessible, spécifique ou exprimée plus fortement dans la zone tumorale et avoir un ligand avec une grande sélectivité et affinité.

Le ciblage actif agit en collaboration avec le ciblage passif : le cheminement de la particule jusqu'à la tumeur se fait *via* le ciblage passif, où le ciblage actif augmentera la captation des nanoparticules par le tissu tumoral [197, 198] (Figure 15).

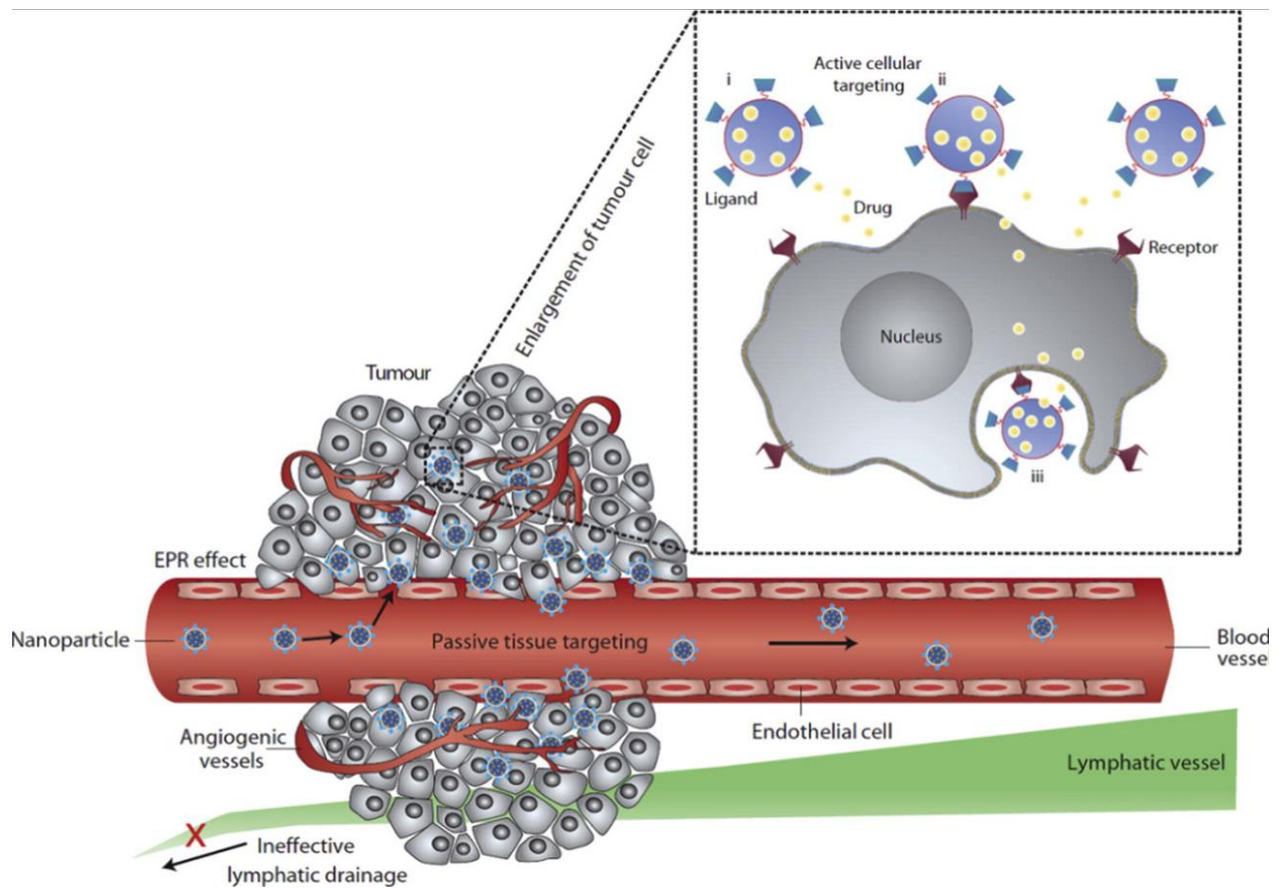


Figure 15 : Illustration du ciblage tumoral passif et actif réalisé par les nanoparticules.

Le ciblage passif permet l'accumulation des nanoparticules dans l'environnement tumoral par effet EPR. Le ciblage actif, réalisé par greffage d'un ligand spécifique d'une cible tumorale, permet la reconnaissance spécifique de la cible, une meilleure captation par les cellules, améliorant ainsi l'effet thérapeutique. Les nanoparticules dans l'environnement tumoral (i) libéreront leur contenu directement au niveau des cellules tumorales, ou, (ii) lieront la membrane et libéreront leur contenu (iii) ou seront internalisées et libéreront leur contenu dans le cytoplasme. Adaptée d'après (Perez-Herrero et al. 2015).

1.3. Les différentes générations de nanoparticules

L'idée des nanoparticules à usage thérapeutique a fait son apparition dans les années 1950 [200]. Dans le milieu des années 60 le liposome fut découvert [201] puis en 1972 la première nanoparticule à base d'albumine fut proposée pour l'étude du système réticuloendothélial [202]. De manière générale les nanoparticules sont caractérisées par leur charge électrique, leur composition chimique, leur taille et leur forme. Tous ces paramètres vont grandement influencer leur devenir biologique mais aussi leur capacité de ciblage. L'étude et la

compréhension de ces phénomènes a permis d'améliorer les paramètres pharmacocinétiques mais aussi la capacité de ciblage des nanoparticules [194].

La première génération de nanoparticules consiste en l'encapsulation de principes actifs au sein de colloïdes stables en milieu aqueux, l'intérêt principal étant de ralentir leur élimination (notamment par voie rénale) et de prolonger leurs effets. Ces nanoparticules étaient souvent trop réactives du fait de leur charge importante et étaient rapidement captées par le système réticuloendothélial et séquestrées dans le foie et la rate. Afin d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique et d'améliorer l'accumulation passive dans la zone d'intérêt, la surface des nanoparticules a été modifiée pour obtenir des nanoparticules dites « furtives ». Les agents de furtivité, généralement des polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG), créent une « couche protectrice » permettant d'échapper à la capture par les cellules du système immunitaire en limitant la fixation des opsonines [203-205]. Les particules de seconde génération ainsi obtenues permettent une libération lente du principe actif et une accumulation passive dans les tissus par effet EPR.

Par la suite une troisième génération de particules a été développée en fonctionnalisant leur surface avec des ligands biologiques (anticorps, peptide, aptamer, sucre) reconnus spécifiquement par les cellules d'intérêt et permettant un ciblage actif [197, 198].

1.4. Les différentes nanoparticules développées

La notion de nanoparticules ne faisant intervenir que la taille, elle englobe donc une grande variété d'objets de compositions différentes. Les nanoparticules sont regroupées en différentes familles, en fonction de leur constituants, dont les principales sont : les liposomes, les nanoparticules lipidiques, les nanoparticules inorganiques, les nanoparticules polymériques [206].

1.4.1. Les liposomes

La morphologie des liposomes est assez proche de la membrane cellulaire. Ils sont constitués d'une simple ou de multiples bicouches lipidiques concentriques encapsulant un compartiment aqueux. Les lipides peuvent être d'origine naturelle et/ou synthétique. La taille de ces nanovecteurs varie de 50nm à quelques μm . Le principal avantage de ces nanovecteurs est leur

capacité à encapsuler à la fois les composés hydrophiles dans leur cœur et hydrophobes dans leur membrane. Leur surface peut être modifiée par des ligands permettant le ciblage actif. Les principaux paramètres influençant le devenir d'un liposome *in vivo* sont les caractéristiques physicochimiques de la membrane, leur taille et leur charge de surface [207].

Les principales limitations à leur utilisation sont leur faible capacité d'encapsulation, leur stabilité modérée et la libération précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang [208]. Cependant devant l'intérêt grandissant pour les liposomes, de nombreuses études pour améliorer ces paramètres ont été menées. L'addition de cholestérol dans la bicouche augmente sa stabilité *in vitro* et *in vivo* tout en diminuant sa perméabilité [209]. L'addition de PEG a permis d'augmenter le temps de circulation et de diminuer leur capture par le système réticuloendothélial [210, 211]. L'intérêt pour ces nanovecteurs est grand et de nombreuses stratégies thérapeutiques utilisant les liposomes sont en cours d'évaluation ou disponibles sur le marché [207] pour revue).

1.4.2. Les nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques sont parfois regroupées sous l'appellation de nanoémulsions [212]. On distingue les nanoparticules lipidiques solides, les nanocapsules et les transporteurs nanostructurés

Les nanoparticules lipidiques solides, sont des nanosphères faites à partir de lipides solides à température ambiante et corporelle avec un diamètre allant de 50 à 1000 nm. Le terme lipide employé ici regroupe des triglycérides, des acides gras, des stéroïdes et des cires. Les nanoparticules solides possèdent une stabilité et une capacité d'encapsulation de molécules lipophiles supérieures à celle des liposomes, et peuvent être synthétisées en absence de solvants organiques. Elles présentent cependant divers inconvénients comme l'augmentation de leur taille au cours du temps, une tendance à gélifier de manière imprévisible et une faible capacité d'encapsulation due à la structure cristalline du cœur lipidique.

Les nanocapsules lipidiques ont un cœur liquide ou semi-liquide et une couche externe solide à température ambiante. Leur taille est du même ordre que celle des nanoparticules lipidiques solides.

Les transporteurs lipidiques nanostructurés quant à eux possèdent un cœur lipidique solide composé d'un mélange de lipides solides et liquides. Ceci a pour effet d'abaisser le point de fusion du cœur par rapport aux nanoparticules lipidiques solides. Cependant la matrice restera solide à la température corporelle.

1.4.3. Les nanoparticules inorganiques

La famille des nanoparticules inorganiques regroupe une grande variété d'objets de nature différente. On retrouve les nanoparticules d'or [213, 214]), d'argent [215], d'oxyde de gadolinium [216, 217], d'oxyde de fer [218], d'oxyde d'hafnium [219], des nanoparticules magnétiques [220], des nanoparticules de silice [221], des nano-cristaux semi-conducteurs (ou quantum dots) [222, 223] des nanotubes de carbone, des nanoparticules en céramique [224]. Leurs propriétés optiques et magnétiques, leur stabilité et la facilité de les fonctionnaliser offrent de nombreuses perspectives, notamment dans le domaine de l'imagerie [224].

1.4.4. Les nanoparticules polymériques

1.4.4.1. Les différents types de nanoparticules polymériques

Les nanovecteurs polymériques regroupent une grande variété de nanostructures comprenant les nanoparticules polymériques (à base de polymères comme poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), polylactide (PLA), polyglycolide, polycaprolactone (PCL), poly(D,L-lactide), chitosan), les micelles polymériques et les polymersomes (à base de copolymère amphiphile) les dendrimères (système polymérique fortement branché) , les polyplexes (fragment d'ADN ou d'ARN chargé négativement et complexé au polymère chargé positivement), les systèmes hybrides polymères lipides, les conjugués polymère-molécule thérapeutique/protéine (Figure 16) [191]. De manière générale, les systèmes polymériques ont une bonne stabilité en milieu biologique et leur utilisation permet le contrôle de la libération des molécules thérapeutiques. Ils permettent une longue circulation des molécules thérapeutiques et ont une grande capacité de chargement [199]. D'autre part, leur biocompatibilité, la possibilité de modifier leur surface, de produire des objets de tailles et de formes différentes et de charger une grande variété de molécules thérapeutiques en font des vecteurs idéaux pour un usage médical [191, 225]. Nous ne développerons dans ce paragraphe que les micelles polymériques qui nous intéresseront dans la suite de ce travail.

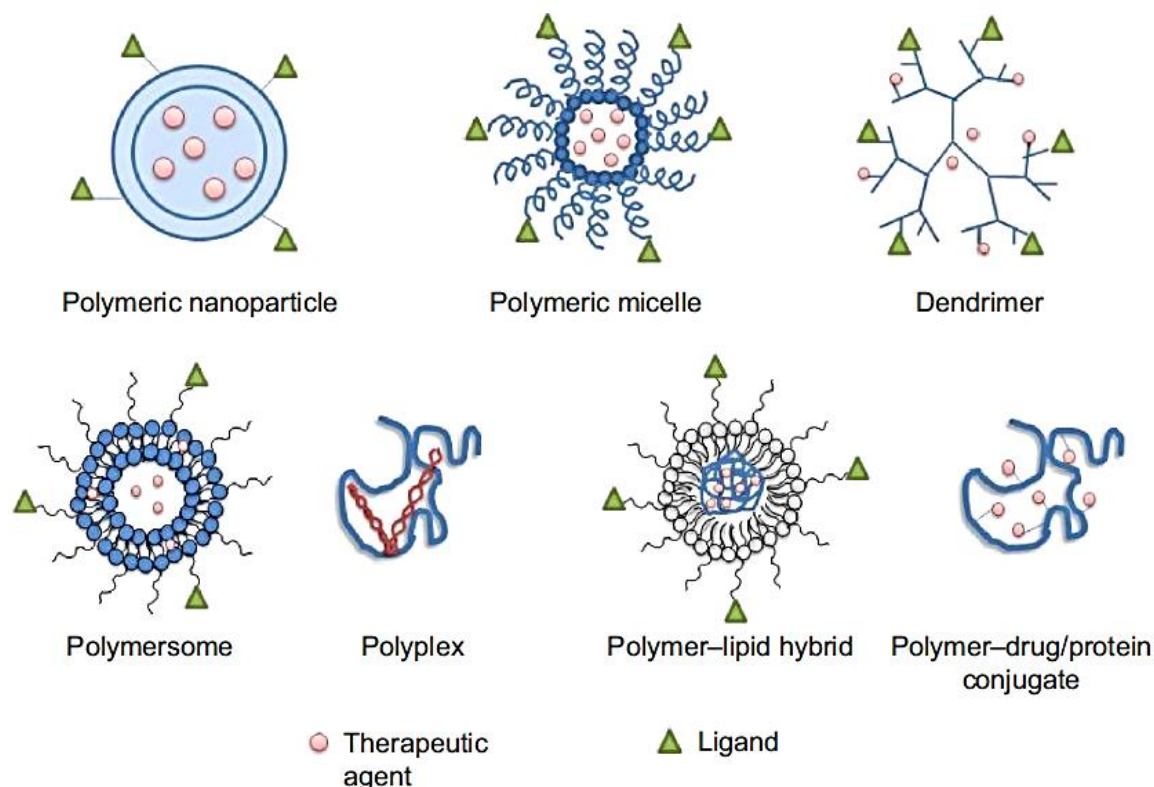


Figure 16 : Représentation schématique des principaux types de nanoparticules polymériques.
Adaptée d'après (Prabhu et al. 2015).

1.4.4.2. Les micelles polymériques

Les micelles polymériques sont des auto-assemblages produits à partir de copolymères amphiphiles qui vont former une micelle nanométrique au cœur hydrophobe (dans lequel des molécules hydrophobes pourront être encapsulées) et une membrane hydrophile. La partie hydrophile confère des propriétés de furtivité et un temps de circulation augmenté [226-228]. Une large variété de tailles et de formes peut être produite ce qui impactera les propriétés pharmacocinétiques de ces particules [228]. La nécessité d'utiliser des polymères biocompatibles et dégradables pour la production des micelles polymériques limite les choix. On retrouve classiquement le PEG pour la partie hydrophile qui réduit la captation par le système réticuloendothélial. Pour la partie hydrophobe, les polyesters sont les plus représentés, mais on retrouve également des polyéthers et des polypeptides [229].

Les micelles permettent de solubiliser des molécules anticancéreuses généralement très hydrophobes [228]. Leur temps de circulation prolongé leur permet de s'accumuler profondément dans les tumeurs et de libérer uniformément des molécules anticancéreuses dans le tissu tumoral [230].

Les micelles sont très étudiées actuellement [228]. Dans le cancer du poumon on retrouve des micelles de PEG-poly(acide glutamique) chargées avec du cisplatine. Ces micelles ont montré un temps de circulation prolongé et une forte accumulation dans les tumeurs conduisant à une efficacité antitumorale [231]. Des stratégies équivalentes sont évaluées en clinique comme le Genexol-PM, une micelle de poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) chargée avec du paclitaxel. Des essais de Phase II menés dans le CBNPC ont montré que l'association à la gemcitabine avait un taux de réponse de 46.5% avec une diminution des effets émétisants [232].

Des micelles avec des motifs de ciblage actif comme des molécules organiques [233], des anticorps [234], des peptides [235] ont été développées. A titre d'exemple des micelles PEG-poly(L-acide glutamique) couplées avec le C225, un anticorps anti-EGFR, ont été développées pour véhiculer la doxycycline. Ces micelles ont montré un ciblage dépendant de l'EGFR et une IC50 inférieure à celle de la doxycycline seule dans les cellules surexprimant l'EGFR [236]. Des micelles coiffées d'un anticorps anti-nucléosome et chargées avec du paclitaxel ont permis une meilleure accumulation du paclitaxel dans les tumeurs pulmonaires chez la souris et une meilleure inhibition de la croissance tumorale par rapport au paclitaxel seul [234].

1.5. Encapsulation et libération des molécules thérapeutiques

1.5.1. Chargement en molécules thérapeutiques

Les nanoparticules en particulier les liposomes, les particules lipidiques, les nanoparticules polymériques offrent la possibilité d'encapsuler les molécules thérapeutiques. La capacité de chargement dépend de la nature de la molécule à encapsuler et du type de nanoparticule [237]. Ainsi, les liposomes et les polymersomes permettent le chargement de molécules hydrophiles et hydrophobes, tandis que les micelles polymériques et les nanoparticules lipidiques sont plutôt utilisées pour l'encapsulation des molécules hydrophobes. La taille et la géométrie des nanoparticules influenceront également sur la quantité encapsulable au sein du vecteur. Il y a deux grands procédés d'encapsulation. Le premier consiste à codisperser dans un même milieu les molécules à encapsuler et le vecteur en formation, l'encapsulation et la formation du vecteur se produisant conjointement. Ce procédé nécessite d'avoir recours à de hautes températures, à la sonication et à l'utilisation de solvants organiques, ce qui diminue généralement l'efficacité d'encapsulation des molécules. La deuxième technique consiste à encapsuler les molécules après formation de la nanoparticule et est généralement utilisée lorsqu'une répulsion entre les constituants existe, notamment pour l'encapsulation de composés hydrophiles dans les liposomes. Les chimistes ont généralement recours à des gradients de pH ou de concentration ou à la diffusion [197].

1.5.2. Libération des molécules thérapeutiques

La cinétique sanguine des molécules varie grandement entre une molécule libre pour laquelle on observe, après un pic plasmatique, une décroissance de la concentration sanguine, et une molécule chargée au sein d'une nanoparticule pour laquelle la cinétique de libération des molécules sera plutôt d'ordre zéro avec une concentration sanguine formant un plateau [197] (Figure 17).

Les nanoparticules permettent de maintenir la concentration sanguine en molécules thérapeutiques dans la fenêtre thérapeutique plus longtemps et de diminuer ainsi le nombre d'administrations et la concentration sanguine initiale nécessaire. La libération des molécules thérapeutiques encapsulées peut se faire par désorption des molécules liées en surface des

vecteurs, par diffusion à travers le cœur et/ou la membrane de la vésicule, ou par érosion de la matrice de la nanoparticule, ces phénomènes pouvant coexister [197].

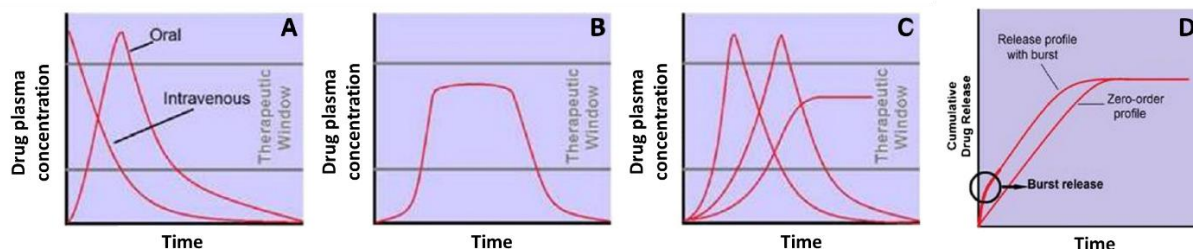


Figure 17 : Profil cinétique des concentrations sanguines en molécules thérapeutiques au cours du temps. Molécules libres (a), molécules encapsulées dans un vecteur simple (b), ou molécules encapsulées dans un vecteur permettant une libération contrôlée (c). Représentation schématique du « Burst effect » pour le cas d'une nanoparticule suivant une cinétique d'ordre 0 (d). Adaptée d'après (Felice et al. 2014). [197]

La diffusion et la désorption des molécules situées en surface se fait généralement de manière rapide entraînant une augmentation brutale de la concentration sanguine initiale suivie d'une cinétique d'ordre 0 [238, 239] (Figure 17 D). Ce phénomène, appelé « burst effect », diminue la fraction de molécules disponibles pour une libération prolongée et peut être à l'origine d'effets indésirables. Comme « le burst effect » est principalement lié aux phénomènes de diffusion et de désorption des molécules la plupart des stratégies visant à réduire ce phénomène se sont attachées à améliorer la qualité d'encapsulation des molécules à l'intérieur des nanoparticules [240, 241].

Les interactions entre les molécules thérapeutiques et les constituants de la nanoparticule sont régies par l'hydrophobicité ou l'hydrophilicité, la structure chimique, la charge et le poids moléculaire des composés. La force de ces interactions (hydrophile, hydrophobe, liaison hydrogène, interaction électrostatique) favorisera ou diminuera le relargage des molécules. Par exemple, l'utilisation de charges opposées entre les composés thérapeutiques et les constituants des nanoparticules favorisera la rétention des molécules, les grosses molécules diffuseront moins facilement que les petites et les molécules peu solubles dans le plasma seront plus retenues. La stabilité des particules affectent également le relargage des molécules. Ainsi pour les nanoparticules avec une faible stabilité le phénomène de « burst effect » sera plus fort. Enfin, la structure des nanoparticules, leur taille, leur nature et l'épaisseur de la membrane influenceront également sur le relargage [197].

Les nanoparticules permettant une libération contrôlée des molécules dans le temps et dans l'espace sont des systèmes sensibles à un ou plusieurs stimuli responsables de leur dégradation et de la libération des composés thérapeutiques [242]. Ces stimuli variés peuvent être des changements de température entraînant des modifications de viscosité de la membrane des nanoparticules, des ultrasons détruisant la structure du vecteur ou provoquant un échauffement, le pH provoquant la protonation ou la déprotonation des groupements ionisables ou encore des réactions enzymatiques entraînant la destruction du vecteur [237, 243] (pour revue).

A titre d'exemple la figure 18 illustre les principales données pharmacologiques des nanoparticules utilisées actuellement en oncologie montrant ainsi l'impact de l'encapsulation sur la pharmacocinétique des principes actifs

Nom	Molécule encapsulée	Nature de vecteur	Indication	Demi-vie de la molécule vs molécule encapsulée	Pourcentage de molécule relargué en fonction du temps	Taux d'encapsulation possible dans les formulations
Myocet®	Doxorubicine	Liposome	Cancer du sein	0.2 h vs 2 à 3 h [244]	50% en 1h 90% en 24h	Taux d'encapsulation maximum dans un liposome > 90% [245, 246]
Doxil®	Doxorubicine	Liposome-PEG	Divers Cancers	0.2 h vs 41 à 71 h [244]	10% en 24h [247]	Taux d'encapsulation maximum dans un liposome > 90% [245, 246]
Oncaspar®	Asparaginase	Liaison covalente au PEG	Leucémie	8 à 30 h vs 5 à 7 j [248, 249]		
Abraxane®	Paclitaxel	Albumine	Cancer du sein Cancer du poumon Adénocarcinome du pancréas	5 h vs 15 à 18h [250]		10% [251]

Figure 18 : Principales données pharmacologiques des nanovecteurs utilisées dans la thérapie du cancer.

2. Administration et suivi *in vivo* des nanoparticules

2.1. Modes d'administration des nanoparticules

De nombreuses voies d'administration comme la voie oculaire [252], orale [253], vaginale [254], topique [255], pulmonaire [256], ou parentérale sont disponibles pour l'administration des nanoparticules. Le choix d'une voie se fait en fonction de la pathologie visée et des problématiques liées au contexte thérapeutique. Dans le cadre de la thérapie du cancer du poumon nous avons choisi de nous intéresser aux voies intraveineuse et pulmonaire.

2.1.1. La voie intraveineuse

Le système sanguin irrigant l'ensemble des organes, l'injection systémique des nanovecteurs semble adaptée pour atteindre l'ensemble des tissus ciblés. Cette voie d'administration permet de maîtriser la quantité de nanoparticules administrée, d'éviter le phénomène de 1^{er} passage hépatique, offre une biodisponibilité de 100% et un effet rapide voire immédiat et permet l'injection de molécules inactivées par les sucs digestifs. Les règles qui régissent le devenir biologique des nanoparticules ont été largement étudiées ces dernières années et sont aujourd'hui bien décrites. Les nanovecteurs injectés par voie systémique atteindront et seront retenus dans les tumeurs grâce au ciblage passif et actif. Cependant, la distribution des nanovecteurs peut aussi se faire dans les tissus sains, étant ainsi responsable d'effets indésirables. En fonction de leur taille, les nanoparticules sont captées par le système réticulo-endothélial (si elles ont une taille supérieure à 10nm) ou sont éliminées rapidement par voie urinaire (si elles ont une taille < 10nm). La forme et la charge influent également sur la captation par le système réticulo-endothélial: les sphères ou les particules fortement chargées seront mieux captées que les tubes ou les nanoparticules peu chargées [194] pour revue.

2.1.2. La voie pulmonaire

La voie pulmonaire pourrait se révéler intéressante pour la thérapie du cancer bronchique. Les thérapies inhalées sont utilisées depuis de nombreuses années pour le traitement de maladies pulmonaires telles que l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, la mucoviscidose, mais aussi depuis peu pour le traitement de maladies systémiques comme le diabète [257, 258]. Plus récemment, cette voie d'administration a été étudiée pour l'administration d'anti-tuberculeux, d'anticancéreux, d'anticorps et de nanoparticules pour la thérapie anticancéreuse et l'imagerie [257, 259-264].

Le principal avantage d'un tel mode d'administration dans les pathologies pulmonaires est qu'il permet de délivrer sur place de fortes concentrations de molécules thérapeutiques conduisant ainsi à une réponse thérapeutique rapide tout en diminuant le risque d'effets indésirables systémiques. D'autre part, le poumon offre une grande surface pour l'absorption systémique et permet d'éviter l'effet de premier passage des molécules thérapeutiques au niveau hépatique [258].

Pour être efficaces les thérapies délivrées par voie pulmonaire doivent se distribuer correctement au sein du poumon. La taille des particules inhalées affecte grandement cette distribution [258] : les particules de 5 à 30 μm restent au niveau du nasopharynx, celles de 1 à 5 μm atteignent la région trachéobronchique où elles seront absorbées ou éliminées par la clairance mucociliaire, celles $< 1 \mu\text{m}$ atteignent les alvéoles, et celles $< 100 \text{ nm}$ entreront en contact avec l'épithélium [265].

Le contexte physiopathologique peut conduire à une distribution inappropriée des particules dues au rétrécissement des bronches ou à l'obstruction des voies aériennes et ainsi favoriser l'accumulation dans les zones saines du poumon [258, 266]. Par conséquent la pertinence de l'utilisation de la voie aérienne dépendra du contexte physiopathologique : traitement de tumeurs diffuses ou de métastases secondaires ou grosses tumeurs obstruant les bronches [260]. La nature des composés inhalés joue également un rôle dans leur devenir biologique. Ainsi les petites molécules hydrophobes sont rapidement évacuées du poumon par diffusion passive. Les molécules trop hydrophobes et trop insolubles peuvent cependant rester plusieurs semaines dans les poumons. Les petites molécules hydrophiles neutres ou chargées négativement sont rapidement absorbées par des transporteurs ou à travers les jonctions serrées [267].

Une grande variété de molécules peuvent être administrées par voie aérienne, comme des peptides [268, 269], des anticorps [259], des nanovecteurs [260]. La première utilisation de l'inhalation pour l'administration de chimiothérapie a été décrite en 1968 [270]. Des essais cliniques portant sur l'inhalation des chimiothérapies (5-fluoro-uracile, doxorubicine, gemcitabine, cisplatine) chez des patients atteints de CBNPC ont montré une bonne tolérance du traitement et un contrôle de la maladie [271-273]

L'évaluation de principes actifs vectorisés a aussi eu lieu dans le cancer bronchique. Par exemple un essai de phase I évaluant la camptothecine liposomale, a montré une bonne tolérance du traitement, avec un contrôle de la maladie chez 5 des 25 patients évalués [274]. Des études de Phase II sont actuellement en cours (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00249990 et NCT00250120). Le cisplatine encapsulé dans des lipides grâce au système « Sustained Release Lipid Inhalation Targeting » a été évalué chez des patients atteints de carcinomes pulmonaires et d'ostéosarcomes avec métastases pulmonaires en rechute ou en progression. La concentration plasmatique du cisplatine reste faible et le traitement est bien toléré. Une stabilisation de la maladie a été observée chez 12/17 patients [275, 276]. Des nanoparticules de gadolinium utilisées comme agent théranostic < 6 nm ont été nébulisées dans les poumons de souris ayant des tumeurs pulmonaires orthotopiques. Ces nanoparticules se distribuent de manière homogène dans les poumons, s'accumulent dans les tumeurs, sont rapidement éliminées par voie rénale et ont montré leur efficacité comme agent radiosensibilisant améliorant ainsi la survie chez les souris traitées [260].

L'administration pulmonaire d'anticorps pour la thérapie du cancer est en cours d'évaluation [264]. Une accumulation durable du cetuximab dans les poumons et au niveau tumoral, ainsi qu'un faible passage dans la circulation systémique ont été montrés chez la souris sur un modèle de carcinome épidermoïde pulmonaire. L'anticorps administré une fois par semaine durant 3 semaines a permis un contrôle de la croissance tumorale [277]. L'inhalation hebdomadaire du cetuximab dans un modèle murin d'adénocarcinome A549 a aussi montré son efficacité antitumorale. Enfin l'évaluation du cetuximab inhalé sur un groupe de 8 macaques a montré que l'administration de l'anticorps est bien tolérée (pas de perte de poids, pas de modifications des constantes biologiques, pas de perturbation hématologique) [259]. Une approche similaire évaluant l'effet d'un anticorps anti-VEGF dans le modèle murin de cancer du poumon K-ras (LA1) a permis de réduire significativement la croissance tumorale et le nombre de lésions pulmonaires [263].

2.2. Suivi du devenir biologique des nanoparticules et imagerie optique *in vivo*

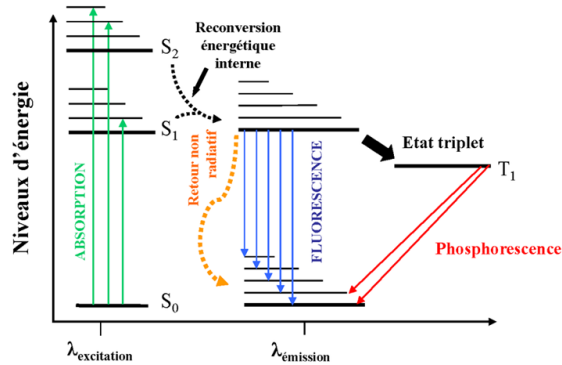
L'imagerie optique de fluorescence *in vivo* dans le proche infrarouge permet de visualiser des phénomènes moléculaires, métaboliques ou physiologiques, en temps réel et de manière non invasive directement chez l'animal vivant, tout en évitant l'utilisation des radioéléments impliquant de fortes contraintes. Ainsi cette technique est un outil de choix pour suivre le devenir biologique des nanoparticules fluorescentes.

2.2.1. Principe de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge

L'absorption de photons d'une source lumineuse par un atome ou une molécule provoque son passage d'un état fondamental à un état excité vibrationnel élevé appelé S2 (Figure 17). Une relaxation rapide vers un état vibrationnel plus faible S1 se produit par conversion interne. De l'état excité S1 la molécule retournera à un état fondamental S0 par émission de photons de fluorescence ou par désexcitation non radiative. Toute substance chimique capable d'émettre une fluorescence après excitation photonique est appelée fluorophore. L'énergie du photon libérée par émission de fluorescence est inférieure à l'énergie du photon absorbée. Les longueurs d'onde étant inversement proportionnelles à l'énergie du photon, la longueur d'onde d'émission sera décalée vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport à celle d'excitation. Cette différence d'énergie appelée « le shift de Stokes » s'explique par la dissipation d'énergie lors de la reversion interne (Figure 17).

Des fluorophores peuvent être synthétisés puis administrés dans l'organisme (fluorophores exogènes) pour l'imagerie. Cependant lors de leur traversée dans les tissus biologiques les photons d'excitation (émis par la source lumineuse) et les photons d'émission (émis par le fluorophore) sont diffractés et absorbés. Les longueurs d'onde inférieures à 650-700 nm sont absorbées par l'hémoglobine tandis que les longueurs d'onde supérieures à 900 nm sont absorbées par l'eau. Il existe une bande de longueurs d'onde à la limite entre le rouge profond et le proche infrarouge située entre 650-900 nm où la transparence des tissus est maximale [278].

a



b

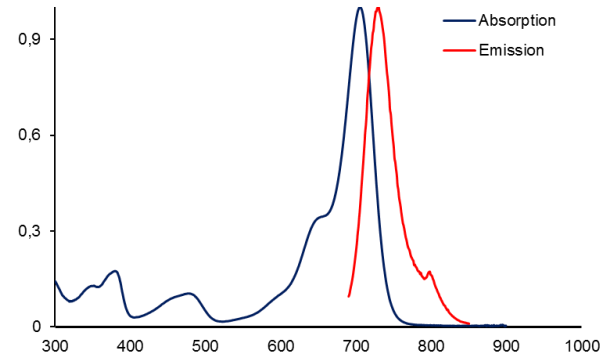


Figure 19: Diagramme de Jablonski

Ce diagramme illustre les différentes transitions électroniques et les différents phénomènes de désexcitation conduisant à l'émission de photons (a). Exemple du Spectre de fluorescence du Dy700. Un fluorophore est caractérisé par ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission qui correspondent aux longueurs d'onde pour lesquelles l'absorption et l'émission sont maximales.

Pour cette raison, les sondes fluorescentes émettant dans le proche infrarouge sont préférentiellement utilisées pour l'imagerie *in vivo*. D'autre part les tissus contiennent de nombreux fluorophores endogènes émettant dans le vert mais pas dans le rouge. Ainsi le choix du proche infrarouge pour l'imagerie optique *in vivo* permet de s'affranchir de l'autofluorescence et offre une transparence maximale des tissus. Le principe de l'imagerie de fluorescence est d'illuminer le tissu avec un laser ou de la lumière blanche filtrée et de collecter la fluorescence émise grâce à une caméra CCD (charge coupled device) munie d'un filtre approprié (Figure 18). Deux modalités de fluorescence existent : l'épi-illumination et la transillumination.

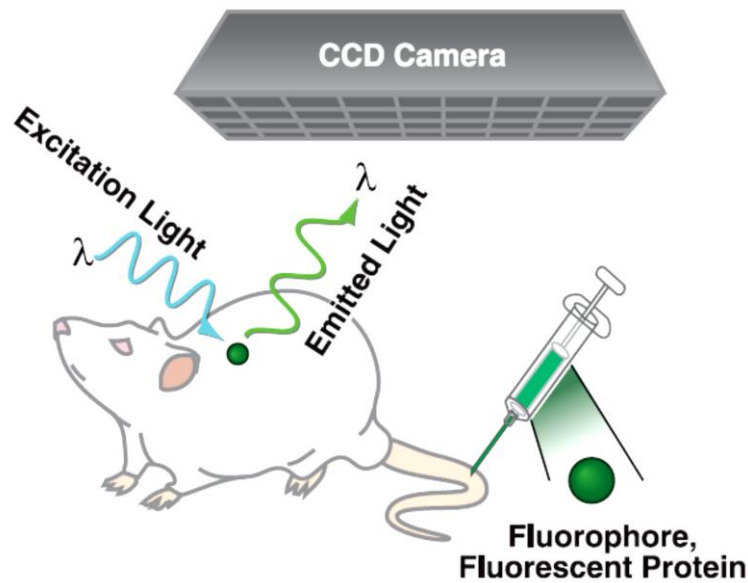


Figure 20 : Principe de l'imagerie optique de fluorescence

Suite à l'administration d'un fluorophore, une lumière d'excitation de longueur d'onde appropriée est utilisée pour éclairer l'animal. Cela conduit à une excitation du fluorophore et à l'émission consécutive de lumière. Cette lumière, détectée par une caméra CCD, est collectée, analysée et convertie en une image qui localise l'emplacement de cette lumière émise (James et al.2012).

2.2.2. l'épi-illumination

Dans l'épi-illumination la source illuminant l'animal et la camera CDD sont situées du même côté de l'animal. Cette modalité d'imagerie en 2D (2 dimensions) ne fournit qu'une information semi-quantitative. En effet cette modalité ne permet pas de conclure sur l'impact de l'atténuation du signal de fluorescence par les tissus. Ainsi, deux foyers de concentrations identiques en fluorophore n'auront pas la même intensité en fonction de leur profondeur dans les tissus. Cependant cette technique présente de nombreux avantages comme sa simplicité d'utilisation, l'obtention instantanée des images et la réalisation de mesures en temps réel. Elle permet la réalisation d'études pharmacocinétiques *in vivo* sur le corps entier de l'animal (Figure 19). [280]

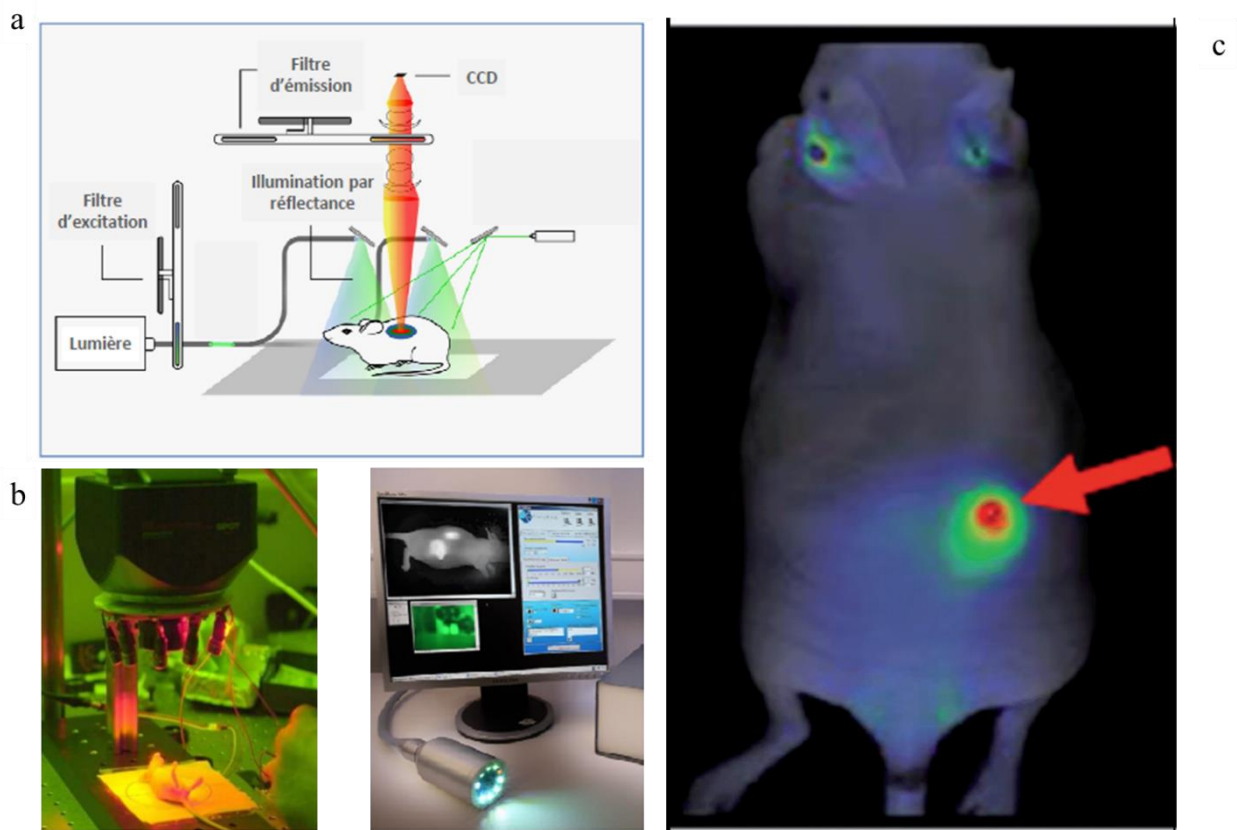


Figure 21 Présentation des systèmes d'épi-illuminations

Schéma général du système d'imagerie d'épi-fluorescence en 2D (a). Système d'imagerie d'épi-fluorescence en 2D (à gauche) et sonde per-opératoire (Fluobeam®, Fluoptics) (à droite) (b). Exemple d'image de fluorescence 2D obtenue chez la souris porteuse d'une tumeur sous cutanée (Bhattacharyya et al. 2014) (c)

2.2.3. La transillumination

La transillumination résout les problèmes liés à l'absorption à la diffusion, rencontrés en épi-illumination, de l'autofluorescence et permet l'obtention d'une image quantitative en 3D (3 dimensions). A l'inverse de l'épi-illumination la source et le détecteur se trouvent à l'opposé l'un de l'autre. Plusieurs systèmes existent : celui utilisé dans cette étude, le Tomographe Optique de Fluorescence en milieux diffus ou, en anglais, fDOT pour fluorescence Diffuse Optical Tomography, a été développé en collaboration avec le CEA LETI [281-284].

Pour fournir des images de fluorescences quantitatives, le système prend en compte les propriétés optiques d'absorption et de diffusion des tissus, ces propriétés étant très hétérogènes d'un tissu à l'autre. Ceci est possible grâce à une double série de mesures. Une source laser balaye une région d'intérêt et réalise pour chaque point une mesure de transmission de la lumière d'excitation, permettant d'établir une carte d'hétérogénéité du milieu traversé, et une

mesure de la fluorescence émise. Un algorithme de reconstruction intègre les données récoltées pour chaque point et chaque série de mesures et permet d'obtenir une image quantitative en 3D qui reflète la distribution spatiale du signal fluorescent (Figure 20b). L'association de l'image de fluorescence 3D avec l'image Rayon X des poumons permet de replacer la fluorescence dans son contexte anatomique (Figure 20c)

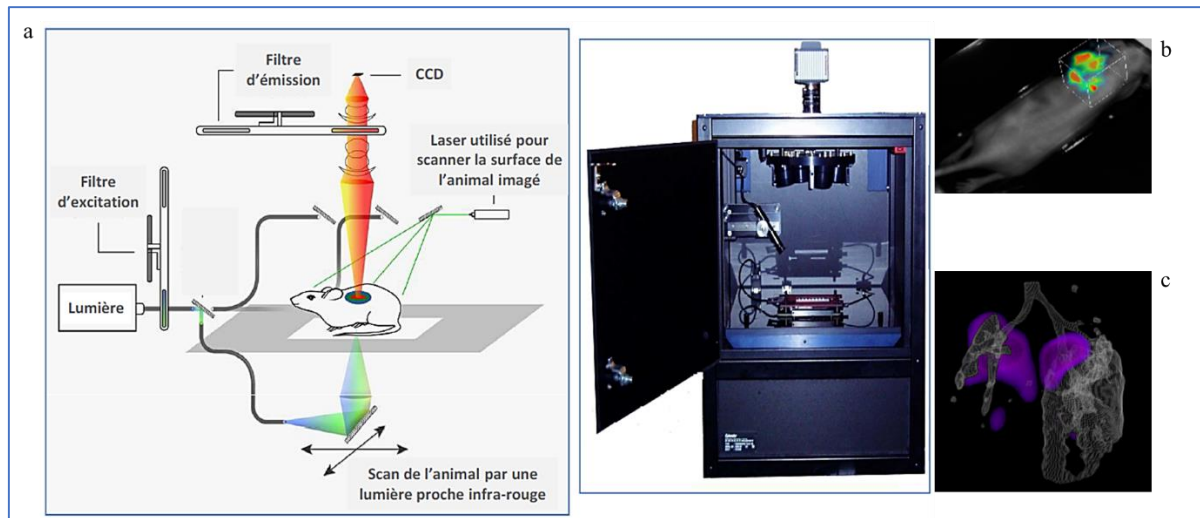


Figure 22 : Présentation de la Tomographie Optique de Fluorescence en milieux diffus

L'acquisition est réalisée par transillumination à l'aide d'un laser proche infra-rouge et la lumière transmise et la fluorescence émise sont recueillies par une caméra CCD (gauche). Présentation du tomographe de fluorescence développé en collaboration avec le CEA Leti (droite) (a). Après balayage précis de la surface d'intérêt par un laser et l'utilisation d'un algorithme de traitement du signal, il est possible d'obtenir des reconstructions en 3D (b). L'association du signal 3D à une image des poumons obtenue par rayon X permet de replacer la fluorescence dans son contexte anatomique (c).

3. Ciblage actif et interaction hyaluronane récepteur CD44

Parmi les motifs de ciblage actif, le récepteur CD44 (cluster of differentiation 44) et son interaction avec le hyaluronane ont été largement étudiés dans différents types de cancers. Aujourd'hui, une grande variété de nanoparticules interagissant avec ce récepteur sont disponibles.

3.1. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique ou hyaluronane est un des glycosaminoglycanes qui composent la matrice extracellulaire. C'est un polymère à base de disaccharide GlcUA (acide D-glucuronique) et de GlcNAc (N-acétyl-D-glucosamine) liés entre eux par une liaison $\beta(1,3)$ et $\beta(1,4)$ [$-\beta(1,4)\text{-GlcUA}-\beta(1,3)\text{-GlcNAc}-$] [285]. (Figure 16). La taille du polymère varie grandement et peut dépasser plusieurs millions de Dalton et atteindre 25 μm . Le hyaluronane est très présent dans l'évolution des bactéries aux eucaryotes supérieurs et est exprimé de manière ubiquitaire chez l'homme.

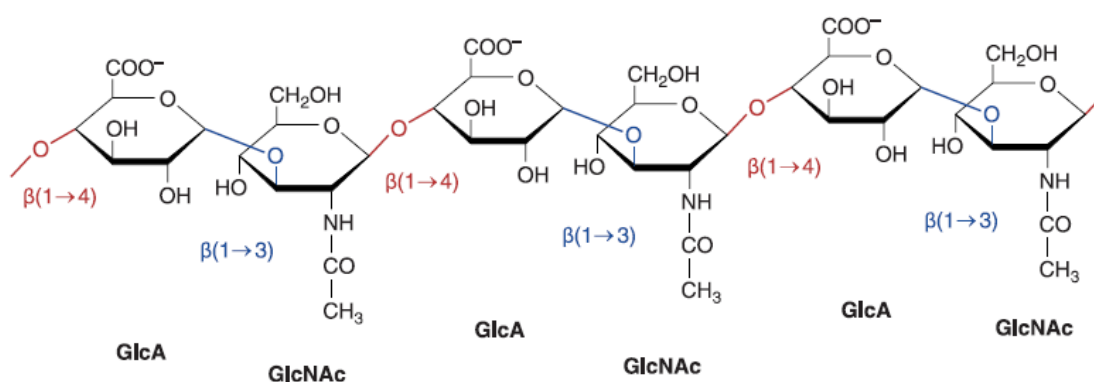


Figure 23 : Schéma d'une molécule de hyaluronane
(Jiang et al. 2013)

3.1.1. Métabolisme du hyaluronane

Le hyaluronane est synthétisé au niveau de la membrane plasmique par les « Hyaluronan synthase » (HAS1, 2,3). Ce sont des enzymes transmembranaires dont le site actif se situe sur la face interne de la membrane plasmique. La réaction de biosynthèse consiste en l'ajout de l'UDP- α -N-acetyl-D-glucosamine et l'UDP- α -D-glucuronate sur la chaîne en cours de formation. Le hyaluronane est excrété dans la matrice extracellulaire durant sa synthèse [287, 288].

Les HAS synthétisent des fragments de tailles différentes : HAS 1 et 2 synthétisent des fragments $> 5.10^5$ Da et HAS3 des fragments $< 5.10^5$ Da [289, 290]. Des études montrent cependant que toutes les HAS seraient capables de synthétiser des fragments de taille supérieure à 10^6 Da [291].

L'expression des HAS est régulée par des facteurs de croissance et des cytokines (comme le $TNF\alpha$, l'IL-1 β (interleukin-1 beta) ou l'EGF) [286]. Les substrats de la réaction modulent l'activité de ces enzymes [292]. Le hyaluronane sera ensuite soit internalisé par des récepteurs de surface et dégradé par les lysosomes [293, 294], soit dégradé dans le compartiment extracellulaire par les HYALs (hyaluronidases). Les HYALs hydrolysent la liaison β 1,4 entre le GlcNAc et le GlcUA. Il existe six HYAL (HYAL1-2-3-4, PH HYALP1) qui ont des profils d'expression tissulaire différents [286]. L'élimination des fragments de hyaluronane ainsi formés se fait dans la lymphe via le récepteur LYVE-1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) [295, 296], ou dans le foie via le récepteur HARE (hyaluronan receptor for endocytosis) [286, 297].

3.1.2. Rôles physiologiques et implication dans le cancer

De par ses propriétés physicochimiques (rétention de l'eau, interaction avec les constituants de la matrice extracellulaire) le hyaluronane joue un rôle important dans l'homéostasie et l'intégrité tissulaire. Il est ainsi impliqué dans l'hydratation, la lubrification des articulations, la formation d'une matrice permettant le soutien tissulaire et la migration cellulaire. Le hyaluronane est massivement produit lors d'un traumatisme tissulaire et dans la cicatrisation. Enfin il intervient également dans la réponse immunitaire et l'inflammation [286].

Les rôles physiologiques du hyaluronane sont étroitement liés à sa masse moléculaire. Sous sa forme native retrouvée par exemple dans le liquide synovial, le hyaluronane mesure ~ 1000 kDa.

Cependant des modifications des conditions physiologiques entraînent une polydispersité dans la taille des fragments avec une prédominance des fragments de faible poids moléculaire (LMW- HA). Il a été montré que les fragments < 5000 kDa induisent une réponse inflammatoire [286]. Les oligomères de 3 à 25 disaccharides stimulent l'angiogenèse, tandis que les fragments de grandes tailles sont antiangiogéniques [298, 299]. Les fragments de hyaluronane contenant 6 à 40 dimères augmentent le clivage du récepteur CD44 et la mobilité cellulaire, à l'inverse des fragments de plus grande taille [300].

Le hyaluronane est impliqué dans différentes pathologies dont le cancer. En effet, la plupart des tumeurs sont enrichies en hyaluronane où il est impliqué dans la progression tumorale et le phénomène métastatique. L'augmentation de la quantité de hyaluronane est due à une augmentation de la production de ce dernier par les cellules tumorales ou les cellules du stroma [301]. La surexpression et l'activation des HAS conduit à une augmentation du hyaluronane et à la production d'un environnement pro-métastatique [302]. Toutefois, si une augmentation modérée du hyaluronane peut favoriser la croissance tumorale un trop grand excès peut avoir l'effet inverse. Ainsi les HYAL sont nécessaires à la dégradation du hyaluronane et favorisent le maintien d'un phénotype invasif. D'autre part, les HYAL sont responsables de la production de fragments induisant la prolifération des cellules endothéliales et stimulant l'angiogenèse. Le hyaluronane protège également les cellules tumorales de l'action des lymphocytes T cytotoxiques [301].

3.2. Les récepteurs du hyaluronane

Le hyaluronane interagit directement sur la physiologie des cellules cancéreuses *via* son interaction avec ses récepteurs membranaires. Ces récepteurs interviennent dans la transduction de signal. Le hyaluronane sera ainsi impliqué dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire [303]. Les principaux récepteurs liant le hyaluronane seront présentés ici, ainsi que leur rôle dans le cancer.

3.2.1. Le récepteur CD44

L'interaction des cellules entre elles, ou avec les composants de la matrice extracellulaire, ainsi que leur locomotion sur l'endothélium des vaisseaux cellulaires se fait par le biais de molécules d'adhésion telles que les intégrines, les selectines, les cadhérines et le récepteur CD44. Hormis son rôle dans l'adhésion, le récepteur CD44 intervient dans de nombreux processus cellulaires comme la régulation de la croissance, la survie, la différenciation et la mobilité cellulaire. Toutes ces fonctions essentielles pour une vie cellulaire normale sont aussi associées à la physiopathologie du cancer.

3.2.1.1. Structure et expression du récepteur CD44

Le récepteur CD44 est un récepteur protéique transmembranaire, constitué d'une seule chaîne polypeptidique codé par le bras court du chromosome 11. Le gène du récepteur CD44 comporte 20 exons. Les exons 1 à 5 et 16 à 18 sont dits constants, les exons 6 à 15 (numérotés v1 à v10) et 19 et 20 sont dits variables. L'exon v1 est absent chez l'homme. Les mécanismes d'épissage alternatif permettent l'insertion d'un ou plusieurs exons variables, produisant ainsi un grand nombre d'isoformes. La forme la plus courante est dénommée standard (CD44s) où l'intégralité des exons variables (v2 à v10 chez l'homme) sont exclus. En théorie près de 800 isoformes peuvent être générées [304], mais à l'heure actuelle seule une trentaine ont été identifiées.

Le récepteur comporte (Figure 22) :

- Une partie extracellulaire : représentée par les exons 1 à 17 sur laquelle se trouve le domaine de liaison au hyaluronane.
- Un domaine transmembranaire : représenté par l'exon 18 jouant entre autre un rôle dans le métabolisme du hyaluronane [305]
- Une queue cytoplasmique : codée par les exons 19 et 20, possédant des sites de phosphorylation [306]. Elle est impliquée dans la signalisation cellulaire et les interactions avec le cytosquelette (en influençant la liaison au hyaluronane)

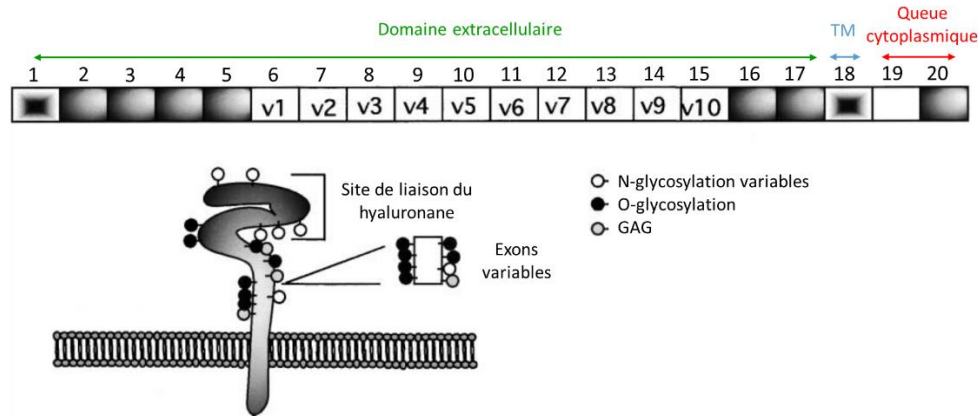


Figure 24 : Représentation schématique du récepteur CD44

Le gène du récepteur CD44 comporte 20 exons dont 10 (v1 à v10) seront insérés par épissage alternatif. Le récepteur comporte une partie extracellulaire, (vert) liant le hyaluronane et étant modifiée par des sucres sur les sites de O et N glycosylation ou des GAG (glycosaminoglycane), une partie transmembranaire (bleue) et une queue cytoplasmique (rouge). Adaptée d'après (Isacke et al. 2002).

Le degré de variabilité du récepteur CD44 est enrichi par les modifications post-traductionnelles. En effet l'attachement de GAG ainsi que des -N- et -O- glycosylation ont lieu au niveau du domaine extracellulaire. A titre d'exemple le poids moléculaire du CD44s va augmenter de 37kDa jusqu'à 80 à 100 kDa en raison de la fixation de GAG.

Le récepteur CD44 est largement exprimé dans l'organisme. On le retrouve dans les fibroblastes, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les cellules endothéliales et les leucocytes [307]. Le principal ligand du récepteur CD44 est le hyaluronane, mais il peut aussi interagir avec d'autres molécules dont le collagène, la fibronectine, le fibrinogène, la lamiline, le chondroïtine sulfate, l'ostéopontine, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, le L et E selectine, la serylgine [308].

La liaison du hyaluronane au niveau du récepteur CD44 se fait sur le domaine de liaison du hyaluronane situé sur la partie extracellulaire. Une densité minimum de récepteurs est requise pour permettre la liaison du hyaluronane au CD44 [309]. L'organisation spatiale du hyaluronane dans la matrice extracellulaire influe également sur la liaison au CD44 [310]. Enfin la longueur de la chaîne de hyaluronane affecte l'affinité pour le récepteur. Les petits fragments ont une faible affinité pour le récepteur, tandis que les grands fragments ont une forte affinité due à la liaison des grandes chaînes à plusieurs récepteurs [311].

Le récepteur possède trois états en fonction du statut de glycosylation : un état actif qui lie de manière constitutive le hyaluronane, un état inductible qui liera le hyaluronane s'il est stimulé par des facteurs de croissance ou des cytokines, et un état inactif qui ne liera pas le hyaluronane [312].

3.2.1.2. Rôles physiologiques du CD44

Le CD44, grâce à sa queue cytoplasmique, interagit avec le cytosquelette par l'intermédiaire de molécules telles que l'e-zrin-radixin-moesin et l'ankyrine [313]. Il relie donc le cytosquelette au hyaluronane [314]. Le CD44 est ainsi impliqué dans l'adhésion cellulaire et le maintien de la structure tridimensionnelle des tissus, intervient dans l'agrégation des macrophages, des lymphocytes et des fibroblastes [315, 316]. Dans ce contexte le hyaluronane sert de support et de ligand pour la migration des cellules [317] et permet le recrutement de cellules proinflammatoires, l'adhérence des lymphocytes aux cellules endothéliales vasculaires et leur extravasation, la migration des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules de mélanomes [307]. Le récepteur CD44 intervient également dans le recyclage et l'internalisation cellulaire du hyaluronane [318]. Les fragments de hyaluronane internalisés sont délivrés au lysosome et dégradés en monosaccharides [293, 294].

Le récepteur CD44 intervient dans la réception et la transduction de nombreux signaux extracellulaires soit par lui-même soit en collaboration avec d'autres molécules de surface via la cascade de signalisation NFκB (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells), la voie RAS-MAPK, la famille des protéines Rho, la voie de PI3K [306] (Figure 22). La stimulation cellulaire par du hyaluronane de faible poids moléculaire (LMW-HYA < 5.10⁵ Da) aura pour effet l'activation de la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, la survie cellulaire [306].

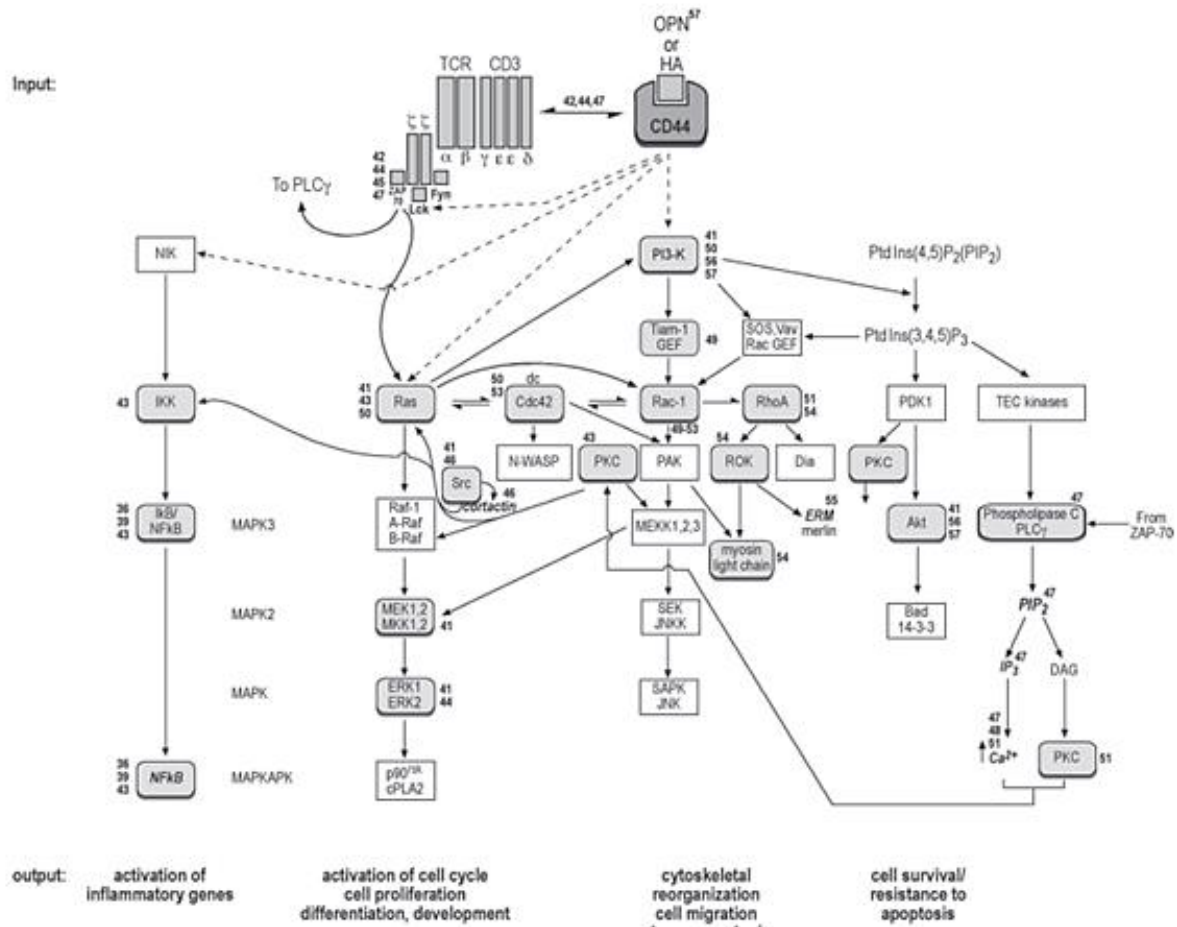


Figure 25 : Représentation schématique du rôle du récepteur CD44 dans la signalisation cellulaire. (Naor et al. 2002).

3.2.1.3. Implication du récepteur CD44 dans la tumorigénèse

La mise en relation entre l'interaction hyaluronane / récepteur CD44 et le cancer date de plus de trente ans [319].

Dans le cancer du poumon, il a été montré que l'expression de certains variants du récepteur CD44 est un facteur pronostique. La surexpression de CD44-v6 est associée à la différenciation cellulaire, la présence de métastases ganglionnaires et influe sur le sous-type histologique en orientant vers les carcinomes épidermoïdes [320, 321]. Inversement la sous-expression de CD44-v6 et v3 est associée avec les formes invasives d'adénocarcinomes [322]. La sous-expression du variant 3 (CD44v3) est aussi un facteur de mauvais pronostic et est corrélée avec la fréquence des rechutes ([323] pour revue).

Le CD44 induit la résistance à l'apoptose dans les cellules de cancer du côlon [324, 325] et l'activation de la prolifération et de la survie dans les adénocarcinomes mutés *KRAS* [326].

L'utilisation d'anticorps anti-CD44 provoque l'apoptose des cellules tumorales [327-329]. La relation entre CD44 et la voie de survie PI3K a clairement été établie [330, 331]

De manière générale, le récepteur CD44 participe à la tumorigénèse en établissant des complexes transmembranaires avec des corécepteurs, en liant des facteurs de croissance comme HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor), FGF-2 (Basic fibroblast growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) ou HGF (hepatocyte growth factor), ou en modulant la signalisation de certains récepteurs à activité tyrosine kinase tels que MET, VEGFR-2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2), EGFR, HER2. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et peuvent coexister. Ils ont un impact direct sur l'angiogenèse, la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Par exemple la liaison du hyaluronane avec le récepteur CD44 est responsable de la production autocrine de facteurs de croissance conduisant à la prolifération cellulaire dans le mélanome [332]. Elle induit également l'interaction entre CD44/HER2 activant l'activité tyrosine kinase de HER2 et la prolifération dans le carcinome de l'ovaire [333]. Dans le glioblastome la colocalisation CD44/EGFR, entraîne l'activation ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) après la fixation du hyaluronane [334].

L'activation du récepteur CD44 par le hyaluronane inhibe l'apoptose médiée par FAS (Apoptosis Stimulating Fragment) et les lymphocytes T cytotoxiques [335] et est impliquée dans la résistance au cisplatine [336]

La collaboration entre les MMP (Matrix Metalloprotease) et CD44 sur la surface cellulaire est nécessaire à la dégradation de la matrice extracellulaire et facilite la migration cellulaire. Le CD44 module la sécrétion et l'activation de MMP-2 et ancre la forme active de MMP-9 à la surface des cellules tumorales [337]. Le complexe CD44-MMP9 retrouvé sur les cellules en migration, peut provoquer la dégradation de collagène IV et l'invasion cellulaire. De plus le clivage du TGF- β par MMP-9 entraîne sa libération et une activation de l'angiogenèse tumorale [338].

Une augmentation du clivage du CD44 a été rapportée dans de nombreux cancers, suggérant que la dégradation du CD44 joue un rôle dans la progression tumorale [339].

La dégradation du hyaluronane par les HYAL en surface des cellules cancéreuses est responsable de la production de LMW-HYA, induit la protéolyse du CD44 par les métalloproteases et ainsi la mobilité et l'invasion [340].

Enfin de nombreuses études mettent en avant que le CD44 serait un marqueur des cellules souches de cancer (CSC: cancer stem cell). Il participerait également à l'acquisition par les CSC de leurs caractéristiques biologiques et à leur fonctionnement cellulaire [341]. Ces cellules souches sont des cellules qui ont la capacité de s'autorenouveler, de se différencier et de générer

une tumeur. Elles sont impliquées dans la progression de la maladie, les rechutes, participent au développement de métastases et sont généralement résistantes à la radiothérapie et aux chimiothérapies.

3.2.2. RHAMM

Le récepteur RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility expressed protein ou CD168) est exprimé dans de nombreux tissus et dans différents compartiments cellulaires comme la surface cellulaire, le cytosquelette, la mitochondrie, et le noyau. Plusieurs isoformes du récepteur existent [342].

RHAMM joue un rôle important dans la réparation tissulaire, l'adhésion et la migration des cellules dans le tissu sain et tumoral. La liaison de LMW-HYA sur le récepteur RHAMM membranaire provoque l'activation de la voie RAS/MAPK par interaction avec la protéine adaptatrice SRC et le PDGF (platelet-derived growth factor receptor). L'interaction de RHAMM avec CD44 conduit également à l'activation de la voie RAS/MAPK [343]. RHAMM intracellulaire régule également RAS, et le cycle cellulaire [314, 342].

Le récepteur RHAMM est impliqué dans le développement et est un facteur pronostique dans de nombreux cancers [344]. Dans les carcinomes pulmonaires à grandes cellules l'expression de RHAMM est associée avec un plus faible taux de survie [345].

3.2.3. LYVE-1

LYVE-1, est un récepteur analogue du CD44 exprimé au niveau des vaisseaux et des ganglions lymphatiques, du foie et de la rate [346].

La dégradation du hyaluronane provoque son relargage dans le tissu lymphatique, puis sa dégradation dans les ganglions et l'évacuation par un vaisseau lymphatique au niveau du foie pour son hydrolyse finale [347].

LYVE-1 joue un rôle dans le transport du hyaluronane du tissu vers la lymphe [295, 296]. Ce récepteur est également impliqué dans le transport cellulaire des cellules dans les vaisseaux et les ganglions lymphatiques [348]. L'interaction LMW-HYA avec LYVE-1 est impliquée dans lymphangiogénese [349].

L'expression de LYVE-1 est un facteur pronostique dans le neuroblastome [350] et le carcinome de la langue [351]. Dans le cancer de l'estomac, une corrélation positive a été observée entre le niveau d'expression de LYVE-1 et un envahissement lymphatique [352]. LYVE-1 participe également à la résistance à la chimiothérapie dans le lymphome [353].

3.2.4. HARE

HARE aussi appelé stabilin-2 ou FEEL-2, est une protéine transmembranaire principalement exprimée dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques [297]. Ce récepteur existe sous deux isoformes et possède 14 ligands dont le hyaluronane et l'héparine [354]. Il intervient dans le recyclage de ces derniers [286, 297].

Le hyaluronane circulant dans le sang ou la lymphe se lie au récepteur HARE et est internalisé dans les cellules et pris en charge par les lysosomes pour la dégradation [355, 356]. Ce récepteur régule ainsi la concentration de hyaluronane dans le sang, évitant ainsi une trop grande viscosité du sang [356]. L'interaction du hyaluronane avec le récepteur HARE participe également à la signalisation cellulaire en activant les voies MAPK/ERK1/2 et NFκB [357-359]

3.2.5. Autres récepteurs liant le hyaluronane

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) est une protéine transmembranaire exprimée constitutivement sur les cellules endothéliales vasculaires, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les lymphocytes et les macrophages. Elle possède un domaine extracellulaire ressemblant aux immunoglobulines et une queue intracytoplasmique intervenant dans la signalisation cellulaire et la liaison au cytosquelette [360]. Ce récepteur joue un rôle dans l'interaction cellules-cellules et la migration des leucocytes.

L'interaction hyaluronane/ICAM-1 joue un rôle dans les phénomènes anti-inflammatoires [361] [362], l'adhésion cellulaire [363] et l'apoptose [364].

Les récepteurs TLRs (toll like receptors) sont des récepteurs transmembranaires en charge de la reconnaissance des bactéries, des virus, et des invasions fongiques. Ils jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire innée [365]. Les principaux TLR interagissant avec le hyaluronane sont TLR2 et TLR4 et participent à la sécrétion de cytokines, à la maturation des cellules dendritiques, à l'inflammation et inhibent la différenciation des ostéoclastes [286].

3.3. Stratégie de ciblage du récepteur CD44

Nous venons de voir que le récepteur CD44 et son interaction avec le hyaluronane jouent un rôle prépondérant dans la tumorigénèse. De nombreuses stratégies visant à bloquer l'interaction du hyaluronane avec le récepteur CD44 ont ainsi été développées. D'autre part la surexpression du récepteur CD44 dans de nombreuses tumeurs permet son ciblage par des transporteurs de molécules thérapeutiques utilisant du hyaluronane ou des anticorps. Ces deux approches ont été et sont encore largement étudiées. Les principales données de la littérature sont résumées dans [366, 367].

3.3.1. Anticorps CD44

Les principales stratégies utilisant des anticorps anti-CD44 ciblent l'isoforme CD44v6. Le premier anticorps développé est un anticorps monoclonal murin (VFF18), ciblant les carcinomes squameux [368]. Un autre anticorps monoclonal anti-CD44-v6, le BIWA-1, a été évalué en clinique chez des patients porteurs de carcinomes de la tête et du cou (HNSCC), montrant une forte captation tumorale et une demi-vie sanguine d'environ trois jours sans effet indésirable imputable au traitement [369]. Une version humanisée, le BIWA-4 ou bivatuzumab, a ensuite été développée [370] et a montré chez 10 patients avec un HNSCC que le traitement est bien toléré, cible les tumeurs primaires et les métastases et permet de stabiliser la maladie [371, 372].

Une prodrogue couplant la mersantine au bivatuzumab a été développée et évaluée en clinique. Le développement de nécrose épidermique ayant entraîné la mort a conduit à l'arrêt de son développement [373, 374]. Actuellement, l'anticorps anti-CD44, le RG7356 est en cours d'évaluation préclinique [375].

3.3.2. Liaison covalente de molécules thérapeutiques au hyaluronane

L'effet de molécules liant de façon covalente une chaîne de hyaluronane à des molécules thérapeutiques a été évalué *in vitro* et *in vivo* dans de nombreux modèles tumoraux.

Le hyaluronane lié au sodium butyrate a montré *in vitro* son efficacité dans les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 [376]. Son évaluation *in vivo* dans un modèle de métastases hépatiques a montré une forte diminution du développement de ces métastases [377]. Le couplage du hyaluronane au paclitaxel a été largement étudié *in vitro* [378-381] et a permis de diminuer la toxicité du paclitaxel dans des modèles *in vivo* de cancer de la vessie [382], d'améliorer le temps de circulation plasmatique et l'effet thérapeutique dans des modèles de tumeur de l'ovaire [383, 384]. Enfin un essai de phase II évaluant le couplage du hyaluronane à l'irinotecan dans le cancer colorectal métastatique, a mis en évidence une survie sans progression et un temps avant rechute plus long dans le groupe traité par hyaluronane-irinotecan que dans le groupe contrôle [385]. Une étude de phase III est actuellement en cours (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01290783).

3.3.3. Encapsulation au sein de nanovecteurs

Le hyaluronane peut être utilisé pour encapsuler de manière non covalente des molécules thérapeutiques. Dans cette approche, le hyaluronane est utilisé à la fois comme excipient et agent de ciblage. *Saravanakumar et al.* a développé une nanoparticule autoassemblée de 247-356 nm dans laquelle le paclitaxel est encapsulé. Cette nanoparticule est internalisée de manière spécifique et montre une plus forte cytotoxicité dans les cellules (SCC)-7 exprimant le CD44 [380]. Des essais cliniques évaluant le 5-fluorouracil ou la doxorubicine combinés au hyaluronane ont montré une réponse tumorale au traitement et une bonne tolérance [386]. L'encapsulation de l'irinotecan dans le hyaluronane a également montré son efficacité dans le traitement du cancer colorectal et une réduction des effets indésirables [387].

L'encapsulation de molécules thérapeutiques peut également être réalisée au sein de nanoparticules coiffées de fragments de hyaluronane. Une grande diversité de transporteurs a été générée. Ils se distinguent par la nature du vecteur et la taille des fragments de hyaluronane. On retrouve notamment des micelles de hyaluronane-paclitaxel [388], des nanoparticules de

chitosan chargées avec du 5-fluorouracil [389], des particules de fer délivrant des peptides [390], des liposomes chargés avec la mytocyne ou la doxorubicine [391, 392].

Dans les CBNPC des lipoplexes ciblant le CD44 ont été testés dans la lignée A549 [393]. La même équipe a montré la capacité de liposomes DOTAP/DOPE modifiés avec le hyaluronane à délivrer des siRNA anti-téломérase dans les cellules A549 [394]. D'autres approches s'appuyant sur des liposomes coiffés de hyaluronane et ciblant le CD44 ont été développées [395-398] et permettent de le transport de la gemcitabine dans les cellules d'adénocarcinomes du pancréas [396, 397].

L'équipe de S. Lecommandoux a développé un polymersome ciblant le récepteur CD44 grâce au fragment de hyaluronane rentrant dans sa composition [225]. Une étude de toxicité menée avec ces particules vides a montré l'absence de toxicité et une dose maximum tolérée de 10 g/kg chez la souris. Ces polymersomes chargés avec du docetaxel [399] ont montré l'absence d'hémolyse, une augmentation de la demi-vie sanguine et une plus grande accumulation du docetaxel encapsulé par rapport au docetaxel seul dans les organes [399]. Des études menées avec ces vésicules chargées avec de la doxorubicine ont montré *in vitro* une meilleure captation cellulaire par rapport à la doxorubicine libre, une internalisation des particules chargées par les cellules corrélée avec l'expression du CD44 et une meilleure efficacité thérapeutique chez le rat porteur de tumeur mammaire par rapport à la doxorubicine seule [400]. Des résultats complémentaires obtenus chez la souris dans le modèle « Ehrlich ascite tumor », ont montré une croissance tumorale significativement retardée et une survie prolongée dans le groupe recevant la doxorubicine encapsulée [401].

Objectifs

Nous avons vu dans cette introduction que le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Les cancers bronchiques non à petites cellules représentent 80% des cancers du poumon et possèdent un pronostic extrêmement médiocre, avec une survie à 5 ans inférieure à 15%. Un des enjeux actuels est d'adapter le traitement du cancer du poumon pour proposer des thérapeutiques ciblées plus efficaces et moins agressives. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (EGFR-TKI, gefitinib et erlotinib) constituent un réel progrès pour le traitement des cancers du poumon. Cependant, des mécanismes de résistance ont été décrits et des traitements combinés de thérapies ciblées avec des EGFR-TKI, bloquant simultanément plusieurs voies de signalisation pourraient permettre de surmonter les résistances dans les cancers du poumon.

Dans ce contexte, l'équipe a montré que l'AREG coopère avec le l'IGF1R pour induire une résistance à l'apoptose [402, 403] et contribue à la résistance aux EGFR-TKI dans les tumeurs pulmonaires [135, 137], en particulier les adénocarcinomes mucineux avec une mutation *KRAS* [50]. Des combinaisons d'EGFR-TKI avec des anti-AREG [50, 137], anti-IGF1R [50], ou des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi) [137, 404] constituent ainsi de nouvelles approches thérapeutiques pour contourner cette résistance. Cependant les voies de signalisation mises en jeu et les partenaires cellulaires impliqués dans ces mécanismes dépendant de l'acétylation ne sont pas clairement identifiés.

Dans un premier temps, nous avons donc étudié les voies de signalisation impliquées dans la résistance aux EGFR-TKI et mises en jeu par la coopération AREG/IGF1R en lien avec les mécanismes dépendant de l'acétylation. Nous avons analysé l'activation de ces voies chez des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires et *in vitro* dans des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires avec un *EGFR* sauvage avec une mutation *KRAS*. Nous avons ainsi étudié l'impact de l'inhibition de ces voies sur la résistance aux EGFR-TKI.

Cette étude a également été élargie à différents modèles cellulaires de CBNPC et d'hépatocarcinomes (HCC) résistants aux thérapies ciblées, en particulier aux TKI. Nous avons ainsi étudié *in vitro* et *in vivo* le potentiel thérapeutique de combinaisons de traitements ciblés.

Les molécules thérapeutiques doivent atteindre spécifiquement le site tumoral, nécessitant parfois de les protéger contre leur dégradation, de réduire leurs effets indésirables, et de contrôler leur libération dans le temps et l'espace, à l'aide de transporteurs [405]. Les vecteurs de drogues peuvent cibler les cellules cancéreuses passivement ou activement. Le ciblage actif des tumeurs peut être réalisé par greffage d'un motif de ciblage sur les vecteurs contenant les agents thérapeutiques, permettant la reconnaissance d'antigènes ou de récepteurs surexprimés

au niveau des tissus cibles. Par conséquent, les nanovecteurs de médicaments offrent des améliorations majeures pour le traitement du cancer *via* leur spécificité à atteindre le site tumoral et la distribution efficace des agents anticancéreux [206].

Dans la deuxième partie de cette thèse, en collaboration avec l'équipe de S. Lecommandoux (CNRS UMR-5629, Bordeaux), nous avons évalué les capacités de ciblage de tumeurs pulmonaires de nanoparticules polymériques contenant une partie polysaccharidique, le hyaluronane, ligand du récepteur CD44 surexprimé dans certaines tumeurs. Nous avons comparé les voies systémique et pulmonaire pour l'administration des nanoparticules. Les combinaisons de molécules thérapeutiques que nous avons identifiées précédemment et permettant de contourner la résistance aux EGFR-TKI ont été chargées dans ces vecteurs et nous étudierons *in vitro* leur effet thérapeutique.

Résultats

I. IDENTIFICATION DE CIBLES THERAPEUTIQUES ET DE COMBINAISONS DE TRAITEMENTS.

1. Résistance aux thérapies ciblées impliquant la voie PI3K/AKT et les mécanismes dépendant de l'acétylation dans les adénocarcinomes pulmonaires

1.1. Présentation de l'étude et des principaux résultats

En amont de ce travail, notre équipe avait montré le rôle de l'AREG, un ligand de l'EGFR et facteur de mauvais pronostic dans les CBNPC de stades avancés [406], dans la résistance aux thérapies anti-EGFR, en particulier les EGFR-TKI (gefitinib). Les travaux menés ont montré que l'AREG coopère avec l'IGF1R, conduisant à la résistance à l'apoptose [402, 403] et aux EGFR-TKI [50, 137]. La surexpression d'AREG et d'IGF1R est retrouvée dans les adénocarcinomes pulmonaires mucineux, qui sont fréquemment mutés *KRAS* et résistent aux EGFR-TKI [50, 139]. L'AREG, en présence de gefitinib, diminue le niveau d'expression de la protéine proapoptotique BAX, inhibe son changement de conformation et l'inactive dans le cytoplasme [137]. De plus, l'AREG inhibe l'acétylation de la protéine Ku70 induite par le gefitinib, qui interagit alors avec BAX pour le séquestrer dans le cytoplasme, empêchant ainsi la mort cellulaire [135]. L'AREG prévient donc l'apoptose induite par gefitinib *via* un mécanisme dépendant de l'acétylation. L'utilisation d'inhibiteurs des HDACs, comme la TSA ou, le vorinostat (inhibiteurs des HDACs de classes I et II) et le nicotinamide (inhibiteur des sirtuines), sensibilise fortement les cellules au gefitinib, en acétylant Ku70, provoquant la libération de BAX et l'apoptose.

Les voies de signalisation induites par la coopération de l'AREG et de l'IGF1R en présence d'EGFR-TKI, conduisant à la régulation de l'acétylation ne sont pas connues, et les HDACs régulant ces mécanismes d'acétylation ne sont pas clairement identifiées.

Dans cette étude nous avons analysé les voies de signalisation impliquées dans la résistance aux EGFR-TKI, en nous focalisant sur les voies des PI3K/AKT et MAPK/ERK1/2 qui sont principalement activées par les récepteurs tyrosine kinase (EGFR et IGF1R) dans 62 échantillons d'adénocarcinomes pulmonaires, incluant 34 tumeurs de patients traités par gefitinib (essai clinique IFCT0401). De plus, nous avons examiné si l'inhibition de ces voies

pouvait contrer la résistance induite par l'AREG et l'IGF1R dans des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires mutées *KRAS*.

Nous montrons que, chez les patients avec un EGFR sauvage, l'activation d'AKT est associée avec une progression de la maladie sous traitement par gefitinib. *In vitro*, nous montrons que la coopération AREG/IGF1R conduit à l'activation de la voie PI3K/AKT en présence de gefitinib, et au contrôle de l'interaction BAX/Ku70 et l'inhibition de l'apoptose. L'inhibition de l'AREG ou l'IGF1R bloque l'activation de cette voie et libère BAX de Ku70, restaurant ainsi l'apoptose dans les cellules traitées par gefitinib. L'inhibition de la voie PI3K/AKT restaure aussi l'apoptose induite par gefitinib, suggérant que ce traitement pourrait sensibiliser les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires avec un *EGFR* sauvage et une mutation *KRAS*. De plus, les HDACi, et en particulier les inhibiteurs des HDACs de classes IIb et III, qui diminuent l'interaction entre BAX et Ku70, inhibent l'activation de la voie PI3K/AKT et induisent l'apoptose en réponse au gefitinib. Il est à noter que la seule inhibition des HDACs de classe IIb ne permet pas de restaurer la sensibilité aux EGFR-TKI, suggérant des mécanismes de compensation entre les HDACs et les sirtuines.

1.2. Article 1

“The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant *KRAS* lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism.” Jeannot V, Busser B, Brambilla E, Wislez M, Robin B, Cadranel J, Coll JL, Hurbin A. **International Journal of Cancer**, 2014. **134**(11):2560-71.

The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant *KRAS* lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism

Victor Jeannot^{1,2}, Benoît Busser^{1,2,3}, Elisabeth Brambilla^{1,2,3}, Marie Wislez^{4,5}, Blaise Robin^{1,2}, Jacques Cadranel^{4,5†}, Jean-Luc Coll^{1,2} and Amandine Hurbin^{1,2}

¹INSERM U823, Grenoble, France

²University UJF Grenoble 1, Grenoble, France

³CHRU Grenoble University Hospital, Grenoble, France

⁴AP-HP Tenon Hospital, Pneumology Service, University Paris 6, France

⁵Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT), Paris, France

To select the appropriate patients for treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs), it is important to gain a better understanding of the intracellular pathways leading to EGFR-TKI resistance, which is a common problem in patients with lung cancer. We recently reported that mutant *KRAS* adenocarcinoma is resistant to gefitinib as a result of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 receptor overexpression. This resistance leads to inhibition of Ku70 acetylation, thus enhancing the BAX/Ku70 interaction and preventing apoptosis. Here, we determined the intracellular pathways involved in gefitinib resistance in lung cancers and explored the impact of their inhibition. We analyzed the activation of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathway and the mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal regulated kinase (MAPK/ERK) pathway in lung tumors. The activation of AKT was associated with disease progression in tumors with wild-type *EGFR* from patients treated with gefitinib (phase II clinical trial IFCT0401). The administration of IGF1R-TKI or amphiregulin-directed shRNA decreased AKT signaling and restored gefitinib sensitivity in mutant *KRAS* cells. The combination of PI3K/AKT inhibition with gefitinib restored apoptosis via Ku70 downregulation and BAX release from Ku70. Deacetylase inhibitors, which decreased the BAX/Ku70 interaction, inhibited AKT signaling and induced gefitinib-dependent apoptosis. The PI3K/AKT pathway is thus a major pathway contributing to gefitinib resistance in lung tumors with *KRAS* mutation, through the regulation of the BAX/Ku70 interaction. This finding suggests that combined treatments could improve the outcomes for this subset of lung cancer patients, who have a poor prognosis.

Key words: EGFR-TKI resistance, lung cancer, PI3K-AKT, sirtuins, IGF1R

Abbreviations: EGFR: epidermal growth factor receptor; HDAC: histone deacetylases; IGF1R: insulin-like growth factor-type 1 receptor; IFCT: Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; MAPK/ERK: mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal regulated kinase; NSCLC: non-small cell lung cancers; PDK: phosphatidylinositol-3-kinase-dependent kinase; PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase; shRNA: small hairpin ribonucleic acid; siRNA: small interfering ribonucleic acid; TKI: tyrosine kinase inhibitor. Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

[†]Jacques Cadranel is an IFCT0401 Principal Investigator.

Grant sponsors: “La Ligue Contre le Cancer” (“comités Isère” and “Puy de Dôme”) and “La Fondation de France”; Grenoble University (Erasmus-Mundus program) and “La Région Rhône-Alpes”

DOI: 10.1002/ijc.28594

History: Received 15 May 2013; Accepted 28 Oct 2013; Online 8 Nov 2013

Correspondence to: Amandine Hurbin, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, BP170 Grenoble, F-38042 cedex 9, France, Fax: +33-476-549-413, E-mail: amandine.hurbin@inserm.fr

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequently overexpressed in nonsmall-cell lung cancers (NSCLCs) and is associated with a poor prognosis.¹ As a consequence, therapies targeting the tyrosine kinase activity of EGFR (EGFR-TKIs, such as gefitinib and erlotinib) have been developed, and are highly effective for the treatment of *EGFR*-mutated NSCLC.² For patients with *EGFR* wild-type tumors, first-line chemotherapy is still the standard of care.² EGFR-TKIs are approved for the second- and third-line treatment of advanced NSCLC or as maintenance therapy.² However, the limited response rates to EGFR-TKIs observed in *EGFR* wild type led to the investigation of mechanisms governing resistance to EGFR-TKI treatments.³ Tumors with constitutive activation of *KRAS* small GTPase (30%) are hypothesized to be intrinsically resistant to EGFR-TKI.² Elevated level of circulating amphiregulin, an EGFR ligand, is correlated with a poor prognosis in NSCLC patients.⁴ Our group has demonstrated that amphiregulin cooperates with the insulin-like growth factor-type 1 receptor (IGF1R)^{5,6} to promote resistance to gefitinib-induced apoptosis in *KRAS* mutant NSCLC cells.^{7,8} The overexpression of amphiregulin or IGF1R has been observed in the mucinous invasive adenocarcinoma subtype of NSCLC tumors, which often harbors *KRAS* mutations

What's new?

EGFR is frequently overexpressed in non-small cell lungcancers (NSCLCs) and is associated with poor prognosis. While therapies targeting the tyrosine kinase activity of EGFR (EGFR-TKIs, such as gefitinib) are highly effective for the treatment of EGFR mutated NSCLC, limited response rates are observed in EGFR wild-type NSCLC. Here the authors found that the PI3K/AKT pathway contributes to gefitinib resistance in mutant *KRAS* adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism. They showed for the first time that the PI3K/AKT pathway induces survival of wild-type EGFR NSCLCs with *KRAS* mutations, suggesting a new therapeutic target for treating this subset of lung cancer patients.

and is resistant to EGFR-TKI treatments.^{8,9} In addition, amphiregulin prevents gefitinib-induced cell death through the inhibition Ku70 protein acetylation, thus enhancing the interaction between the proapoptotic protein BAX and Ku70.^{7,10} However, the survival-signaling pathway that is induced by amphiregulin and IGF1R in the presence of an EGFR-TKI, leading to the regulation of acetylation, is not fully understood. Receptor tyrosine kinases, such as EGFR or IGF1R, mainly activate the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT and mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) pathway. PI3K/AKT signaling is frequently deregulated in NSCLC.¹¹ Recent studies indicate that the PI3K/AKT pathway plays a crucial role in the resistance to various types of TKI, including EGFR-TKIs.^{12–14}

Acetylation is a reversible modification controlled by the antagonistic actions of two types of enzymes, histone acetyltransferases and histone deacetylases (HDACs). HDACs regulate the function of histones and many nonhistone proteins by modulating their acetylation status and have emerged as crucial transcriptional co-repressors in highly diverse physiological and pathological systems.¹⁵ To date, 18 human HDACs have been identified and grouped into four classes.¹⁵ Class I, class II (subdivided into classes IIa and IIb) and class IV HDACs are named “classical” HDACs. Class III HDACs are also called sirtuins. The expression of HDACs is deregulated in many cancer types. Interestingly, class I and II HDACs are involved in lung carcinogenesis.^{15,16} The use of class I/II HDACs inhibitor (trichostatin A) or class III HDACs inhibitor (nicotinamide) results in the increased acetylation of Ku70 and the dissociation of BAX/Ku70.^{10,17} Recently, the tubulin deacetylase HDAC6 has been shown to deacetylate Ku70 and to regulate BAX/Ku70 binding in neuroblastoma.¹⁸

In the present study, we analyzed the intracellular pathways associated with EGFR-TKI response in *EGFR* wild-type lung adenocarcinoma. In particular, we examined whether the activation of AKT or ERK1/2 can predict the responses of patients with adenocarcinoma to gefitinib as well as whether the inhibition of these signaling pathways can overcome EGFR-TKI resistance induced by amphiregulin and IGF1R in mutant *KRAS* adenocarcinoma cells. In this setting, we investigated the relationships between AKT or ERK1/2 activation and acetylation-dependent regulation of BAX/Ku70 interaction.

Material and methods**Immunohistochemistry of NSCLC tumors**

The experiments were performed on 62 formalin-fixed paraffin-embedded human adenocarcinoma samples. Twenty-eight were taken from the site of the surgical resections of lung tumors, and 34 were collected from patients enrolled in the prospective multicenter phase II trial that was conducted to evaluate gefitinib as a first-line therapy for non-resectable adenocarcinoma (IFCT0401, NCT00198380).⁹ All patients enrolled in this trial provided informed consent. Tissue banking and research conduct were approved by the ministry of research (approval AC-2010-1129) and by the regional IRB (CPP 5 Sud-Est). *EGFR* exons 18–21 and *KRAS* exon 2 were amplified and sequenced in both directions, as previously described.⁸ Mucinous invasive adenocarcinoma were categorized as mucinous type ($n = 15$), whereas others adenocarcinoma were categorized as nonmucinous type ($n = 47$), as previously described.⁸

Immunostaining analysis was performed with 3- μ m-thick tissue sections on an automated instrument (BenchMark, Ventana Medical Systems). Sections were incubated with antibody against phosphorylated-AKT or -ERK1/2 (Cell Signaling Technology, 1/50 and 1/100, respectively). An indirect biotin avidin system and the Ventana Basic DAB detection kit (Ventana Medical Systems) were used, according to the manufacturer's instructions. The omission of the primary antibody and/or incubation with same species and isotype IgG at the same concentration of the primary antibody served as negative controls. Pathologists blinded to the clinicopathological variables, mutation status and treatment response independently evaluated the immunostaining. Differential scores (0–300) were ascribed by multiplying the percentage of stained cells (0–100%) by the staining intensity (1+, 2+, 3+). A score >0 was considered positive.

Cell culture and drug treatments

The human H358 and H322 NSCLC cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Amphiregulin-directed or control shRNA lentiviral particles (Santa Cruz Biotechnology) were used to infect H358 cells. Stable cell lines were selected by culturing cells in

2 µg/mL puromycin (Calbiochem, La Jolla, CA) for 2 weeks. Western blotting or qPCR was used to determine the effects of gene expression knockdown as described.⁷

Tubastatin A, LY294002, gefitinib, PD98059 and OSI-906 were from Selleckchem (Munich, Germany); trichostatin A, nicotinamide, U0126 and sodium butyrate were from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

Apoptosis assays

The morphological changes related to apoptosis were assessed by fluorescence microscopy after Hoechst 33342 (5 µg/mL, Sigma) staining of cells. The percentage of apoptotic cells was scored after counting at least 500 cells. Active caspase-3 was detected by immunoblotting or by flow cytometry using a phycoerythrin-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody kit (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France), following the manufacturer's instructions. The analysis was performed on a BD-Accuri C6 flow cytometer with CFlow-Plus software (BD Biosciences).

Immunoprecipitation and immunoblotting

Endogenous BAX immunoprecipitation and immunoblotting experiments were performed as previously described^{7,10} using antibodies against Ku70 (N3H1), IGF1Rβ (Santa Cruz Biotechnology), BAX (BD Pharmingen), cleaved caspase-3 (Asp¹⁷⁵), actin, phospho-EGFR-Y¹⁰⁶⁸, EGFR, phospho-IGF1R-Y^{1135/1136}, phospho-AKT-S⁴⁷³, pan-AKT, phospho-ERK1/2-T²⁰²/Y²⁰⁴ and ERK1/2 (Cell Signaling Technology, St Quentin en Yvelines, France). The relative intensity, measured using ImageJ (NIH software), of co-precipitated Ku70 was normalized to the respective immunoprecipitated Bax.

Statistical analyses

Difference in treatments and continuous variables were compared using the Kruskal–Wallis test or Mann–Whitney *U*-test. Two-sided *p* values <0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using Statview 4.1 software (Abacus Concept, Berkeley, CA).

Results

AKT and ERK1/2 activation in patients

We previously showed that gefitinib resistance is associated with the overexpression of IGF1R and amphiregulin in mucinous invasive adenocarcinoma.⁸ We investigated the intracellular pathways involved in this resistance by analyzing the phosphorylation of AKT (p-AKT) and ERK1/2 (p-ERK1/2) in 62 lung adenocarcinoma samples. p-ERK1/2 and p-AKT were undetectable in normal tissues distant from cancer tissues and moderately detectable in normal bronchial epithelia adjacent to tumor cells. p-AKT and p-ERK1/2 displayed diffuse cytoplasmic staining and less frequent (~32% of positive tumors) nuclear staining patterns (Fig. 1a). Twenty-five (49%) and 49 (82%) tumors had a staining score >0 for p-AKT and p-ERK1/2, respectively (Fig. 1b). The medians of the staining scores for p-AKT and p-ERK1/2 are shown in Table 1. High p-

ERK1/2 levels were strongly associated with the presence of lymph-node metastasis (*p* = 0.0053); p-AKT levels were also higher in tumors with lymph-node metastasis (not significant).

Five tumors (8%) had *EGFR* exon-19 or -21 mutations. All were non-mucinous subtypes, as previously described,⁸ and had higher levels of p-AKT (*p* = 0.0732), highlighting the continuous activation of the mutated *EGFR*.

Among *EGFR* wild-type tumors, 11 (19%) had a *KRAS* exon 2 mutation and higher p-AKT and p-ERK1/2 levels (not significant). No additional relationships were observed between p-AKT and p-ERK1/2 (Table 1) or between *EGFR*, IGF1R, amphiregulin expression (Supporting Information Table S1) and other clinical parameters in *EGFR* wild-type tumors.

p-AKT, p-ERK1/2 and the gefitinib response

Among the adenocarcinoma samples, we analyzed the responses to gefitinib of the 34 patients with surgical samples who were enrolled in the IFCT0401 phase II clinical trial, initially conducted to evaluate gefitinib as a first-line therapy for nonresectable adenocarcinoma.⁹ Twelve patients achieved disease control at 3 months with gefitinib treatment.⁸ Among them, four patients with an *EGFR* mutation had a partial response to treatment. Consistent with the enhanced p-AKT levels in patients with mutated *EGFR* among the 62 tumors, a high p-AKT was associated with a partial response to gefitinib (*p* = 0.0378, Table 1). No significant relationship was observed between p-ERK1/2 level and disease control with gefitinib (*p* = 0.43, Table 1).

Interestingly, in patients with wild-type *EGFR*, a high p-AKT level was associated with disease progression (*p* = 0.0475, Fig. 1c), whereas the eight patients with stable diseases had wild-type *EGFR* and *KRAS* and did not express p-AKT. No significant relationship was observed between p-ERK1/2 level and disease progression in patients with wild-type *EGFR* (*p* = 0.32, Fig. 1c). These results suggest that high p-AKT levels are associated with gefitinib resistance in lung adenocarcinoma with wild-type *EGFR*, independently of *KRAS* mutational status.

Amphiregulin and IGF1R activate AKT and promote gefitinib resistance

Amphiregulin and IGF1R control gefitinib resistance in adenocarcinoma cells with wild-type *EGFR*,^{7,8} as seen using the mutant *KRAS* adenocarcinoma cell line H358, which overexpresses amphiregulin⁶ and is resistant to gefitinib.^{7,8} Small hairpin RNA (shRNA) were used to stably silence amphiregulin expression (Fig. 2a) and to restore the sensitivity to gefitinib at the same level as that of the wild-type *EGFR* and *KRAS*, amphiregulin-lacking NSCLC cell line H322 (Fig. 2b). We examined the phosphorylation of EGFR, IGF1R and their downstream pathways (the PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathways) by western blotting. As previously shown,⁸ gefitinib decreased the level of p-EGFR and increased the levels of p-IGF1R, p-AKT and p-ERK1/2 after 96 hr of treatment (Figs. 2c and 2e, second column). Amphiregulin-directed shRNA prevented gefitinib resistance by

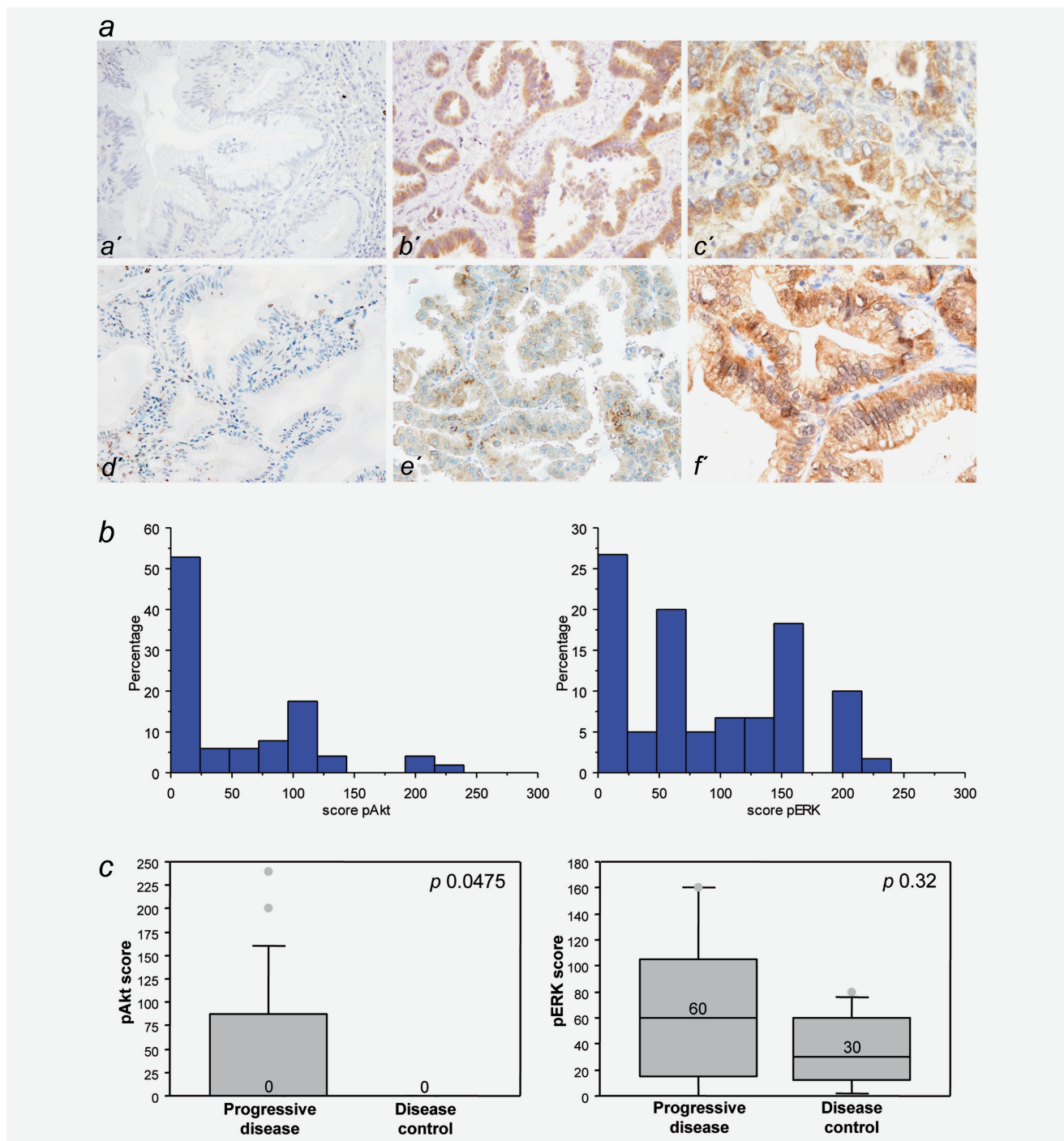


Figure 1. p-AKT and p-ERK1/2 immunostaining in NSCLC tumors. (a) Immunohistochemistry showing p-AKT expression (a, negative score, b, score of 100, c, score of 240) and p-ERK1/2 expression (d, negative score, e, score of 60, f, score of 160). Original magnification: 200 $\times$. (b) Distribution of p-AKT (left) and p-ERK1/2 (right) staining across all tumor samples: percentage of samples (Y-axis) showing the indicated scores of stained cells (X-axis). (c) Distribution of p-AKT scores (left) and p-ERK1/2 (right) scores, according to disease control with gefitinib in patients with wild-type *EGFR*. Numbers: median score staining. Statistical analysis was carried out using the Mann-Whitney *U*-test.

inhibiting p-IGF1R and p-AKT, whereas ERK1/2 phosphorylation was not affected (Fig. 2c). OSI-906, an IGF1R-TKI, inhibited cell proliferation (Supporting Information Fig. S1) and restored gefitinib-induced apoptosis in H358 cells (Fig. 2d). OSI-906 also strongly blocked p-IGF1R and the gefitinib resistance by decreas-

ing p-AKT but not p-ERK1/2 (Fig. 2e). These results further suggest that amphiregulin and IGF1R control resistance to gefitinib through the activation of downstream PI3K/AKT.

To confirm the importance of the PI3K/AKT pathway in gefitinib resistance, we examined whether the inhibition of

Table 1. Immunohistochemical analysis of p-AKT and p-ERK1/2 in lung adenocarcinoma

	<i>n</i> (%)	p-AKT		p-ERK1/2	
		Median (range)	<i>P</i>	Median (range)	<i>p</i>
All patients	62 (100%)	0 (0–240)		60 (0–240)	
Gender			0.26		0.63
Male	39 (63%)	30 (0–240)		100 (0–210)	
Female	23 (37%)	0 (0–200)		60 (0–240)	
Age (years)			0.80		0.25
Median (range)	65.7 (36–80.4)				
<70	44 (71%)	10 (0–240)		80 (0–240)	
≥70	18 (29%)	0 (0–200)		60 (0–160)	
Smoking status			0.57		0.18
Smokers	49 (79%)	25 (0–240)		80 (0–240)	
Never a smoker	13 (21%)	0 (0–200)		50 (0–160)	
Stage			0.84		0.57
I–II	23 (37%)	15 (0–240)		60 (0–210)	
III–IV	39 (63%)	0 (0–200)		90 (0–240)	
Node metastasis			0.19		0.0053
No	38 (61%)	0 (0–240)		50 (0–210)	
Yes	24 (39%)	45 (0–120)		120 (0–240)	
Metastasis			0.98		0.14
No	37 (60%)	20 (0–240)		80 (0–240)	
Yes	25 (40%)	0 (0–200)		60 (0–200)	
Cytological subtype			0.10		0.94
Mucinous	15 (24%)	0 (0–200)		100 (0–160)	
Nonmucinous	47 (76%)	30 (0–240)		60 (0–240)	
<i>EGFR</i> mutation			0.0732		0.33
Mutation	5 (8%)	100 (0–200)		40 (20–150)	
No mutation	57 (92%)	0 (0–240)		80 (0–240)	
<i>KRAS</i> mutation			0.60		0.78
Mutation	11 (19%)	40 (0–240)		110 (0–200)	
No mutation	47 (81%)	10 (0–200)		70 (0–240)	
Noninterpretable	4				
IFCT0401 patients	34 (100%)	0 (0–240)		30 (0–160)	
Disease control with gefitinib			0.0378*		0.43*
Partial response	4 (12%)	90 (0–200)		35 (20–50)	
Stable disease	8 (24%)	0 (0)		30 (0–80)	
Progressive disease	22 (64%)	0 (0–240)		60 (0–160)	

Statistical analysis was performed using Mann–Whitney *U*-test or *Kruskall–Wallis test.

this pathway could affect gefitinib-induced apoptosis *in vitro*. LY294002, a PI3K inhibitor, strongly inhibited the activation of AKT without affecting the levels of p-EGFR, p-IGF1R or p-ERK1/2 (Fig. 3a). The resistance of H358 cells to gefitinib was abolished when the cells were co-treated with LY294002, producing a significant induction of apoptosis (Fig. 3b) and inhibition of cell proliferation (Supporting Information Fig. S1). The same results were obtained using the PI3K inhibitor

wortmannin (Supporting Information Fig. S1). In contrast, MAPK/ERK1/2 pathway inhibition, using the specific inhibitors PD98059 or U0126, did not significantly enhance gefitinib-induced apoptosis (Fig. 3c, left panel). The effect of PD98059 and U0126 on gefitinib-induced ERK1/2 phosphorylation inhibition was confirmed by western-blot (Fig. 3c, right panel). These results confirm that PI3K/AKT activation is a major pathway contributing to gefitinib resistance

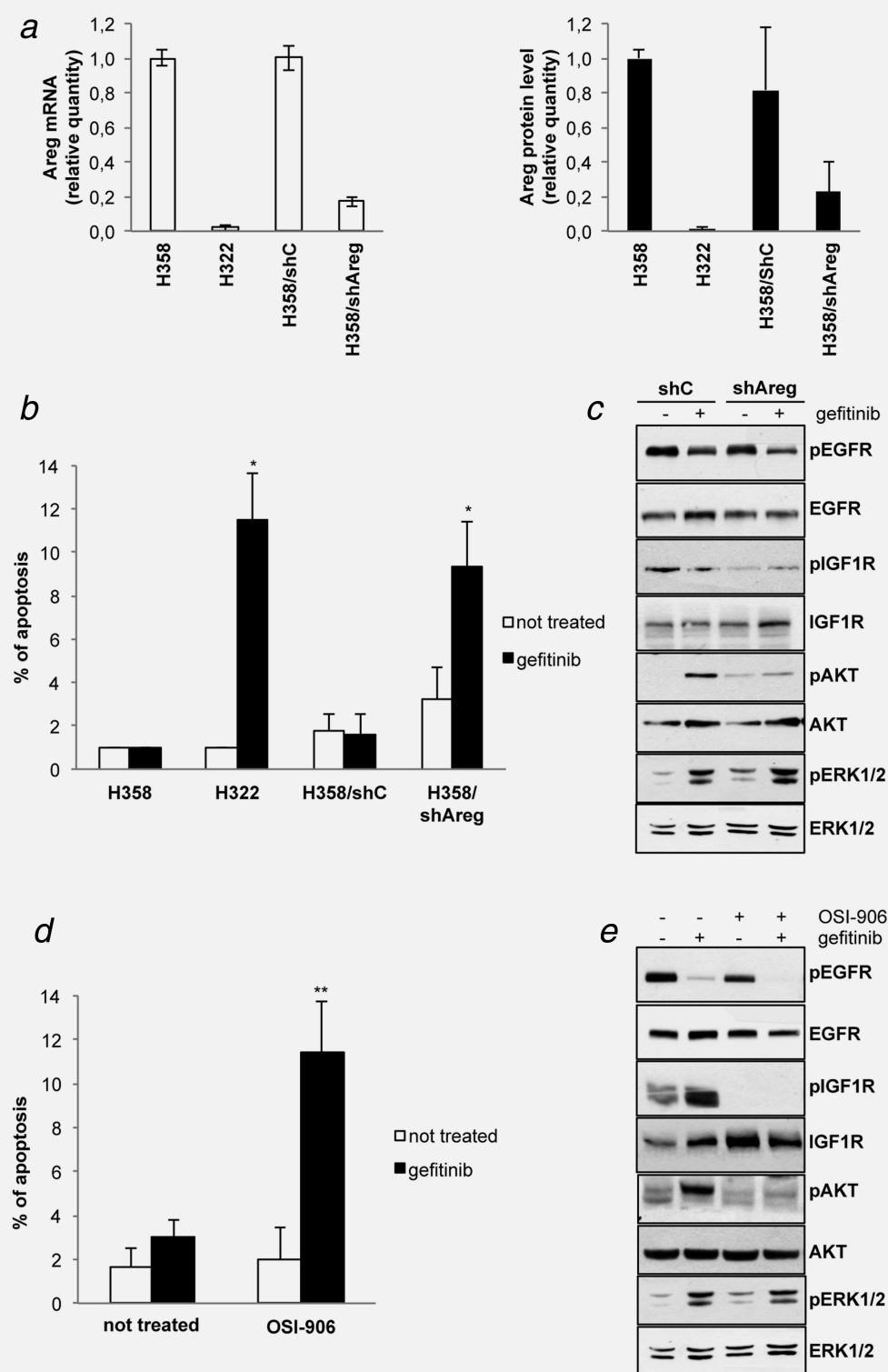


Figure 2. Amphyregulin or IGF1R inhibition restored gefitinib sensitivity and decreased p-AKT levels. (a) Amphyregulin (Areg) mRNA (left), assessed by quantitative real-time RT-PCR for amphyregulin mRNA on total RNA extracted from cells, and protein levels (right), detected by enzyme-linked immunosorbent assay, in H358, H322 and H358 stably expressing control shRNA (shC) or amphyregulin-directed shRNA (shAreg). Results are expressed as a rate of amphyregulin mRNA or amphyregulin released by H358 cells and as the mean $\pm$ SD. (b and c) H358, H322 or H358/shC or H358/shAreg were treated with 0.5 μ mol/L gefitinib for 96 hr. (d–e) H358 cells were treated with 1 μ mol/L OSI-906 and/or 0.5 μ mol/L gefitinib for 96 hr. (b and d) Percentages of apoptosis were scored and expressed as the mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for comparison between treated and control cells, and (c and e) representative immunoblots of EGFR, IGF1R, AKT and ERK1/2 and their respective phosphorylated forms are shown.

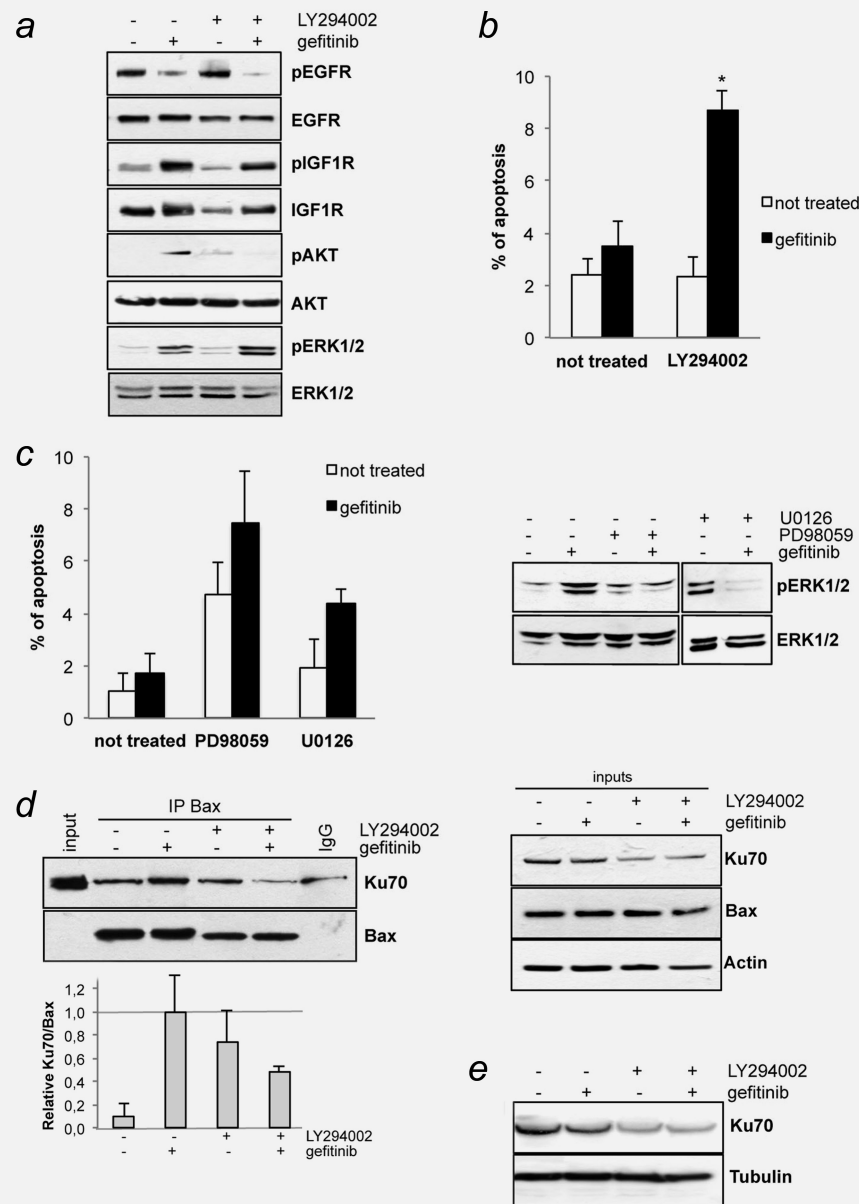


Figure 3. PI3K/AKT inhibition restored gefitinib sensitivity. H358 cells were treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ LY294002, 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 or U0126 and/or 0.5 $\mu\text{mol/L}$ gefitinib, as indicated. (a) Representative immunoblots of EGFR, IGF1R, AKT and ERK1/2 and their respective phosphorylated forms are shown. (b and c) Left panel: Percentages of apoptotic cells were scored and expressed as means $\pm$ SD ($n = 4$). $*p < 0.05$, for comparison between treated and control cells. (c) Right panel: Representative immunoblots of ERK1/2 and their respective phosphorylated forms. (d) Endogenous BAX immunoprecipitations (left panel) were performed and subjected to immunoblotting with Ku70-specific and BAX-specific antibodies. IgG: irrelevant immunoglobulin, used as negative control. Input: cell lysate not subjected to immunoprecipitation. Actin was used as a protein level control (right panel). The histogram shows the relative intensity of Ku70 protein bands of samples to that of gefitinib treated cells, after being normalized to the respective Bax and represents the means $\pm$ SD of two independent experiments. (e) Representative immunoblot of Ku70. Tubulin was used as a protein level control.

and that PI3K/AKT inhibition can overcome gefitinib resistance.

AKT activation controls BAX/Ku70 interaction in the gefitinib resistance mechanism

We have previously shown that amphiregulin and IGF1R mediate gefitinib resistance through increasing the interaction

between the proapoptotic protein BAX and Ku70.^{7,10} The inhibition of Ku70 acetylation enhances BAX/Ku70 binding and prevents gefitinib-induced apoptosis. In contrast, the acetylation of Ku70 releases BAX from Ku70 and restores the sensitivity to gefitinib.¹⁰ We investigated the involvement of the PI3K/AKT pathway in the interaction between BAX and Ku70. We observed that PI3K/AKT inhibition by LY294002 decreased

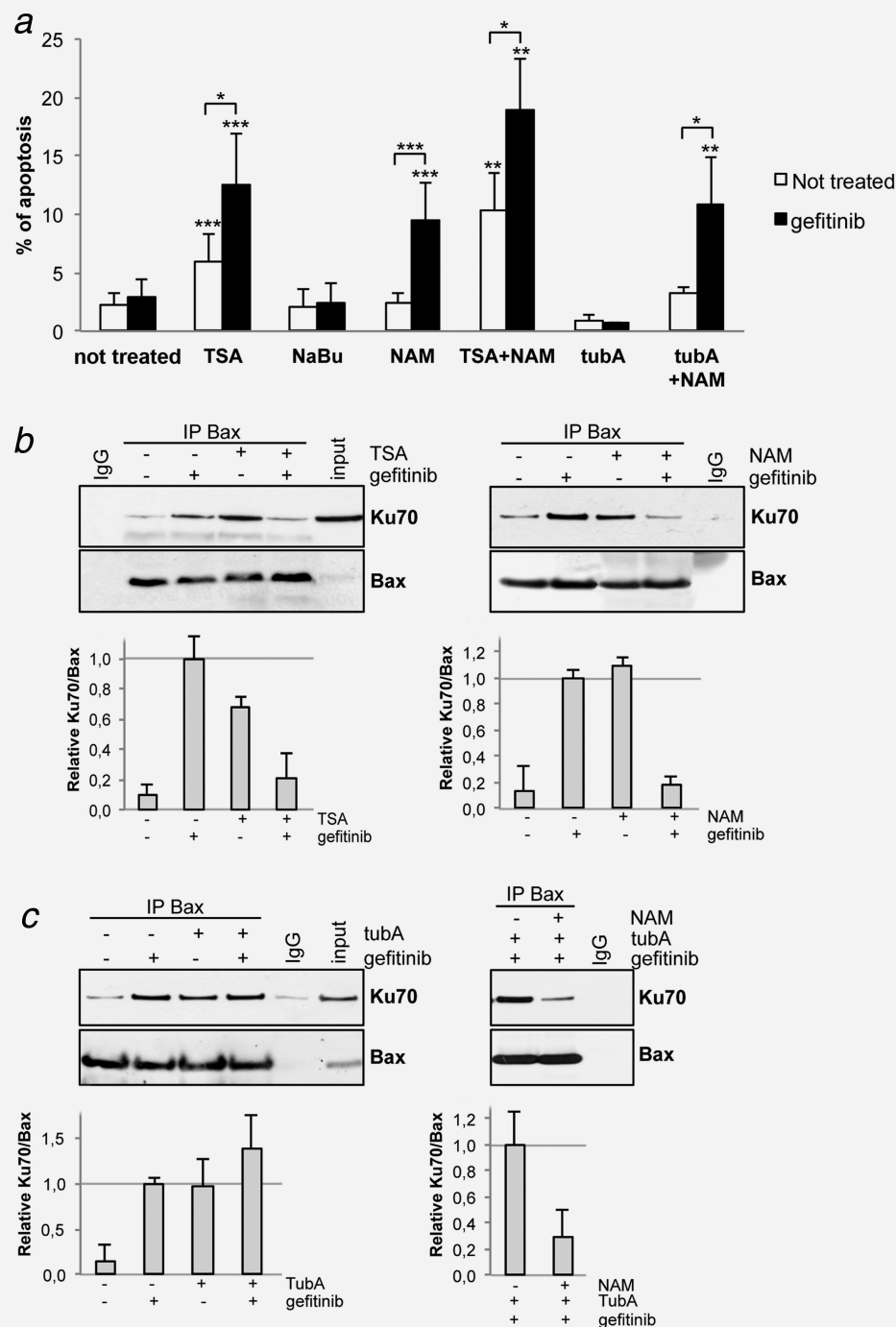


Figure 4. HDACs inhibited gefitinib-induced apoptosis in NSCLC cells via a decrease in BAX/Ku70 interaction. H358 cells were treated with 2 mmol/L sodium butyrate (NaBu), 200 ng/mL trichostatin A (TSA), 5 mmol/L nicotinamide (NAM), 5 μ mol/L tubastatin A (tubA), 0.5 μ mol/L gefitinib or a combination of inhibitors for 96 hr as indicated. (a) Percentages of apoptotic cells were scored and expressed as means $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for comparisons between treated and control cells or as indicated. (b and c) Endogenous BAX immunoprecipitations were performed and subjected to immunoblotting with Ku70-specific and BAX-specific antibodies. IgG: irrelevant immunoglobulin, used as negative controls. Input: cell lysate not subjected to immunoprecipitation. The histograms show the relative intensity of Ku70 protein bands of samples to that of gefitinib treated cells, after being normalized to the respective Bax and represent the means $\pm$ SD of two or three independent experiments.

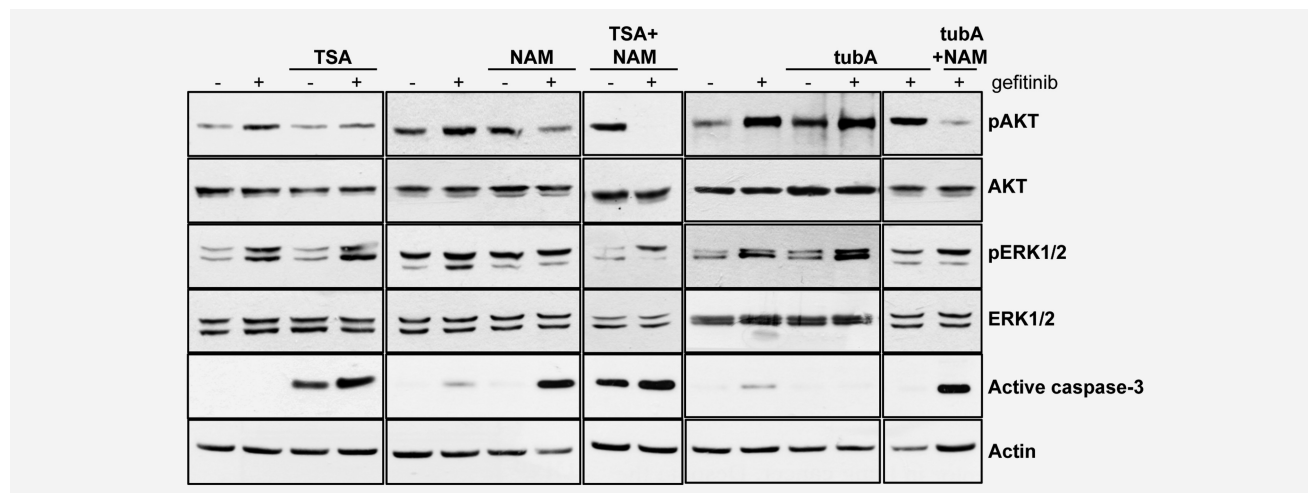


Figure 5. HDACs inhibited gefitinib-induced apoptosis in NSCLC cells *via* activation of AKT. H358 cells were treated as described in Figure 4. Representative immunoblots of cleaved caspase-3, AKT and ERK1/2 and of their respective phosphorylated forms are shown. Actin was used as a protein-level control.

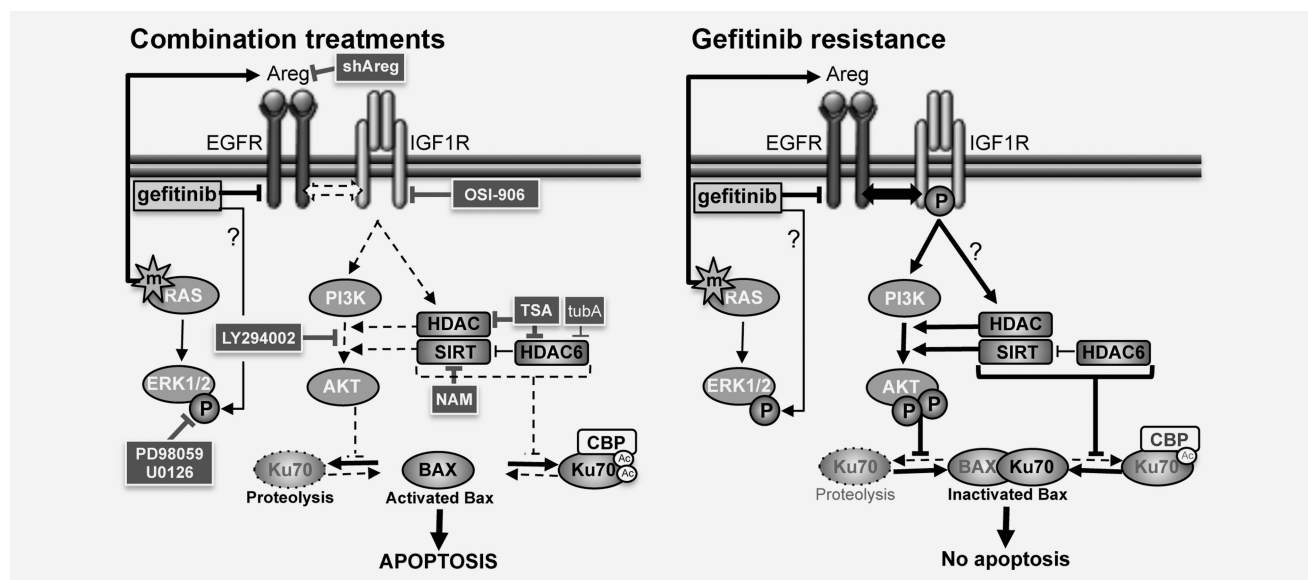


Figure 6. Hypothesized model for regulation of gefitinib resistance by PI3K/AKT and HDAC in mutant *KRAS* lung adenocarcinoma cells. In the presence of gefitinib (left panel), the level of p-ERK1/2 is increased, probably through the Ras/Raf/MAPK pathway activation by mutant *KRAS*. Amphiregulin (Areg), whose level of expression and secretion is upregulated by mutant *KRAS*, and IGF1R cooperate to enhance the level of p-AKT, which inhibits the proteolysis of Ku70. Ku70 levels are thus high enough to suppress BAX activation and apoptosis. Classes I/II/III HDACs also increase the activation of p-AKT, and in addition, inhibit Ku70 acetylation, thus enhancing BAX/Ku70 binding and preventing gefitinib-induced apoptosis. HDAC6 may regulate sirtuins activation. In the presence of combination treatments with gefitinib (right panel), leading to inhibition of active AKT signals (shAreg, OSI-906, LY294002), Ku70 is targeted for degradation. In addition, HDACs inhibitors (trichostatin A (TSA) or nicotinamide (NAM)) inhibit the activation of AKT in an additive manner, and enhance Ku70 acetylation by histone acetyltransferase such as CBP. These conditions allow the release of BAX from inhibition, and BAX is activated. In contrast, tubastatin A (TubA) removes sirtuins inhibition, thus reinforcing p-AKT activation and Ku70 deacetylation. The level of p-ERK1/2 is still increased through Ras/Raf/MAPK pathway, except in presence of PD98059 or U0126.

gefitinib-induced BAX/Ku70 binding in the immunoprecipitation assay using a BAX-specific antibody (Fig. 3d, left panel). In addition, LY294002 downregulated the level of Ku70 (Figs. 3d, right panel, and 3e). These data suggest that the PI3K/AKT pathway controls gefitinib-induced apoptosis, at least in part through the regulation of Ku70 levels and interaction with BAX.

HDACs control BAX/Ku70 interaction *via* AKT activation

We next examined the relationship between acetylation, which controls the interaction between BAX and Ku70, gefitinib resistance and the PI3K/AKT pathway. Trichostatin A (classes I/II HDAC inhibitor) and nicotinamide (class III/sirtuin deacetylases inhibitor) strongly sensitized H358 cells to

gefitinib-induced apoptosis,¹⁰ in contrast to sodium butyrate (classes I/IIa HDAC inhibitor) (Fig. 4a). In addition, the combination of trichostatin A and nicotinamide treatment induced apoptosis and significantly sensitized cells to gefitinib compared to gefitinib treatment with trichostatin A or nicotinamide alone (Fig. 4a). As a control of their activity, we verified that administration of trichostatin A or nicotinamide increased the acetylation of α -tubulin,^{19,20} whereas sodium butyrate promoted the accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1} protein²¹ and trichostatin A or sodium butyrate strongly inhibited cell proliferation (Supporting Information Fig. S2).

When gefitinib, trichostatin A, or nicotinamide were administered alone, the interaction between BAX and Ku70 was strongly enhanced,¹⁰ whereas combination treatments (gefitinib with either trichostatin A or nicotinamide) decreased the interaction between BAX and Ku70,¹⁰ in agreement with the induction of apoptosis (Fig. 4b). Together, these data suggest that gefitinib in combination with trichostatin A or nicotinamide leads to BAX-dependent NSCLC cell death, whereas sodium butyrate induces cellular growth arrest.

The effects of trichostatin A and sodium butyrate suggested the involvement of a class IIb HDAC. As the class IIb HDAC HDAC6 has been shown to deacetylate Ku70 and to regulate BAX/Ku70 binding,¹⁸ we analyzed its role in gefitinib resistance. Specific HDAC6 inhibition using tubastatin A enhanced BAX/Ku70 binding (Fig. 4c, left panel), without affecting the HDAC6 level, cell proliferation (Supporting Information Fig. S2) or apoptosis induction (Fig. 4a), in either the presence or absence of gefitinib. These results were confirmed using specific siRNA targeting either HDAC6 or the other class IIb HDAC HDAC10 (Supporting Information Fig. S3). Interestingly, nicotinamide sensitized the cells to gefitinib-induced apoptosis (Fig. 4a) and decreased the interaction between BAX and Ku70 (Fig. 4c, right panel), even in presence of tubastatin A. Overall, these results suggest that inhibition of class IIb HDACs is not sufficient to restore gefitinib-induced apoptosis. In contrast, HDACs and sirtuin deacetylases prevented gefitinib-dependent BAX-mediated cell death.

Finally, we assessed the effect of HDACs and sirtuin deacetylases on the PI3K/AKT pathway with respect to gefitinib resistance. The effects of gefitinib and/or HDAC inhibitors on apoptosis were controlled by cleaved caspase-3 detection by western-blot (Fig. 5). Trichostatin A or nicotinamide inhibited the gefitinib-induced activation of p-AKT through an additive effect (Fig. 5). In contrast, both tubastatin A and gefitinib increased the p-AKT level; this effect was blocked by NAM. HDAC6- or HDAC10-directed siRNA also enhanced the p-AKT level (Supporting Information Fig. S3). The level of activation of p-ERK1/2 was not affected by HDAC inhibitor treatment. These results suggest that trichostatin A or nicotinamide lead to BAX-dependent apoptosis through p-AKT inactivation.

Discussion

The intracellular pathways leading to EGFR-TKI resistance in NSCLC patients with wild-type *EGFR* should be investigated in order to search for new combination therapies. We have previously shown that amphiregulin and IGF1R both induce gefitinib resistance in mucinous invasive adenocarcinoma⁸ through the inhibition of Ku70 acetylation, which enhances the BAX/Ku70 interaction.¹⁰ Here, we investigated which downstream pathways underlie this mechanism in 62 human lung tumors and showed that the activation of AKT is associated with progressive disease during gefitinib treatment in patients with wild-type *EGFR*. The inhibition of amphiregulin, IGF1R or deacetylase expression *in vitro* decreases PI3K/AKT signaling and releases BAX from Ku70, thus restoring apoptosis under gefitinib treatment (Fig. 6). PI3K/AKT inhibition strongly sensitizes wild-type *EGFR* and mutant *KRAS* mucinous adenocarcinoma cells to gefitinib, suggesting that this treatment could overcome the resistance of these tumors to EGFR-TKIs (Fig. 6).

AKT activation in tumors and its correlation with clinicopathological parameters have already been investigated.^{22,23} Overall, these studies show that elevated AKT activity is prevalent in high-grade, advanced tumors and is associated with metastasis, radioresistance and reduced patient survival.^{22,24} Most cases of NSCLC that harbor mutations in the *EGFR* show hyperphosphorylated AKT,^{11,24,25} and their gefitinib responsiveness can be predicted by AKT activation.²⁶ The present study confirms that elevated AKT activity is associated with *EGFR* mutation and plays an essential role downstream of continuous activation of mutated *EGFR*. Interestingly, we observed that AKT activation is also associated with disease progression under gefitinib treatment in adenocarcinoma patients with wild-type *EGFR*. This underlines the importance of blocking the PI3K/AKT pathway while treating adenocarcinoma with EGFR-TKIs. Resistance to TKI has been associated with the presence of a *KRAS* mutation,²⁷ most likely through the direct activation of downstream Ras effector pathways MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT.²⁸ The EGFR/Ras axis is often thought of a simple one-directional signaling cascade where Ras activation leads to changes in gene expression. However, several studies have suggested that tumors with aberrant Ras signaling may require an EGFR autocrine feedback loop to promote tumor growth and progression.²⁹ In agreement, the upregulated expression and secretion of EGFR ligands including amphiregulin have been observed in *KRAS* mutant cells.²⁹ Depending on mutant *KRAS* amino-acid substitutions, PI3K/AKT signaling is constitutively activated or is growth factor dependent.³⁰ To support these observations, we established here the involvement of PI3K/AKT signaling by amphiregulin and IGF1R in wild-type *EGFR* and mutant *KRAS* mucinous invasive adenocarcinoma cells (Fig. 6). This suggests that inhibiting EGFR may be more effective if combined with selective inhibition of the downstream pathways for treating wild-type *EGFR* and mutant *KRAS* tumor cells, in agreement with previous studies.^{14,29,30}

AKT activation is dependent on the stimulation of growth factor receptors and is initiated through translocation to the plasma membrane and phosphorylation at Thr³⁰⁸ by PI3K-dependent kinase (PDK1) and at Ser⁴⁷³ by PDK2.²² Subsequently, AKT translocates to distinct cellular compartments, phosphorylates its substrates and regulates diverse cellular functions, such as survival, cell-cycle progression and growth.²² AKT has been shown to suppress BAX-mediated apoptosis through cytosolic Ku70 proteolysis inhibition.³¹ In agreement, we observed a decrease in the Ku70 level after PI3K/AKT inhibition. The activation of the PI3K/AKT pathway under treatment with an EGFR-TKI inhibits Ku70 degradation, thus reinforcing the BAX/Ku70 interaction. This results in BAX inhibition, absence of apoptosis and thus to resistance to the treatment (Fig. 6).

The interaction between BAX and Ku70 is also regulated by an acetylation-dependent mechanism. Ku70 is targeted for deacetylation by classes I/II and III/sirtuin deacetylases.^{17,18} Class I/II HDACs are involved in the development of lung cancer^{32,33} and are associated with poor prognosis.^{16,34} Class III/sirtuin deacetylases are implicated in important cellular processes, such as aging, metabolism, stress response and cancer.^{35,36} Deacetylation of Ku70 by the sirtuin SIRT1 or SIRT3 promotes the interaction of Ku70 with BAX,^{37–39} and high SIRT1 expression may be important in the pathogenesis of lung cancer.⁴⁰ In agreement with these studies, we showed that the class I/II HDAC inhibitor trichostatin A and the class III/sirtuin deacetylase inhibitor nicotinamide both sensitize NSCLC cells to gefitinib¹⁰ through the inhibition of p-AKT and the release of BAX from Ku70. Surprisingly, the administration of trichostatin A or nicotinamide alone enhanced the interaction of BAX and Ku70, suggesting that the acetylation level of Ku70 is not strong enough to release BAX and requires the combination of both trichostatin A and nicotinamide, as previously demonstrated.¹⁷ This could indicate that HDAC activity can compensate for sirtuins inhibition and vice versa and that both inhibitors are required concomitantly in order to induce cell death in NSCLC cells. In addition, HDAC inhibitors may allow these resistant cells to maintain a reservoir of active BAX, ready for apoptosis induction after additional exposure to gefitinib, as already proposed.⁴¹

In contrast to trichostatin A, the class I/IIa HDAC inhibitor sodium butyrate did not restore gefitinib sensitivity, suggesting the involvement of class IIb HDACs in resistance to EGFR-TKIs. HDAC6, a class IIb HDAC mainly localized in the cytoplasm, directly deacetylates tubulin, cortactin, Hsp90 and Ku70.^{18,42} In particular, HDAC6 interacts with cytoplasmic Ku70 and regulates its acetylation and BAX-dependent cell death in neuroblastoma.¹⁸ Little is known about the other class IIb HDAC HDAC10.^{15,16} HDAC10 has been recently reported to be involved in autophagy-mediated cell survival.⁴³ In our hands, specific HDAC6 inhibition using the highly specific tubastatin A⁴⁴ or siRNA, or HDAC10 invalidation, induced

AKT phosphorylation, but maintained the BAX/Ku70 interaction, and thus failed to restore apoptosis in adenocarcinoma cells, in contrast to that observed in neuroblastoma cells.¹⁸ One likely explanation is that other HDACs prevent Ku70 acetylation, thus compensating for the specific inhibition of class IIb HDAC. Consistent with this possibility, nicotinamide inhibited p-AKT, induced BAX/Ku70 dissociation and restored gefitinib-induced apoptosis, even in presence of tubastatin A. This finding suggests that the activation of PI3K/AKT following HDAC6 inhibition could be mediated by sirtuins (Fig. 6). Synergistic relationships between HDACs and sirtuins have been reported in several cancers.^{20,45,46} Our results support an important role for sirtuins in EGFR-TKI resistance mediated through PI3K/AKT signaling. Consistent with this idea, direct binding of SIRT1 to AKT has been demonstrated in the presence of growth factor stimulation, mediating the activating deacetylation of AKT/PDK1.⁴⁷ The specific sirtuin isoform involved in the regulation of the BAX/Ku70 interaction in adenocarcinoma cells in response to gefitinib remains to be identified.

Our results support a potential therapeutic role of co-targeting EGFR and the PI3K pathway to counteract gefitinib resistance and suggest that this approach should be evaluated further for lung cancer patients with wild-type *EGFR* and mutant *KRAS*. A large number of PI3K inhibitors are currently being developed.^{23,48,49} Perifosine, an allosteric inhibitor of AKT, reduces the levels of activated AKT in breast and ovarian cancer cells.⁵⁰ Other trials of triciribine phosphate, which inhibits AKT phosphorylation and its recruitment to the plasma membrane,⁵¹ and of BKM120⁵² have been initiated. However, the inhibition of AKT frequently induces the expression of upstream receptor tyrosine kinases and their activity by relieving feedback inhibition.⁵³ In addition, EGFR can function both upstream and downstream of Ras,²⁹ reinforcing the use of combinatorial therapy using EGFR-TKI and AKT signaling pathway inhibitors in mutant *KRAS* tumor cells.

In summary, we have shown that PI3K/AKT activation is a major pathway leading to gefitinib resistance and that it contributes to maintaining the BAX/Ku70 complex, at least in part by inhibiting the proteolysis of cytosolic Ku70. HDACs and sirtuin deacetylases participate in this resistance through the control of PI3K/AKT activation and the BAX/Ku70 interaction. These findings suggest new prospects for combining both PI3K/AKT and EGFR inhibitors for the treatment of resistant mutant *KRAS* adenocarcinoma; these possibilities should be evaluated in clinical trials for patients with lung adenocarcinoma.

Acknowledgements

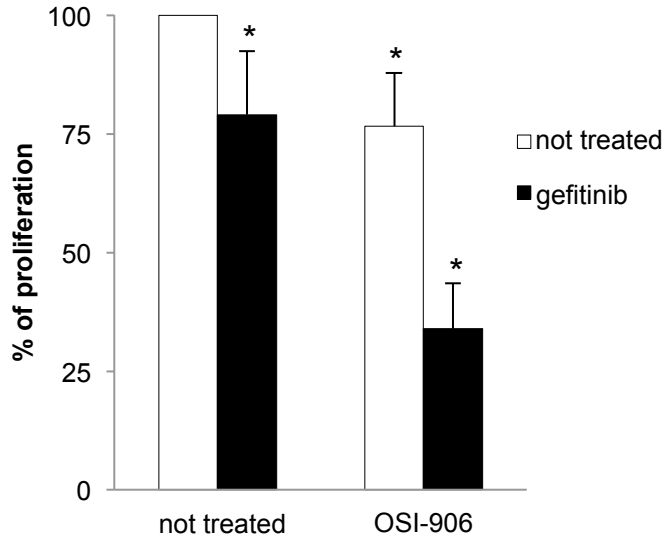
The authors thank Virginie Rouyre and Laetitia Vanwonderghem (INSERM U823), Virginie Poulot and Nathalie Rabbe (Tenon Hospital) and Corine Cadet (CHRU Grenoble University Hospital) for excellent technical assistance. Victor Jeannot was supported by grant from the Grenoble University (Erasmus-Mundus program) and "La Region Rhone-Alpes."

References

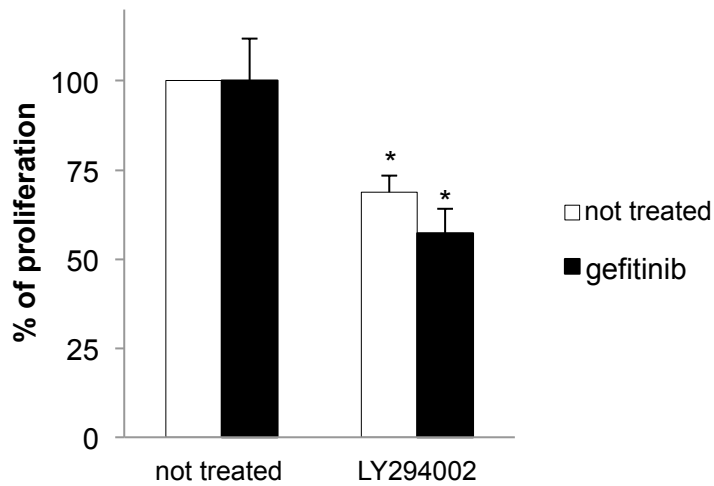
- Selvaggi G, Novello S, Torri V, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:28–32.
- Hirsch FR, Janne PA, Eberhardt WE, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012. *J Thorac Oncol* 2013;8:373–84.
- Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:75ra26.
- Busser B, Sancey L, Brambilla E, et al. The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2011;1816:119–31.
- Hurbin A, Coll JL, Dubrez-Daloz L, et al. Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280:19757–67.
- Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, et al. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:49127–33.
- Busser B, Sancey L, Josserand V, et al. Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers. *Mol Ther* 2010;18:528–35.
- Hurbin A, Wislez M, Busser B, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma. *J Pathol* 2011;225:83–95.
- Cadranel J, Quoix E, Baudrin L, et al. IFCT-0401 Trial: a phase I study of gefitinib administered as first-line treatment in advanced adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma subtype. *J Thorac Oncol* 2009;4:1126–35.
- Busser B, Sancey L, Josserand V, et al. Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation. *Mol Ther* 2010;18:536–43.
- Dobashi Y, Suzuki S, Kimura M, et al. Paradigm of kinase-driven pathway downstream of epidermal growth factor receptor/Akt in human lung carcinomas. *Hum Pathol* 2011;42:214–26.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039–43.
- Yamasaki F, Johansen MJ, Zhang D, et al. Acquired resistance to erlotinib in A-431 epidermoid cancer cells requires down-regulation of MMAC1/PTEN and up-regulation of phosphorylated Akt. *Cancer Res* 2007;67:5779–88.
- Li H, Schmid-Bindert G, Wang D, et al. Blocking the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways can overcome gefitinib-resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Adv Med Sci* 2011;56:275–84.
- Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 2012.
- Osada H, Tatematsu Y, Saito H, et al. Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:26–32.
- Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, et al. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004;13:627–38.
- Subramanian C, Jarzembowski JA, Oipari AW, Jr, et al. HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma. *Neoplasia* 2011;13:726–34.
- Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, et al. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2767–76.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, et al. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003;11:437–44.
- Archer SY, Meng S, Shei A, et al. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6791–6.
- Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005;24:7455–64.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005;94:29–86.
- Brognaud J, Clark AS, Ni Y, et al. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001;61:3986–97.
- Shah A, Swain WA, Richardson D, et al. Phospho-akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2930–6.
- Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1133–41.
- Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005;2:e17.
- Laurent-Puig P, Lievre A, Blons H. Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res* 2009;15:1133–9.
- Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, et al. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol* 2010;28:4769–77.
- Ihle NT, Byers LA, Kim ES, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:228–39.
- Gama V, Gomez JA, Mayo LD, et al. Hdm2 is a ubiquitin ligase of Ku70-Akt promotes cell survival by inhibiting Hdm2-dependent Ku70 destabilization. *Cell Death Differ* 2009;16:758–69.
- Jung KH, Noh JH, Kim JK, et al. HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. *J Cell Biochem* 2012;113:2167–77.
- Vannini A, Volpari C, Filocamo G, et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15064–9.
- Minamiya Y, Ono T, Saito H, et al. Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2011;74:300–4.
- Di Marcotullio L, Canettieri G, Infante P, Greco A, Gulino A. Protected from the inside: endogenous histone deacetylase inhibitors and the road to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1815:241–52.
- Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 2010;5:253–95.
- Jeong J, Juhn K, Lee H, et al. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp Mol Med* 2007;39:8–13.
- Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, et al. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* 2008;28:6384–401.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004;305:390–2.
- Tseng RC, Lee CC, Hsu HS, et al. Distinct HIC1-SIRT1-p53 loop deregulation in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma patients. *Neoplasia* 2009;11:763–70.
- Amsel AD, Rathaus M, Kronman N, et al. Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5117–22.
- Boyault C, Sadoul K, Pabion M, et al. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 2007;26:5468–76.
- Oehme I, Linke JP, Bock BC, et al. Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E2592–601.
- Butler KV, Kalin J, Brochier C, et al. Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A. *J Am Chem Soc* 2010;132:10842–6.
- Zuo Q, Wu W, Li X, et al. HDAC6 and SIRT2 promote bladder cancer cell migration and invasion by targeting cortactin. *Oncol Rep* 2012;27:819–24.
- Cea M, Soncini D, Fruscione F, et al. Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells. *PLoS One* 2011;6:e22739.
- Sundaresan NR, Pillai VB, Wolfgeher D, et al. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci Signal* 2011;4:ra46.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627–44.
- Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1075–83.
- Hennessy BT, Lu Y, Poradosu E, et al. Pharmacodynamic markers of perifosine efficacy. *Clin Cancer Res* 2007;13:7421–31.
- Garrett CR, Coppola D, Wenham RM, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of tricaribine phosphate monohydrate, a small-molecule inhibitor of AKT phosphorylation, in adult subjects with solid tumors containing activated AKT. *Invest New Drugs* 2011;29:1381–9.
- Bendell JC, Rodon J, Burris HA, et al. Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012;30:282–90.
- Chandrapaty S, Sawai A, Scaltriti M, et al. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell* 2011;19:58–71.

Supplementary figure S1

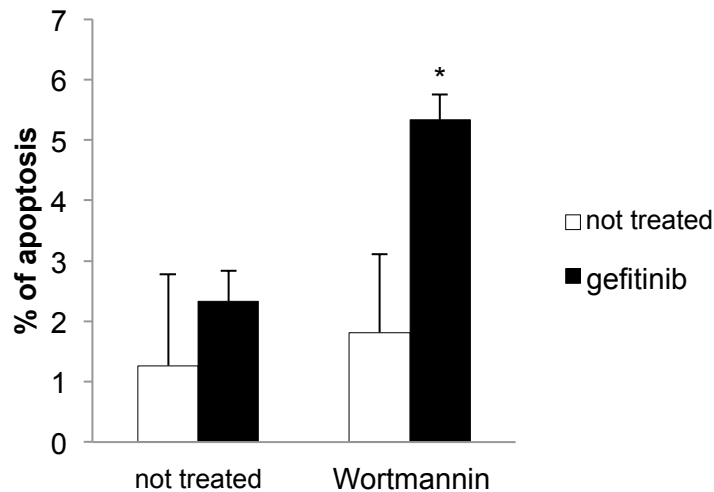
a



b



c

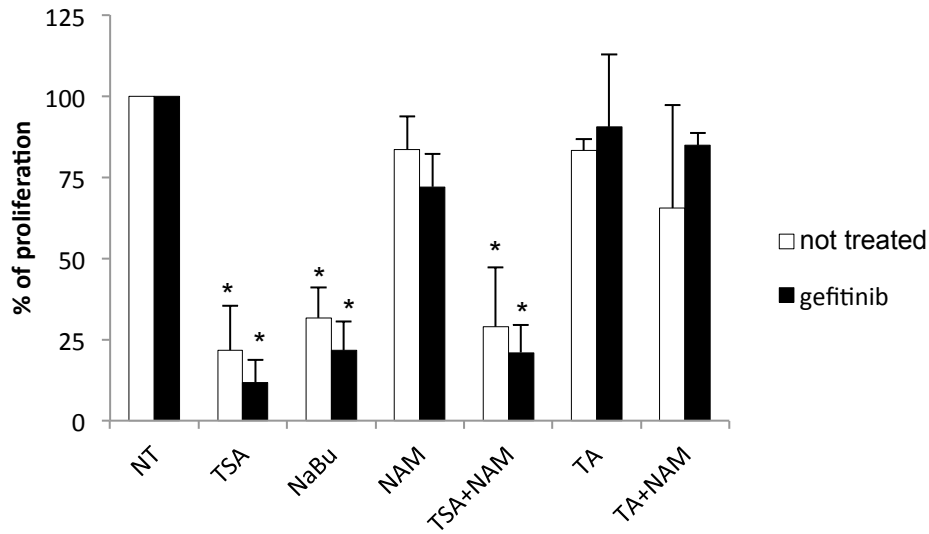


OSI-906 and LY294002 inhibited NSCLC cell proliferation and wortmannin enhanced gefitinib-induced apoptosis.

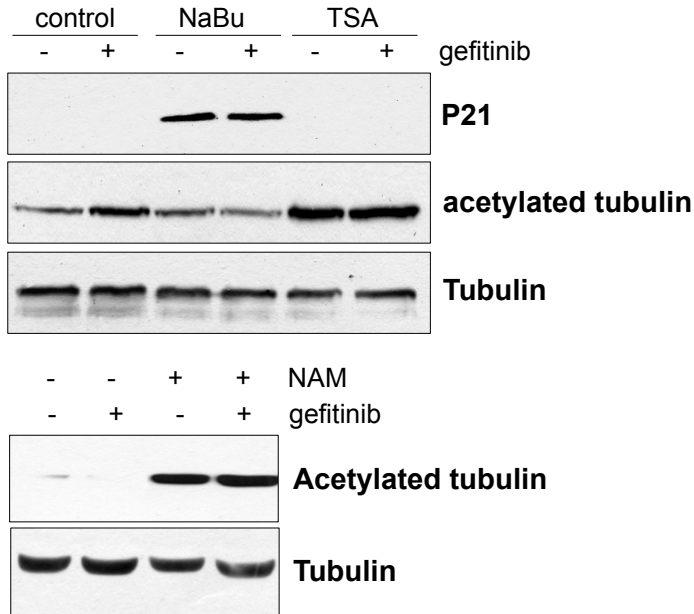
H358 cells were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ OSI-906 (a), 25 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 (b), 0.5 $\mu\text{mol/L}$ wortmannin (c) and/or 0.5 $\mu\text{mol/L}$ gefitinib as indicated. (a-b) Cell proliferation was measured within Invitrogen Countess[®] automated cell counter (Life Technologies, St Aubin, France) after coloration with Trypan Blue. (c) Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g/mL}$, Sigma) staining of cells. Percentages of cell proliferation or apoptosis were expressed as mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $P < 0.05$, for comparison between treated and control cells.

Supplementary figure S2

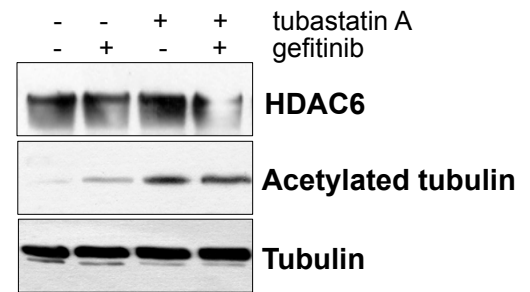
a



b



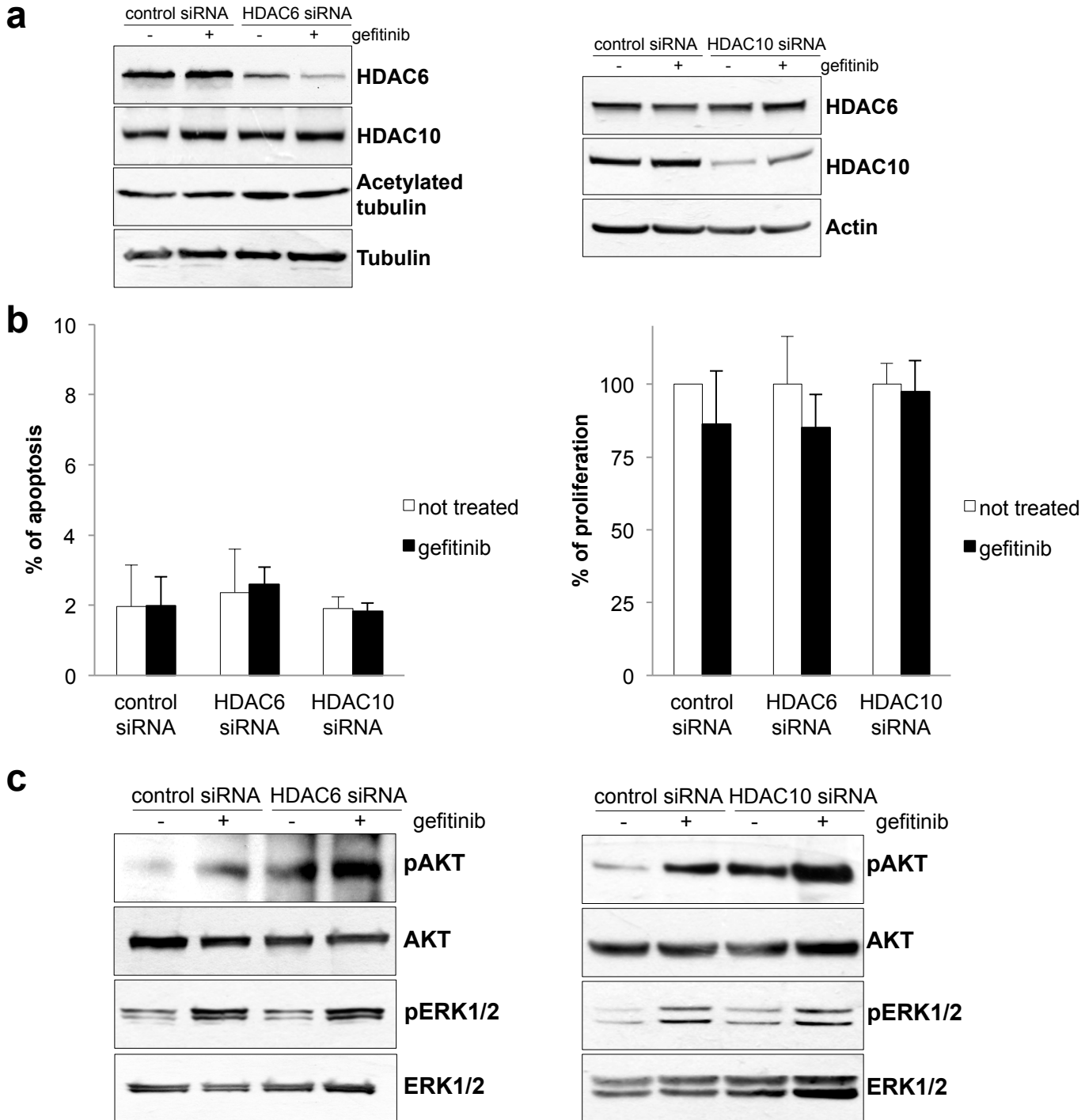
c



Effect of HDAC inhibitors on NSCLC cell proliferation.

H358 cells were treated by 2 mmol/L sodium butyrate (NaBu), 200 ng/mL trichostatin A (TSA), 5 mmol/L nicotinamide (NAM), 5 μ mol/L tubastatin A (TA) and/or 0.5 μ mol/L gefitinib for 96 hours as indicated. (a) Percentages of cell proliferation, evaluated after counting trypan blue-stained within Invitrogen Countess® automated cell counter (Life Technologies, St Aubin, France), were expressed as mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $P < 0.05$, for comparison between treated and control cells. (b-c) Whole-cell lysates were subjected to western blotting using p21^{WAF1} (Calbiochem), HDAC6 (TEBU-Bio) or acetylated α -tubulin (Abcam) antibodies. Tubulin (Sigma) was used as protein level control.

Supplementary figure S3



HDAC6 or HDAC10 invalidation did not restore apoptosis or inhibit NSCLC cell proliferation, and increased p-AKT level.

H358 cells were transfected with nonspecific control (5'-CUU-ACG-CUC-ACU-ACU-GCG-ATT-3') or HDAC6 siRNA (5'-UCU-AGG-CUG-UGA-ACC-AAC-AUC-UU-3' and 5'-CCC-AAG-AGU-GCU-UAU-UUA-AGU-UU-3'), synthesized by MWG Biotech, or HDAC10 siRNA (5'-GCA-GAA-ACA-CGG-GCU-ACA-CTT-3') from Ambion, using Interferin (PolyPlus Transfection) at a final concentration of 2 nmol/L following the manufacturer's instructions. Four hours after transfection cells were treated with 0.5 μ mol/L gefitinib. (a) Western blotting assessed the efficiency of knockdown using HDAC6 (TEBU-Bio), HDAC10 (Sigma) or acetylated α -tubulin antibodies (Abcam). Tubulin (Sigma) was used as protein level control. (b) Apoptosis was evaluated after Hoechst 33342 (5 μ g/mL, Sigma) staining of cells and cell proliferation was evaluated after counting trypan blue-stained within Invitrogen Countess[®] automated cell counter (Life Technologies, St Aubin, France). Percentages were expressed as mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). (c) Representatives immunoblots of AKT and ERK1/2 and their respective phosphorylated forms were shown.

Supplementary table S1. Immunohistochemical analysis of EGFR, IGF1R and amphiregulin expression in lung adenocarcinoma

	n (%)	EGFR expression		IGF1R expression		Amphiregulin expression	
		median (range)	p value	median (range)	p value	median (range)	p value
All patients	62 (100%)	48 (0-300)		160 (0-300)		100 (0-300)	
Gender			0.84		0.79		0.54
Male	39 (63%)	60 (0-300)		160 (0-300)		100 (0-300)	
Female	23 (37%)	45 (0-270)		160 (0-300)		180 (0-300)	
Age, years			0.78		0.57		0.94
Median (range)	65.7 (36-80.4)						
<70	44 (71%)	55 (0-270)		160 (0-300)		100 (0-300)	
≥70	18 (29%)	45 (0-300)		160 (0-300)		180 (0-300)	
Smoking status			0.0486		0.53		0.37
smokers	49 (79%)	60 (0-300)		160 (0-300)		100 (0-300)	
never a smoker	13 (21%)	40 (0-240)		160 (0-300)		200 (0-240)	
Stage			0.53		0.61		0.86
I-II	23 (37%)	40 (0-300)		160 (0-300)		100 (0-300)	
III-IV	39 (63%)	60 (0-270)		160 (0-300)		100 (0-300)	
Node metastasis			0.0508		0.57		0.0724
No	38 (61%)	45 (0-270)		160 (0-300)		160 (0-300)	
Yes	24 (39%)	60 (0-300)		160 (0-300)		80 (0-240)	
Metastasis			0.41		0.84		0.17
No	37 (60%)	60 (0-300)		160 (0-300)		100 (0-300)	
Yes	25 (40%)	45 (0-270)		170 (0-300)		200 (0-300)	
Cytological subtype			<0.0001		<0.0001		<0.0001
Mucinous	15 (24%)	0 (0-180)		300 (150-300)		200 (0-300)	
Non mucinous	47 (76%)	60 (0-300)		150 (0-240)		100 (0-240)	
EGFR mutation			0.75		0.12		0.49
Mutation	5 (8%)	45 (15-240)		150 (0-160)		90 (0-200)	
No mutation	57 (92%)	50 (0-300)		160 (0-300)		100 (0-300)	
KRAS mutation			0.82		0.55		0.51
Mutation	11 (19%)	60 (0-240)		150 (20-300)		160 (0-300)	
No mutation	47 (81%)	0 (0-300)		160 (0-300)		100 (0-300)	
Non interpretable	4						
IFCT0401 patients	34 (100%)	38 (0-270)		210 (0-300)		200 (0-300)	
Disease control with gefitinib			0.59*		0.0540*		0.56*
Partial response	4 (12%)	45 (15-240)		85 (0-160)		160 (20-200)	
Stable disease	8 (24%)	45 (0-225)		140 (30-300)		200 (50-200)	
Progressive disease	22 (64%)	25 (0-270)		240 (30-300)		2000 (0-300)	

Statistical analysis was performed using Mann-Whitney *U*-test or *Kruskall-Wallis test.

1.3. Conclusion

Nos travaux montrent que l'activation de la voie PI3K/AKT est une voie majeure conduisant à la résistance aux EGFR-TKI, en favorisant la formation du complexe BAX/Ku70. Les HDACs et les sirtuines interviennent dans ces mécanismes de résistance, en modulant l'activation de la voie PI3K/AKT et l'interaction BAX/Ku70. Ces résultats confirment l'intérêt thérapeutique de l'association EGFR-TKI/HDACi et montrent le potentiel thérapeutique d'associer des inhibiteurs de l'EGFR et de la voie PI3K/AKT, en particulier dans des adénocarcinomes bronchiques avec un *EGFR* sauvage et une mutation *KRAS*.

2. Résistance aux TKI dans les cancers pulmonaires et les carcinomes hépatocellulaires

2.1. Présentation de l'étude et principaux résultats

Les mécanismes de résistance mis en jeu par les cellules cancéreuses sont complexes et limitent l'efficacité des thérapies ciblées. La compréhension de ces mécanismes permet d'identifier des cibles cellulaires et ainsi de proposer des combinaisons de molécules thérapeutiques pour inhiber plusieurs voies et améliorer l'efficacité des traitements.

Les EGFR-TKI ont ainsi montré un intérêt thérapeutique dans les CBNPC avec une mutation activatrice de l'*EGFR*, mais des mécanismes de résistance intrinsèque et acquise sont décrits.

Notre laboratoire et d'autres ont ainsi montré un bénéfice à associer des HDACi avec des EGFR-TKI, en particulier pour induire l'apoptose des cellules de CBNPC [116, 134, 407-409].

Le sorafenib est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du VEGFR, de RAF et du PDGFR (platelet derived growth factor receptor). Cette molécule a montré son intérêt dans le traitement des HCC [410]. Cependant, la majorité des patients ne répond pas à ce traitement et presque tous les patients répondeurs développent une résistance [411]. Des études précliniques ont montré que l'association du sorafenib avec des HDACi inhibe l'angiogénèse et la prolifération et induit l'apoptose des cellules tumorales [412-414].

Nous avons émis l'hypothèse que des combinaisons de traitements avec des TKI (gefitinib ou sorafenib) et des HDACi (vorinostat) pourraient contrer les mécanismes de résistance aux TKI des cellules tumorales. Nous avons élargi nos travaux précédents, et évalué l'effet de combinaisons de gefitinib, sorafenib et vorinostat, dans plusieurs modèles cellulaires de CBNPC et d'HCC avec un *EGFR* sauvage, *in vitro* sur la prolifération, le cycle cellulaire, l'activation des voies de signalisation (PI3K/AKT et MAPK/ERK1/2) et l'apoptose, et également *in vivo*.

Nous montrons que l'association du gefitinib avec du vorinostat ou du sorafenib réduit la croissance cellulaire, inhibe la voie PI3K/AKT et induit l'apoptose dans les lignées de CBNPC et de HCC. Inversement, l'association du sorafenib et du vorinostat n'inhibe pas la croissance cellulaire comparée aux traitements seuls, maintient l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK/ERK1/2, et induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M sans apoptose. Enfin, la combinaison gefitinib/vorinostat inhibe fortement croissance de tumeurs sous-cutanées de CBNPC (H358) ou de HCC (PLC/PRF5) chez les souris.

2.2. Article 2

“Synergistic combination of vorinostat with gefitinib, and not sorafenib, in wild-type EGFR human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*.” Jeannot V, Busser B, Vanwonterghem L, Ferroudj S, Cokol M, Coll JL, Ozturk M, Hurbin A. **Submitted**

Synergistic combination of vorinostat with gefitinib, and not sorafenib, in wild-type *EGFR* human non-small cell lung cancers and hepatocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*.

Victor Jeannot^{1,2}, Benoît Busser^{1,2,3}, Laetitia Vanwonderghem^{1,2}, Sana Ferroudj^{1,2}, Murat Cokol⁴, Jean-Luc Coll^{1,2}, Mehmet Ozturk^{1,2,4}, Amandine Hurbin^{1,2}

¹ INSERM U823, Institut Albert Bonniot, F-38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, F-38000 Grenoble, France

³ CHRU Grenoble, Hop. Michallon, F-38000 Grenoble, France

⁴ Dokuz Eylul University, Izmir Biomedicine and Genome Center, T-35340 Izmir, Turkey

Running title (60c): gefitinib and vorinostat combination in NSCLC and HCC

Keywords: targeted therapy, gefitinib, sorafenib, vorinostat, combination

Financial support: This study was supported by grants from “La Ligue Contre le Cancer” (“comités Isère” and “Puy de Dôme”), “La Région Rhône-Alpes”, the “ANR projet blanc” (Agence Nationale pour la Recherche, grant ANR 11-BSV5-018-02), and TÜBİTAK (grant no. 113S389).

Corresponding author: Amandine Hurbin, INSERM U823, Institut Albert Bonniot, BP170 Grenoble, F-38042 cedex 9, France. Phone: +33 476 549 553. Fax: +33 476 549 413. amandine.hurbin@inserm.fr

No conflict of interest to disclose

Abstract

Development of drug resistance limits the efficacy of targeted therapies. Alternative approaches using combinations of therapeutic agents to inhibit several pathways could be a more effective strategy for treating cancer. Here, the effects of the approved therapeutics epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitor (gefitinib), multi-targeted kinase inhibitor (sorafenib), and histone deacetylase inhibitor (vorinostat), alone or in combination, on cell proliferation, cell cycle distribution, signaling pathway activation, and apoptosis were investigated in a panel of human lung adenocarcinoma and hepatocarcinoma cell lines with wild-type *EGFR*. In these cell lines, the combination of gefitinib and either vorinostat or sorafenib significantly reduced cell growth, inhibited the phosphatidyl inositol-3 kinase/AKT-dependent signaling pathway, and strongly induced apoptosis. In contrast, the combination of sorafenib and vorinostat did not inhibit cell proliferation compared to single treatment, sustained phosphatidyl inositol-3 kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathways, and induced G2/M cell cycle arrest without apoptosis. Moreover, gefitinib and vorinostat combination strongly inhibited tumor growth in mice with lung adenocarcinoma or hepatocarcinoma tumor xenografts. These results show the synergistic cytotoxicity of gefitinib when combined with vorinostat in lung adenocarcinoma and hepatocarcinoma *in vitro* and *in vivo*. In addition, the combination of sorafenib with gefitinib showed an additive antitumor effect, whereas the combination of sorafenib and vorinostat seemed to exert antagonistic effects in both lung adenocarcinoma and hepatocarcinoma cells. These findings should encourage the use of histone deacetylase inhibitors in combination with EGFR-tyrosine kinase inhibitors especially to treat patients with wild-type *EGFR* who resist to treatment.

Introduction

Although the use of new therapeutic agents has improved the treatment of cancer patients in recent years, the efficacy of targeted therapies is limited by the development of drug resistance. Thus, the identification of alternative approaches that further disrupt tumor cell growth is essential, and such strategies could have significant clinical impact. In particular, combinations of targeted agents might be exploited to inhibit more than one pathway and could be significantly more effective in achieving tumor regression than single therapeutic agents.

Gefitinib and erlotinib are epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) that improve the survival of patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) (1). However, despite an initial response to EGFR-TKIs, patients invariably develop resistance to these drugs, typically within 10 to 14 months (2). The presence of an intrinsic resistance mechanism in patients with wild-type EGFR NSCLC also confers resistance to EGFR-TKIs, although the underlying mechanisms of this resistance are not completely understood (3). Histone deacetylase (HDAC) inhibitors induce a range of anticancer effects, including tumor cell apoptosis, cell cycle arrest, differentiation, senescence, modulation of immune responses, and altered angiogenesis (4). Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) and romidepsin are the most advanced HDAC inhibitors and are currently approved for treating T-cell lymphomas (5,6). Several studies support the use of HDAC inhibitors in combination with other targeted cancer therapies, such as EGFR-TKIs (7-13), to induce apoptosis in NSCLC cells (7,9).

Sorafenib is a small molecule TKI that targets vascular endothelial growth factor receptors, Raf kinases, and platelet-derived growth factor receptor. It was the first inhibitor to produce a survival benefit in advanced hepatocellular carcinoma (HCC) (14). However, the majority of HCC patients do not respond to sorafenib and most, if not all, patients who initially respond to sorafenib develop tumor resistance after few months of treatment (15). Preclinical studies have also shown that combining HDAC inhibitors with sorafenib can have antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic effects on epithelial tumor cells (16-18).

With the aim of developing effective preclinical studies for rational multi-targeted cancer treatment approaches, we hypothesized that combined treatment with TKIs (such as the EGFR-TKI gefitinib or multi-targeted kinase inhibitor sorafenib) and the HDAC inhibitor vorinostat could overcome the intrinsic resistance of epithelial tumor cells to TKI, allowing more effective treatment of both HCC and NSCLC. We thus investigated the effects of combinations of

vorinostat, sorafenib and gefitinib on antiproliferative and survival pathways in NSCLC and HCC cells with wild-type *EGFR* *in vitro* and *in vivo*.

Material and methods:

Cell lines

Four NSCLC (A549, H1299, H358, H322) and five HCC (HepG2, Hep3B, HuH7, Hep40 and PLC/PRF5) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained in RPMI 1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere with 5% CO₂. All cell lines were routinely tested for the presence of mycoplasma (MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit, Lonza, France).

Drugs

Sorafenib and vorinostat were obtained from Selleckchem (Munich, Germany). Gefitinib was provided by AstraZeneca (France). All drugs were dissolved in sterile dimethylsulfoxide, and a 10 mM stock solution was prepared and stored at -20°C. Working concentrations were diluted in culture medium just before each experiment.

Cell proliferation assay

Exponentially growing cells were seeded in 96-well plates and exposed to serial dilutions of gefitinib, sorafenib, and vorinostat in regular growth medium containing 10% FBS for 96 hours. Cell proliferation was measured with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Growth inhibition was expressed as the percentage of surviving drug-treated cells compared with untreated control cells. The drug concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC₅₀) were determined by interpolation from the dose-response curves. Combinations of treatments were performed in 96-well plates using serial dilutions of gefitinib, sorafenib, and vorinostat ranging from 0 to IC₅₀ (0; 0.2 IC₅₀; 0.4 IC₅₀; 0.6 IC₅₀; 0.8 IC₅₀; IC₅₀). Cell proliferation was measured using the MTT assay. The mean growth inhibition rate of each individual agent was calculated by dividing the growth rate of treated cells by the growth rate

of untreated cells. In the following equations, A and B are the mean growth inhibition rate of each individual agent, and AB is the mean growth inhibition rate of the combination. The synergistic index was calculated as reported[415]: subadditivity was defined as $(A \times B) / AB < 0.9$; additivity was defined as $(A \times B) / AB = 0.9-1.1$; and supra-additivity was defined as $(A \times B) / AB > 1.1$.

Cell cycle analysis

Cells were harvested, pooled, and fixed with 70% ethanol. Cells were then incubated in PBS at 37°C for 30 min before being stained with 20 µg/mL propidium iodide. The percentage of cells in specific cell cycle phases (G₀/G₁, S, and G₂/M) was determined using a flow cytometer equipped with a 488 nm argon laser (Accuri C6, Becton Dickinson, France). Apoptotic cells with hypodiploid DNA staining were counted in the “sub-G1” peak.

Immunoblotting

Cells were lysed and immunoblotting was performed as previously described (7,9) using antibodies against cleaved caspase-3 (Asp¹⁷⁵), actin, phospho-EGFR-Y¹⁰⁶⁸, EGFR, phospho-AKT-S⁴⁷³, pan-AKT, phospho-ERK1/2-T²⁰²/Y²⁰⁴, and ERK1/2 (Cell Signaling Technology, St Quentin en Yvelines, France).

In vivo models

The effect of the combination of gefitinib and vorinostat was measured on established subcutaneous tumor bearing mice. Animal experiment studies were approved by the institutional guidelines and by the European Community for the use of experimental animals. Female NMRI nude mice (6-8 weeks old, Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were injected subcutaneously in the flank with 20.10⁶ H358 cells suspended in PBS or with 5.10⁶ PLC/PRF5 suspended in 50% Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA). Tumor size was measured twice weekly using a caliper and the tumor volume was calculated as follow: length x (width)² x 0.4. When tumors of approximately 250 mm³ were detected, mice were orally administered with gefitinib (5 mg/kg/day for H358 or 50 mg/kg/day for PLC/PRF5) and/or vorinostat (100 mg/kg/day), 5 (H358) or 3 (PLC/PRF5) days a week. Control mice received a vehicle (tween/DMSO) *per os*. Mice bearing tumors ≥ 2 cm³ were euthanized immediately.

Statistical analysis

Comparison of mean values was performed using the Mann-Whitney U-test or ANOVA test. Survival was calculated from the date of beginning of treatment to the last day of experiment or tumor size-related death. Univariate survival analyses were done using the Kaplan-Meier method and the log-rank test. $p < 0.05$ was considered to be significant. All analyses were performed using Statview 4.1 software (Abacus Concept, Berkeley, CA).

Results

Inhibition of proliferation by gefitinib, sorafenib, or vorinostat in NSCLC and HCC cell lines

We first evaluated the ability of gefitinib, sorafenib or vorinostat to inhibit growth in human NSCLC (A549, H1299, H358, and H322) and HCC (Hep3B, Huh7, HepG2, Hep40, and PLC/PRF5) cell lines harboring wild-type *EGFR*. Cancer cells were treated with increasing concentrations of gefitinib, sorafenib or vorinostat (Supplementary figure S1). As shown in Table 1, there was a wide range of gefitinib sensitivity for NSCLC cell lines, with concentrations required to inhibit cell growth by 50% ranging from 1 $\mu\text{mol/L}$ to 30 $\mu\text{mol/L}$. Approximately 1 $\mu\text{mol/L}$ gefitinib significantly inhibited the proliferation of H322 and H358 cells. In contrast, the gefitinib IC_{50} values for A549 and H1299 NSCLC cells were 10 to 20 times higher (Table 1). HCC cells were homogeneously resistant to gefitinib with IC_{50} concentrations ranging from 9 to 15 $\mu\text{mol/L}$ (Table 1). IC_{50} concentrations for sorafenib ranged from 4 to 7 $\mu\text{mol/L}$ in NSCLC cells and from 3 to 5 $\mu\text{mol/L}$ in HCC cells (Table 1). IC_{50} concentrations were higher than 3 $\mu\text{mol/L}$ for vorinostat in NSCLC cells (range: 3-4 $\mu\text{mol/L}$) and ranged from 1 to 3 $\mu\text{mol/L}$ in HCC cells, indicating that HCC cell lines were more sensitive than NSCLC cell lines to vorinostat (Table 1).

Effects of vorinostat, gefitinib or sorafenib combinations on NSCLC and HCC cell growth

Three human NSCLC (A549, H358 and H322) and three HCC (PLC/PRF5, Hep3B and Huh7) cell lines were selected to be treated with combinations of vorinostat, gefitinib and sorafenib. In general, the combination of vorinostat with gefitinib at doses lower than the IC_{50} reduced viability to a greater extent than each drug alone (Figure 1A). The inhibitory effects were supra-additive in three NSCLC cell lines but only one HCC cell line (PLC/PRF5). This effect was confirmed in H358 and PLC/PRF5 cells treated with increasing concentrations of gefitinib and vorinostat (Figure 1B). The combination of treatments reduced cell viability more effectively than each drug alone at all concentrations studied in H358 cells and at higher concentrations in PLC/PRF5 cells, and the growth inhibition index calculation showed a synergistic effect of the gefitinib/vorinostat combination (Supplementary table 1). In contrast, the combination of vorinostat with sorafenib at concentrations lower than the IC_{50} showed no additive effects in NSCLC and HCC cell lines (Figure 1C). The effect of the combination was not significantly different from that of each drug alone in every cell line studied and at all concentrations studied in both H358 and PLC/PRF5 cells (Figure 1D and supplementary table 2). Finally, the combination of sorafenib with gefitinib at doses lower than the IC_{50} significantly reduced viability to a greater extent than each drug alone in only H358 and PLC/PRF5 cells (Figure 1E and 1F). The growth inhibition index calculations showed additive effects for the gefitinib/sorafenib combination in H358 but not in PLC/PRF/5 cells (supplementary table 3).

Effects of combinations of gefitinib, sorafenib and vorinostat on signaling pathways in NSCLC and HCC cell lines

Western blots were performed on protein extracts from the six NSCLC and HCC cancer cells after they had been treated for 96 hours with gefitinib, sorafenib or vorinostat, alone or in combination, to determine the impact of these treatments on key intracellular pathways for cell survival and proliferation.

Gefitinib alone markedly inhibited phospho-EGFR in all NSCLC and HCC cell lines (Figure 2). Phospho-AKT was also inhibited by gefitinib, except in H358 cells, as previously observed (20). No activation of AKT was observed in either untreated Huh7 cells or those treated with gefitinib. Gefitinib had no inhibitory effect on phospho-ERK and increased it in H358 and H322 NSCLC cells, as previously described (20). Vorinostat alone had no significant effect on phospho-EGFR, phospho-AKT or phospho-ERK, except in H358 cells in which it slightly

inhibited phospho-EGFR and enhanced phospho-ERK (Figure 2). Sorafenib alone had an inhibitory effect only on phospho-AKT in H358 and Hep3B cells, but it induced a paradoxical increase of phospho-ERK in the six cell lines (Figure 2).

When gefitinib was combined with vorinostat, a marked reduction of phospho-AKT but not phospho-ERK was observed compared with each drug alone in all cell lines (Figure 2). This effect on phospho-AKT was lessened in Hep3B and Huh7 cells. In contrast, the combination of sorafenib with vorinostat had no significant effect on phospho-EGFR but maintained or enhanced phospho-AKT and phospho-ERK in comparison with each drug alone (Figure 2). When sorafenib was combined with gefitinib, a reduction of phospho-AKT and phospho-ERK was observed compared to sorafenib alone in HCC cells and H322 NSCLC cells (Figure 2). The sorafenib-induced increase in phospho-ERK was maintained in the presence of gefitinib in both H358 and A549 *KRAS*-mutated NSCLC cells. No significant effect of combined treatment on phosphorylated STAT3 was observed in NSCLC or HCC cell lines (supplementary figure S2). Together, these findings show that gefitinib combined with vorinostat potently repressed AKT-dependent survival signaling in both the NSCLC and HCC cell lines. Gefitinib, unlike vorinostat, prevents the adverse effects of sorafenib on ERK and AKT phosphorylation, at least in wild-type *KRAS* cells.

Effects of combining gefitinib with sorafenib and/or vorinostat on cell cycle distribution in NSCLC and HCC cell lines

Lung adenocarcinoma H358 and hepatocarcinoma PLC/PRF5 cells showed a significant synergistic inhibition of growth when treated with a combination of gefitinib and either vorinostat or sorafenib. Therefore, we selected these two cancer cell lines to investigate the mechanisms underlying this effect. Flow cytometry was used to analyze the cell cycle distribution in cells treated with vorinostat, gefitinib, or sorafenib alone and in combination. None of the three single agent treatments resulted in a marked change in the cell cycle distribution for H358 (Figure 3A, 3B) or PLC/PRF5 (Figure 3C, 3D) cells. However, the combination of gefitinib with either vorinostat or sorafenib induced a strong and significant accumulation of subG1 cells, together with a decrease in G0/G1 and/or G2/M cells. These effects were higher in PLC/PRF/5 cells (Figure 3C) than in H358 cells (Figure 3A). In contrast, the combination of sorafenib and vorinostat induced a strong accumulation of cells in the G2/M phases in H358 cells (Figure 3A). The type of cell cycle aberrations observed strongly

suggested that gefitinib, when combined with vorinostat or sorafenib, induced apoptotic death in both cell lines and that the combination of sorafenib and vorinostat induced G2/M arrest.

Apoptotic effects of gefitinib, sorafenib or vorinostat combinations in NSCLC and HCC cell lines

To further elucidate and confirm the cytotoxic effects of gefitinib combined with vorinostat or sorafenib, we next used caspase-3 cleavage detection to evaluate the ability of these drugs (as single agents or in combination) to induce apoptosis (Figure 4). In agreement with the increase of the apoptotic sub-G1 population (Figure 3), the combination of gefitinib with either vorinostat or sorafenib were more effective than for each drug alone in the induction of caspase-3 cleavage in H358 and PLC/PRF5 cells (Figure 4). The combination of gefitinib with vorinostat also strongly induced apoptosis in H322, A549 and Hep3B cells but not in Huh7 cells. In keeping with their effects on cell growth (Figure 1E), the combination of gefitinib with sorafenib did not induce apoptosis in A549, H322, Hep3B or Huh7 cells (figure 4). Finally, the combination of vorinostat with sorafenib decreased the level of apoptosis in all NSCLC and HCC cells tested compared to single treatment (figure 4). Taken together, these findings indicate that there is a synergistic interaction between gefitinib and vorinostat to induce apoptosis and an additive effect between gefitinib and sorafenib. In contrast, a combination of the HDAC inhibitors vorinostat and sorafenib failed to induce apoptosis.

Antitumor efficacy of gefitinib and vorinostat combination in NSCLC and HCC cells *in vivo*

Because gefitinib and vorinostat combination showed synergistic effects *in vitro*, we examine their *in vivo* cooperativity in nude mice bearing H358 or PLC/PRF5 subcutaneous xenografts. According to IC₅₀ concentrations determined in H358 and PLC/PRF5 cells (Table 1), we used 5 or 50 mg/kg gefitinib for treating H358-tumor bearing mice or PLC/PRF5-tumor bearing mice respectively, and/or 100 mg/kg vorinostat. Gefitinib, vorinostat and the drug combination were well tolerated and no significant weight loss were observed in H358-tumor bearing mice (Figure 5A). In PLC/PRF5-tumor bearing mice, the higher dose of gefitinib induced 8-12% weight loss after 1 week of treatment (not shown), forcing to reduce the frequency of treatment administration to 3 times a week. This adaptation was well tolerated until the end of the

experiment (Figure 5D). Treatment with a low concentration of gefitinib or with vorinostat alone did not show reduced H358 tumor growth and tumor weight compared with the control group (Figure 5B and 5C). Treatment of PLC/PRF5 tumor-bearing mice with a higher concentration of gefitinib alone significantly inhibited tumor growth and tumor weight compared with the control group (35% inhibition of PLC/PRF5 tumor growth after 30 days of treatments compared to control) (Figure 5D and 5E). Vorinostat alone did not affect PLC/PRF5 tumor growth and weight compared with the control group (Figure 5D and 5E). In contrast, the combination of vorinostat with gefitinib had a strong inhibitory effect on both H358 and PLC/PRF5 tumor growths (66% inhibition of H358 tumor growth after 35 days of treatments compared to control, $p < 0.01$ (Figure 5B); 55% inhibition of PLC/PRF5 tumor growth after 30 days of treatments compared to control, $p < 0.001$ (Figure 5E)) and tumor weights compared with control and also with single agents (Figure 5C and 5D). The combination of treatments reduced tumor volume more effectively than each drug alone in H358 and PLC/PRF5 tumors, and the growth inhibition indexes calculation showed a synergistic effect of the gefitinib/vorinostat combination (Supplementary table 4). In addition, the fast tumor growing of PLC/PRF5 and the lower frequency of treatment administration, necessitated stopping the experiment in mice bearing 2 cm³ tumors. The control and vorinostat alone mice groups exhibited similar PLC/PRF5 tumor size-related deaths (median survival time of 25 and 21 days, no significant difference, $p = 0.47$) (Figure 5F). In contrast, the median survival time was not reached in the gefitinib alone or the combination treated groups. Therefore, gefitinib or gefitinib/vorinostat combination treatments were associated with enhanced survival for mice with PLC/PRF5 tumors compared with control or vorinostat treated mice ($p = 0.0339$).

Discussion

Although the development of selective molecular targeted therapies have led to advances in cancer treatment, several relevant issues for their optimal and effective use remain unsolved. Clinical activity of a single agent EGFR-TKI or the multi-kinase inhibitor sorafenib has rarely been observed in unselected NSCLC and HCC patients, respectively (1,14), who eventually develop resistance (2,3,15). There is an urgent need for the identification of alternative therapeutic strategies. In this respect, combinations of therapies with other molecular targeted drugs could be key factors to increase the therapeutic efficacy of TKI when treating patients with NSCLC or HCC and wild-type *EGFR*.

Despite the demonstrated benefits of EGFR-TKI in NSCLC patients with *EGFR*-activating mutations, not all patients with NSCLC respond to treatment and they eventually develop resistance (1,2,21). Unlike NSCLC, very few studies have shown the effects of single agent EGFR-TKI treatment in HCC cells. Gefitinib can be effective in HCC cells under limited conditions, including high dosage (22), activation of TGF- α /EGFR (23), and epithelial-mesenchymal transition (EMT) status, mesenchymal cells being more resistant (24). The clinical efficacy of EGFR inhibitors as single agents in HCC is modest (25,26). Likewise, limited clinical benefit was observed with HDAC inhibitors for patients with solid tumors, including NSCLC and HCC (12). In lung cancer, phase II trials of vorinostat showed encouraging results (27-29). However, the subsequent phase III randomized trial failed to demonstrate an improvement in response rate and survival with vorinostat (12). The results reported here demonstrate that combined inhibition of both EGFR and HDAC provides more effective growth blockade and cell death in both NSCLC and HCC cell lines than single agents *in vitro* and *in vivo*. The sub-optimal doses of gefitinib and vorinostat used in H358 tumor-bearing mice, as well as the lower frequency of administration used in PLC/PRF5 tumors-bearing mice, are not associated with any documented side-effect, and no sign of toxicity was observed in the co-treated animals. We observed that the synergistic interaction of gefitinib and vorinostat triggered apoptosis in NSCLC and HCC (especially PLC/PRF5) cell lines with wild-type *EGFR* and showed major effect on inhibition of NSCLC and HCC tumor growth. Accordingly, other preclinical studies reported enhanced efficacy of EGFR and HDAC inhibition in NSCLC cells (7-9,13,30). Interestingly, we were not able to find reports on the combined effects of EGFR-TKI and HDAC inhibitors in HCC.

Mechanistic analyses revealed that the synergism between gefitinib and vorinostat involves inhibition of the PI3K/AKT survival signaling pathway and the activation of pro-caspase 3 in

both NSCLC and HCC cells. In agreement, EGFR-targeted agents would not induce significant apoptosis if the PI3K signaling pathway was not effectively inhibited in NSCLC cells (31). Moreover, HDACs enhance PI3K/AKT signaling and inhibit gefitinib-dependent apoptosis in wild-type EGFR NSCLC cells (7,9). Apoptotic effects of gefitinib on HCC cells have also been reported *in vitro* (22), as has the induction of tumor cell apoptosis by HDAC inhibitors (4).

Sorafenib is the standard of care for the treatment of advanced HCC (14). However, its clinical benefits remain modest and most often consist of temporary tumor stabilization (15). In NSCLC, sorafenib showed clinical activity in a phase II study (32) but not in a randomized phase III trial in NSCLC patients with a KRAS mutation (33). The first completed prospective, biopsy-mandated, biomarker-based, adaptively randomized study in pretreated lung cancer patients (Biomarker-integrated Approaches of Targeted Therapy for Lung Cancer Elimination, BATTLE trial) reported a benefit of sorafenib in patients with mutated or wild-type KRAS (34). Our study showed the strong efficacy of gefitinib when combined with sorafenib, demonstrating an additive antitumoral effect in both PLC/PRF5 HCC and H358 NSCLC cells.

Sorafenib is a multi-kinase inhibitor whose targets include B-Raf and C-Raf, both of which function in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. We observed that sorafenib inhibited ERK phosphorylation in NSCLC cells with wild-type but not mutant KRAS, as previously observed (35). *In vitro* and *in vivo* studies on gefitinib and sorafenib combination reported increased efficacy in HCC cell lines (36) and a dependence on EGFR and HER3 expression (37). However, clinical trials combining sorafenib with the EGFR-TKI erlotinib did not demonstrate superiority to sorafenib alone in terms of HCC patient survival (38). In lung cancer, there is increasing interest in using combinations of targeted agents to inhibit VEGFR and EGFR (39).

Preclinical studies have demonstrated antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic effects of combining HDAC inhibitors with sorafenib in epithelial tumor cells (16-18). In contrast, we observed that a combination of vorinostat with sorafenib failed to enhance apoptosis, suggesting antagonistic effects both in NSCLC and HCC cells. Indeed, this combination of treatments induced G2/M cell cycle arrest, the maintenance of AKT and ERK activation, and no apoptosis. Interestingly, autophagy plays a compensatory role during treatment with sorafenib, vorinostat, or their combination in HCC cells (40). This could explain the absence of apoptosis observed. In addition, a phase I study in patients with renal cell carcinoma and NSCLC showed that combined sorafenib and vorinostat treatment was not tolerable, and no confirmed response was seen (41).

In summary, HDAC inhibitors have the potential to restore sensitivity to EGFR-TKIs and dramatically reduce the concentration of EGFR-TKI necessary to induce cell death in wild-type *EGFR* NSCLC and HCC cell lines *in vitro* and *in vivo*. In addition, the combination of the multi-targeted kinase inhibitor sorafenib with EGFR-TKI shows an additive antitumoral effect, especially in wild-type *KRAS* cells. Unlike its combination with gefitinib, sorafenib exerts an antagonistic effect when combined with vorinostat both in NSCLC and HCC cell lines. A therapeutic strategy that directly activates the apoptotic machinery may circumvent multiple mechanisms of resistance to targeted therapies and may therefore be an alternative approach to inhibit more than one resistance mechanism at a time. So far, no combination of drugs has been very effective clinically. Many clinical trials are undertaken without prospectively evaluating or targeting the specific subpopulation of drug-resistant patients when, on the basis of preclinical data, the addition of a new agent may be clinically effective. Our results strongly support the value of associating HDAC inhibitors with EGFR-TKI treatments, especially in EGFR-TKI-resistant patients. Our observations, demonstrating the strong killing activity of gefitinib combined with vorinostat or sorafenib, deserve attention when designing future clinical trials based on the association of these inhibitors in both NSCLC and HCC patients with wild-type *EGFR*.

Acknowledgments

This study was supported by grants from “La Ligue Contre le Cancer” (“comités Isère” and “Puy de Dôme”), “La Région Rhône-Alpes”, the “ANR projet blanc” (Agence Nationale pour la Recherche, grant ANR 11-BSV5-018-02), and TÜBİTAK (grant no. 113S389).

References

1. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.
2. Hirsch FR, Janne PA, Eberhardt WE, Cappuzzo F, Thatcher N, Pirker R, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012. *J Thorac Oncol* 2013;8:373-84.
3. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci Transl Med* 2011;3:75ra26.
4. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:769-84.
5. Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, et al. Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:3109-15.
6. Piekarz RL, Frye R, Turner M, Wright JJ, Allen SL, Kirschbaum MH, et al. Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:5410-7.
7. Busser B, Sancey L, Josserand V, Niang C, Khochbin S, Favrot MC, et al. Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation. *Molecular therapy* 2010;18:536-43.
8. Chen MC, Chen CH, Wang JC, Tsai AC, Liou JP, Pan SL, et al. The HDAC inhibitor, MPT0E028, enhances erlotinib-induced cell death in EGFR-TKI-resistant NSCLC cells. *Cell Death Dis* 2013;4:e810.(
9. Jeannot V, Busser B, Brambilla E, Wislez M, Robin B, Cadranel J, et al. The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism. *Int J Cancer* 2014;134:2560-71.
10. LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzone W, Russell J, Louie SG, El-Khoueiry A, et al. The dual EGFR/HER2 inhibitor lapatinib synergistically enhances the antitumor activity of

- the histone deacetylase inhibitor panobinostat in colorectal cancer models. *Cancer Res* 2011;71:3635-48.
11. Lai CJ, Bao R, Tao X, Wang J, Atoyan R, Qu H, et al. CUDC-101, a multitargeted inhibitor of histone deacetylase, epidermal growth factor receptor, and human epidermal growth factor receptor 2, exerts potent anticancer activity. *Cancer Res* 2010;70:3647-56.
 12. Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol* 2011;7:263-83.
 13. Witta SE, Dziadziuszko R, Yoshida K, Hedman K, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., et al. ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 2009;20:689-95.
 14. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.
 15. Siegel AB, Olsen SK, Magun A, Brown RS, Jr. Sorafenib: where do we go from here? *Hepatology* 2010;52:360-9.
 16. Baradari V, Hopfner M, Huether A, Schuppan D, Scherubl H. Histone deacetylase inhibitor MS-275 alone or combined with bortezomib or sorafenib exhibits strong antiproliferative action in human cholangiocarcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2007;13:4458-66.
 17. Park MA, Zhang G, Martin AP, Hamed H, Mitchell C, Hylemon PB, et al. Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation. *Cancer Biol Ther* 2008;7:1648-62.
 18. Zhang G, Park MA, Mitchell C, Hamed H, Rahmani M, Martin AP, et al. Vorinostat and sorafenib synergistically kill tumor cells via FLIP suppression and CD95 activation. *Clin Cancer Res* 2008;14:5385-99.
 19. Heinicke U, Fulda S. Chemosensitization of rhabdomyosarcoma cells by the histone deacetylase inhibitor SAHA. *Cancer Lett* 2014.

20. Hurbin A, Wislez M, Busser B, Antoine M, Tenaud C, Rabbe N, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma. *The Journal of pathology* 2011;225:83-95.
21. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380-8.
22. Hopfner M, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherubl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004;41:1008-16.
23. Okano J, Matsumoto K, Nagahara T, Murawaki Y. Gefitinib and the modulation of the signaling pathways downstream of epidermal growth factor receptor in human liver cancer cells. *J Gastroenterol* 2006;41:166-76.
24. Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008;68:2391-9.
25. Philip PA, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, et al. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:6657-63.
26. Thomas MB, Chadha R, Glover K, Wang X, Morris J, Brown T, et al. Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2007;110:1059-67.
27. Ramalingam SS, Maitland ML, Frankel P, Argiris AE, Koczywas M, Gitlitz B, et al. Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:56-62.
28. Ramalingam SS, Parise RA, Ramanathan RK, Lagattuta TF, Musguire LA, Stoller RG, et al. Phase I and pharmacokinetic study of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in combination with carboplatin and paclitaxel for advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2007;13:3605-10.

29. Traynor AM, Dubey S, Eickhoff JC, Kolesar JM, Schell K, Huie MS, et al. Vorinostat (NSC# 701852) in patients with relapsed non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network phase II study. *J Thorac Oncol* 2009;4:522-6.
30. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, et al. EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition. *Cancer Res* 2013;73:2428-34.
31. Johnson BE, Jackman D, Janne PA. Rationale for a phase I trial of erlotinib and the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) for patients with relapsed non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:s4628-31.
32. Dingemans AM, Mellema WW, Groen HJ, van Wijk A, Burgers SA, Kunst PW, et al. A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIB or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. *Clin Cancer Res* 2013;19:743-51.
33. Paz-Ares LG, Biesma B, Heigener D, von Pawel J, Eisen T, Bennouna J, et al. Phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of gemcitabine/cisplatin alone or with sorafenib for the first-line treatment of advanced, nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:3084-92.
34. Kim ES, Herbst RS, Wistuba, II, Lee JJ, Blumenschein GR, Jr., Tsao A, et al. The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer. *Cancer Discov* 2011;1:44-53.
35. Takezawa K, Okamoto I, Yonesaka K, Hatashita E, Yamada Y, Fukuoka M, et al. Sorafenib inhibits non-small cell lung cancer cell growth by targeting B-RAF in KRAS wild-type cells and C-RAF in KRAS mutant cells. *Cancer Res* 2009;69:6515-21.
36. Ezzoukhry Z, Louandre C, Trecherel E, Godin C, Chauffert B, Dupont S, et al. EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Int J Cancer* 2012;131:2961-9.
37. Blivet-Van Eggelpoel MJ, Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Barbu V, Rey C, et al. Epidermal growth factor receptor and HER-3 restrict cell response to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol* 2012;57:108-15.
38. Worns MA, Galle PR. HCC therapies--lessons learned. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:447-52.

39. Belani CP, Goss G, Blumenschein G, Jr. Recent clinical developments and rationale for combining targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Treat Rev* 2012;38:173-84.
40. Yuan H, Li AJ, Ma SL, Cui LJ, Wu B, Yin L, et al. Inhibition of autophagy significantly enhances combination therapy with sorafenib and HDAC inhibitors for human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2014;20:4953-62.
41. Dasari A, Gore L, Messersmith WA, Diab S, Jimeno A, Weekes CD, et al. A phase I study of sorafenib and vorinostat in patients with advanced solid tumors with expanded cohorts in renal cell carcinoma and non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 2013;31:115-25.

Table 1. The sensitivity of human NSCLC and HCC cell lines to gefitinib, sorafenib and vorinostat

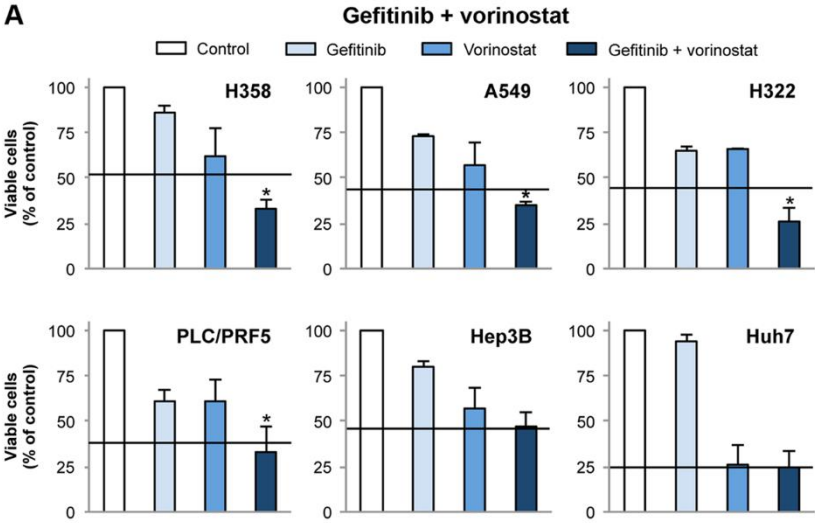
Cell lines		IC ₅₀ (μM)		
		gefitinib	sorafenib	vorinostat
A549	NSCLC	12.8	4.8	3.0
H1299	NSCLC	28.7	4.9	3.9
H358	NSCLC	1.3	4.7	3.0
H322	NSCLC	1.5	6.9	3.2
Hep3B	HCC	12.5	4.2	2.6
Huh7	HCC	14.5	3.0	1.6
HepG2	HCC	9.6	2.9	2.0
PLC/PRF/5	HCC	9.4	4.7	2.4

The drug concentrations required to inhibit cell growth by 50% were determined by interpolation from the dose-response curves.

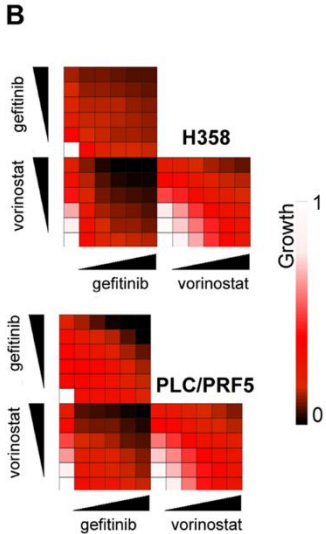
Table 1. The sensitivity of human NSCLC and HCC cell lines to gefitinib, sorafenib and vorinostat. The drug concentrations required to inhibit cell growth by 50% were determined by interpolation from the dose-response curves.

Figure 1

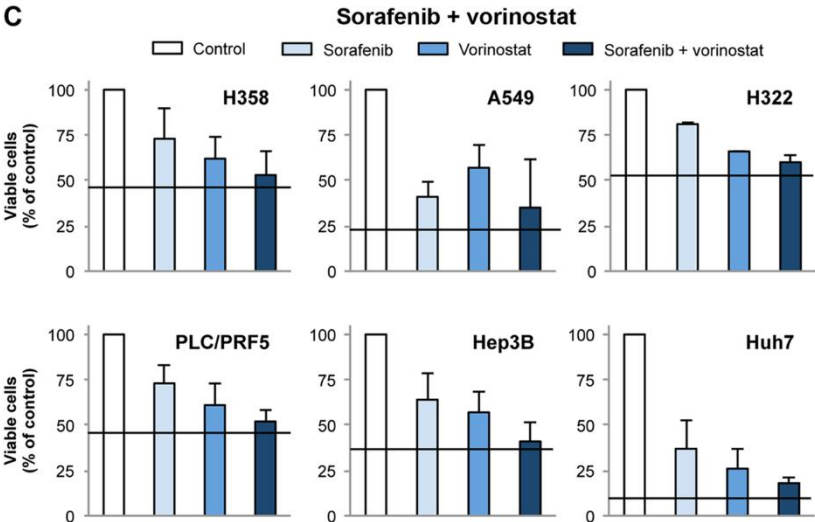
A



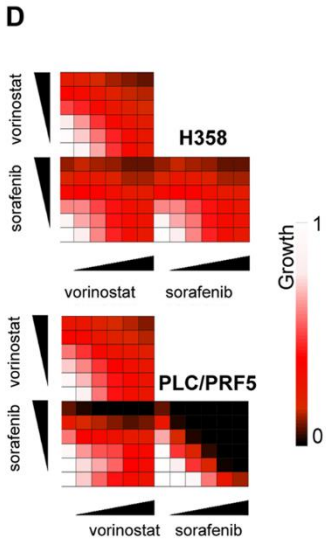
B



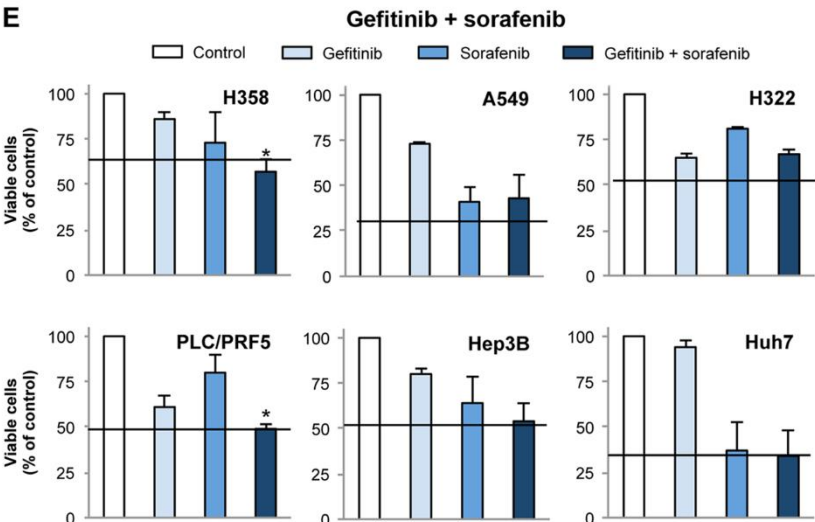
C



D



E



F

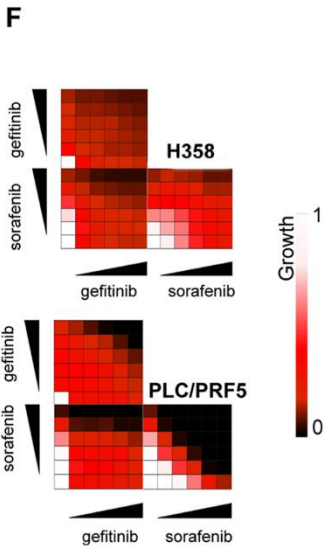
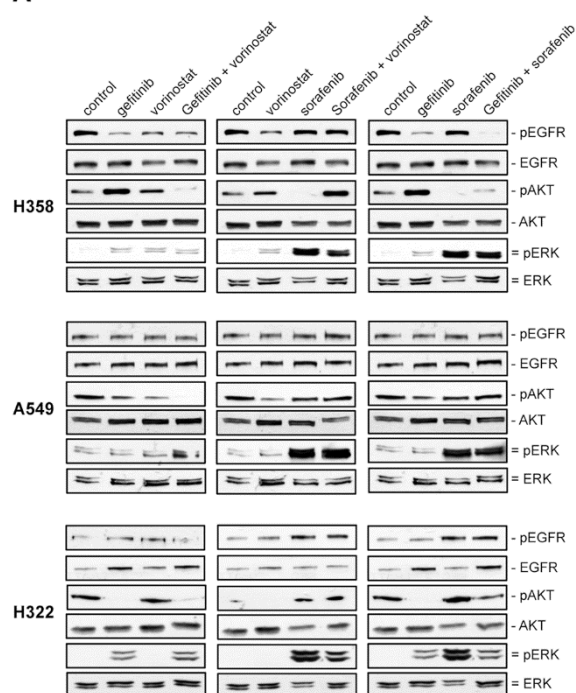


Figure 1. Antitumoral effects of drug combinations in NSCLC and HCC cell lines.

A, C, E: Cell lines were treated for 96 h with gefitinib (**A and E:** H358 and H322: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, A549, PLC/PRF5, Hep3B and Huh7: 3 $\mu\text{mol/L}$) and/or vorinostat (**A and C:** 2 $\mu\text{mol/L}$) and/or sorafenib (**C and E:** 3 $\mu\text{mol/L}$) in complete medium as indicated, and cell viability was measured. Values are means $\pm$ SD of 3 independent experiments. Black lines indicate the additivity threshold. * $p < 0.05$ compared to cells treated with each drug alone. **B, D, F:** H358 or PLC/PRF5 cells were treated with increasing treatment concentrations (0; 0.2 IC_{50} ; 0.4 IC_{50} ; 0.6 IC_{50} ; 0.8 IC_{50} ; IC_{50} ; gefitinib: 0; 0.2, 0.4; 0.6; 0.8; 1 $\mu\text{mol/L}$ in H358 and 0; 1.8, 3.6; 5.4; 7.2; 9 $\mu\text{mol/L}$ in PLC/PRF5; vorinostat: 0; 0.6, 1.2; 1.8; 2.4; 3 $\mu\text{mol/L}$ in H358 and 0; 0.4, 0.8; 1.2; 1.6; 2 $\mu\text{mol/L}$ in PLC/PRF5; sorafenib: 0; 0.9; 1.8, 2.7; 3.6; 4.5 $\mu\text{mol/L}$ in both H358 and PLC/PRF5) for 96 h and cell viability was measured. The scheme shows the relative cell viability, after being normalized to untreated cells, according to the color code indicated and represents the means of 3 independent experiments.

Figure 2

A



B

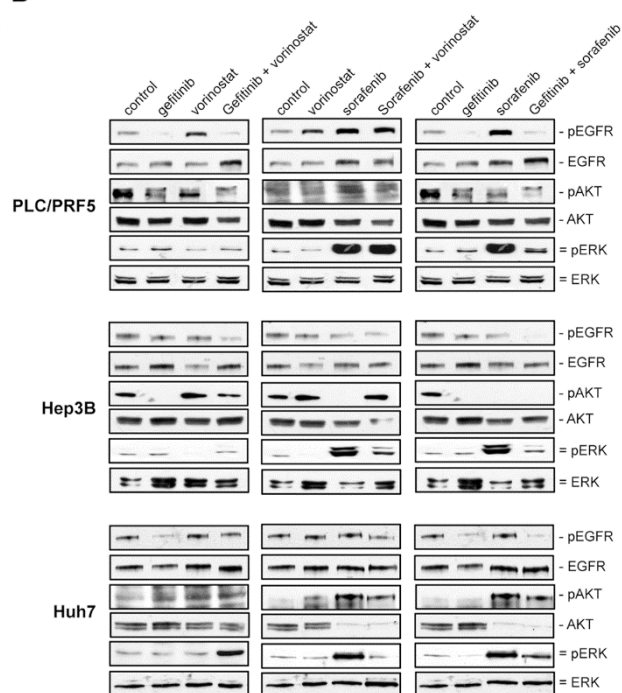


Figure 2. The effects of gefitinib, sorafenib and/or vorinostat on signaling pathways in NSCLC and HCC cell lines.

NSCLC (**A**) and HCC (**B**) cells were treated for 96 h with gefitinib (H358 and H322: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, A549, PLC/PRF5, Hep3B and Huh7: 3 $\mu\text{mol/L}$) and/or sorafenib (3 $\mu\text{mol/L}$) and/or vorinostat (2 μM $\mu\text{mol/L}$) in complete medium. Phosphorylation and total protein levels were evaluated using Western blotting. Each blot is representative of 3 independent experiments.

Figure 3

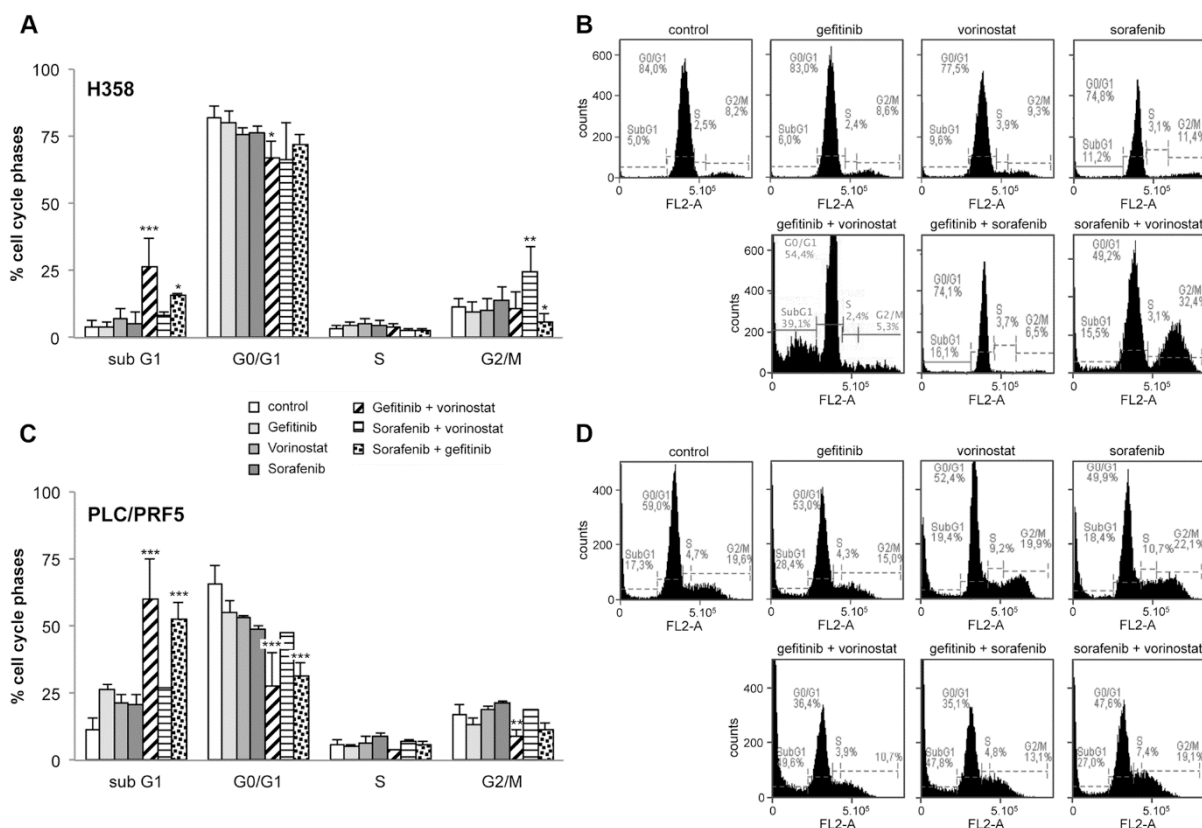


Figure 3. Effects of gefitinib, sorafenib and/or vorinostat on cell cycle distribution in H358 and PLC/PRF5 cell lines.

H358 NSCLC (**A, B**) and PLC/PRF5 HCC (**C, D**) cells were treated for 96 h with gefitinib (H358: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, PLC/PRF5: 3 μM) and/or sorafenib (3 $\mu\text{mol/L}$) and/or vorinostat (2 μM $\mu\text{mol/L}$) in complete medium. Cell cycle distribution was analyzed using flow cytometry. **A, C**: Histograms represent the percentage of cells in each cell cycle phase. Data are the average of three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control or to cells treated with each drug alone (ANOVA). **B, D**: Examples of cell cycle distribution analyzed using flow cytometry. DNA is stained with propidium iodide. The percentage of cells in each phase is indicated.

Figure 4

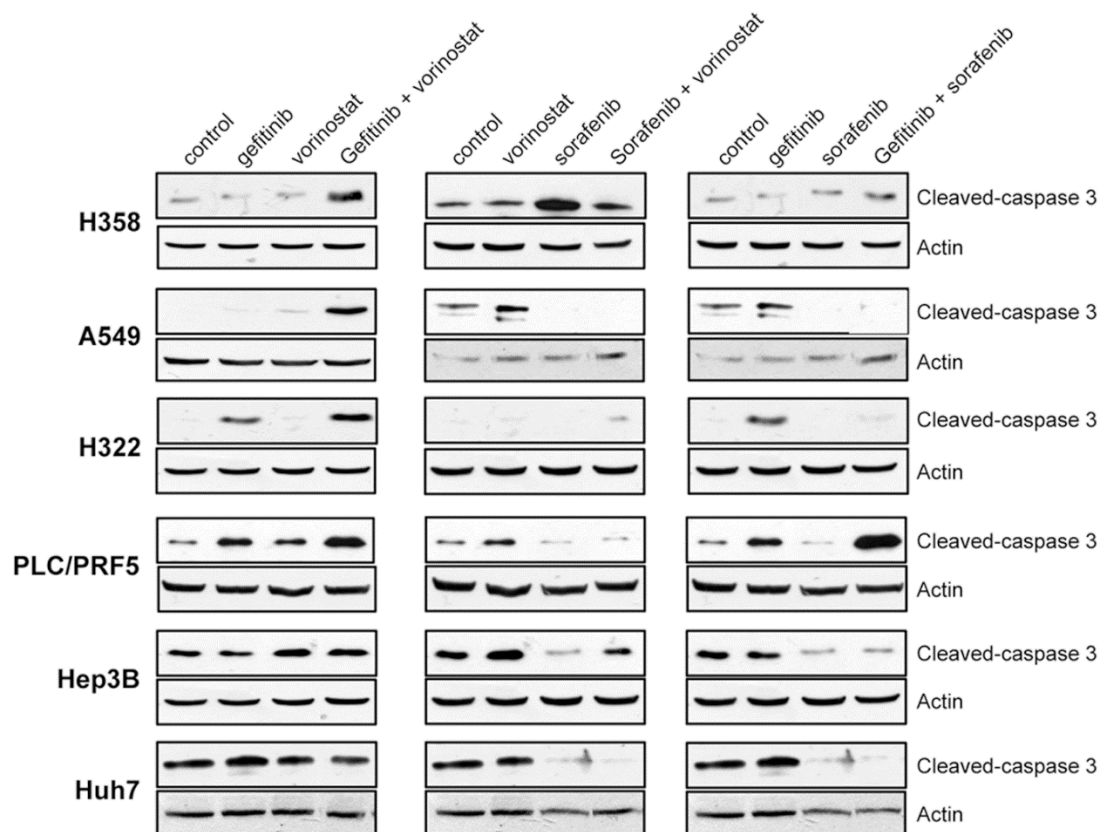


Figure 4. Apoptotic effects of gefitinib, sorafenib and/or vorinostat in NSCLC and HCC cell lines.

Cells were treated for 96 h with gefitinib (H358 and H322: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, A549, PLC/PRF5, Hep3B and Huh7: 3 $\mu\text{mol/L}$) and/or sorafenib (3 μM $\mu\text{mol/L}$) and/or vorinostat (2 $\mu\text{mol/L}$) in complete medium. Caspase-3 cleavage was evaluated using Western blotting. A representative experiment out of two is shown.

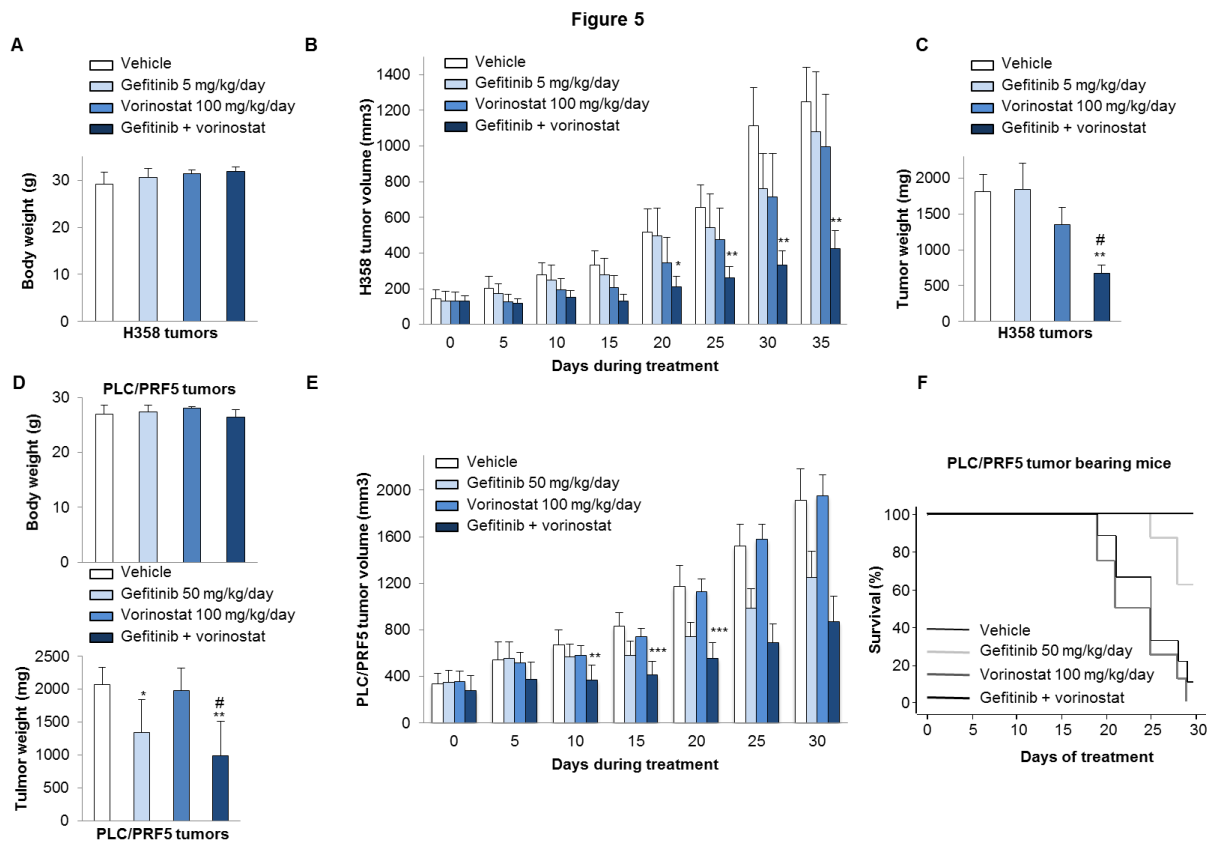
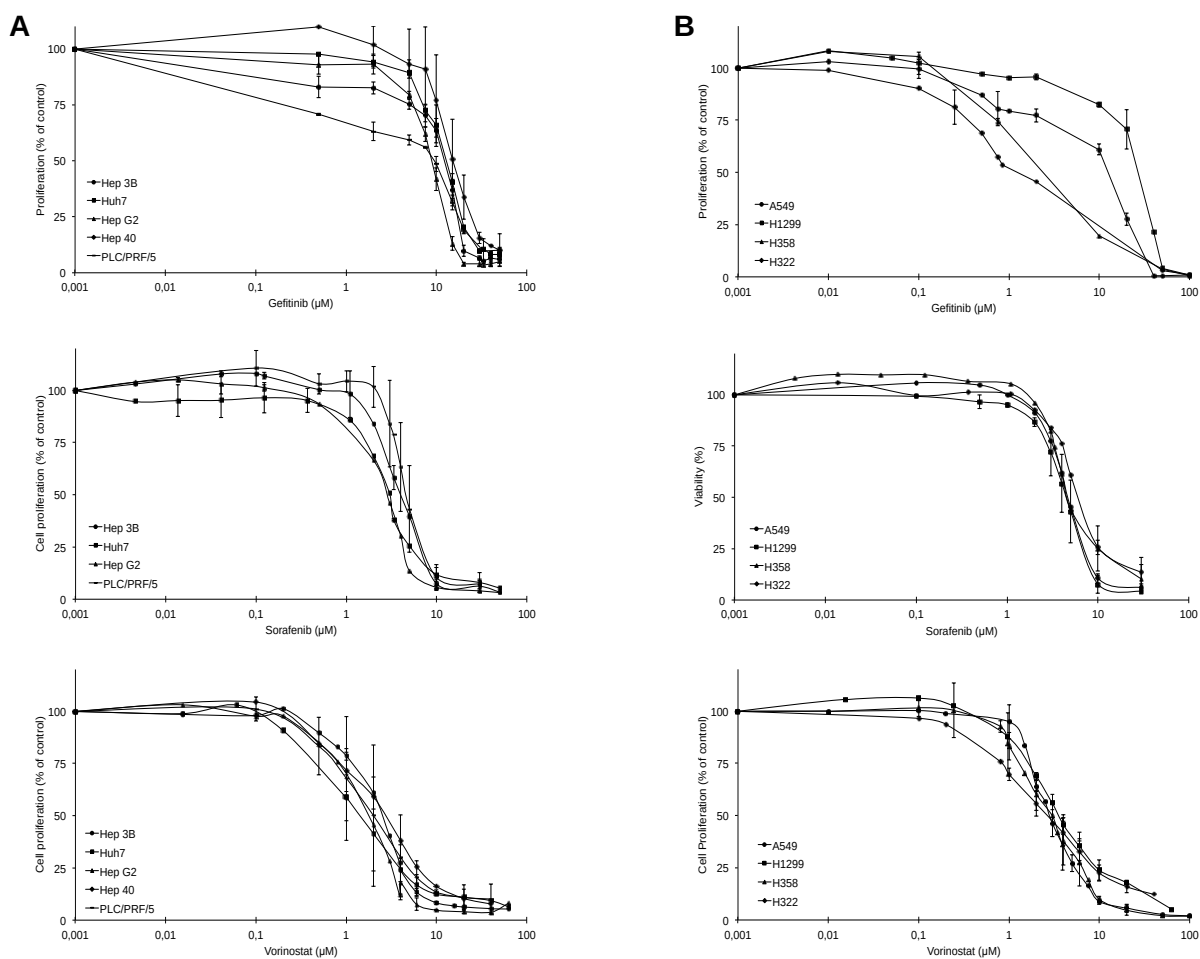


Figure 5. Effects of gefitinib combined to vorinostat on the growth of H358 or PLC/PRF5 xenografts.

Mice bearing H358 tumors (**A-C**) or PLC/PRF5 tumors (**D-F**) were treated with vehicle, gefitinib (5 or 50 mg/kg), vorinostat (100 mg/kg) or both for 30-35 days. Treatment groups comprised 8-11 mice. **A, D**: Mean of body weight at sacrifice. **B, E**: Mean of tumor volume $\pm$ SEM at a given time point. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control group. **C, D**: Tumor weight at sacrifice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ compared to control group; # $p > 0.05$ compared to gefitinib- or vorinostat-treated group. **F**: Kaplan-Meier analysis on PLC/PRF5 tumor-bearing mice. The treatments began 16 days after tumor implantation. P log-rank = 0.0095.

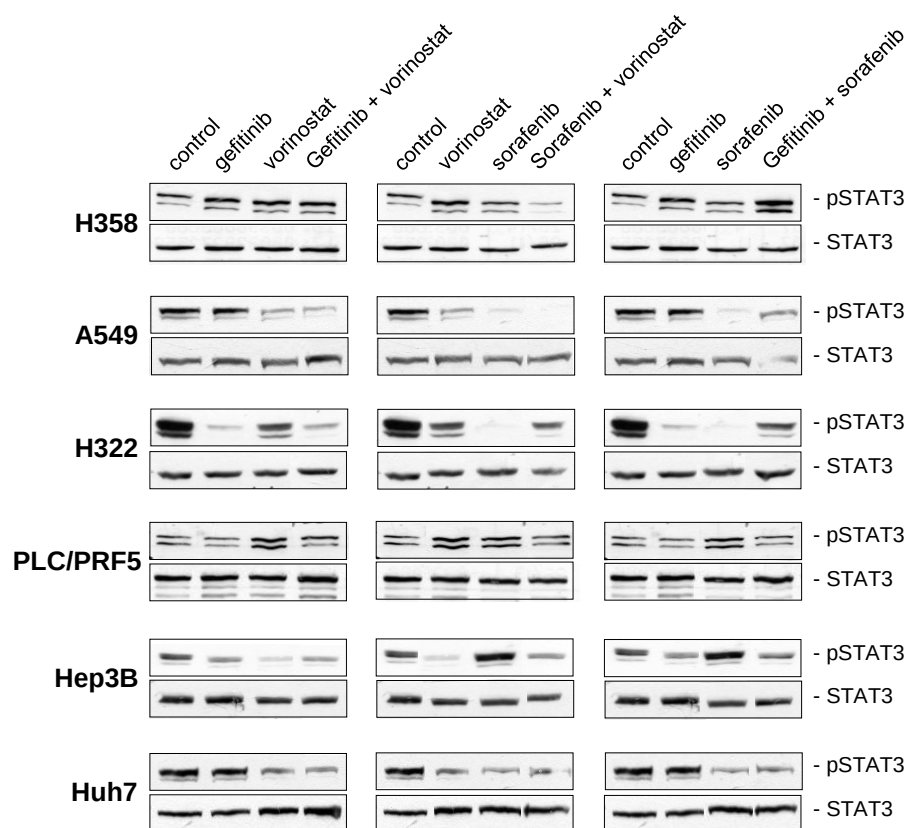
Supplementary figure S1:



Supplementary figure S1: MTT assays in HCC and NSCLC cells treated with gefitinib, sorafenib or vorinostat.

A: Hep3B, Huh7, HepG2, Hep40, and PLC/PRF5 HCC cells and, **B:** A549, H1299, H358, and H322 NSCLC cells were treated for 96 hours with increasing concentrations of gefitinib, sorafenib or vorinostat as indicated in complete medium and then cell viability was measured. Data represent the mean $\pm$ SE of 3 independent experiments.

Supplementary figure S2:



Supplementary figure S2: Effects of gefitinib, sorafenib and/or vorinostat on STAT3 phosphorylation in NSCLC and HCC cell lines.

NSCLC and HCC cells were treated for 96h with gefitinib (H358 and H322: 0.2 $\mu\text{mol/L}$, A549, PLC/PRF5, Hep3B and Huh7: 3 $\mu\text{mol/L}$) and/or sorafenib (3 $\mu\text{mol/L}$) and/or vorinostat (2 $\mu\text{mol/L}$) in complete medium and then phosphorylated-STAT3 and total STAT3 levels were evaluated by western-blotting.

Supplementary table 1. Synergistic indexes of combination treatment with gefitinib and vorinostat

	Gefitinib			Vorinostat			gefitinib + vorinostat			Index ⁴
	Conc.	MGI ¹	p-value ⁵	Conc.	MGI	p-value ⁵	Expected ²	Observed ³	p-value ⁶	
H358	0.2 μ M	0.86	0.0006	1.2 μ M	0.86	0.02	0.74	0.63	0.02	1.17
				1.8 μ M	0.72	0.0006	0.62	0.47	0.02	1.32
				2.4 μ M	0.62	0.0006	0.53	0.33	0.02	1.62
	0.4 μ M	0.68	0.0006	1.2 μ M	0.86	0.02	0.58	0.52	0.02	1.12
				1.8 μ M	0.72	0.0006	0.49	0.39	0.02	1.26
				2.4 μ M	0.62	0.0006	0.42	0.29	0.02	1.45
PLC/PRF5	1.8 μ M	0.60	0.0006	0.8 μ M	0.81	0.0012	0.49	0.49	ns	0.99
				1.2 μ M	0.72	0.0006	0.43	0.43	0.02	1.00
				1.6 μ M	0.61	0.0006	0.37	0.35	0.02	1.05
	3.6 μ M	0.61	0.0006	0.8 μ M	0.81	0.0012	0.49	0.48	ns	1.03
				1.2 μ M	0.72	0.0006	0.44	0.42	0.02	1.05
				1.6 μ M	0.61	0.0006	0.37	0.33	0.02	1.13
	5.4 μ M	0.61	0.0006	0.8 μ M	0.81	0.0012	0.49	0.47	ns	1.05
				1.2 μ M	0.72	0.0006	0.44	0.38	0.02	1.16
				1.6 μ M	0.61	0.0006	0.37	0.33	0.02	1.13

Cell proliferation treated with indicated concentrations of gefitinib, vorinostat, or their combinations was calculated by the MTT assay. ¹MGI: mean growth inhibition rate=growth rate of treated/growth rate of untreated. ²Expected: growth inhibition rate of gefitinib x growth rate of vorinostat. ³Observed: growth inhibition rate of combined on gefitinib and vorinostat. ⁴Index: calculated by dividing the expected growth inhibition rate by the observed growth inhibition rate. An index >1.1 indicates synergistic effect, between 0.9 and 1.1 indicates additive effect and < 0.9 indicated less than additive effect. *P*-value was calculated by Mann-Whitney U-test ⁵compared to control (no treatment) or ⁶compared to gefitinib or vorinostat alone. ns: *p* >0.5.

Supplementary table 2. Synergistic indexes of combination treatment with sorafenib and vorinostat

	Vorinostat			Sorafenib			vorinostat + sorafenib			Index ⁴
	Conc.	MGI ¹	p-value ⁵	Conc.	MGI	p-value ⁵	Expected ²	Observed ³	p-value ⁶	
H358	1.2 μ M	0.86	0.02	2.7 μ M	0.73	0.0003	0.63	0.65	ns	0.97
				3.6 μ M	0.55	0.0003	0.47	0.52	ns	0.91
	1.8 μ M	0.72	0.0006	2.7 μ M	0.73	0.0003	0.53	0.59	ns	0.89
				3.6 μ M	0.55	0.0003	0.40	0.48	ns	0.83
	2.4 μ M	0.62	0.0006	2.7 μ M	0.73	0.0003	0.45	0.53	ns	0.85
				3.6 μ M	0.55	0.0003	0.34	0.39	ns	0.87
PLC/PRF5	0.8 μ M	0.81	0.0012	2.7 μ M	0.73	0.0012	0.59	0.62	ns	0.95
				3.6 μ M	0.55	0.0012	0.45	0.40	ns	1.11
	1.2 μ M	0.72	0.0006	2.7 μ M	0.73	0.0012	0.53	0.57	ns	0.92
				3.6 μ M	0.55	0.0012	0.40	0.34	ns	1.16
	1.6 μ M	0.61	0.0006	2.7 μ M	0.73	0.0012	0.45	0.52	ns	0.86
				3.6 μ M	0.55	0.0012	0.34	0.31	ns	1.08

Cell proliferation treated with indicated concentrations of sorafenib, vorinostat, or their combinations was calculated by the MTT assay. ¹MGI: mean growth inhibition rate=growth rate of treated/growth rate of untreated. ²Expected: growth inhibition rate of sorafenib x growth rate of vorinostat. ³Observed: growth inhibition rate of combined on sorafenib and vorinostat. ⁴Index: calculated by dividing the expected growth inhibition rate by the observed growth inhibition rate. An index >1.1 indicates synergistic effect, between 0.9 and 1.1 indicates additive effect and < 0.9 indicated less than additive effect. *P*-value was calculated by Mann-Whitney U-test ⁵compared to control (no treatment) or ⁶compared to sorafenib or vorinostat alone. ns: *p* >0.5.

Supplementary table 3. Synergistic indexes of combination treatment with sorafenib and gefitinib

	Gefitinib			Sorafenib			gefitinib + sorafenib			Index ⁴
	Conc.	MGI ¹	p-value ⁵	Conc.	MGI	p-value ⁵	Expected ²	Observed ³	p-value ⁶	
H358	0.2 μ M	0.86	0.0006	2.7 μ M	0.73	0.0003	0.63	0.57	0.02	1.10
				3.6 μ M	0.55	0.0003	0.47	0.37	ns	1.28
	0.4 μ M	0.68	0.0006	2.7 μ M	0.73	0.0003	0.50	0.50	ns	0.99
				3.6 μ M	0.55	0.0003	0.37	0.34	0.04	1.10
PLC/PRF5	1.8 μ M	0.60	0.0006	2.7 μ M	0.80	0.0012	0.48	0.48	ns	1.00
				3.6 μ M	0.54	0.0012	0.32	0.31	ns	1.05
	3.6 μ M	0.61	0.0006	2.7 μ M	0.80	0.0012	0.49	0.49	ns	1.00
				3.6 μ M	0.54	0.0012	0.33	0.30	ns	1.10
	5.4 μ M	0.61	0.0006	2.7 μ M	0.80	0.0012	0.49	0.47	ns	1.04
				3.6 μ M	0.54	0.0012	0.33	0.30	ns	1.10

Cell proliferation treated with indicated concentrations of sorafenib, gefitinib, or their combinations was calculated by the MTT assay. ¹MGI: mean growth inhibition rate=growth rate of treated/growth rate of untreated. ²Expected: growth inhibition rate of gefitinib x growth rate of sorafenib. ³Observed: growth inhibition rate of combined on gefitinib and sorafenib. ⁴Index: calculated by dividing the expected growth inhibition rate by the observed growth inhibition rate. An index >1.1 indicates synergistic effect, between 0.9 and 1.1 indicates additive effect and < 0.9 indicated less than additive effect. *P*-value was calculated by Mann-Whitney U-test ⁵compared to control (no treatment) or ⁶compared to gefitinib or sorafenib alone. ns: *p* >0.5.

Supplementary Table 4. Synergistic indexes of combination treatment with gefitinib and vorinostat *in vivo*

xenografts	Gefitinib			Vorinostat			gefitinib + vorinostat			Index ⁴
	Conc.	MGI ¹	p-value ⁵	Conc.	MGI	p-value ⁵	Expected ²	Observed ³	p-value ⁵	
H358	5 mg/kg	0.87	ns	100 mg/kg	0.80	ns	0.69	0.34	< 0.01	2.02
PLC/PRF5	50 mg/kg	0.65	0.0193	100 mg/kg	1.02	ns	0.67	0.46	0.0002	1.46

Growth inhibition rate on established subcutaneous tumor nodules in athymic nude mice treated with indicated concentrations of gefitinib, vorinostat or their combination. ¹MGI: mean growth inhibition rate=growth rate of treated group/growth rate of untreated group. ²Expected: growth inhibition rate of gefitinib x growth rate of vorinostat. ³Observed: growth inhibition rate of combined treatment on gefitinib and vorinostat treatments. ⁴Index: calculated by dividing the expected growth inhibition rate by the observed growth inhibition rate. An index >1.1 indicates synergistic effect, between 0.9 and 1.1 indicates additive effect and < 0.9 indicated less than additive effect. P-value was calculated by t-test ⁵compared to control treatment or to gefitinib or vorinostat alone. ns: $p > 0.5$.

2.3. Conclusion

Ces travaux montrent l'effet synergique du gefitinib combiné au vorinostat dans des lignées de CBNPC et de HCC avec un *EGFR* sauvage *in vitro* et *in vivo*. L'association gefitinib/sorafenib a un effet additif, alors que la combinaison sorafenib/vorinostat semble avoir des effets antagonistes dans les cellules de CBNPC et de HCC.

Ces résultats montrent que les HDACi ont le potentiel de restaurer la sensibilité aux EGFR-TKI dans des lignées de CBNPC et de HCC avec un *EGFR* sauvage *in vitro* et *in vivo*, et encouragent l'utilisation de ces combinaisons de traitements, en particulier chez les patients résistants aux EGFR-TKI.

II. VECTORISATION DE COMBINAISONS DE TRAITEMENTS DANS LA THÉRAPIE DES CBNPC

Pour être efficaces, les molécules thérapeutiques doivent atteindre spécifiquement le site tumoral. D'autre part, l'utilisation de bithérapies est souvent limitée par la toxicité des associations de molécules. L'utilisation de vecteurs chargés avec les combinaisons de traitements permettrait de les transporter jusqu'au site tumoral et de réduire les effets indésirables. Notre objectif est d'évaluer le bénéfice thérapeutique pour les CBNPC de vectoriser les combinaisons de traitements que nous avons précédemment identifiées.

1. Ciblage des tumeurs bronchiques pulmonaires avec des nanoparticules polymériques

1.1. Présentation de l'étude et principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons évalué les capacités de ciblage des cellules tumorales pulmonaires *in vitro* et *in vivo* de nanoparticules polymériques faites d'une combinaison de polysaccharide naturel, le hyaluronane, et de polypeptide biodégradable, le poly-bensyl-L-glutamate (PBLG). La présence de hyaluronane confère aux nanoparticules une affinité pour les récepteurs CD44 surexprimés dans certaines tumeurs.

La taille et la forme des nanoparticules affectent leur biodistribution, en particulier leur élimination et leur captation par les tumeurs [194]. Des nanosphères de 30 nm de diamètre (Np30) et des nanodisques de 300 nm de diamètre (Np300) ont été synthétisés et nous avons évalué leur comportement, en fonction de la forme et de la taille, *in vitro* sur des modèles cellulaires de CBNPC avec différents niveaux d'expression des récepteurs du hyaluronane, et *in vivo* dans des tumeurs pulmonaires orthotopiques. De plus, nous avons étudié si l'administration intrapulmonaire des nanoparticules augmente leur quantité dans les tumeurs pulmonaires, par comparaison à une administration par voie intraveineuse.

Nos données *in vitro* montrent que la fixation et l'internalisation des nanoparticules Np30 et Np300 sont corrélées au niveau d'expression de CD44 par les cellules de CBNPC, et sont

inhibées de 40 à 50% par un excès de hyaluronane libre. La fixation et l'internalisation des Np30 sont significativement supérieures à celles des Np300.

Les tests de biodistribution, réalisés *in vivo* dans deux modèles orthotopiques de CBNPC exprimant différents niveaux de récepteurs CD44, montrent que les nanoparticules Np30 et Np300, injectées par voie intraveineuse, sont fortement captées par le foie. Cependant, cette voie permet une accumulation et une rétention des Np30 significativement supérieures dans les tumeurs pulmonaires par rapport au tissu pulmonaire sain environnant. Les nanoparticules Np30 et Np300, administrées par voie aérienne (nébulisation), s'accumulent fortement dans les poumons, mais pas dans les tumeurs.

1.2. Articles 3

“Targeting lung tumors using polysaccharide-based nanocarriers targeting the CD44 receptor: influence of the nanoparticles size, shape and administration route.” Jeannot V, Mazzaferro S, Lavaud J, Arboléas M, Josserand V, Coll JL, Lecommandoux S, Schatz C, Hurbin A. **soumis pour publication**

Targeting CD44 receptor-positive lung tumors using polysaccharide-based nanocarriers: influence of nanoparticle size, shape and administration route

Victor Jeannot^{1,2 *}, Silvia Mazzaferro^{3,4 *}, Jonathan Lavaud^{1,2}, Mélanie Arboléas^{1,2}, Véronique Josserand^{1,2}, Jean-Luc Coll^{1,2}, Sébastien Lecommandoux^{3,4}, Christophe Schatz^{3,4 #}, Amandine Hurbin^{1,2 #}

¹ INSERM U823, Institut Albert Bonniot, F-38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, F-38000 Grenoble, France

³ CNRS UMR5629, Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, F-33607 Pessac, France

⁴ Univ. Bordeaux, Bordeaux-INP, F-33607 Grenoble, France

* these authors contributed equally to this work

co-last authors

Co-corresponding authors:

Amandine Hurbin. INSERM/UJF U823, Institut Albert Bonniot, BP170, 38042 Grenoble cedex 9, France. Tel: 334 76 54 95 53. Fax: 334 76 54 94 13. Email: amandine.hurbin@inserm.fr

Christophe Schatz. CNRS UMR5629, Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac, France. Tel: 335 40 00 36 96. Fax: 335 40 00 84 87. Email: schatz@enscbp.fr

Running title: Hyaluronan-based nanoparticles biodistribution in orthotopic lung cancer models

Abstract

Lung cancer is the most common and fatal cancer worldwide. Thus, new approaches that are more efficient and able to specifically reach tumors are needed. We developed new hyaluronan-based nanospheres (30 nm diameter) and disk-like (300 nm diameter) nanoparticles targeting CD44 receptors. We investigated their efficacy in targeting lung tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. The lung cancer cellular uptake of polymer nanoparticles was dose-dependent, correlated with CD44 levels, and inhibited by an excess of free hyaluronan, which demonstrates the specificity of binding to hyaluronan cell surface receptors. The nanospheres' binding and internalization were higher than those of disk-like nanoparticles. *In vivo* biodistribution studies in two orthotopic lung tumor models showed that intrapulmonary administration (nebulization) of nanoparticles enhanced their accumulation in lungs, but not in the lung tumor nodules. In contrast, despite a significant liver capture, intravenous injection led to a better accumulation of the nanoparticles in the lung tumor compared with the surrounding healthy lung tissues. Only small nanospheres showed active targeting of CD44-overexpressing tumors. Our results demonstrated that the size and shape of hyaluronan-based nanoparticles play critical roles in cellular uptake and biodistribution *in vivo*. Systemic injection of small nanospheres targeting CD44 positive tumors is promising for future clinical applications.

Keywords

hyaluronan; polymer nanoparticles; CD44; biodistribution; near-infrared optical imaging; lung cancer

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related adult deaths worldwide [1]. Non-small cell lung cancers (NSCLCs) account for ~85% of lung cancers [2]. Despite continuous improvements in cancer treatments, the prognosis is poor, and the development of new approaches is urgently needed. In particular, major efforts have been made to generate macromolecular transporters that will deliver the therapeutic molecules specifically to the tumor site, protect them from degradation, limit their side effects, and allow better control of their spatio-temporal release [3].

Polymeric micellar nanostructures have been demonstrated to be powerful tools to address issues of efficacy, specificity, and controlled release of drugs to diseased tissues [4]. These structures are able to overcome the body's natural defenses, remain stable for an extended time in circulation, and have tunable physico-chemical properties, allowing control of their permeability and the kinetics of drug release. An active targeting of tumors can be achieved by conjugating a targeting motif that allows the recognition of antigens or overexpressed receptors in targeted tissues [5].

The size and shape of nanoparticles (NPs) are key factors that affect their *in vivo* distributions [6-8]. Small NPs (<10 nm) are quickly cleared by the kidney and thus have short blood half-lives. Larger NPs are mostly captured by the reticuloendothelial system (RES) [8]. In both cases, their half-life depends on their stealthiness. The size and shape of the NPs also affects their ability to flow through poorly structured tumor capillaries and to stick to the different cells that they will encounter (e.g., endothelial, blood cells, stromal and tumor cells), as well as their penetrating capability across the lipid bilayer of the cells [8, 9]. Most of the described NPs are usually of spherical form. Non-spherical shapes show great promise as drug delivery vectors [9], although there is currently a lack of understanding of the factors governing their properties.

The intravenous route is generally used for the administration of NPs *in vivo*. However, the inhalation of anti-tumor agents may be a local and non-invasive alternative administration route to improve lung cancer treatment because of the large surface area of the lungs for drug absorption and their extensive vasculature with a weak anatomical barrier that does not limit access to the body [10, 11]. Direct administration *via* the airways can increase the amount of locally delivered NPs in lung tumor models [10-12].

In the present study, we developed glycopolypeptide-based nanocarriers and evaluated their efficacy to target lung tumor cells *in vitro* and *in vivo*. These amphiphilic copolymers were

combinations of the natural polysaccharide hyaluronan (Hya), known for its relative affinity toward CD44 receptors that are up-regulated on some cancer cells and are involved in tumor growth, progression and metastasis [13], and poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG), a biodegradable polypeptide characterized by an ordered secondary structure (α -helix) [14, 15]. By varying the hydrophilic/hydrophobic volume ratio of the copolymer and the conditions of particle formation, it was possible to obtain different NP sizes and shapes [16]. We evaluated the behavior of small nanospheres (Np30, 30 nm) and disk-like NPs (Np300, 300 nm) *in vitro* in lung cancer cells with different levels of CD44. Then, we compared their *in vivo* biodistribution after intrapulmonary nebulization or conventional intravenous administration using two orthotopic lung cancer models.

Materials and methods

Nanoparticle synthesis and characterization

Synthesis of hyaluronan-b-poly(γ -benzyl-L-glutamate) copolymer by 1,3 Huisgen cycloaddition

The strategy used was based on the coupling reaction between poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG) and hyaluronan using a Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition click chemistry reaction. For this purpose, hyaluronan (Life Core Biomedical, MW = 5000 g/mol) was functionalized by a conventional reductive amination reaction according to a procedure that was previously described by our group [17]. Azide-end functionalized poly(γ -benzyl-L-glutamate) (α -azide-PBLG) with two different degrees of polymerization (DP), i.e., 20 and 60, was synthesized by ring-opening polymerization (ROP), following the procedure described in a previous report [18, 19]. α -azido-PBLG (1 eq.), α -alkyne-hyaluronan (1.2 eq.) and sodium ascorbate (7 eq.) were then dissolved in anhydrous DMSO in a Schlenk tube at a concentration of 100 mg/mL. CuSO₄ (4 eq. to azide groups) was then added, and the Schlenk tube was placed in an oil bath at 30 °C for 16 h [20]. The reaction medium was dialyzed 4–5 days against MilliQ water (Spectra/Por®6 MWCO 50 kDa membrane), containing EDTA for the first 2 days, and then lyophilized. Next, the reaction mixture was purified by ultrafiltration to remove all of the unreacted hyaluronan (yield = 60%). The resulted copolymer was analyzed by ¹H NMR, FTIR and SEC in DMSO to verify the coupling conversion.

Fluorescently labeled nanoparticles

Hya-b-PBLG was also fluorescently labeled by modifying the free amine group at the PBLG end block with the near infrared dye Dy-700 (Life Technologies). Briefly, the diblock

1 copolymer (1 eq.) was dissolved in anhydrous DMSO (50 mg/mL), and triethylamine (1 eq.
2 per acid function) was added. After 5 min of stirring, the 0.1 equivalent of Dy-700 was added,
3 and the mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting product (Hya-*b*-
4 PBLG-Dy-700) was dialyzed against ultrapure water for one day and freeze-dried. A labeling
5 efficiency of 10 mol% was measured in DMSO by UV spectroscopy (720 nm) using $\epsilon =$
6 $90,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ according to the manufacturer's instructions.
7

8 Nanoparticle formulation

9
10 NPs were formulated by a solvent displacement technique. To obtain labeled fluorescent NPs,
11 a mixture of Hya-*b*-PBLG- Dy700 and Hya-*b*-PBLG copolymer was prepared to obtain 5
12 mol% of labeled copolymer. To obtain different sizes, two types of copolymer with PBLG
13 blocks varying in degree of polymerization (DP = 20 and DP = 60) and two different
14 protocols for the nanoprecipitation (fast and slow) were used.
15
16

- 17 • *Slow process*: a solution of Hya-*b*-PBLG₂₀ containing 30% w/w of homo-PBLG₂₀ was
18 prepared in DMSO (10 mg/mL) at 50°C. Using a syringe pump, phosphate buffer (10
19 mM, pH 7.4) was added at a flow rate of 70 mL/h to reach a final concentration of 1
20 mg/mL.
21
- 22 • *Fast process*: Hya-*b*-PBLG₆₀ was dissolved in DMSO (10 mg.mL⁻¹) and rapidly
23 mixed with a tenfold volume of phosphate buffer at 50°C using a micropipette.
24
25

26 The organic solvent was then removed by dialysis (MWCO 25 kDa) against water for 24
27 hours, with the medium changed every 4 h during the day. The NPs were then characterized
28 by dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), atomic force
29 microscopy (AFM) and small-angle neutron scattering (SANS).
30
31

32 **Cell lines**

33 The human H322, H358 and A549 non-small cell lung cancer cell lines were obtained from
34 the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). H358 and A549 cells stably
35 expressing luciferase were obtained from Optimal (Grenoble, France). Cells were cultured in
36 RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum in a humidified
37 atmosphere with 5% CO₂.
38
39

40 **Flow cytometry**

41 CD44 expression levels were determined after cell incubation with FITC-conjugated mouse
42 anti-CD44 antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA) for 30 min at 4°C. FITC mouse
43 IgG_{2b} κ antibody (BD Pharmingen, San Diego, CA) was used as an isotype control.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Cells were seeded in 12 well plates and incubated with 8 µg/mL to 160 µg/mL of NPs in 1X PBS as indicated for 30 min at 37°C and were then harvested and washed with 1X PBS. For competition assays, cells were previously incubated with 5 mg/mL or 10 mg/mL sodium hyaluronan 176–350 kDa (Lifecore Biomedical) for 1 h at 37°C before incubation with 8 µg/mL NP for 30 min at 37°C. The fluorescence intensity was analyzed using flow cytometry LSRII (BD Biosciences, San Jose US). The data were analyzed with FCS Express software.

Immunofluorescence and microscopy

Cells were seeded on glass coverslips coated with 1 µg/mL fibronectin and 1% bovine serum albumin in 24 wells plates. After washing with 1X PBS, 160 µg/mL of NPs in 1X PBS were incubated for 30 min at 4°C or 37°C. The cells were then washed again in 1X PBS and fixed in 0.1% saponin and 2% paraformaldehyde in 1X PBS for 15 min. Nuclei were labeled with DAPI staining. Fluorescence microscopy was carried out using an AxioImager pseudo-confocal microscope (Apotome) with the AxioVision software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Orthotopic lung tumor animal models

Animal experiments studies were approved by the institutional guidelines and by the European Community for the use of experimental animals (authorization to experiment 00393.02). Luciferase-modified human lung cancer H358 cells (H358-Luc) or A549 cells (A549-Luc) were harvested, washed and resuspended in 1X PBS at 10^7 cells/50 µL (H358-Luc) or in 1X PBS/0.5 mM EDTA at $5 \cdot 10^6$ cells/50 µL (A549-Luc). Six-week-old female nude mice (NMRI for H358 tumor model, BalB/c for A549 tumor model) (Janvier, Le Genest, Saint Isle, France) were anesthetized with an intraperitoneal injection of medetomidin (0.2 µg/g)/ketamine (0.1 mg/g), and the tumor cells were inoculated in the lungs with a catheter after orotracheal intubation, as previously described [12, 21, 22].

Tumor growth was followed by *in vivo* bioluminescence imaging after the intraperitoneal injection of 150 mg/kg of Luciferin (Promega, Charbonnières, France) 5 min before imaging (ORCAII-BT-512G, Hamamatsu Photonics, Massy, France), as previously described [23].

Lung tumors developed over a period of five weeks.

Nanoparticle *in vivo* administration

Equal quantities of NPs were administered in healthy mice, H358-tumor bearing mice or A549-tumor bearing mice after 5-6 weeks of tumor growth. NP was administered via intravenous injection into the tail vein of anesthetized mice (isoflurane/oxygen 3.3% for

1 induction and 1.5% thereafter) with 200 μ L of Dy-700 containing the NP suspension (8
2 mg/mL). Intrapulmonary administration of NP was performed using a nebulizing IA-1C
3 Microspayer (Penn-Centur, Inc, PA, USA) connected to a FMJ-250-high-pressure syringe
4 (Penn-Centur, Inc) containing 50 μ L of Dy-700 labeled NPs. After anesthesia with
5 medetomidin/ketamine, the tip of the microsprayer was introduced into the trachea of the
6 animals using a dedicated laryngoscope.
7
8
9

10 11 12 **Nanoparticle *in vivo* biodistribution**

13 Mice were anesthetized (isoflurane 4% for induction and 2% thereafter), and the body
14 temperature was kept constant using a warming plate. 2D-fluorescent images and black and
15 white pictures were acquired 1 h, 3 h, 6 h and 24 h after intravenous or intrapulmonary
16 administration using a back-thinned CCD camera at -80°C (ORCAII-BT-512 G,
17 Hamamatsu, Massy, France) that was fitted with a long-pass RG 700 filter (Melles Griot,
18 Voisins Le Bretonneaux, France), as previously described [24]. At the end of the experiment,
19 mice were sacrificed to image the organs and analyze the plasma. Image display and analyses
20 were performed using Wasabi® software (Hamamatsu, Massy, France). Semiquantitative
21 data were obtained by drawing regions of interest (ROI) on the different organs and were
22 expressed as the number of relative light units per pixel per unit of time exposure and relative
23 to the fluorescence signal in the brain. We extracted 40 μ L of blood from the tail vein before
24 NP administration and at different times after (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, and 24 h).
25 Ten μ L of plasma was obtained after blood centrifugation (5 min at 8,000 g), and
26 fluorescence imaging was performed on the samples (n=5 mice per NP).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **Nanoparticle imaging in lung tumors and histology**

43 Bioluminescence and 2D-fluorescence signals were plotted along a line into the isolated
44 tumor-bearing lungs through healthy and tumor tissues according to the distance and
45 quantified using the Zen® software. The ratio between the fluorescent signal in the tumor and
46 the fluorescent signal in the adjacent healthy tissues was calculated.
47
48
49

50 Confocal microscopy of the lung in frozen sections (30 μ m) was carried out with a LSM710
51 LNO confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) using a 60X oil immersion objective.
52 The 702-nm laser intensity was set at 3% of its maximum intensity. Nuclei were labeled by
53 DAPI.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Statistical analysis

All data are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical comparisons were made using a Mann-Whitney *U*-test. Two-sided *p* values ≤ 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using the Statview software (Abacus concept, Berkeley, CA, USA).

Results

Preparation of nanoparticles

In this work, a hydrophilic hyaluronan block was covalently linked by its reductive end to a hydrophobic PBLG (DP 20 and DP 60) using the 1,3 Huisgen cycloaddition, which combines mild experimental conditions, tolerance of functional groups and nearly quantitative yields (Figure 1A). A proper modulation of the copolymer composition and nanoprecipitation conditions (fast and slow processes) allowed the formation of two types of NPs, which had different sizes and shapes (Figure 1B). On the one hand, small micellar core-shell NPs of 30 nm (Np30) were formulated using a fast nanoprecipitation process (with Hya-*b*-PBLG₆₀). On the other hand, using Hya-*b*-PBLG₂₀ and a slow process, polydispersed NP of 300 nm (Np300) were generated with a disc-like morphology, in co-existence with small micelles. To reduce the polydispersity and reach a pure disk-like phase, 30% of homo-PBLG₂₀ was added in the initial copolymer solution, according to a recent report [20]. The NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM) and small-angle neutron scattering (SANS) (Figure 1C–F).

Nanoparticles bind to lung cancer cells with different CD44 expression levels and are internalized

The level of expression of CD44 was evaluated by flow cytometry in three different non-small cell lung cancer cell lines (H322, H358 and A549 cells) (Figure 2A). H322 cells did not express CD44, whereas H358 cells and A549 cells expressed low and high levels of CD44, respectively. Dose-dependent binding of Np30 and Np300 was observed in the three cell lines, with a higher intensity for A549 cells compared with H322 and H358 cells (Figure 2B). At high NP concentrations (80 μ g/mL and 160 μ g/mL), Np30 binding was 2 to 3 times higher than Np300 binding in the 3 cell lines (Figure 2B and supplementary figure S1A). To further evaluate the specificity of NPs toward the hyaluronan cell surface receptors, competitive binding experiments were performed by pretreating the cells with saturable amounts of free

hyaluronan (with MW ranging between 175-350 kDa) before Np30 or Np300 incubation. Quantitative results were obtained by flow cytometry analysis. Compared with the NP binding without hyaluronan pretreatment, the binding of Np30 on H358 and A549 cells presented a 50-60% reduction in the mean fluorescence intensity (MFI) and a 50-70% reduction when Np300 was used (Figure 2C and supplementary Figure S1B). The inhibitory effect of hyaluronan pretreatment on NP binding increased with hyaluronan concentrations, especially with Np300. The presence of competitive free hyaluronan had no significant effect on Np30 or Np300 binding in H322 cells. These results suggested that the binding of these NPs on A549 and H358 cells could be strongly inhibited by an excess of free hyaluronan, thus demonstrating that the hyaluronan cell surface receptors, particularly CD44 receptors, mediated the interaction.

Finally, NP internalization was assessed using pseudo-confocal microscopy in H358 and A549 cells (Figure 2D). At 4°C, the internalization process was inhibited and both Np30 and Np300 were mostly found on the cell membrane, whereas at 37°C, punctate labeling was observed for Np30 and Np300, which is a hallmark of their intracytoplasmic trafficking after internalization. The Np30 labeling was stronger than that of Np300, which showed that the small core-shell NP Np30 were more efficiently internalized than was the disc-like NP Np300 *in vitro*.

Orthotopic lung tumors

Orthotopic mouse models of human NSCLCs were established to evaluate the biodistribution of the NPs. Such orthotopic models are more relevant than the commonly used subcutaneous tumors [12]. In these models, lung tumors develop after the intrapulmonary inoculation of luciferase-modified human H358 (H358-Luc cells) or A549 lung cancer cells (A549-Luc cells) [12, 21, 22]. Noninvasive *in vivo* bioluminescence was used to follow the implantation and growth of these orthotopic tumors for five weeks (supplementary Figure S2). At this time point, tumors were well developed and had a strong bioluminescent signal, but the mice did not present any detectable symptoms such as body weight loss or breathing difficulties. Mice bearing H358-Luc or A549-Luc lung tumors could be treated at this time with the different NPs, and the distribution of the NIR-labeled NPs was followed by 2D FRI and/or fDOT imaging.

Distribution of the nanoparticles after intravenous injections

The concentrations of Np30 and Np300 in the blood of healthy mice were first measured with

1 fluorescence imaging over time. The results were expressed on a graph, and the exponential
2 decay parameters were determined (supplementary figure S3). The pharmacokinetic constants
3 were calculated, and the theoretical distribution and elimination half-lives for Np30 (29 min
4 and 673 min) were higher than for Np300 (10 and 44 min for distribution, and 196 min for
5 elimination), which showed that Np30 had longer circulation times than Np300.
6

7
8 Equal quantities of Dy700-labeled Np30 or Np300 were then injected intravenously, and their
9 biodistributions were assessed at multiple time points using 2D-FRI optical imaging in
10 healthy mice and H358- or A549-tumor bearing mice. Representative images are shown in
11 Figure 3. Liver uptake was fast and strong for both NPs in healthy and tumor-bearing mice,
12 and the fluorescent signal remained stable over 24 h (Figure 3A). At this time, the mice were
13 euthanized, and the extracted organs were subjected to *ex vivo* bioluminescence and
14 fluorescence imaging (Figure 3B) for semi-quantification (Figure 3C and 3D). The strongest
15 fluorescence signals were measured in the liver and spleen for both Np30 and Np300, which
16 highlighted the hepatic elimination of the NPs. The Np30 and Np300 biodistribution patterns
17 were similar in mice both with and without tumors.
18

19
20 The fluorescence of NP in the lungs was assessed *ex vivo* to compare the accumulation of NPs
21 in healthy and tumor-bearing lungs. The level of fluorescent Np30 was slightly higher in
22 H358 tumor-bearing lungs and was 2 times higher in A549 tumor-bearing lungs than in
23 healthy lungs (figure 4A). In contrast, the levels of fluorescent Np300 in H358 tumor-bearing
24 lungs were not significantly different from those in healthy lungs and were slightly decreased
25 in A549 tumor-bearing lungs compared with healthy lungs.
26

27
28 To evaluate whether the NPs accumulated preferentially in the tumor or healthy part of the
29 lungs, the bioluminescence and fluorescence signals were overlaid, and their respective
30 intensities plotted along a line (Figure 4B and 4C). We observed that the maximum of Np30
31 fluorescent signals co-localized with the H358 and A549 tumor bioluminescent signals. The
32 fluorescent signals were stronger in the H358 or A549 tumors than in the surrounding healthy
33 lungs, as evidenced by the fluorescence ratios of 1.61 ± 0.85 and 1.38 ± 0.29 , respectively. By
34 contrast, no tumor accumulation was detected for Np300. Indeed, the fluorescent signal was
35 not significantly higher in H358 (1.04 ± 0.38) or A549 (1.35 ± 0.43) tumors than in their
36 adjacent healthy tissues. Using confocal microscopy on lung tumor sections, we observed
37 weak Np30- and Np300-related fluorescent signals in healthy tissue and in H358 and A549
38 lung tumors (figure 4D), but these different signals were too sparse to quantify the tumor
39 accumulation.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Altogether, these results showed that after intravenous injection, both Np30 and Np300 were strongly retained by the liver. However, a very small proportion of them reached the lung. When Np30 was used, they accumulated more strongly in the lungs that were invaded by A549 and H358 tumors, respectively, as compared with normal lungs (Figure 4A), and the fluorescence signal correlated well with the bioluminescent signal. When Np300 was used, no particular accumulation in the invaded lung could be measured, and the NPs that were present in the lung were dispersed equally in the tumor and healthy areas.

Distribution of the nanoparticles after intrapulmonary administration

The NP biodistributions after the intrapulmonary administration of equal quantities of Dy700-labeled Np30 or Np300 were evaluated at multiple time points in healthy mice and H358- or A549-tumor bearing mice. Representative images are shown in Figure 5A. Both Np30 and Np300 fluorescent signals were detected in the lungs immediately after administration in healthy and tumor-bearing mice, and they remained stable over 24 h (Figure 5A). After quantification in the extracted organs at 24 h (figure 5B), the fluorescence signal was 15 to 20 times higher in the lungs than in other organs, without significant differences between healthy and H358-tumor bearing mice (figure 5C) or A549-tumor bearing mice (figure 5D). No significant fluorescence signal was observed in the other organs, including liver or kidney, which confirmed a powerful retention of the NPs in the airways.

The levels of nebulized fluorescent Np30 or Np300 in H358- or A549 tumor-bearing lungs were not significantly different from those in healthy lungs (figure 6A), which suggests that the NPs did not accumulate in lung tumors after intrapulmonary administration. Bioluminescence and fluorescence signal overlays indicated that neither Np30 nor Np300 co-localized with the H358 or A549 tumors (Figure 6B and 6C). The ratios between the fluorescent signals in tumors and in adjacent healthy tissues showed that the NP signals were higher in healthy tissue than in H358 or A549 tumors for both Np30 (0.59 ± 0.44 and 0.53 ± 0.11 , respectively) and Np300 (0.50 ± 0.04 and 0.91 ± 0.50 , respectively). The results were confirmed by confocal microscopy (figure 6D). Strong fluorescence signals were observed in healthy tissue adjacent to the tumors but not in H358 or A549 lung tumors, thus illustrating that Np30 and Np300 did not reach lung tumor cells after intrapulmonary administration. In addition, the presence of lung tumors reduced the nebulized NPs' access to the invaded areas of the lung, as a result of airway obstruction. These animals were thus imaged with microCT and 3D-fluorescence tomography, in addition to bioluminescence. Examples of mice with well-established H358 lung tumors are shown in supplementary figure S4. In the microCT

settings used for this acquisition, we reconstructed and extracted 3D images that represent the presence of air in the lungs. As can be seen in the microCT images, the presence of tumors strongly reduced the volume of air in the lungs. Accordingly, the nebulized NPs could not reach these poorly ventilated tumors, and no particular accumulation of fluorescence in the “empty” regions of microCT was found in either Np30- or Np300-treated animals. This finding confirmed that the nebulization of such NPs was not efficient if the tumor nodules were sufficiently large to block the airways.

Discussion

In the present study, we generated hyaluronan-based NPs with two different shapes and sizes: nanospheres (Np30, 30 nm diameter) and disk-like NPs (Np300, 300 nm diameter). We studied the influence of these parameters on the hyaluronan-mediated CD44-dependent cellular binding *in vitro* and on their biodistribution profiles after intravenous or nebulization administration on mice bearing orthotopic lung tumors.

Both Np30 and Np300 are made with low molecular weight hyaluronan (5 kDa). Hyaluronan is the natural ligand of the CD44 receptors and is overexpressed in many tumors [13]. In addition to CD44 receptors, hyaluronan interacts with other cell surface receptors such as the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM, CD168), which is also involved in tumorigenesis, the HARE receptor, Toll-Like receptors-2 and -4 (TLR-2 and TLR-4) and LYVE-1 [25, 26]. Our results showed the high expression of CD44 receptors in A549 cells and the low expression of CD44 receptors in H358 cells. The RHAMM/CD168 receptor is not expressed in A549 cells [19]. The HARE receptor is mainly expressed in the sinusoidal endothelial cells of liver, spleen, and lymph nodes [27]. LYVE-1 is expressed in lymphatic tissue. TLR-2 and TLR-4 mainly recognize hyaluronan oligomers in dendritic cells during inflammatory events [28]. These data indicated that CD44 should be the main hyaluronan receptor for mediating Np30 and Np300 binding on A549 and H358 tumor cell lines but that it is poorly implicated in H322 cells. In agreement with these predictions, we observed that both NPs showed a dose-dependent binding on the tumor cells, with A549 being more intensively stained than H358 and H322 cells. Competition assays with free high-molecular weight hyaluronan at 5 or 10 mg/mL showed a significant reduction of Np30 and Np300 binding.

1 Np30 showed a higher cellular binding and internalization than Np300, in agreement with
2 many other studies that showed NPs with a 20-25 nm radius achieved effective cellular uptake
3 [29]. Particle geometry has indeed been described as crucial for enhancing the specificity of
4 binding and internalization [30-33]. One proposed explanation is that the energy required to
5 bend the membrane around the NP is less favorable for larger-diameter disks than it is for
6 smaller-diameter spheres [33]. Another hypothesis would be that the presentation of
7 hyaluronan motifs could be more adequate in the small NP30 particles with important surface
8 curvature, in contrast to the “flat” surface of the disks. The internalization of nanodisks could
9 also be slower than that of nanospheres, which could explain the difference between the Np30
10 and Np300 uptake profiles, which showed the saturable Np300 uptake compared with Np30
11 uptake in lung cancer cell lines. It has also been proposed that negatively charged NP would
12 be mostly internalized owing to caveolae-mediated endocytosis. However, the use of clathrin-
13 mediated entry to internalize particles with sizes ranging from 10 nm to 300 nm has also been
14 reported [29]. The exact mechanism of internalization of Np30 and Np300 remains to be
15 investigated.

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29 *In vivo* experiments were designed to have comparable parameters to evaluate the importance
30 of size and shape on NP biodistribution. The biodistribution profiles of the NPs injected
31 intravenously presented minor variations because of their size and shape. Despite a longer
32 circulation time for Np30, both Np30 and Np300 were rapidly taken up by the liver, as
33 described in the literature [12]. Indeed, the small particles (typically <10 nm) were quickly
34 cleared by the kidneys, whereas larger particles (>10 nm) were more efficiently captured by
35 the reticuloendothelial system (RES) and sequestered by the liver [34, 35]. In addition, Np30
36 and Np300 were also negatively charged, which is a key factor that drives NP behavior,
37 recognition by the RES and uptake by the liver [36].

38
39
40
41
42
43
44
45 The biodistribution results showed that the fluorescence signal of Np30 was significantly
46 higher in A549 tumor-bearing lungs than in healthy lungs. The tumor vasculature is irregular,
47 leaky, and dilated, and the vascular endothelial cells are poorly aligned with large
48 fenestrations. This morphology results in the increased leakage of nanocarriers from the
49 circulatory system into the tumor tissue because of the enhanced permeability and retention
50 (EPR) effect [37]. Accordingly, the longer circulation time measured for Np30, compared
51 with Np300, could explain the higher accumulation of Np30 in tumor-bearing lungs. In
52 addition, Np30 accumulation was significantly higher in the CD44-overexpressing A549
53 tumor cells than in H358 low-expressing cells or in healthy tissue, which suggests that CD44
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

receptor active targeting could play a role in Np30 retention in lung tumors, although this has yet to be formally established.

The intrapulmonary delivery of antitumoral agents might enhance their amount at the targeted lung cancer site, thereby improving NP accumulation in tumors and the antitumoral effect [10, 12]. The nebulized NPs presented a similar and very strong accumulation in healthy, H358 or A549 lungs, and the fluorescent signal remained stable for at least 72 h (data not shown). Moreover, no fluorescence signal was observed in the other organs during this time, in contrast to ultra-small NP (< 6 nm), which showed a passage from the airways to the blood after nebulization and an elimination by renal excretion [12]. The larger size of Np30 and Np300 as well as their negatively charge surface could explain their long retention in the lungs without diffusion into the blood stream. As a consequence, this would also prevent such NPs from “returning” to the tumors via the blood circulation and the EPR effect.

The fluorescence signals of both Np30 and Np300 were not different between tumor-bearing lungs and healthy lungs, and confocal microscopy demonstrated that NPs did not reach tumor tissue. A possible explanation could be the bronchial obstruction due to the tumor tissue that prevented the NP spray from flowing through the tumor, and thus accumulated in healthy tissue.

In summary, we demonstrated that the shape and size of hyaluronan-based nanoparticles play a critical role in cellular uptake, in correlation with the level of CD44 receptors. In the tested lung cancer cells, spherical micellar NP of 30 nm were bound and internalized more efficiently than were the 300 nm disk-like NP. *In vivo* studies showed that direct administration of these NPs into the airways failed to increase their uptake by the tumors. However, their intravenous injection showed a preferential and possibly active targeting of CD44-positive tumors for 30 nm nanospheres that could not be documented for the 300 nm nanodisks.

Acknowledgements

This study was funded by the National Research Agency (ANR project Nanoluc ANR-11-BSV5-0018), France Life Imaging (FLI, French program “Investissement d’Avenir”; grant

“Infrastructure d’avenir en Biologie Santé”, ANR-11-INBS-0006), and Region Rhône-Alpes.

In addition, the authors are grateful to the team of the OPTIMAL Grenoble small animal optical imaging facility, and to Maxime Henry, Julien Vollaïre and Laetitia Vanwonderghem, for their help and technical assistance.

The authors confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication.

References

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
2. Pisters, K.M., et al., *Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline*. J Clin Oncol, 2007. **25**(34): p. 5506-18.
3. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nat Nanotechnol, 2007. **2**(12): p. 751-60.
4. De Oliveira, H., J. Thevenot, and S. Lecommandoux, *Smart polymersomes for therapy and diagnosis: fast progress toward multifunctional biomimetic nanomedicines*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2012. **4**(5): p. 525-46.
5. Byrne, J.D., T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas, *Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(15): p. 1615-26.
6. Alexis, F., et al., *Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles*. Mol Pharm, 2008. **5**(4): p. 505-15.
7. Nagayama, S., et al., *Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics*. Int J Pharm, 2007. **342**(1-2): p. 215-21.
8. Dufort, S., L. Sancey, and J.L. Coll, *Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(2): p. 179-89.
9. Truong, N.P., et al., *The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv, 2015. **12**(1): p. 129-42.
10. Gagnadoux, F., et al., *Aerosolized chemotherapy*. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2008. **21**(1): p. 61-70.
11. Azarmi, S., W.H. Roa, and R. Lobenberg, *Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(8): p. 863-75.
12. Dufort, S., et al., *Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization*. Small, 2015. **11**(2): p. 215-21.
13. Platt, V.M. and F.C. Szoka, Jr., *Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor*. Mol Pharm, 2008. **5**(4): p. 474-86.
14. Crespo, J.S., et al., *Small angle neutron scattering from diblock copolymer poly(styrene-d8)-b-poly(g-benzyl-L-glutamate) solutions : Rod-Coil to Coil-Coil transition*. Macromolecules, 2003. **36**(4): p. 1253-1256.

15. Lecommandoux, S., et al., *Self-Assembly of Rod-Coil Diblock Oligomers Based on α -Helical Peptides*. *Macromolecules*, 2001. **34**(26): p. 9100-9111.
16. Kakkar, D., et al., *Amphiphilic PEO-b-PBLG diblock and PBLG-b-PEO-b-PBLG triblock copolymer based nanoparticles: doxorubicin loading and in vitro evaluation*. *Macromol Biosci*, 2015. **15**(1): p. 124-37.
17. Upadhyay, K.K., et al., *Biomimetic doxorubicin loaded polymersomes from hyaluronan-block-poly(γ -benzyl glutamate) copolymers*. *Biomacromolecules*, 2009. **10**(10): p. 2802-8.
18. Agut, W., D. Taton, and S. Lecommandoux, *A Versatile Synthetic Approach to Polypeptide Based Rod-Coil Block Copolymers by Click Chemistry*. *Macromolecules*, 2007. **40**(16): p. 5653-5661.
19. Agut, W., et al., *Synthesis of Block Copolypeptides by Click Chemistry*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2008. **29**(12-13): p. 1147-1155.
20. Bonduelle, C., et al., *Synthesis and self-assembly of branched glycopolypeptides: effect of topology and conformation*. *Faraday Discuss*, 2013. **166**: p. 137-50.
21. Guilleminault, L., et al., *Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system*. *J Control Release*, 2014. **196**: p. 344-54.
22. Bianchi, A., et al., *Targeting and in vivo imaging of non-small-cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(25): p. 9247-52.
23. Keramidas, M., et al., *Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model*. *Br J Surg*, 2010. **97**(5): p. 737-43.
24. Bianchi, A., et al., *Quantitative biodistribution and pharmacokinetics of multimodal gadolinium-based nanoparticles for lungs using ultrashort TE MRI*. *MAGMA*, 2014. **27**(4): p. 303-16.
25. Qhattal, H.S. and X. Liu, *Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes*. *Mol Pharm*, 2011. **8**(4): p. 1233-46.
26. Arpicco, S., G. De Rosa, and E. Fattal, *Lipid-Based Nanovectors for Targeting of CD44-Overexpressing Tumor Cells*. *J Drug Deliv*, 2013. **2013**: p. 860780.
27. Harris, E.N., J.A. Weigel, and P.H. Weigel, *The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(25): p. 17341-50.
28. Toole, B.P., *Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(24): p. 7462-7468.
29. Akinc, A. and G. Battaglia, *Exploiting endocytosis for nanomedicines*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(11): p. a016980.
30. Barua, S., et al., *Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(9): p. 3270-5.
31. Gratton, S.E., et al., *The effect of particle design on cellular internalization pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(33): p. 11613-8.
32. Sahay, G., D.Y. Alakhova, and A.V. Kabanov, *Endocytosis of nanomedicines*. *J Control Release*, 2010. **145**(3): p. 182-95.
33. Agarwal, R., et al., *Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(43): p. 17247-52.
34. Choi, H.S., et al., *Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(12): p. 1300-3.

35. Choi, H.S., et al., *Renal clearance of quantum dots*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1165-70.
36. Xiao, K., et al., *The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles*. Biomaterials, 2011. **32**(13): p. 3435-46.
37. Kobayashi, H., R. Watanabe, and P.L. Choyke, *Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target?* Theranostics, 2013. **4**(1): p. 81-9.

Figure legends

Figure 1: Synthesis and self-assembly of the hyaluronan-*b*-PBLG copolymer.

A: Chemical pathway toward hyaluronan-*b*-PBLG copolymer and its labeling with the fluorescent dye Dy-700. **B:** Elaboration of block copolymer nanoparticles through a fast or slow nanoprecipitation protocol. **C:** Characterization of block copolymer nanoparticles by static and dynamic light scattering. R_H : hydrodynamic radius, PDI: polydispersity index, M_w : weight-average molecular weight, N_{agg} : aggregation number (=number of copolymer chains in a nanoparticle); $R_{g,z}$: z-average root-mean-square radius of gyration. **D:** intensity-weighted size distribution of nanoparticles obtained by dynamic light scattering analysis at a detection angle of 90°. **E, F:** Atomic force microscopy pictures of Np30 (**E**, 500 x 500 nm) and Np300 (**F**, 3 x 3 μ m).

Figure 2: *In vitro* uptake of nanoparticles by human lung cancer cells.

A: Flow cytometry histograms shows H322, H358 and A549 cells stained with FITC-CD44 antibodies (blue curve), FITC-IgG_{2b} isotype control (red curve), or without antibodies (black curve). **B:** Concentration-dependent binding of Dy700-labeled Np30 (left panel) and Np300 (right panel) after 30 min at 37°C in H322, H358 and A549 cells. The results are expressed as the mean fluorescence intensity $\pm$ SD normalized against untreated control cells (n=3). **C:** Np30 (left panel) and Np300 (right panel) (8 μ g/mL) binding to H322, H358, and A549 cells with or without 5 mg/mL or 10 mg/mL hyaluronan (HYA) pretreatment. The results are expressed as the percentage of the mean fluorescence intensity $\pm$ SD normalized against cells without HYA pretreatment (100%) (n=3). * $p \leq 0.05$, compared with nanoparticle treatment without HYA pretreatment. **D:** Pseudo-confocal fluorescence microscopy images display cellular binding and internalization of 160 μ g/mL Np30 and Np300 in H358 and A549 cells after 30 min at 4°C and 37°C as indicated. The blue channel represents DAPI stained nuclei, and the red channel represents the Dy700 labeled nanoparticles. Images are at 60X magnification.

Figure 3: Biodistribution of fluorescent nanoparticles after intravenous administration in orthotopic lung tumor models.

In vivo biodistribution of Dy700-labeled Np30 and Np300 in healthy, or H358-Luc or A549-Luc lung tumor-bearing mice were studied. **A:** Fluorescence images (500 ms integration time) were recorded at different times after injection (min-max: frontal 1745-30629; back 1745-

7498). An example of the biodistribution in healthy mice treated with Np30 and Np300 is presented (for each nanoparticle: upper line, dorsal view of the mouse; lower line, ventral view of the mouse). **B**: Fluorescence images were then performed on isolated organs 24 h after injection. An example of organs extracted from a healthy mouse treated with Np30 is presented. **C-D**: Regions of interest are defined on the extracted organs to semi-quantify the amount of photons detected per pixel after a 200 ms exposure. The results of these measurements in each organ are expressed as the mean $\pm$ SD in healthy mice and H358-tumor bearing mice ($n \geq 5$) (**C**) or A549-tumor bearing mice ($n \geq 4$) (**D**).

Figure 4: Colocalization of bioluminescence and fluorescence in orthotopic lung tumors after intravenous administration of nanoparticles.

A: Regions of interest were defined in the extracted lungs to semi-quantify the amount of photons detected per pixel after 200 ms exposure after intravenous injection of Np30 or Np300. The results are expressed as the mean $\pm$ SD and as the rate of signal in healthy mice. H358-tumor bearing mice $n \geq 5$, A549-tumor bearing mice $n \geq 4$. $*p \leq 0.05$, compared to healthy mice. **B-C**: Bioluminescence and fluorescence imaging was performed on isolated lungs, and showed a colocalization between the H358-Luc (**B**) or A549-Luc (**C**) lung tumors (bioluminescence, in red) and the fluorescent Np30 and Np300 (fluorescence, in green). Bioluminescent and fluorescent signals are plotted according to the distance in lungs (arrows). **D**: Lung tumors were extracted and cryosectioned before confocal microscopy observation. In blue: DAPI staining of the nuclei; in red: Dy700 signal; in white and black: superimposed visible light images. Np30 or Np300 signals in adjacent healthy tissue (a and d), H358 tumors (b and e) or A549 tumors (c and f). Images are at 60X magnification.

Figure 5: Biodistribution of fluorescent nanoparticles after nebulization in orthotopic lung tumor models.

In vivo biodistribution of Dy700 labeled Np30 and Np300 in healthy, or H358, or A549 lung tumor-bearing mice, were studied. **A**: Fluorescence images (500 ms integration time) were recorded at different times after injection (min-max: 1774-6508). An example of biodistribution in A549 lung tumor-bearing mice treated with Np30 and Np300 is presented (for each nanoparticle: upper line, dorsal view of the mouse; lower line, ventral view of the mouse). **B**: Fluorescence images were then obtained of isolated organs 24 h after injection. An example of organs extracted from an A549 tumor-bearing mouse treated with Np30 is presented. **C-D**: Regions of interest were then defined on the extracted organs to semi-

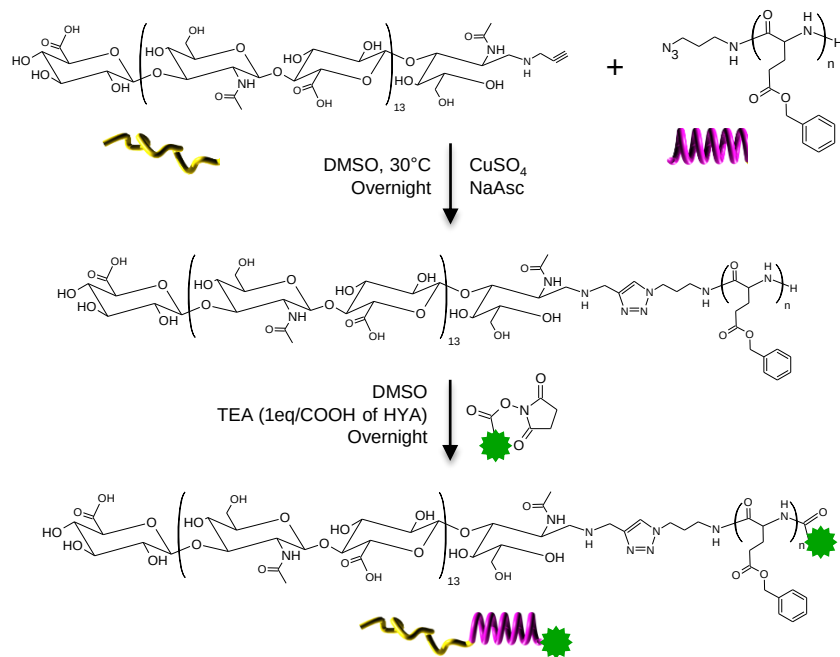
quantify the amount of photons detected per pixel after a 200 ms exposure. The results of these measurements in each organ are expressed as the mean $\pm$ SD in healthy mice and H358-tumor bearing mice ($n \geq 3$) (C) or A549-tumor bearing mice ($n > 3$) (D).

Figure 6: Colocalization of bioluminescence and fluorescence in orthotopic lung tumors after nebulization of nanoparticles.

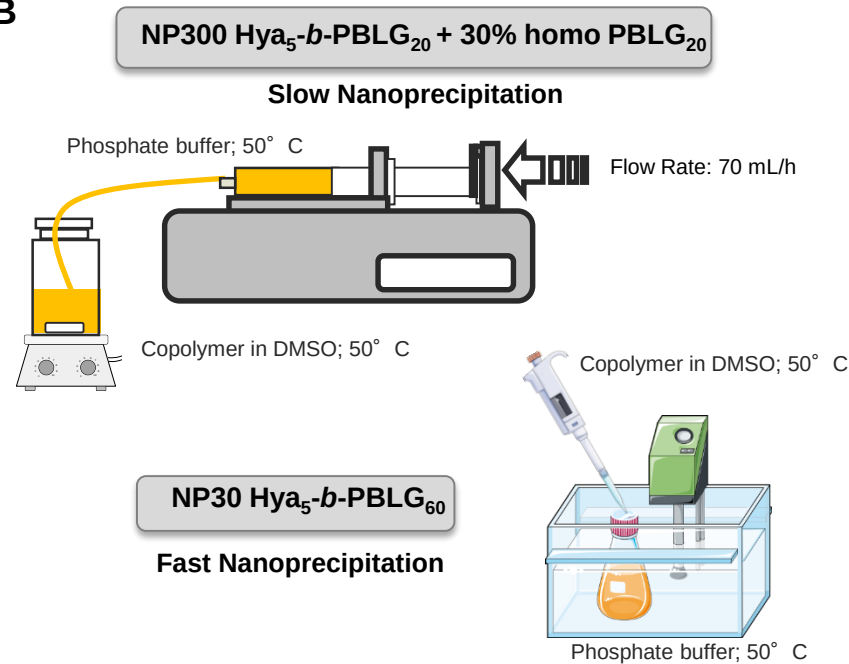
A: Regions of interest were defined in the extracted lungs to semi-quantify the amount of photons detected per pixel after 200 ms exposure after intrapulmonary administration of Np30 or Np300. The results are expressed as the mean $\pm$ SD and as rate of signal in healthy mice ($n \geq 3$ mice per group). **B-C:** Bioluminescence in H358-Luc (B) or A549-Luc (C) lung tumors (bioluminescence, in red) and fluorescence of Np30 or Np300 (fluorescence, in green) imaging were performed on isolated lungs. Bioluminescent and fluorescent signals are plotted according to the distance in lungs (arrows). **D:** Lungs tumors were extracted and cryosectioned before confocal microscopy observation. In blue: DAPI staining of the nuclei; in red: Dy700 signal; in white and black: superimposed visible light images. Np30 or Np300 signals in adjacent healthy tissue (a and d), H358 tumors (b and e) or A549 tumors (c and f). Images are at 60X magnification.

Figure 1

A



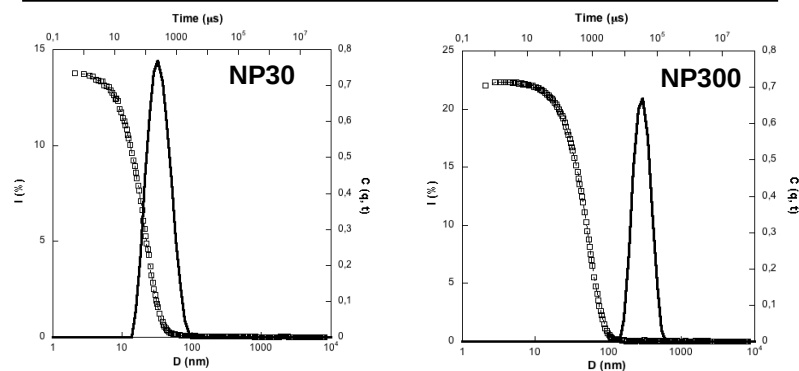
B



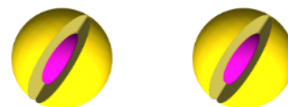
C

	NP30	NP300
R _H (nm)	16	134
PDI	0.21	0.15
Mw (g/mol)	1.32E+06	5.15E+08
Nagg	7.37E+01	5.36E+04
Rg,z (nm)	NA	130

D



E



F

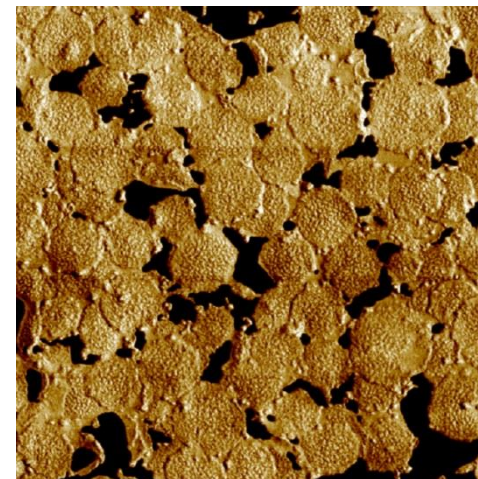
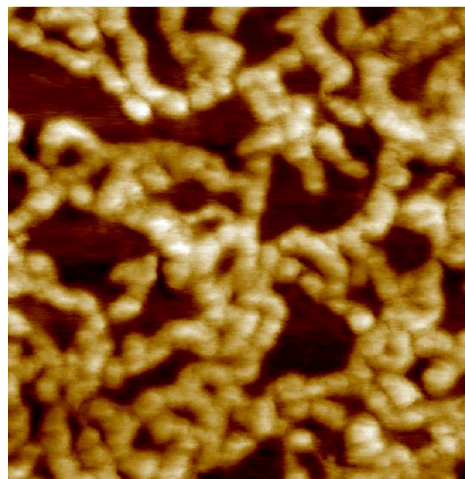
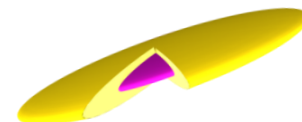
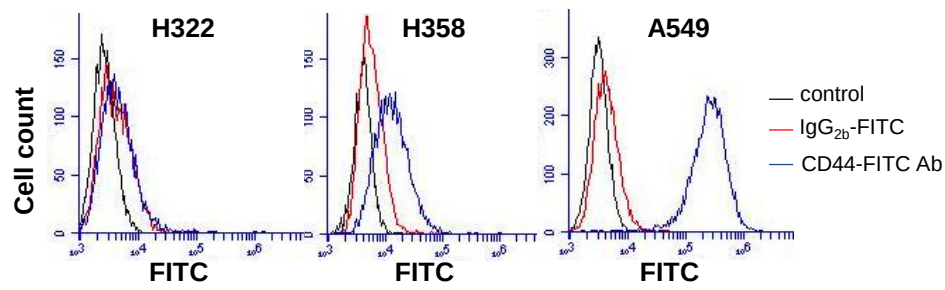
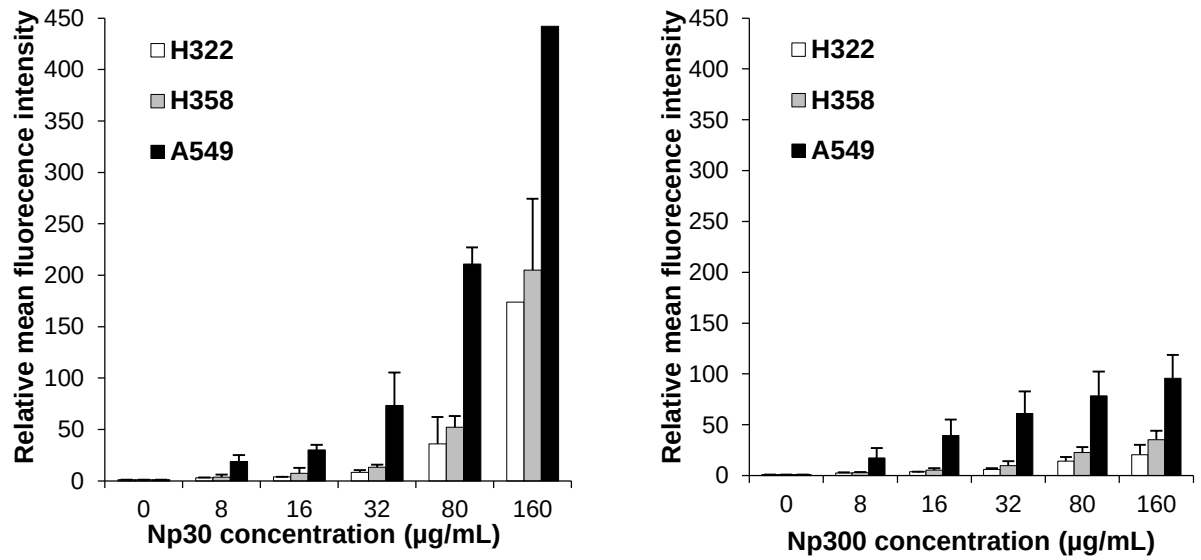


Figure 2

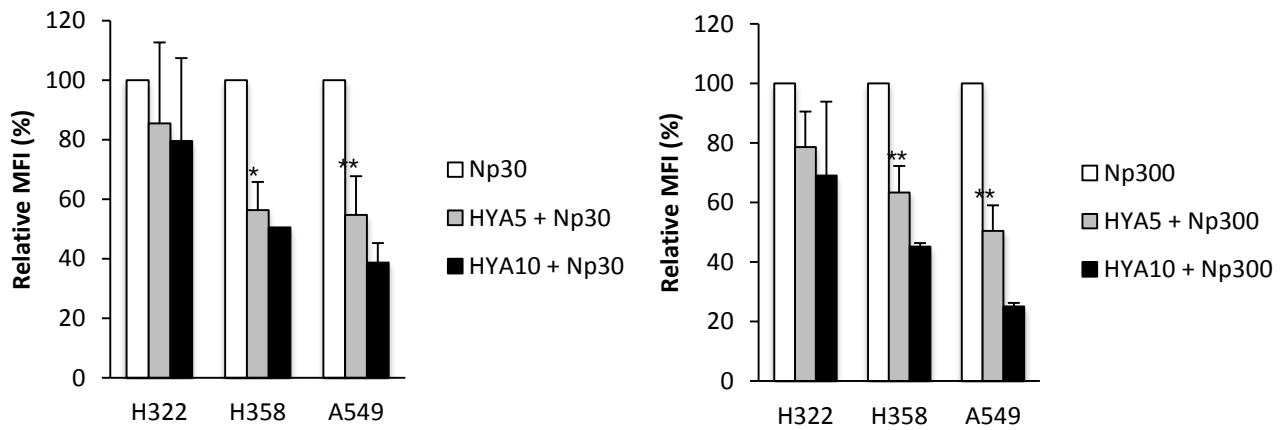
A



B



C



D

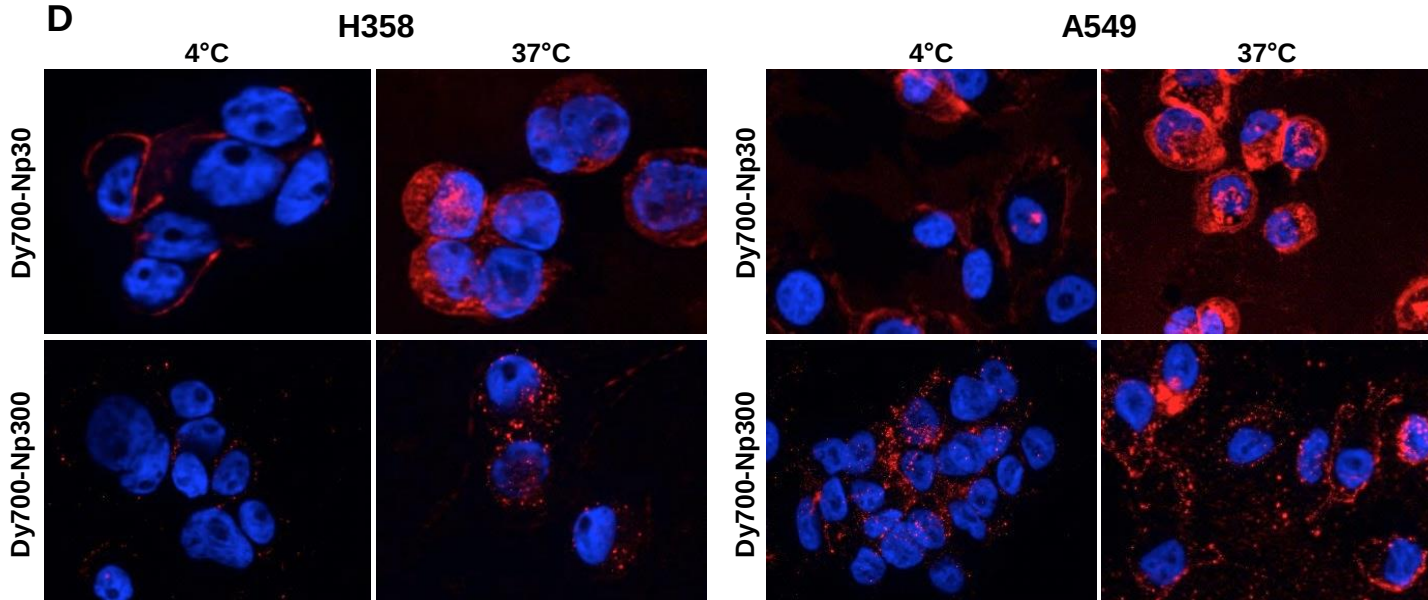


Figure 3

Intravenous administration

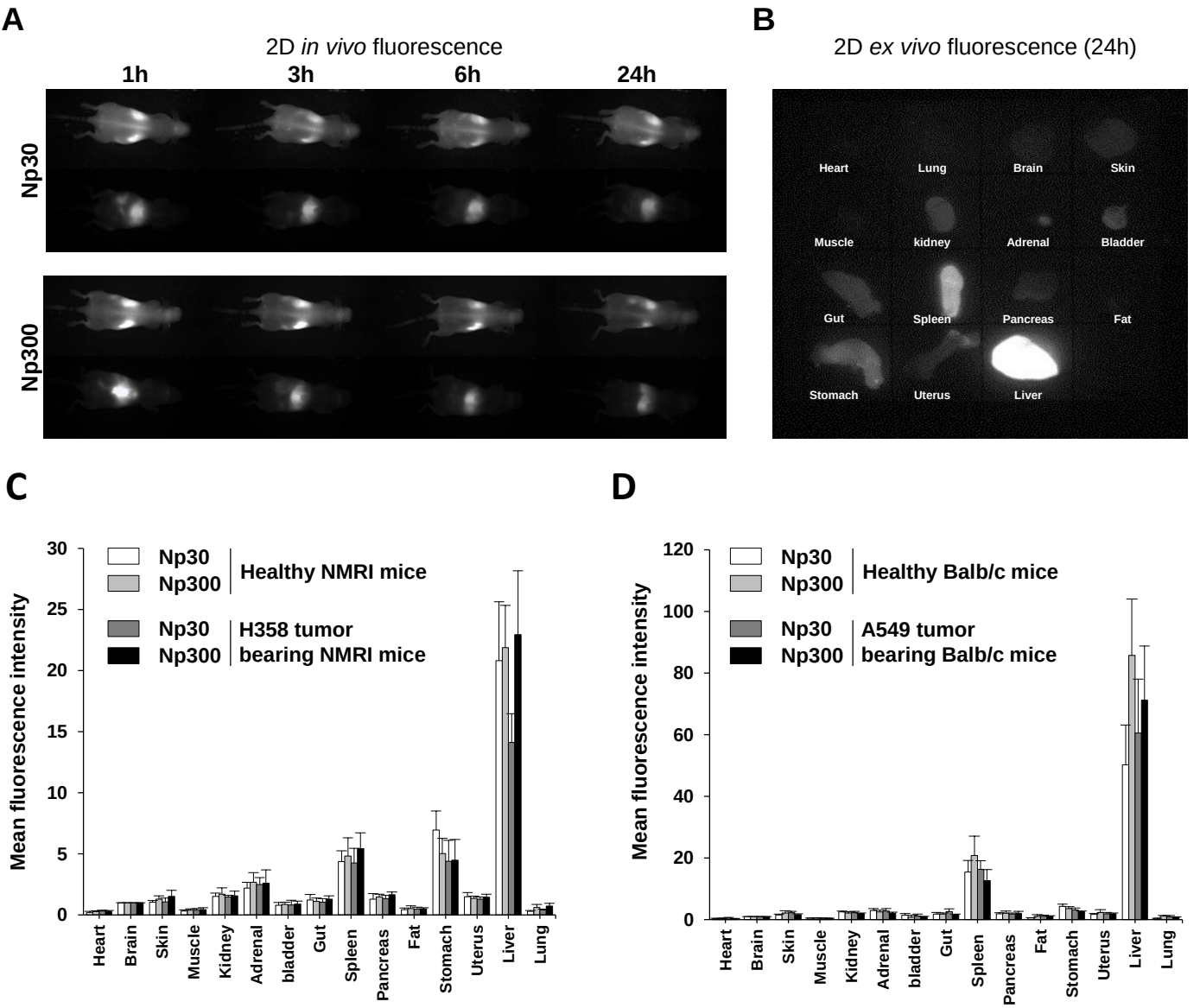
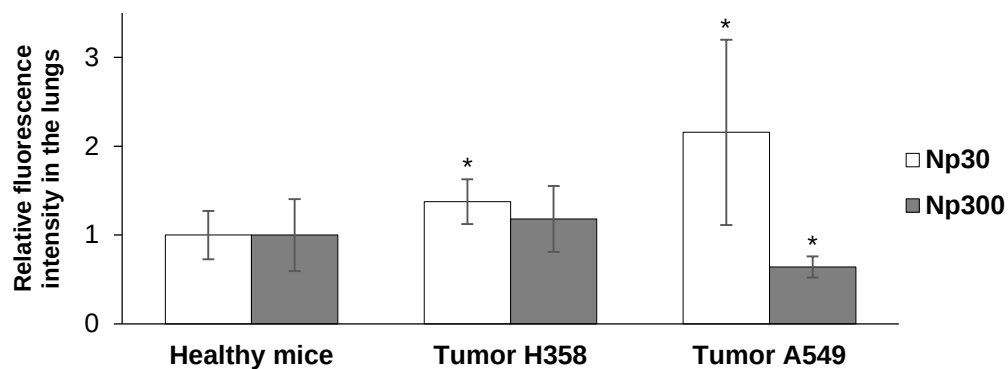


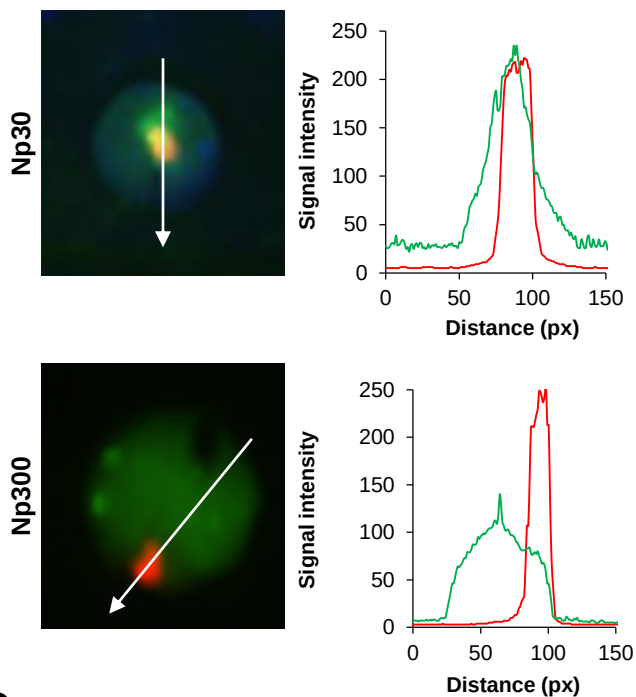
Figure 4

A



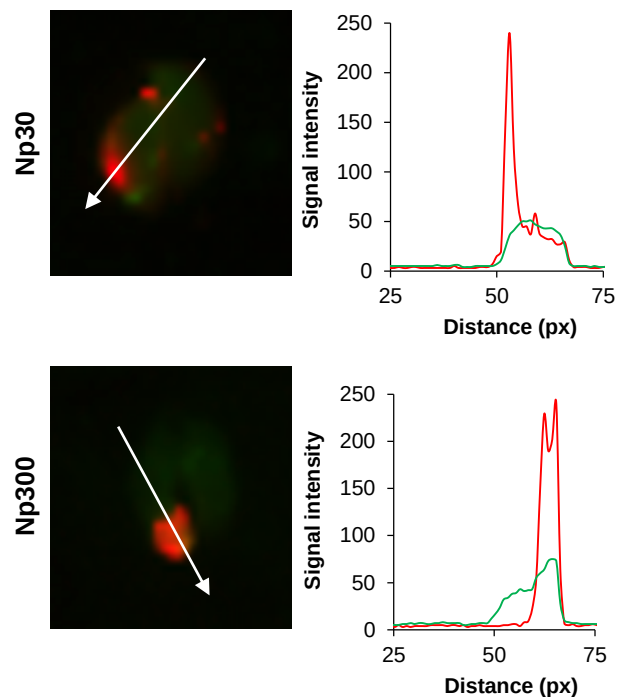
B

Ex vivo lung **fluorescence** and **bioluminescence** in H358 tumors



C

Ex vivo lung **fluorescence** and **bioluminescence** in A549 tumors



D

Adjacent healthy tissue

H358 tumor

A549 tumor

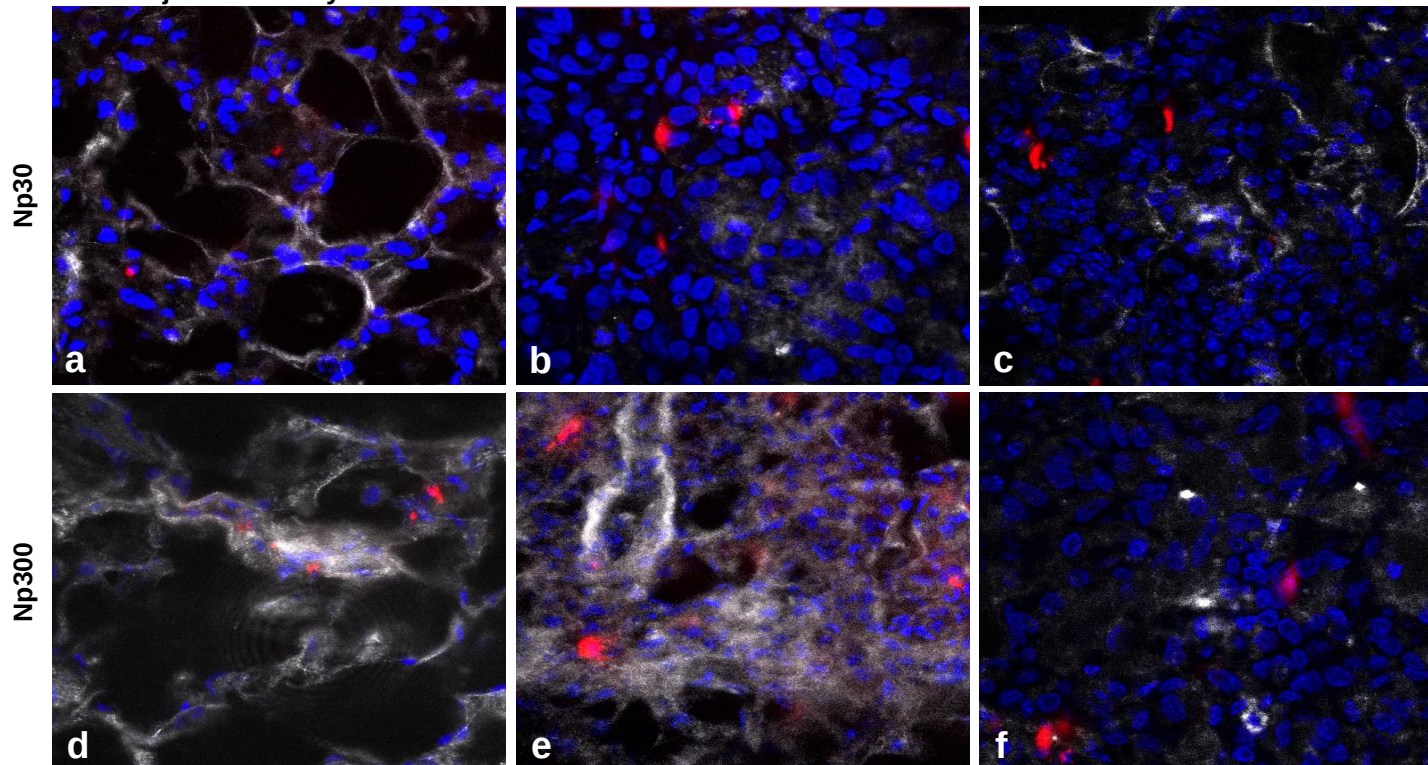


Figure 5

Intrapulmonary administration

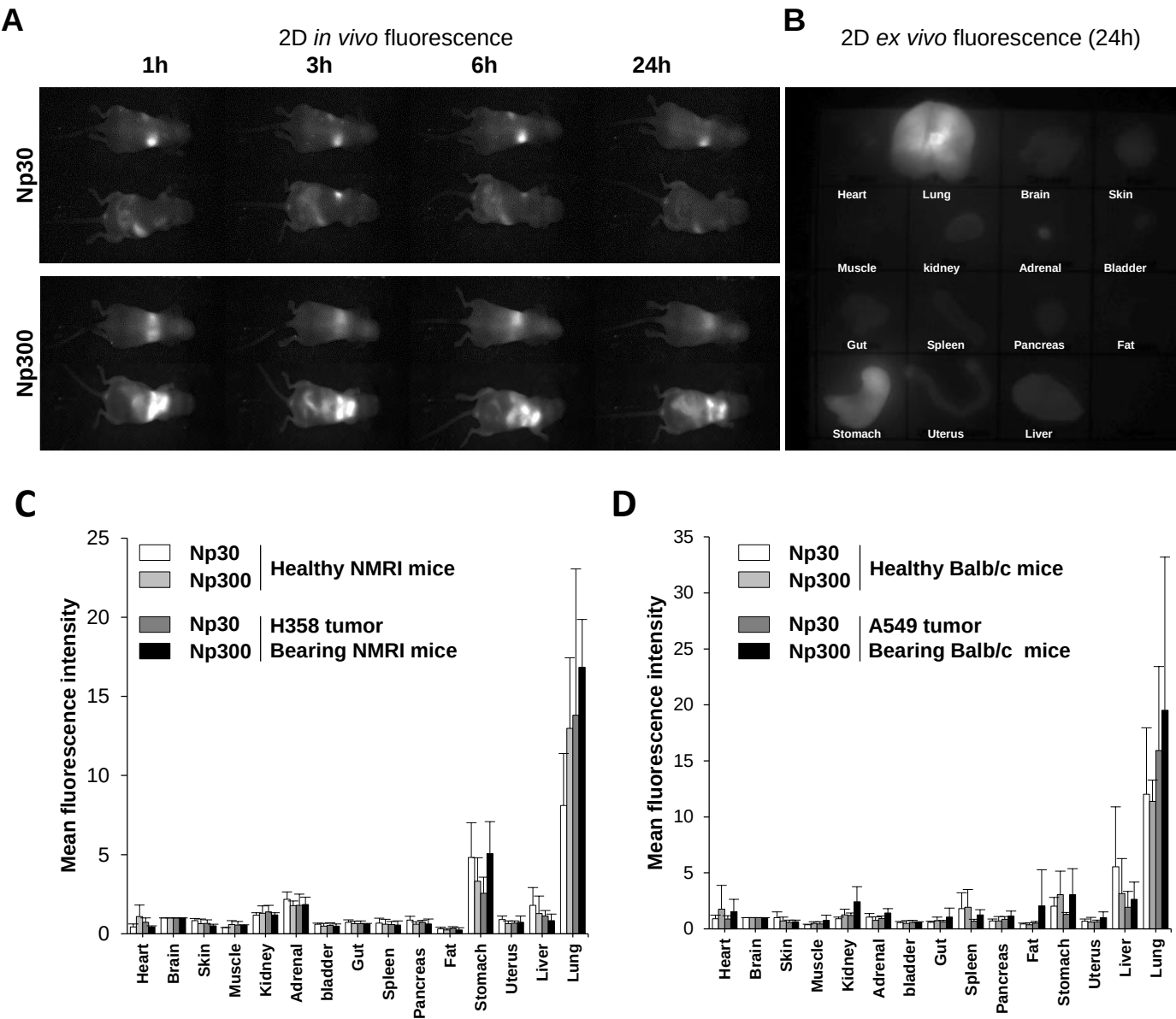
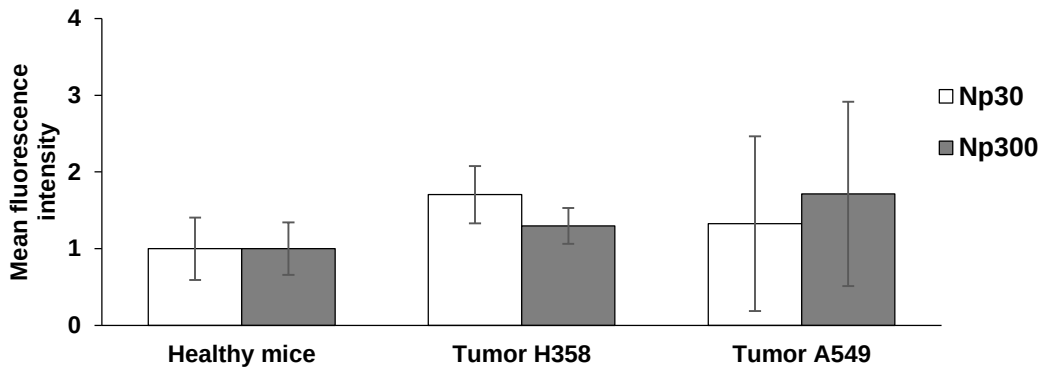


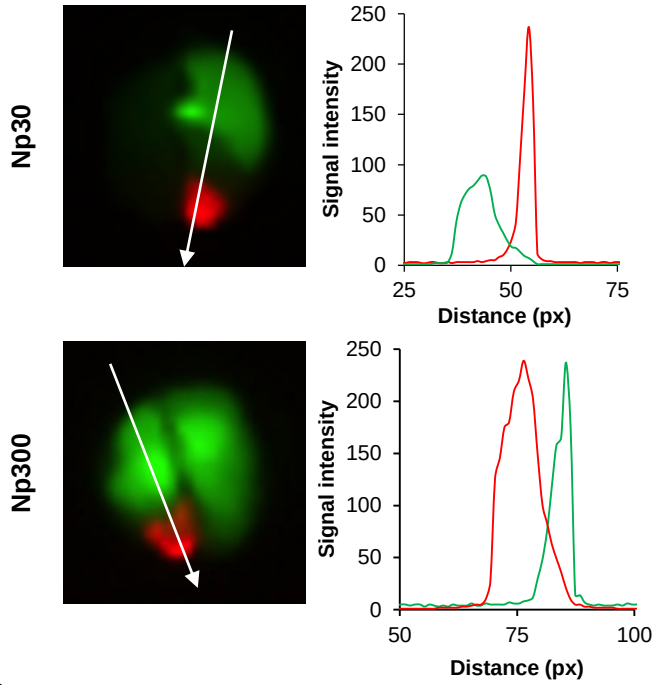
Figure 6

A



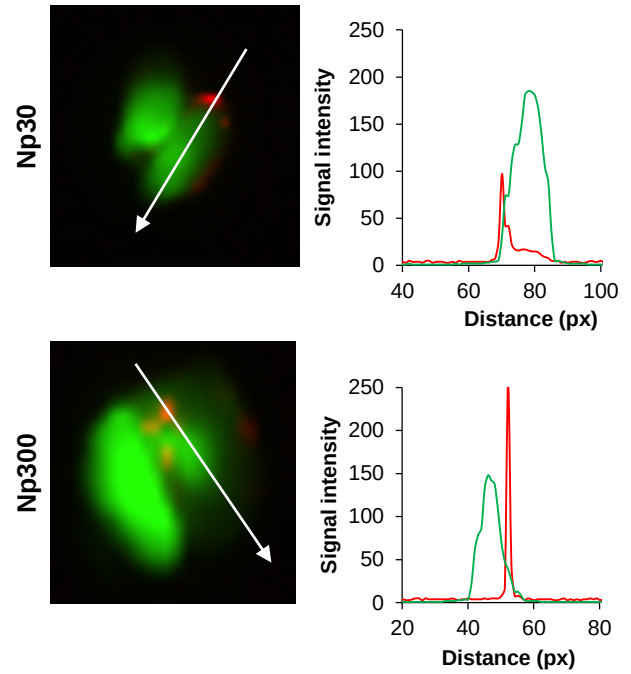
B

Ex vivo lung **fluorescence** and **bioluminescence** in H358 tumors



C

Ex vivo lung **fluorescence** and **bioluminescence** in A549 tumors

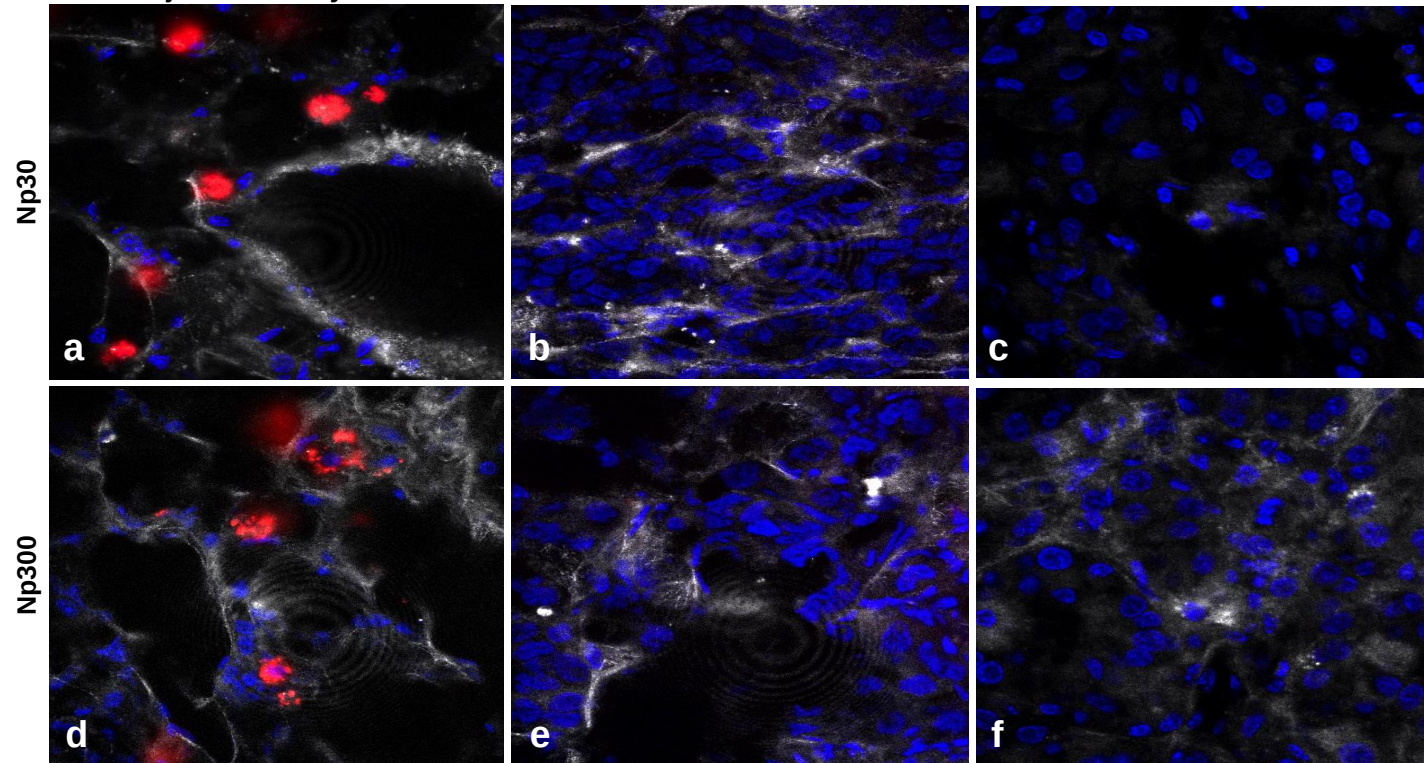


D

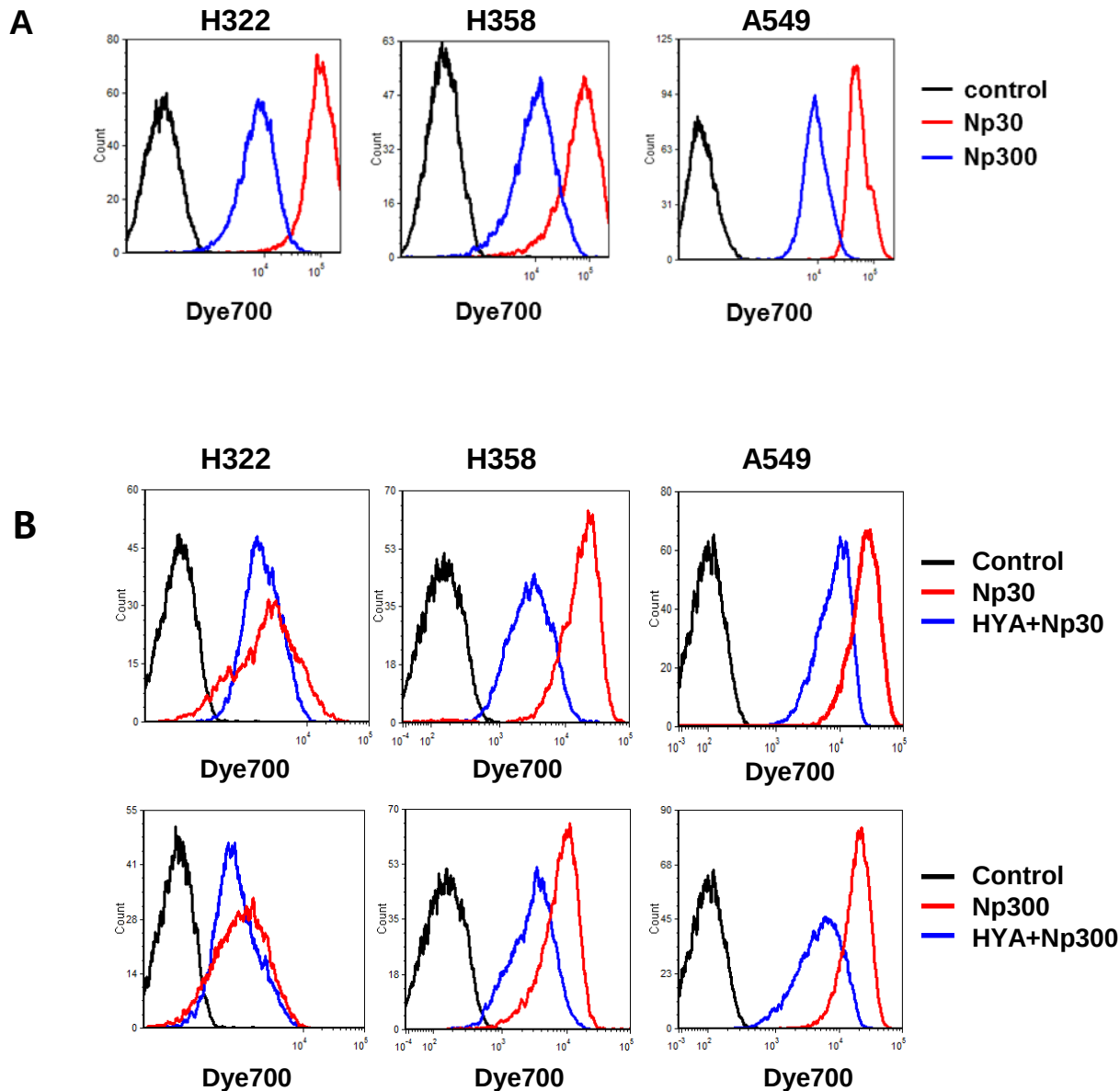
Adjacent healthy tissue

H358 tumor

A549 tumor



Supplementary Fig S1

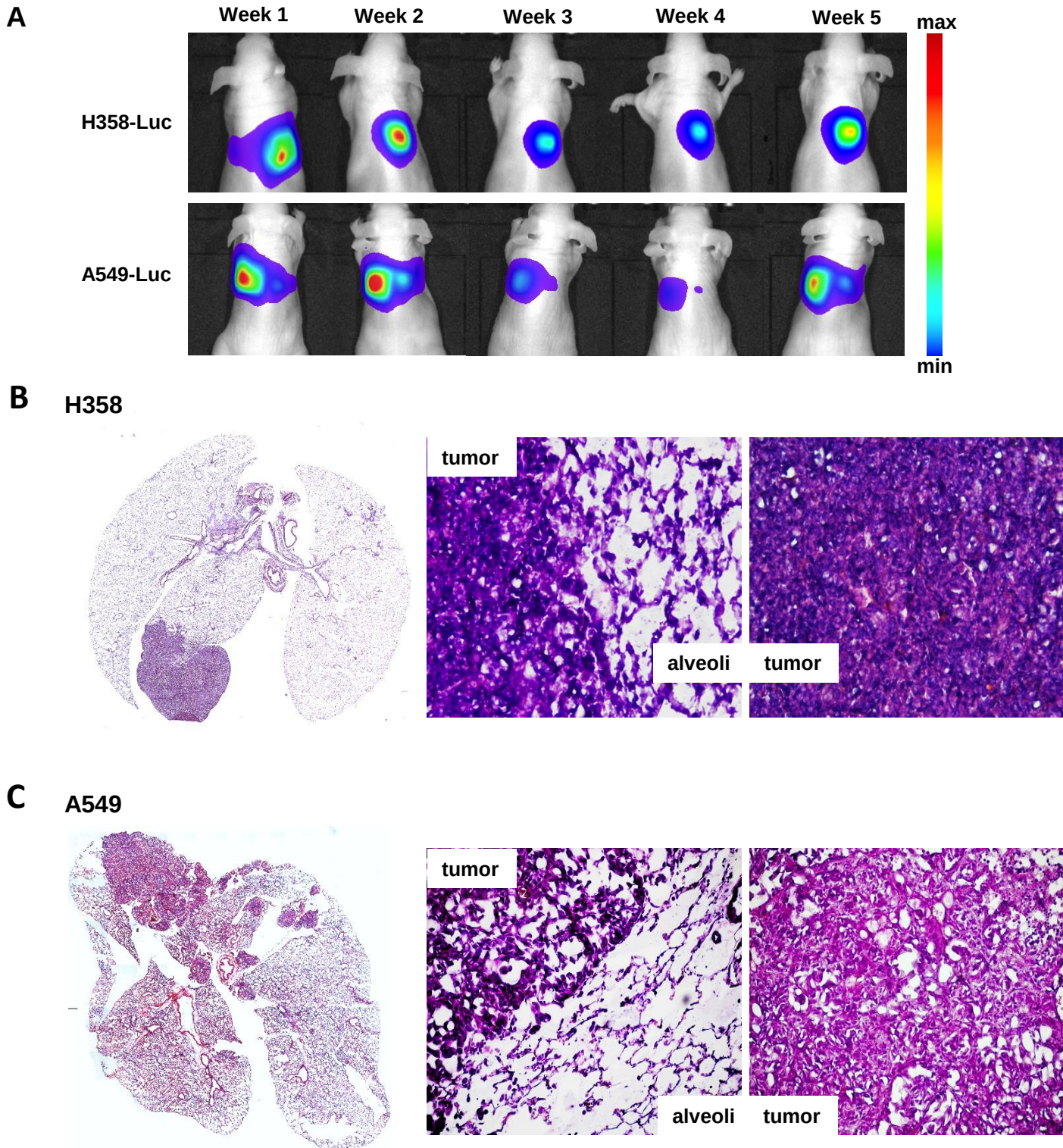


Supplementary Figure S1:

A: Flow cytometry histograms shows H322, H358 and A549 cells stained with Dye700-labeled nanoparticles at 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Np30, red curve; Np300, blue curve; no nanoparticle, black curve) after 30 min at 37°C.

B: Flow cytometry histograms displays the relative fluorescence intensity of unstained control H322, H358 or A549 cells (black curve), or cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Np30 (upper panel) or Np300 (lower panel) with (red curve) or without 5 mg/mL hyaluronan 175-300 kDa pretreatment (blue curve).

Supplementary Fig S2

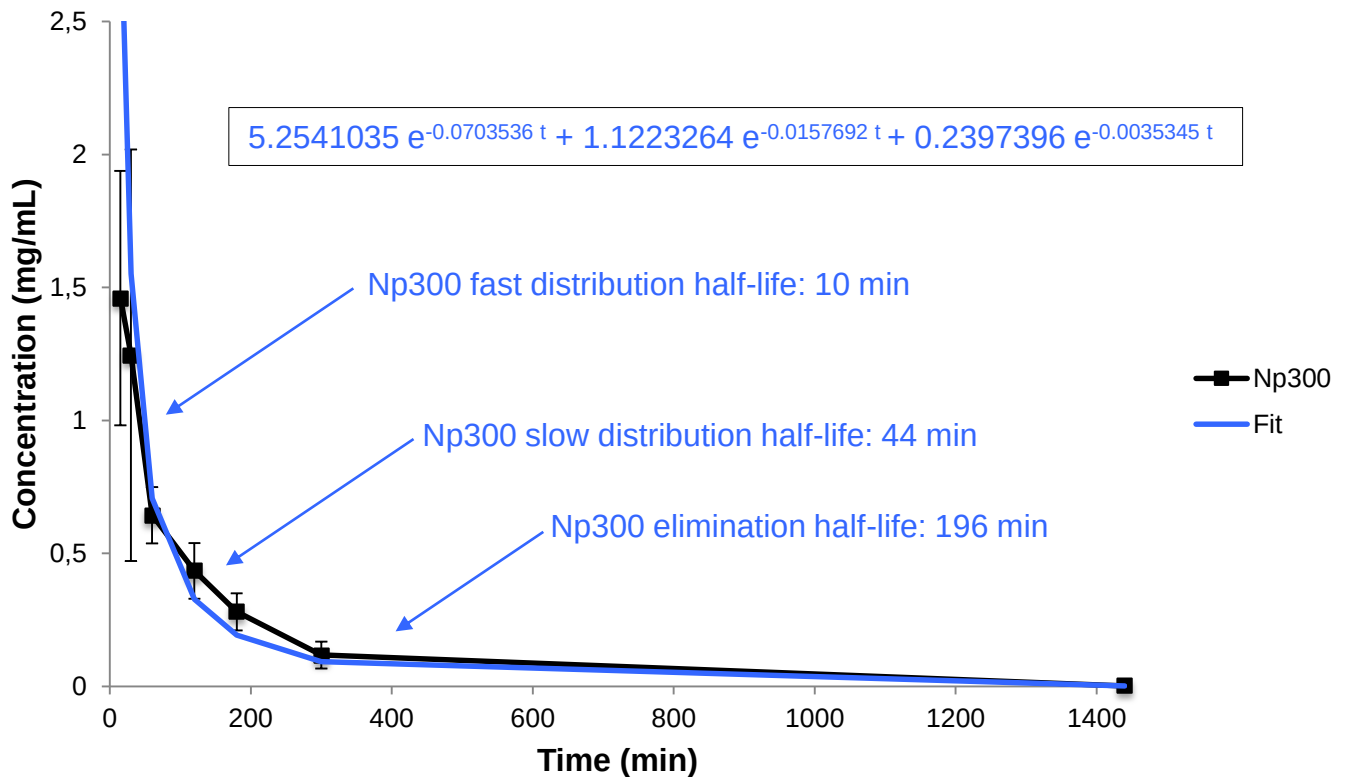
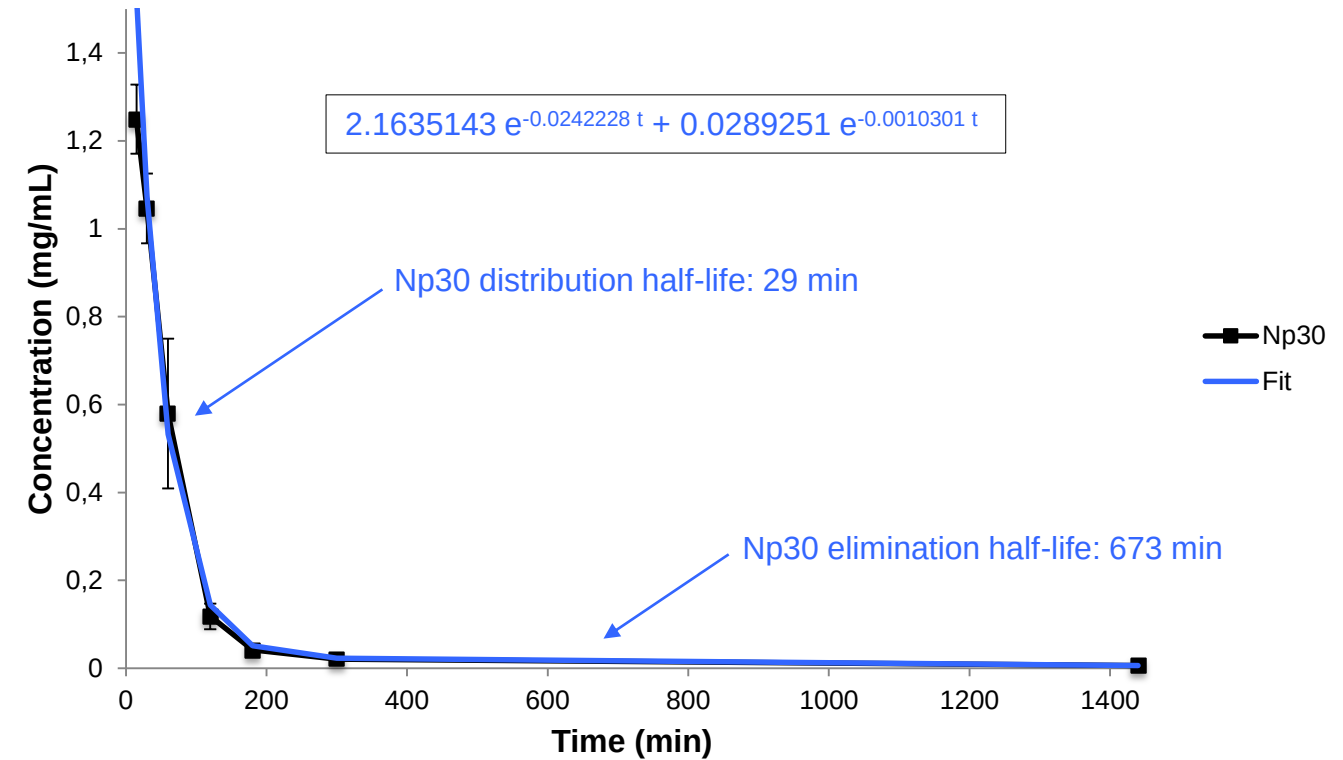


Supplementary Figure S2: H358 and A549 orthotopic lung cancer mouse models.

A: Lung tumors development of intrapulmonary inoculation of luciferase-modified human lung cancer H358 (H358-Luc) or A549 (A549-Luc) cells was followed using bioluminescence *in vivo* at the indicated times. **B-C:** Detection of lung tumor nodules on lung sections after hematoxylin and eosin staining in H358 (**B**) and A549 (**C**) orthotopic tumors. Images are at 4X (left) and 20X magnification (right).

Supplementary Fig S3

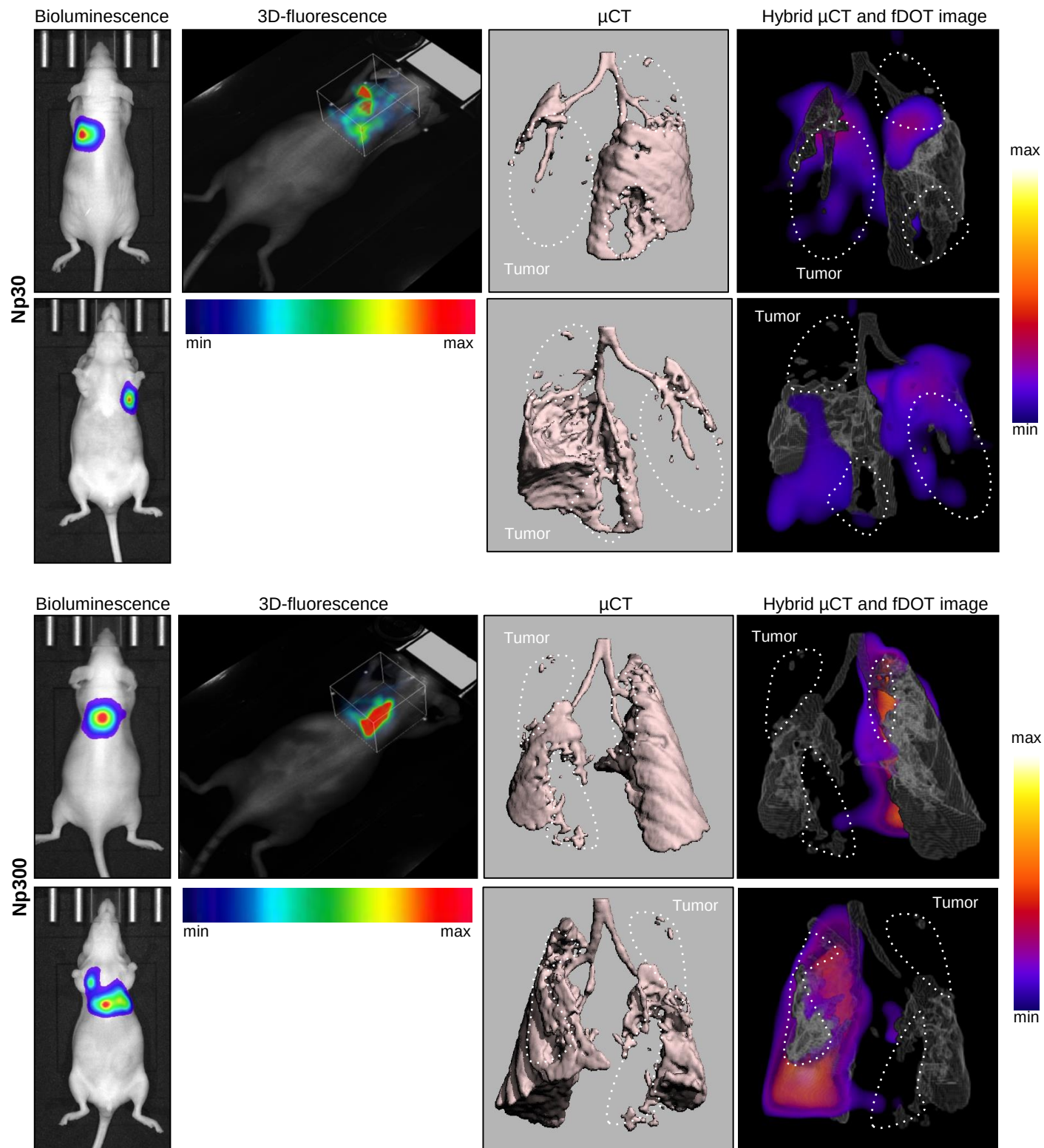
Blood samples



Supplementary Figure S3: Nanoparticles distribution and elimination blood imaging.

Healthy mice were injected intravenously with Dye700-labeled Np30 (n=5) or Np300 (n=4). The fluorescence intensity measurements of blood samples were performed over time for each nanoparticle. The results of these measurements are expressed as the mean $\pm$ SD and the exponential decay parameters were fitted.

Supplementary Fig S4



Supplementary Figure S4: *In vivo* H358-Luc orthotopic lung tumor imaging.

Dy700 labeled Np30 or Np300 were administered intrapulmonary in H358 lung tumor-bearing mice. Bioluminescence, microCT, and 3D-fluorescence tomography imaging were performed 24h after nebulization of nanoparticles. Bioluminescent signal showed H358-Luc tumor cells *in vivo*. 3D-fluorescent signal showed nanoparticles location in thoracic region. MicroCT analysis showing the air in the lungs, solid tumor location was observed through absence of signal on image of the lungs. The 3D fluorescent signal was merged with the mice's lungs in order to replace the fluorescent signal in an anatomical context. For each mouse, a dorsal view (upper line) and a ventral view (lower line) were shown. White dotted line: tumor site.

Supplementary methods

3D fluorescence imaging: 3D fluorescence acquisition were performed 24h after intravenous or intrapulmonary administration, with the continuous-wave fluorescence-enhanced diffuse optical tomography system, as previously described [38]. fDOT consists of a 690-nm laser source, a CCD camera and a set of filters. The light source is a 35 mW compact laser diode (Power Technology, Little Rock, USA) equipped with a bandpass interference filter (685AF30OD6; Melles Griot, Albuquerque, NM, USA). The emitted fluorescence is filtered by two 700-nm high-pass colored glass filters (RG9 OD5; Schott, Mainz, Germany) placed in front of a near infrared-sensitive CCD camera (Hamamatsu Photonics K.K., Japan) mounted with a f/15-mm objective (Schneider Kreutznach, Bad Kreuznach, Germany). The excitation sources described a regular 10 x10 mm spaced grid over the thoracic region of the mouse. Two scans were successively performed for diffusion and fluorescence. The exposure time was automatically computed at each laser position to use the entire dynamic range of the camera. The two stacks of diffusion and fluorescence images were analyzed by the reconstruction algorithm to generate a 3D image. The reconstructed area is a volume meshed with a 2 mm sample rate in the x and y directions and 1 mm in the z direction (depth) that yields a size of approximately 10 x 10 x 14 voxels and may vary slightly depending on animal thickness. The superimposition of the reconstructed volumes viewed as a smooth interpolation perspective and positioned on top of the white-light image of the animal allowed for the generation of the final image. Each fluorescence reconstruction is presented with a color scale to allow visualization. The scale is provided in arbitrary units.

Scanner *in vivo* imaging: Medium resolution microCT (CivaCT 40 Scanco Medical) with a 81 μ m isotropic voxel size, a voltage of 45 kV, and a current of 114 mA was performed. The 3D fluorescence is merge with the mice's lung in order to replace the fluorescent signal in an anatomical context.

Histology: Tumor-bearing lungs were fixed in formaldehyde, frozen and cut into 7 μ m slices for hematoxylin and eosin (H.E.) staining of the orthotopic tumors. Histological examination was performed under transmitted light with an Axioimager Microscope (Carl Zeiss). A mosaic was performed using Axiovision software as followed: Images magnification x4 were automatically taken merged and color harmonized in order to get on overview of the tumor slide.

1.3. Résultats complémentaires

1.3.1. Spécificité de la liaison des nanoparticules sur le CD44

La spécificité de la liaison des nanoparticules Np30 et Np300 au récepteur CD44 a été testée sur la lignée d'adénocarcinome bronchique A549, qui exprime fortement le récepteur CD44 et pas RHAMM [416]. L'utilisation de siRNA anti-CD44 diminue de moitié le niveau d'expression du récepteur CD44, mesuré par cytométrie en flux par rapport au contrôle (Figure 24a). Les siRNA anti-CD44 ne diminuent pas significativement la fixation des Np30 ou des Np300 (Figure 24b), suggérant que l'inhibition partielle de l'expression du récepteur CD44 est peut-être insuffisante pour bloquer la fixation des nanoparticules.

L'utilisation d'un anticorps bloquant spécifique du récepteur CD44, préincubé avant les nanoparticules, permet de réduire de 45% la fixation des Np300, mais pas des Np30, sur les cellules A549 (Figure 24c), montrant ainsi une fixation partiellement dépendante du CD44 des nanodisques.

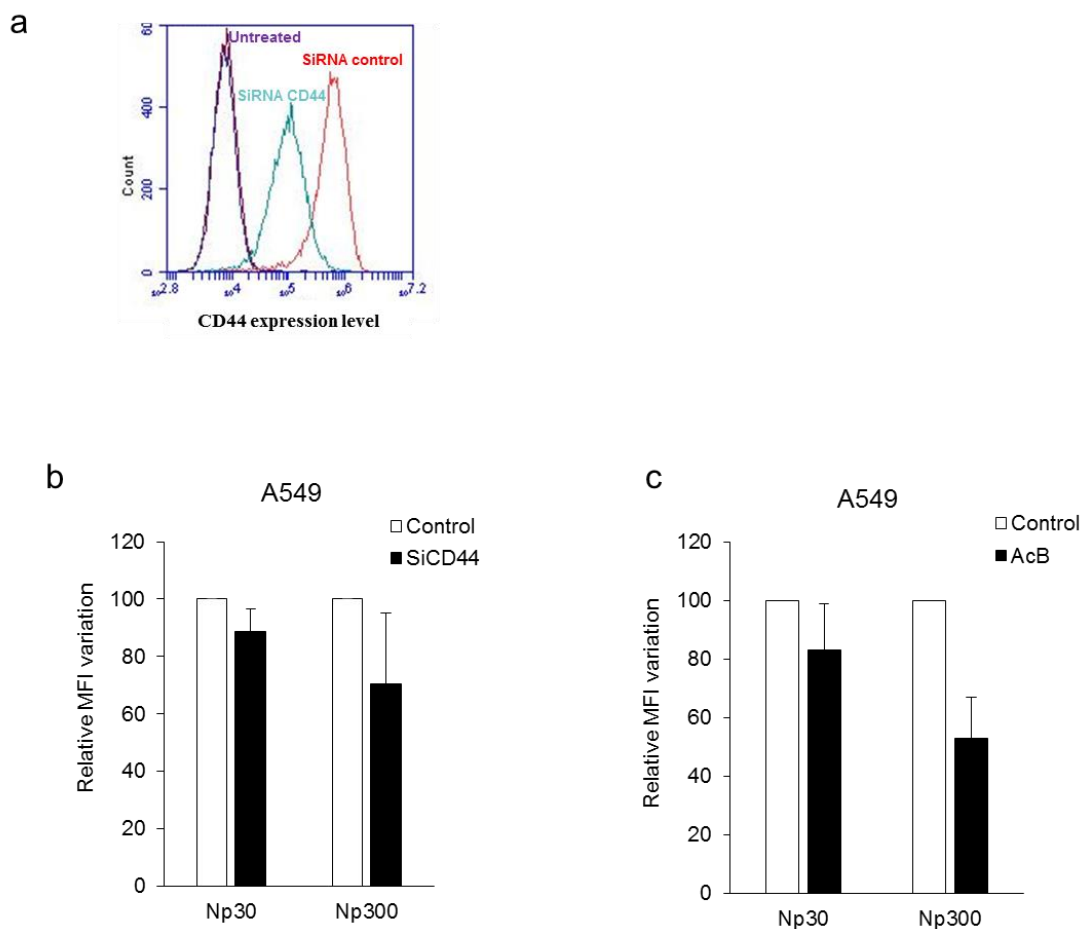


Figure 26 : Fixation des nanoparticules sur les cellules A549, après inhibition du CD44

Les cellules A549 ont été transfectées avec des siRNA anti-CD44 ou contrôles et le niveau d'expression du récepteur CD44 a été évalué par cytométrie en flux 72h après transfection : violet, cellules non transfectées ; vert, cellules transfectées avec les siRNA-CD44 ; rouge, cellules transfectées avec les siRNA contrôles (a,b). Les cellules ont été préincubées 1h à 37°C avec un Ac bloquant anti-CD44 (AcB) (c). Les Np30 et Np300 (8 µg/mL) sont incubées sur les cellules pendant 30 min à 37°C et le niveau de fluorescence a été évalué par cytométrie en flux (b,c). MFI : Mean Fluorescence Intensity.

1.3.2. Ciblage des métastases par les nanoparticules

Le développement des tumeurs pulmonaires orthotopiques A549 chez la souris peut conduire à la formation de métastases, qui sont détectées par imagerie de bioluminescence (Figure 25). Nous avons analysé la distribution des nanoparticules Np30 et Np300 injectées par voie intraveineuse, par imagerie bimodale (μ CT / Fluorescence 3D), dans des souris avec des tumeurs pulmonaires orthotopiques A549 et des métastases osseuses au niveau des pattes, de la colonne vertébrale et du crâne (Figure 25). En accord avec les résultats précédents, un signal de fluorescence est détecté dans les zones tumorales des poumons 24h après injection des Np30 ou Np300. Ce signal de fluorescence est plus faible pour les Np300 que pour les Np30, suggérant une plus faible accumulation des Np300 dans les tumeurs pulmonaires A549. Un faible signal de fluorescence est également retrouvé dans les métastases osseuses du fémur et de la colonne vertébrale, suggérant que les Np30 et Np300 pourraient atteindre les métastases A549 et s'y accumuler légèrement.

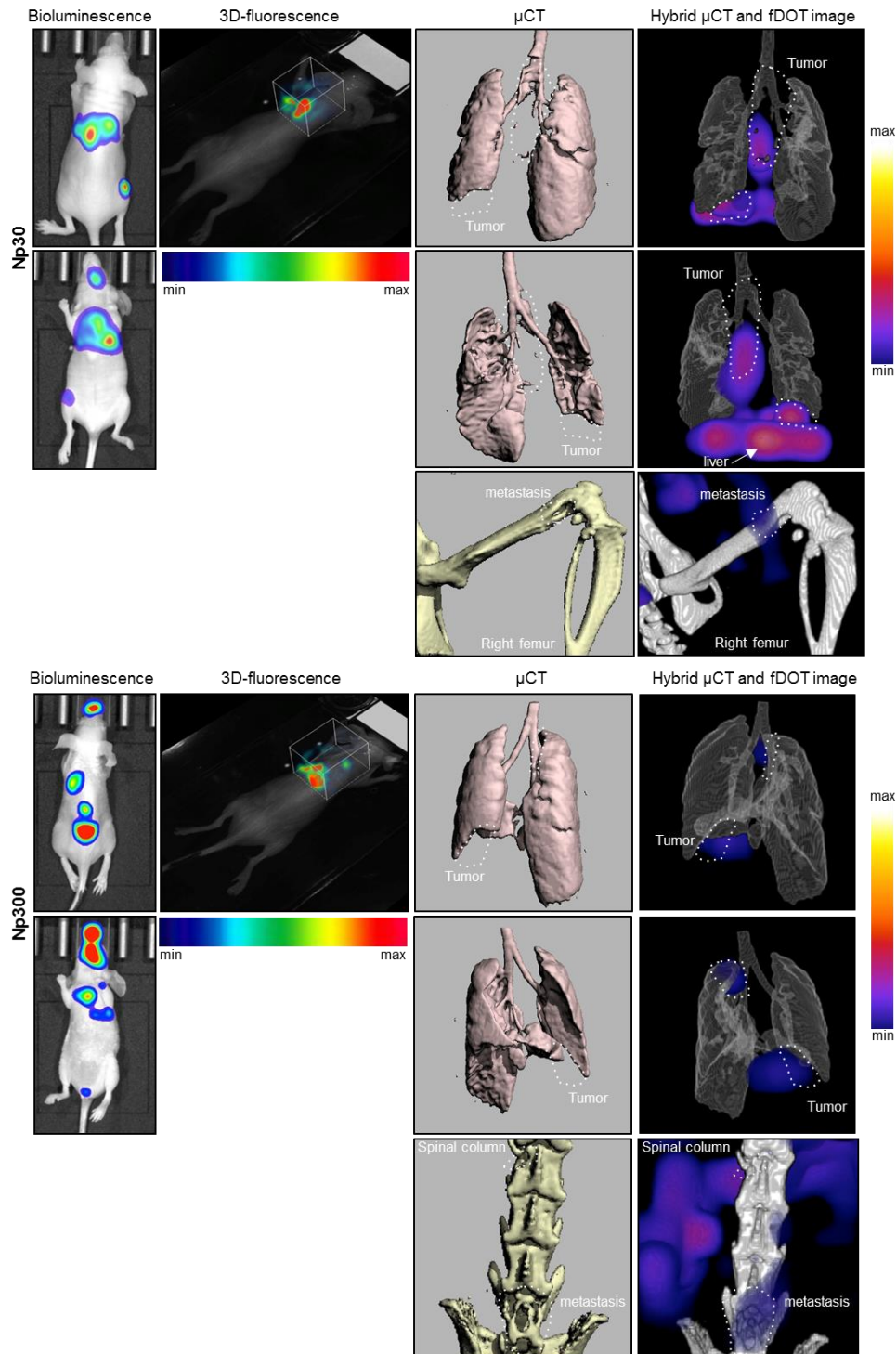


Figure 27 : Biodistribution des Np30 et Np300 dans des souris atteintes de tumeurs pulmonaires A549 et de métastases osseuses

200 μ L de Np30 et Np300 marquées avec le Dy700 ont été injectées par voie intraveineuse dans des souris avec des tumeurs orthotopiques A549. L'imagerie de bioluminescence, μ CT, et la tomographie de fluorescence (3D-fluorescence) ont été réalisées 24h après injection des nanoparticules. Le signal de bioluminescence montre la localisation des cellules tumorales in vivo. La tomographie de fluorescence montre la localisation des nanoparticules au niveau thoracique. Les images de μ CT montrant l'air dans les poumons, les tumeurs sont identifiées par une absence de signal. Le signal de fluorescence 3D a été superposé aux images de μ CT des poumons afin de replacer le signal de fluorescence des nanoparticules dans un contexte anatomique. Pour chaque souris une vue dorsale (ligne du haut) et une vue ventrale (ligne du milieu) sont présentées. Les lignes pointillées blanches représentent la position des tumeurs pulmonaires et des métastases.

1.3.3. Rétention pulmonaire des nanoparticules après nébulisation

Nous avons vu précédemment que les nanoparticules s'accumulent dans les poumons après nébulisation. Nous avons évalué la rétention pulmonaire des nanoparticules par imagerie de fluorescence 2D sur les poumons *ex vivo* dans des souris saines au cours du temps. Trois semaines après nébulisation des nanoparticules, le signal de fluorescence mesuré dans les poumons est de $12,5 \pm 9,1$ et $16,5 \pm 9,1$ RLU/pixel/ms respectivement pour les Np30 et les Np300, soit $\sim 30\%$ et $\sim 18\%$ du signal moyen obtenu 24h après nébulisation des Np30 et Np300 (Figure 26). Ces résultats montrent une longue rétention des nanoparticules dans les poumons des souris saines après nébulisation. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par imagerie de fluorescence 3D (Résultats non présentés).

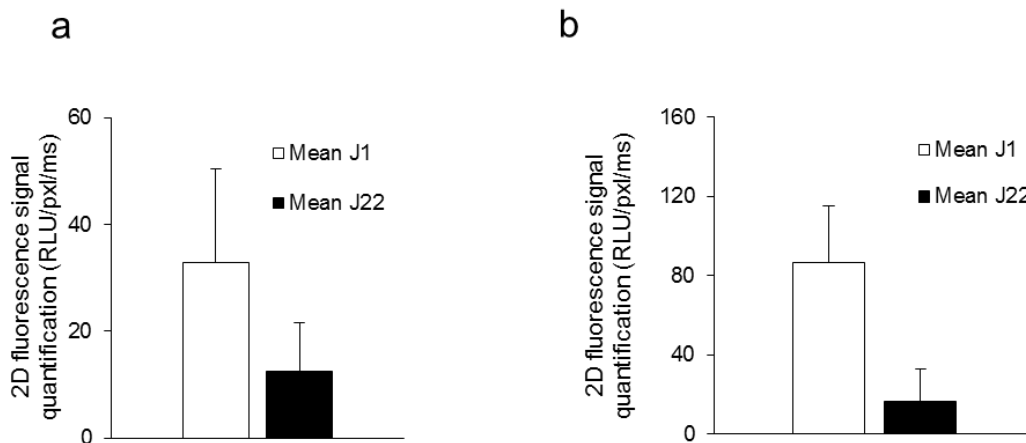


Figure 28 : Rétention pulmonaire des Np30 et Np300 dans des poumons de souris saines.

50 μ L de Np30 (a) ou de Np300 (b) fluorescentes ont été nébulisées dans des souris saines ($n \geq 2$). Le signal de fluorescence dans les poumons *ex vivo* est quantifié par imagerie de fluorescence 2D, 24h (J1) ou 22 jours (J22) après la nébulisation.

1.3.4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que la taille et la forme des nanoparticules polymériques à base de hyaluronane influent sur leur captation par les cellules tumorales et que celle-ci est proportionnelle au niveau d'expression de CD44 des cellules tumorales.

In vivo, l'injection intraveineuse des Np30 et Np300 permet une accumulation des nanoparticules dans les tumeurs, malgré une forte rétention hépatique. Les Np30 circulent plus longtemps que les Np300 et s'accumulent mieux dans les poumons tumoraux que les Np300 en particulier dans les poumons avec des tumeurs surexprimant le CD44. L'analyse de la biodistribution des Np30 et Np300 évoque une accumulation des nanoparticules dans les métastases osseuses des souris porteuses de tumeurs pulmonaires A549. Ces données suggèrent des perspectives cliniques prometteuses pour les petites nanosphères de 30nm. Par contre la nébulisation des nanoparticules entraîne une longue rétention de ces dernières dans les poumons mais ne permet pas leur accumulation dans les parties tumorales.

2. Ciblage du récepteur CD44 dans des tumeurs bronchiques pulmonaires

2.1. Nébulisation d'anticorps anti-CD44

Nous avons analysé la capacité de ciblage de tumeurs pulmonaires d'un anticorps anti-CD44 fluorescent. Pour cela, un anticorps anti-CD44 IgG1 de rat NA/LE (no azide/ low endotoxine) (BD Pharmingen) a été marqué avec l'Alexa 680 à l'aide du kit « Alexa fluor 680 protein labeling Kit » (Molecular probes), par incubation 1 heure à 4°C dans le noir. L'anticorps marqué a été purifié par chromatographie et l'intensité du marquage caractérisée par spectrophotométrie. 50 µL d'anticorps anti-CD44 fluorescent ont été nébulisés dans les poumons de souris saines ou porteuses de tumeurs pulmonaires orthotopiques H358 et nous avons analysé la biodistribution, 24h après l'administration intrapulmonaire, par imagerie optique 3D.

Nous observons un signal de fluorescence supérieur dans les poumons avec une tumeur H358 par comparaison aux poumons de souris saines (Figure 27a et b). Les souris ont ensuite été sacrifiées et la fluorescence dans les différents organes *ex vivo* a été mesurée (Figure 27c). Nos résultats confirment que l'intensité de fluorescence dans les poumons avec une tumeur est significativement supérieure à celle des poumons sains (Figure 27c et d). Le signal de fluorescence est corrélé au signal de bioluminescence (Figure 27d).

Les anticorps nébulisés passent peu dans circulation systemique [277]. D'autre part, une légère augmentation de la fluorescence dans la vessie est également mesurée. Ces résultats suggèrent une élimination du fluorophore par voie rénale (Figure 27c).

Ces résultats suggèrent une accumulation et une rétention de l'anticorps anti-CD44 fluorescent au niveau des poumons avec une tumeur orthotopique comme décrit dans la littérature [259, 277]. Ils devront être confirmés par microscopie optique sur des coupes de poumons pour localiser l'anticorps dans les tumeurs.

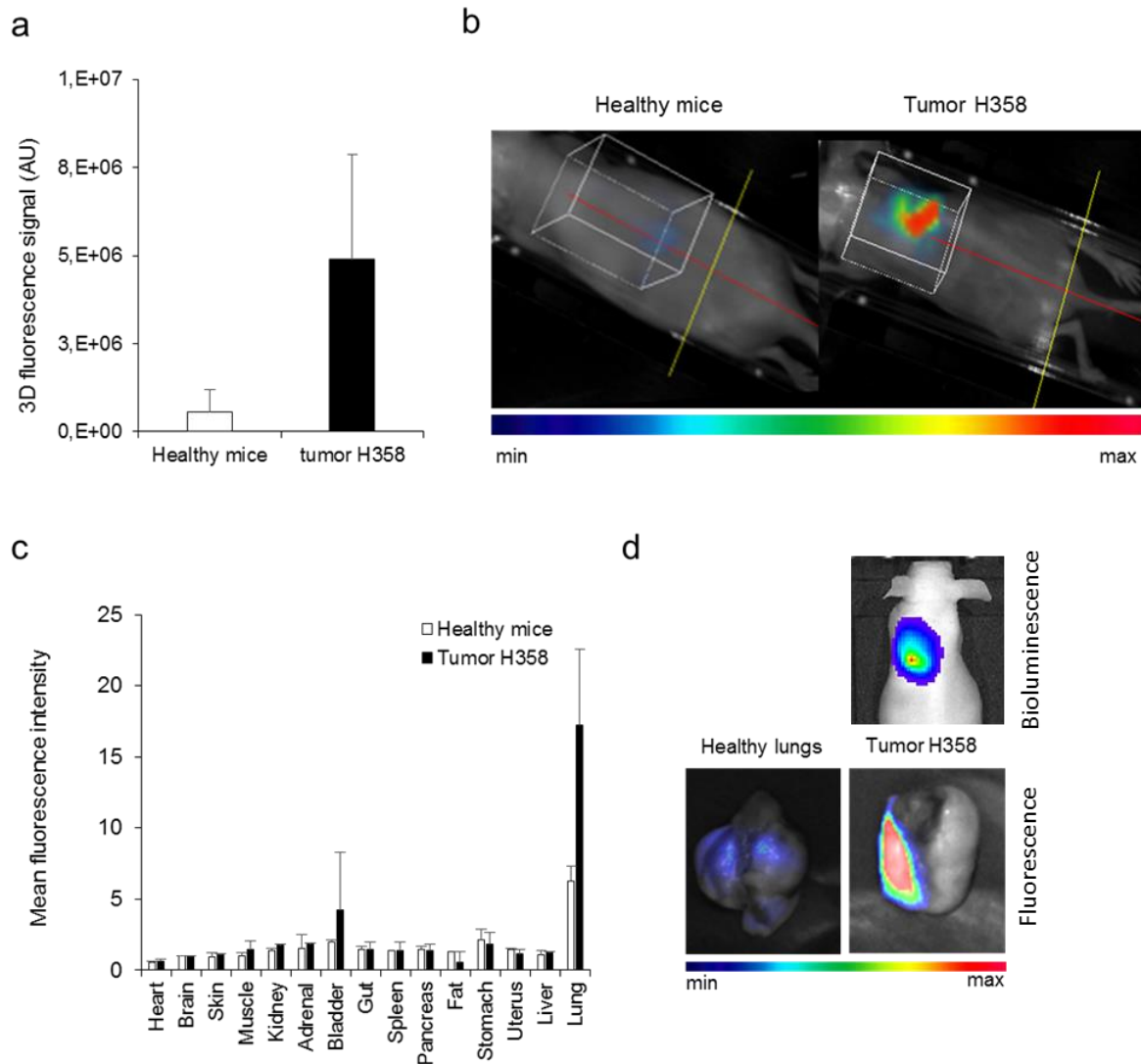


Figure 29 : Ciblage du récepteur CD44 par nébulisation d'un anticorps anti-CD44

L'anticorps anti-CD44 couplé à l'Alexa 680 a été nébulisé dans les poumons de souris saines ou porteuses de tumeurs pulmonaires H358. 24h après administration intrapulmonaire, le signal de fluorescence au niveau thoracique a été quantifié par tomographie de fluorescence ($n \geq 2$) (a). La reconstruction du signal en 3D montre la rétention de l'anticorps anti-CD44 fluorescent dans les souris saines ou avec une tumeur orthotopique H358 24h après nébulisation (b). Les souris ont été sacrifiées et le signal de fluorescence dans les organes a été mesuré et quantifié par imagerie de fluorescence en 2D (c). Illustration de la fluorescence observée dans les poumons ex vivo (vue dorsale) de souris saines ou avec une tumeur H358, et du signal bioluminescence dans une souris porteuse de tumeur orthotopique H358 (d).

2.2. Administration de hyaluronane

Nous avons analysé *in vivo* la capacité de ciblage des tumeurs pulmonaires de fragments de hyaluronane fluorescents de différentes tailles, administrés par voie systémique ou aérienne.

Des fragments de hyaluronane de 5000 ou 35000 Da, marqués par le Dye700, ont été injectés par voie intraveineuse dans des souris saines ou porteuses de tumeurs orthotopiques H358. Leur distribution a été suivie par imagerie optique 2D. Après injection, nous observons que les fragments de hyaluronane s'accumulent rapidement dans le foie (Figure 28a). Vingt-quatre heures après l'injection, les souris sont sacrifiées et le signal de fluorescence est quantifié dans les différents organes (Figure 25b), et confirme l'accumulation principalement dans le foie, témoignant de la rétention hépatique des fragments de hyaluronane.

La comparaison des profils de biodistribution montre que le hyaluronane de 35000 Da s'accumule plus au niveau hépatique et moins au niveau pulmonaire que le hyaluronane de 5000 Da (Figure 28b). Cependant, pour chaque fragment de hyaluronane, le signal de fluorescence mesuré dans les poumons sains et tumoraux n'est pas significativement différent, suggérant une absence de rétention tumorale des hyaluronanes (Figure 28b).

Ces fragments de hyaluronane ont également été administrés par voie aérienne (nébulisation) dans des souris saines ou porteuses de tumeurs orthotopiques H358. Leur biodistribution suivie *in vivo* par imagerie optique 2D montre un fort signal de fluorescence au niveau pulmonaire juste après nébulisation (Figure 29a). La quantification de la fluorescence dans les organes *ex vivo* montre aussi un fort signal dans les poumons, et pas dans les autres organes, sans rétention significative dans les poumons avec des tumeurs par rapport aux poumons de souris saines. Aucune autre différence significative dans la distribution et la rétention des différents fragments de hyaluronane n'a été observée (Figure 29b).

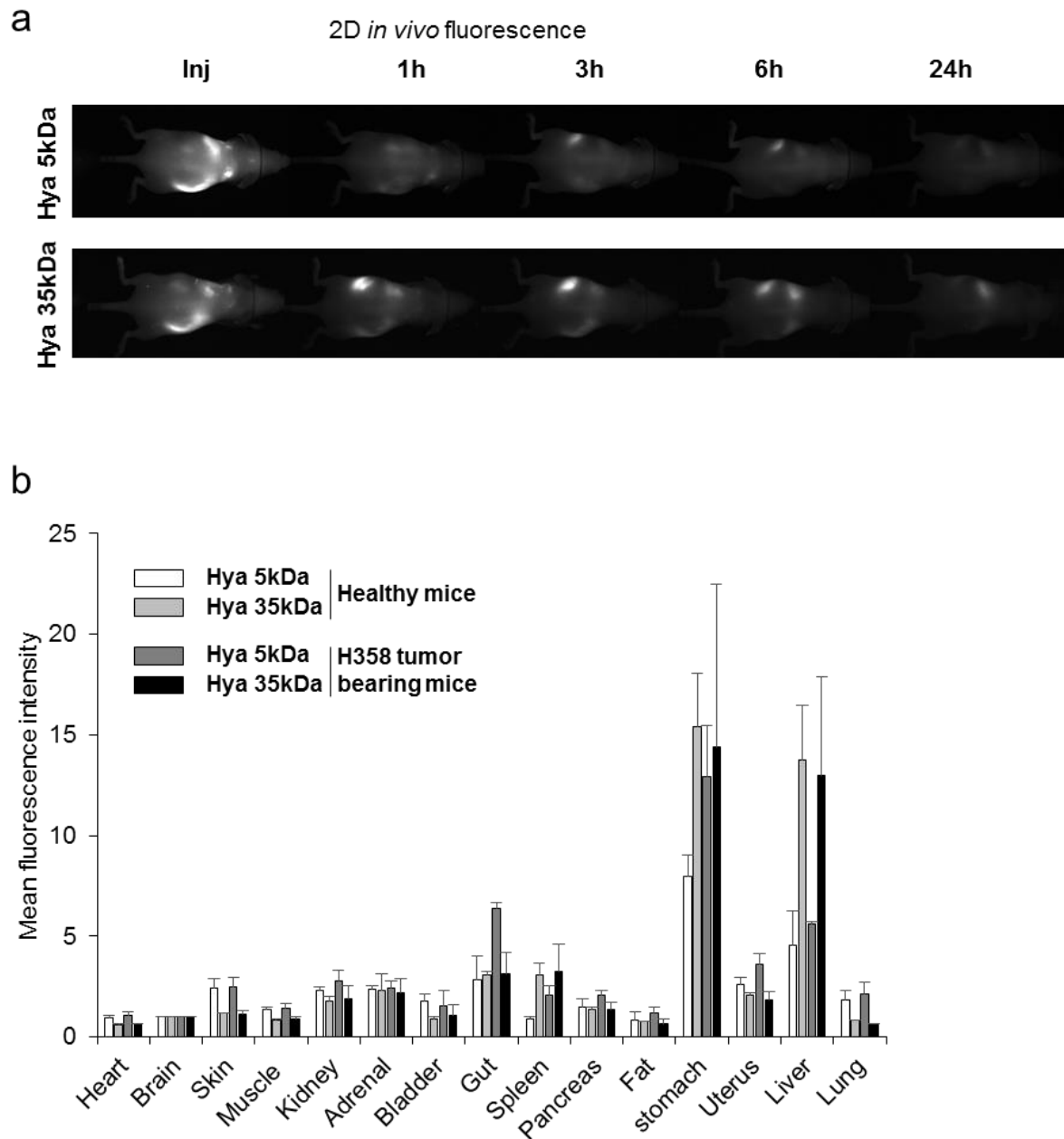


Figure 30 : Biodistribution des hyaluronanes dans les souris, après injection intraveineuse

200 μ L de hyaluronane de 5000 Da (Hya 5kDa) ou 35000 Da (Hya 35kDa) marqués avec le Dy700 ont été injectés par voie intraveineuse dans des souris saines ou avec des tumeurs orthotopiques H358 ($n \geq 2$). Leur biodistribution *in vivo* a été suivie au cours du temps par imagerie de fluorescence 2D (a). 24h après injection les souris ont été sacrifiées et l'intensité de fluorescence quantifiée dans les différents organes par imagerie de fluorescence 2D (b).

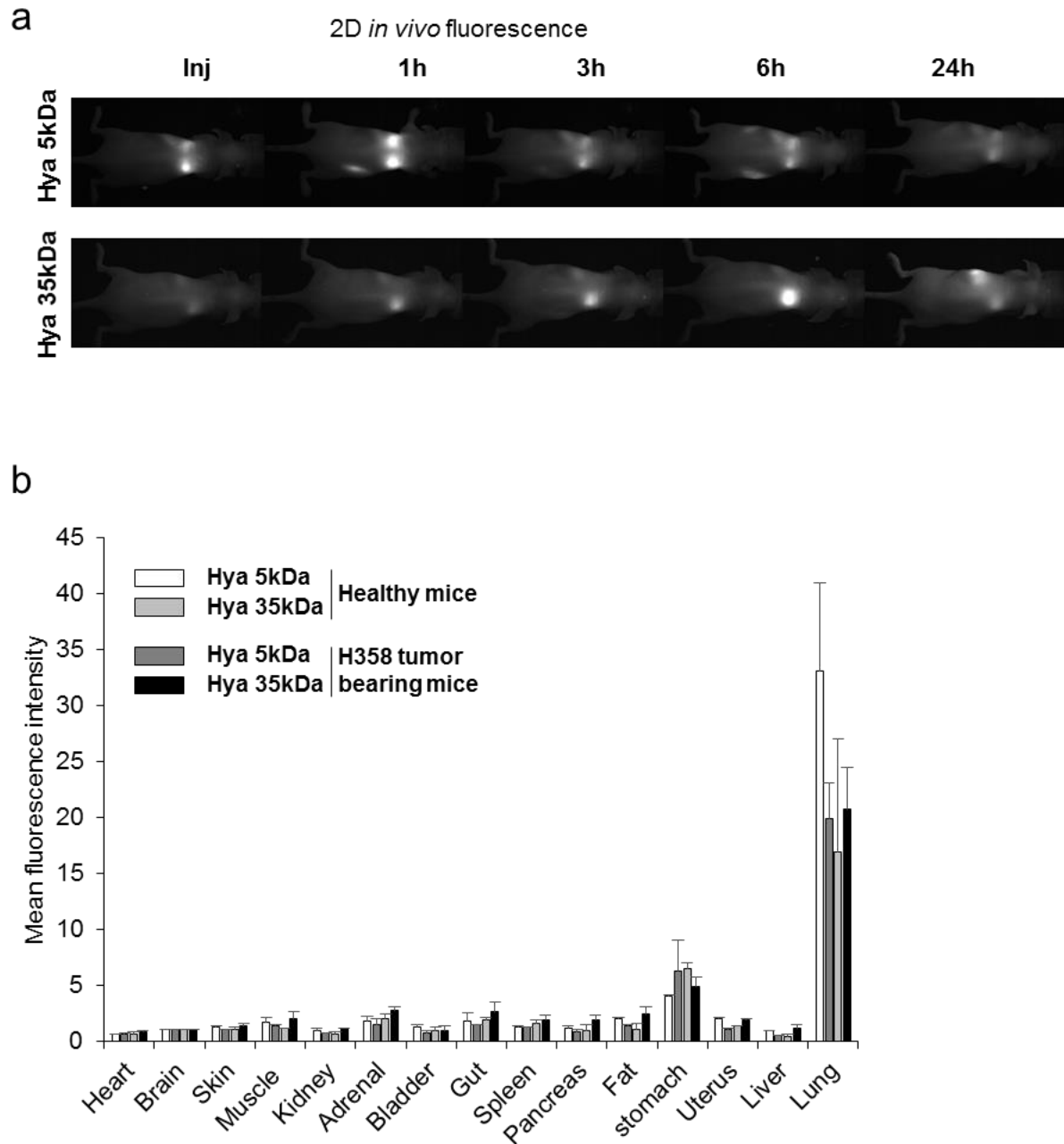


Figure 31 : Biodistribution des hyaluronanes dans les souris, après nébulisation

50 μ L de hyalurone 5000Da (Hya 5kDa) ou 35000Da (Hya 35kDa) marqués avec avec le Dy700 ont été nébulisés dans des souris saines ou avec des tumeurs orthotopiques H358 ($n \geq 2$). Leur biodistribution *in vivo* a été suivie au cours du temps par imagerie de fluorescence 2D (a). 24h après nébulisation les souris ont été sacrifiées et l'intensité de fluorescence quantifiées dans les différents organes par imagerie de fluorescence 2D (b).

2.3. Conclusion

Nous avons étudié les possibilités de ciblage des récepteurs du hyaluronane, et principalement les récepteurs CD44, à l'aide soit d'un anticorps spécifique, soit de fragments de hyaluronane marqués.

La nébulisation de l'anticorps anti-CD44 fluorescent montre une meilleure rétention de l'anticorps dans les poumons présentant des tumeurs que dans les poumons sains. De plus, la rétention est corrélée aux zones tumorales dans les poumons suggérant que le récepteur CD44 est une cible envisageable pour l'administration d'anticorps spécifique par nébulisation.

A l'inverse l'approche utilisant du hyaluronane comme agent de ciblage, ne permet pas de montrer une rétention supérieure du hyaluronane dans les poumons tumoraux, quelque soit la taille des fragments de hyaluronane (5000 ou 35000 Da) après injection intraveineuse ou nébulisation, suggérant que ces fragments ne sont pas appropriés pour le ciblage tumorale.

Discussion

Le cancer du poumon est un problème de santé publique depuis plusieurs décennies, avec un taux de survie à 5 ans toujours inférieur à 15% tous stades confondus. Toutefois les taux de survie pour chaque stade sont très différents. Ainsi le taux de survie du stade I est de 57%, celui du stade II de 33.7%, celui du stade III de 9.4% et celui du stade IV de seulement 1,8% [417]. Les taux observés pour les stades précoces sont dus à une chirurgie curative du cancer pulmonaire. Or, le diagnostic précoce est rare car les symptômes n'apparaissent en général qu'à un stade avancé de la maladie [418]. Seuls 15 à 30% des patients sont diagnostiqués aux stades I et II, contre 50% au stade IV [419]. Afin d'améliorer le pronostic des CBNPC, il est donc urgent d'avoir des outils de diagnostic précoce et de proposer des thérapies plus efficaces pour la prise en charge des stades avancés de CBNPC. Dans ce contexte les EGFR-TKI sont un réel progrès dans la prise en charge des stades IV métastatiques. Cependant seuls 10 à 15% des patients atteints de CBNPC bénéficieront de ces traitements et ils développeront presque tous, dans les 10 mois une résistance aux EGFR-TKI [37, 119, 420]. Devant ce constat très pessimiste nous avons cherché à caractériser les mécanismes cellulaires de résistance aux EGFR-TKI afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de proposer des combinaisons de traitements restaurant la sensibilité aux EGFR-TKI.

1. Mécanismes de résistance aux EGFR-TKI dans les CBNPC

Les travaux précédents du laboratoire avaient montré qu'une coopération entre l'AREG et l'IGF1R induit la résistance au gefitinib dans des adénocarcinomes pulmonaires mucineux, *via* l'inhibition de l'apoptose par des mécanismes dépendant de l'acétylation [135, 137].

Nous avons étudié les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans ces mécanismes chez des patients avec un adénocarcinome pulmonaire. Nous montrons que l'activation d'AKT est associée à la résistance au gefitinib chez les patients porteurs d'adénocarcinome avec un *EGFR* sauvage, ne répondant pas aux EGFR-TKI. En accord avec ces données, il a été montré qu'une forte activité d'AKT est corrélée avec des tumeurs de haut grade, la présence de métastases, la radiorésistance et une survie réduite chez les patients [421-423]. D'autre part, chez les patients atteints de CBNPC avec un *EGFR* muté constitutivement activé, un haut niveau d'activation d'AKT est aussi observé et prédit la réponse au gefitinib [424]. Ces données soulignent l'importance de la voie PI3K/AKT dans la réponse des adénocarcinomes aux EGFR-TKI.

La résistance aux EGFR-TKI est également associée à la présence de mutations de *KRAS* [425], conduisant à l'activation des voies de signalisation MEK/ERK1/2 et PI3K/AKT en aval [426]. De plus, les tumeurs avec une mutation *KRAS* peuvent induire une surexpression de ligands de l'EGFR, comme l'AREG [427]. En accord avec ces données nous montrons l'implication de la voie PI3K/AKT *via* l'AREG et l'IGF1R dans des cellules d'adénocarcinomes mucineux avec un *EGFR* sauvage et une mutation *KRAS*.

Nos travaux montrent le rôle de la voie PI3K/AKT dans la régulation du niveau d'expression de Ku70 et l'apoptose dans les cellules traitées au gefitinib, en accord avec les données de la littérature montrant qu'AKT bloque l'apoptose médiée par BAX en inhibant la protéolyse de Ku70 [428]. Ainsi, l'activation de la voie PI3K/AKT inhibe la dégradation de Ku70, renforçant son interaction avec BAX pour bloquer l'apoptose induite par les EGFR-TKI. L'interaction entre BAX et Ku70 est également régulée par des mécanismes dépendant de l'acétylation. Les HDACs de classes I/II et les sirtuines régulent l'acétylation de Ku70 [163, 429], sont impliquées dans le développement des cancers pulmonaires et sont associées à un mauvais pronostic [149-151, 154, 155, 164]. La déacétylation de Ku70 par SIRT1 ou SIRT3 augmente son interaction avec BAX [430-432]. Nous montrons que l'inhibition combinée des HDACs de classes I et II (par la trichostatine A ou le vorinostat) et de classe III (par le nicotinamide) inhibe l'activation d'AKT et conduit à la libération de BAX par Ku70, sensibilisant ainsi les cellules de CBNPC au gefitinib.

Le sodium butyrate (inhibiteur des HDACs de classes I et IIa) ne permet pas de restaurer la sensibilité au gefitinib contrairement aux inhibiteurs de HDACs de classes I, IIa et IIb, suggérant l'implication des HDACs de classe IIb (HDAC6 et HDAC10) dans la résistance aux EGFR-TKI. HDAC6 régule l'acétylation de Ku70 et de l'apoptose induite par BAX dans le neuroblastome [163]. Dans cette étude nous montrons que l'inhibition d'HDAC6 ou d'HDAC10 induit la phosphorylation d'AKT, maintient l'interaction BAX/Ku70 et ne permet pas de restaurer l'apoptose induite par gefitinib dans les cellules d'adénocarcinomes, au contraire des résultats observés dans le neuroblastome [163].

Une explication probable est que d'autres HDACs ou sirtuines préviennent l'acétylation de Ku70 compensant ainsi l'inhibition spécifique des HDACs de classe IIb. En accord avec cette hypothèse, le nicotinamide inhibe l'activation d'AKT, induit la dissociation de BAX/Ku70 et restaure l'apoptose induite par gefitinib en présence de tubastatine A (un inhibiteur spécifique d'HDAC6). Les sirtuines et HDACs impliquées dans la régulation de l'apoptose induite par le gefitinib restent à identifier formellement.

2. Cibles thérapeutiques et combinaisons de traitements

L'ensemble de nos résultats, montre le potentiel thérapeutique d'associer des inhibiteurs de l'EGFR avec des inhibiteurs de l'IGF1R, de la voie PI3K/AKT ou encore des HDACs, en particulier dans des adénocarcinomes bronchiques avec un *EGFR* sauvage et une mutation *KRAS*, pour contrer la résistance aux EGFR-TKI en accord avec la littérature [135, 407, 433-436].

L'inhibition conjointe de l'EGFR et l'IGF1R permettant de restaurer l'apoptose dans les cellules résistantes aux EGFR-TKI a déjà été montré [49, 50, 437, 438]. Plusieurs molécules ciblant l'IGF1R sont évaluées comme des anticorps (cixutumumab, ganitumab) ou des inhibiteurs de la tyrosine kinase (OSI-906, MEDI-573, BI836845). Les premiers résultats cliniques se sont révélés décevants. En effet, dans le cancer du sein l'utilisation d'un anticorps anti-IGF1R n'améliorait pas le pronostic [439] et dans le cancer du poumon l'absence de présélection des patients n'a pas permis de mettre en avant de bénéfice de la thérapie [440].

Des études rapportent le potentiel de la combinaison de traitement EGFR-TKI/Inhibiteurs de la voie PI3K sur des modèles de souris [441]. A l'heure actuelle aucun inhibiteur de la voie PI3K/AKT n'est disponible en clinique. Des molécules sont en cours d'évaluation dans les CBNPC comme le XL765 qui, en association avec l'erlotinib a montré une stabilisation de la maladie chez 30% des patients atteints de tumeurs solides [442, 443]. Des essais cliniques du GDC-0941 en association à l'erlotinib (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00975182), du BKM120 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01723800 ; NCT01911325) en association avec le gefinib (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01570296) ou l'erlotinib (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01487265) ont aussi été initiés.

Il serait intéressant de confirmer *in vivo* nos résultats sur l'association d'EGFR-TKI avec un inhibiteur de la voie PI3K/AKT ou de l'IGF1R avant d'évaluer ces combinaisons dans des essais cliniques chez les patients atteints d'adénocarcinome bronchique avec un *EGFR* sauvage et une mutation *KRAS*.

L'effet thérapeutique des TKI comme les EGFR-TKI ou le sorafenib est rarement observé en monothérapie sans sélection préalable des patients atteints de CBNPC ou d'HCC [78, 410], et la plupart des patients répondant à ces traitements développent des résistances [411, 420, 444]. Les EGFR-TKI ont un effet modeste en monothérapie chez les patients avec un HCC avancé [445, 446]. Le gefitinib peut toutefois être efficace dans les cellules de HCC à haute dose [447],

et en présence d'une transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) [448]. Dans les CBNPC, le sorafenib seul a montré une activité clinique en phase II [449], qui a été confirmée en phase III chez les patients avec un *KRAS* sauvage [450] mais pas muté [451]. Enfin les HDACi seuls ont peu d'effet dans le traitement des tumeurs solides [452].

Nos résultats *in vitro* et *in vivo* suggèrent fortement que des combinaisons de thérapies, en particulier d'EGFR-TKI et d'HDACi, pourraient augmenter l'efficacité thérapeutique des TKI chez les patients atteints de CBNPC ou de HCC. Nous montrons également une synergie des traitements gefitinib et vorinostat, *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes de CBNPC et de HCC. Des études précliniques ont également rapporté une efficacité accrue de l'inhibition conjointe de l'EGFR et des HDACs dans les cellules de CBNPC [116, 134, 407-409].

Un essai de phase I/II a montré la bonne tolérance de l'association du gefitinib et du vorinostat et son efficacité chez les patients atteints de CBNPC avec un *EGFR* muté mais pas chez les patients non sélectionnés préalablement [453]. Un autre essai de phase I/II évaluant l'association erlotinib/vorinostat dans les CBNPC a confirmé la bonne tolérance du traitement, mais n'a toutefois pas montré de bénéfice chez les patients avec un *EGFR* muté en rechute après traitement par EGFR-TKI [185]. Enfin une étude de phase II, associant l'erlotinib et l'entinostat (un HDACi de classe I) a montré une amélioration de la survie totale chez les patients atteints de CBNPC avec un haut niveau d'E-cadhérine mais pas sans sélection préalable des patients [454]. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'étude sur cette combinaison de traitements dans les HCC.

Nous montrons également l'efficacité de la combinaison du gefitinib et du sorafenib dans les cellules d'HCC et de CBNPC, confirmant l'intérêt de cette association de traitements montré dans les cellules de HCC *in vitro* et *in vivo* [455]. Enfin nous ne montrons pas de bénéfice de l'association du vorinostat avec le sorafenib dans les cellules de CBNPC et HCC. Un essai clinique de phase I, dans le cancer du rein, montre l'absence de réponse de cette combinaison de traitements, associée à de forts effets indésirables [456].

Ensemble nos données démontrent la nécessité de caractériser précisément les mécanismes de résistance mis en jeu pour chaque type tumoral afin d'identifier des cibles thérapeutiques et de proposer des combinaisons de traitements pour des populations de patients sélectionnés.

3. Utilisation de vecteurs pour le traitement des CBNPC

Afin de délivrer massivement et en même temps les combinaisons de molécules thérapeutiques au niveau du site tumoral [191], de protéger les molécules de la dégradation tout en augmentant leur efficacité thérapeutique [192], l'utilisation de vecteurs comme les nanoparticules peut être appropriée.

3.1. Choix du nanovecteur

Les systèmes polymériques ont une bonne stabilité en milieu biologique et une grande capacité de chargement de molécules. Ces systèmes ont généralement une longue circulation dans le sang et leur utilisation permet le contrôle de la libération des molécules thérapeutiques [199]. La possibilité de modifier leur surface et de produire des objets de tailles et de formes différentes offre de grandes possibilités d'évolution pour diminuer la captation hépatique et améliorer le ciblage actif. Enfin ces vecteurs permettent d'encapsuler des molécules hydrophobes, comme les traitements anticancéreux [226-228], et ont montré leur intérêt *in vivo* [225, 399-401]. Nous avons ainsi choisi une micelle polymérique à base de hyaluronane pour délivrer les combinaisons de traitements.

3.2. Impact de la forme et de la taille et spécificité pour les récepteurs CD44

Le hyaluronane entrant dans la composition des nanoparticules, est le ligand du récepteur CD44 surexprimé dans les CBNPC et pourrait permettre de réaliser un ciblage actif des tumeurs [321, 457], comme cela a été montré *in vitro* et *in vivo* avec plusieurs types de nanoparticules [225, 393, 395-399, 458, 459].

In vitro la fixation des Np30 sur les cellules tumorales suit un profil exponentiel, tandis que celle des Np300 suit un profil de type logarithmique. Ces données suggèrent que la liaison des Np300 sur les cellules est saturable, une caractéristique qui est retrouvée dans les liaisons spécifiques aux récepteurs. Au contraire la liaison de Np30 ne semble pas saturable. Nous avons montré que le hyaluronane de 100 kDa permet de déplacer la fixation des Np30 et des Np300, surtout sur les cellules exprimant le CD44 suggérant l'implication des récepteurs du

hyaluronane dans la liaison de nanoparticules. L'inhibition de la fixation des Np300 par l'anticorps bloquant anti-CD44 montre, au moins en partie, l'implication du récepteur CD44 dans la fixation des Np300. Le récepteur CD44 semble moins impliqué dans la fixation des Np30 aux cellules.

La liaison entre le hyaluronane et le CD44 dépend de la densité en récepteurs [309], de l'organisation spatiale du hyaluronane par rapport au CD44 [310] et de la longueur de la chaîne de hyaluronane [311]. Ainsi la géométrie des Np300 pourrait offrir une meilleure présentation du hyaluronane aux récepteurs, une plus grande surface de contact avec la cellule, et mimerait ainsi une longue chaîne de hyaluronane à haute affinité pour le récepteur CD44. Au contraire la géométrie des Np30 induirait une faible surface de contact et leur fort rayon de courbure serait moins favorable à la liaison des hyaluronanes sur le récepteur CD44. Ainsi les mécanismes de ciblage actif semblent être différents entre les Np30 et Np300. Ces résultats suggèrent l'implication d'autres récepteurs liant le hyaluronane dans la fixation des nanoparticules. RHAMM et TLR4 sont connus pour lier les petits fragments de hyaluronane [460, 461] et pourraient ainsi participer à la liaison de Np30.

3.3. Ciblage du récepteur CD44 dans les tumeurs pulmonaires *in vivo*

Le récepteur CD44 est exprimé de manière ubiquitaire, y compris par l'épithélium bronchique normal. La présence de tumeurs est étroitement liée à un environnement inflammatoire et donc à la présence de leucocytes [462] qui expriment le récepteur CD44 [463]. Nous avons cherché à valider le CD44 comme cible potentielle dans nos modèles de tumeurs pulmonaires.

La nébulisation d'un anticorps anti-CD44 fluorescent montre une meilleure rétention de l'anticorps dans les poumons avec des tumeurs que dans les poumons sains. De plus, l'anticorps est colocalisé avec les zones tumorales ou l'environnement tumoral dans les poumons, suggérant que le récepteur CD44 est une cible possible pour l'administration d'anticorps par nébulisation. La localisation précise de l'anticorps au niveau des cellules tumorales devra être confirmée sur coupes histologiques de poumons. De plus l'utilisation de modèles cellulaires dans lesquels l'expression du récepteur CD44 est invalidée (H358-shCD44 et A549-shCD44) devrait nous permettre d'identifier l'implication du CD44 des cellules tumorales dans le ciblage de l'anticorps anti-CD44.

La biodistribution des fragments de hyaluronanes de 5000 et 35000 Da fluorescents administrés par voie intraveineuse montre une forte accumulation hépatique, en accord avec les données de la littérature montrant une forte captation hépatique des fragments de hyaluronane par le récepteur HARE [355, 384]. Des études réalisées chez le rat montrent que la rétention hépatique est similaire pour les fragments de hyaluronane entre 10 et 100 kDa [464]. Cependant nous montrons que les fragments de hyaluronane de petites tailles (5000 Da) sont moins retenus dans le foie que ceux de 35000 Da et inversement dans les poumons.

La nébulisation des hyaluronanes de 5000 ou 35000 Da montre un signal décroissant au niveau pulmonaire durant 24h, suggérant une élimination des fragments qui reste à évaluer car l'absence de signal au niveau hépatique ou rénale ne nous permet pas de conclure sur leur processus d'élimination.

Enfin les hyaluronanes quelques soient leur taille et leur mode d'administration, ne semblent pas atteindre préférentiellement les tumeurs pulmonaires, par rapport aux poumons sains, suggérant que le hyaluronane doit être formulé en nanoparticules pour cibler activement les tumeurs exprimant le récepteur CD44.

Nos données *in vivo* montrent en effet une accumulation des Np30 et Np300 contenant du hyaluronane de 5000 Da dans les tumeurs après injection intraveineuse. L'analyse de coupes de poumons en microscopie confocale a confirmé la présence des nanoparticules dans les tumeurs. Le ciblage passif permet aux nanoparticules d'atteindre la tumeur tandis que le ciblage actif permet une meilleure rétention et une meilleure captation par les cellules exprimant le ligand [197, 198].

Le niveau supérieur des Np30 dans les tumeurs H358 et A549 par rapport aux poumons de souris saines et par comparaison aux Np300 pourrait être dû à leur temps de circulation plus long permettant une accumulation passive supérieure. Les tumeurs H358 ont une croissance plus lente et sont très bioactives tandis que les tumeurs A549 poussent plus rapidement, ont tendance à nécroser et à former des métastases. La nature des tumeurs H358 et A549 étant différente, l'accumulation des nanoparticules par effet EPR sera modifiée [195], expliquant ainsi probablement la meilleure captation des Np30 par les tumeurs A549.

De plus, les cellules A549 surexpriment le récepteur CD44, et fixent mieux les Np30 *in vitro* et *in vivo* que les cellules H358 suggérant ainsi un ciblage actif des tumeurs A549 *in vivo* par rapport à des souris sans tumeurs. Toutefois *in vitro* le CD44 ne semble pas impliqué dans la liaison des Np30 aux cellules. Pour pouvoir conclure sur un ciblage actif, il faudra comparer la

biodistribution des nanoparticules dans des modèles de tumeurs pulmonaires orthotopiques avec et sans expression du récepteur CD44 (H358-shCD44 ou A549-shCD44).

3.4. Mode d'administration des nanoparticules

Nous montrons qu'après injection intraveineuse les nanoparticules sont principalement retenues dans le foie. Cette captation hépatique des nanoparticules est probablement due à la présence du récepteur HARE liant le hyaluronane dans le foie [399], et à la captation des nanoparticules par le système réticuloendothélial du fait de leur charge négative [194]. La préinjection de fragments de hyaluroane pourrait permettre de saturer les récepteurs HARE et ainsi diminuer la captation hépatique. Malgré cela une petite fraction des nanoparticules s'accumule dans les tumeurs, montrant que la voie intraveineuse est intéressante pour atteindre les tumeurs et les métastases.

Les études de biodistribution ont été réalisées après une seule injection intraveineuse. Avant de poursuivre les investigations une étude de toxicité hépatique des nanoparticules et des nanoparticules chargées avec les molécules thérapeutiques injectées quotidiennement devra être réalisée. En l'absence de toxicité la voie intraveineuse pourra être envisagée pour des tests d'efficacité thérapeutique ultérieurs. Nous aimerions également évaluer le bénéfice de la préinjection

La voie aérienne pourrait permettre de contourner le foie et conduire ainsi une meilleure accumulation des nanoparticules dans les tumeurs pulmonaires. La nébulisation des Np30 ou Np300 ne nous a pas permis d'augmenter l'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs. Cette approche a déjà été utilisée avec des nanoparticules de gadolinium de 6 nm et a montré leur accumulation autour et dans les tumeurs pulmonaires avec une élimination rapide par voie rénale [260]. La nébulisation de nanoparticules de gélatine ciblant l'EGFR a aussi permis d'atteindre des tumeurs pulmonaires surexprimant l'EGFR [465]. La nébulisation de l'anticorps anti-CD44 dans les poumons porteurs de tumeurs pulmonaires nous a permis de montrer son accumulation dans les poumons avec des tumeurs. Une accumulation durable au niveau tumoral du cetuximab nébulisé dans les poumons de souris a aussi été rapporté [259, 277]. Ces données confirment la pertinence de l'emploi de la nébulisation dans la thérapie des CBNPC.

Les tumeurs que nous avons utilisées lors des expériences de nébulisation de l'anticorps anti-CD44 étaient de plus petite taille que celles utilisées pour la nébulisation des nanoparticules,

suggérant que la taille des tumeurs a permis à l'anticorps d'atteindre les régions tumorales mais pas aux nanoparticules.

Les images de bimodalité (μ CT, fluorescence 3D) montrent que la croissance tumorale prolongée conduit à la formation de tumeurs pulmonaires massives obstruant complètement l'arbre bronchique. Les pathologies responsables d'un rétrécissement des voies aériennes entraînent une distribution aberrante des molécules administrées par voie aérienne. L'obstruction bronchique empêche les nanoparticules d'atteindre les parties tumorales conduisant leur accumulation dans les zones saines des poumons [258, 266]. L'emploi de la nébulisation semble donc peu adapté pour le ciblage de tumeurs massives et obstruantes. La nébulisation paraît plus adaptée dans les adénocarcinomes lépidiques (comme H358) qui tapissent les parois des alvéoles plutôt que de former des tumeurs massives ou pour de multiples métastases disséminées dans le parenchyme pulmonaire [466].

Pour conclure sur l'accumulation possible des Np30 et Np300 par voie aérienne dans les tumeurs il nous faudra évaluer l'accumulation tumorale des nanoparticules sur des tumeurs présélectionnées permettant une répartition adéquate du spray. Dans la perspective d'un emploi en clinique de la voie aérienne, nous proposons l'utilisation des données d'imageries permettant la classification pTNM afin d'évaluer l'envahissement tumoral et de définir les patients pouvant être traités par nébulisation.

Enfin, nous observons une rétention d'au moins trois semaines dans les poumons. Cette rétention n'a pas provoqué d'effets indésirables chez les souris cependant une évaluation de la toxicité pulmonaire devrait être réalisée pour confirmer l'innocuité des nanoparticules [467].

3.5. Perspective d'amélioration du ciblage

Les tests de liaison des nanoparticules montrent *in vitro* une liaison partiellement dépendante du CD44. Le récepteur CD44 lie le hyaluronane lorsqu'il est activé par des facteurs de croissance. Il a été montré dans le cancer du sein que la forme activée du CD44 est présente dans le tissu tumoral et pas dans le tissu sain et qu'elle permet la liaison de nanoparticules à base de hyaluronane [458]. La fixation des nanoparticules au récepteur CD44 pourrait être grandement améliorée par un excès de récepteur sous forme activée. Dans un contexte de cellules tumorales résistantes aux EGFR-TKI et sécrétant de l'AREG nous proposons d'étudier le rôle des ligands de l'EGFR sur la liaison des nanoparticules au récepteur CD44. De plus il est nécessaire d'évaluer le niveau d'expression du récepteur CD44 et son état d'activation dans

des tumeurs pulmonaires humaines avant d'envisager une utilisation des nanoparticules en clinique.

L'affinité du récepteur CD44 pour les fragments de hyaluronane est directement dépendante de la longueur de ces fragments. Ainsi, l'utilisation de fragments de haut poids moléculaire pour la synthèse des nanoparticules pourrait augmenter leur affinité pour le récepteur CD44. En effet il a été montré que l'affinité des nanoparticules à base de hyaluronane envers le CD44 et leur internalisation dépend de la taille des fragments de hyaluronane [311, 396]. Toutefois, l'augmentation significative de la charge des nanoparticules due à la plus grande tailles des hyaluronanes pourrait augmenter leur captation par le système réticuloendothéliale et par le foie [194, 464].

Une autre stratégie visant à améliorer le ciblage actif des nanoparticules pourrait être de greffer un ligand spécifique des tumeurs sur les nanoparticules à base de hyaluronane. Le tripeptide RGD (R : Arginine – G : Glycine – D : Acide aspartique) permet de cibler l'intégrine $\alpha v \beta 3$ surexprimée dans les néo vaisseaux et dans certaines cellules tumorales [468]. L'utilisation de ce peptide a déjà permis le ciblage des tumeurs [469-473]. Nous proposons d'analyser la capacité de ciblage des Np30 avec du RGD *in vitro* sur des cellules exprimant ou non l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et *in vivo* dans des modèles tumoraux développés au laboratoire.

3.6. Effet thérapeutique des nanoparticules chargées avec la combinaison EGFR-TKI/ HDACi

Le temps de circulation plus long, la meilleure accumulation au niveau tumoral et l'internalisation par les cellules, nous amène à retenir la Np30 pour vectoriser la combinaison de traitement EGFR-TKI/HDACi (gefitinib/vorinostat).

Nous souhaitons évaluer le bénéfice thérapeutique des nanoparticules chargées avec cette combinaison de traitement par rapport aux nanoparticules « vides » ou aux molécules thérapeutiques seules sur la prolifération et l'apoptose des cellules en culture. Les fragments de hyaluronane de faible poids moléculaires sont connus pour activer la signalisation cellulaire [306]. Nous caractériserons aussi l'impact sur les voies de signalisation intracellulaires des nanoparticules vides ou chargées avec les combinaisons de traitements.

Nous développons également des modèles de culture 3D (sphéroïdes) qui miment les interactions cellulaires dans les tumeurs et avec le microenvironnement, grâce auxquels nous mesurerons l'effet des nanoparticules chargées ou non sur la croissance.

Nous évaluerons le bénéfice thérapeutique des combinaisons de molécules vectorisées par les nanoparticules *in vivo* sur les modèles de tumeurs orthotopiques pulmonaires après injection intraveineuse et par comparaison aux molécules non vectorisées.

Conclusion

Ce travail nous a permis de démontrer le rôle central de la voie des PI3K/AKT et de l'acétylation dans la résistance des CBNPC aux thérapies anti-EGFR. Nous avons caractérisé les mécanismes moléculaires responsables de cette résistance.

Nous montrons que l'utilisation de molécules inhibitrices d'histones déacétylases permet de sensibiliser les cellules de CBNPC et de HCC à l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro*. L'association d'HDACi (vorinostat-SAHA®) à un EGFR-TKI (gefitinib-IRESSA®) *in vivo* entraîne un important ralentissement de croissance tumorale chez les souris porteuses de CBNPC et de HCC, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la prise en charge thérapeutique de ces cancers. Le gefitinib et le vorinostat possèdent déjà une AMM. Les étapes de développement précliniques ont donc déjà été effectuées et validées, et cela confèrera un gain de temps précieux pour la mise en place de nouveaux protocoles.

Dans un contexte où le cancer pulmonaire est un problème majeur de santé publique et où la résistance aux traitements reste une des principales préoccupations des professionnels de santé, nos travaux pourraient avoir un impact important sur la prise en charge des patients porteurs d'adénocarcinomes bronchiques.

Les stratégies de ciblage de cellules d'intérêt avec des nanoparticules constituent des stratégies prometteuses pour la vectorisation de médicaments anticancéreux. Les vecteurs que nous avons évalués sont capables d'atteindre les tumeurs pulmonaires et les métastases. Nous cherchons actuellement à évaluer leur toxicité et le bénéfice thérapeutique qu'ils pourraient offrir par rapport aux molécules seules. En parallèle, nous cherchons à modifier ce vecteur pour améliorer ses capacités de ciblage et sa biodistribution, afin d'en proposer une version optimisée pour le traitement des tumeurs pulmonaires.

Références bibliographiques

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
2. Janssen-Heijnen, M.L., et al., *Variation in causes of death in patients with non-small cell lung cancer according to stage and time since diagnosis*. Ann Oncol, 2015.
3. Dela Cruz, C.S., L.T. Tanoue, and R.A. Matthay, *Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention*. Clin Chest Med, 2011. **32**(4): p. 605-44.
4. Karam-Hage, M., P.M. Cinciripini, and E.R. Gritz, *Tobacco use and cessation for cancer survivors: an overview for clinicians*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(4): p. 272-90.
5. Eilstein, D., et al., *Lung cancer mortality in France. Trend analysis and projection between 1975 and 2012, using a Bayesian age-period-cohort model*. Lung Cancer, 2008. **59**(3): p. 282-90.
6. Sangani, R.G. and A.J. Ghio, *Lung injury after cigarette smoking is particle related*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2011. **6**: p. 191-8.
7. Zhong, L., et al., *Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis*. Lung Cancer, 2000. **27**(1): p. 3-18.
8. Brambilla, E. and A. Gazdar, *Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies*. Eur Respir J, 2009. **33**(6): p. 1485-97.
9. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
10. Beasley, M.B., E. Brambilla, and W.D. Travis, *The 2004 World Health Organization classification of lung tumors*. Semin Roentgenol, 2005. **40**(2): p. 90-7.
11. van Meerbeeck, J.P., D.A. Fennell, and D.K. De Ruysscher, *Small-cell lung cancer*. Lancet, 2011. **378**(9804): p. 1741-55.
12. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1367-80.
13. Pisters, K.M., et al., *Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline*. J Clin Oncol, 2007. **25**(34): p. 5506-18.
14. Travis, W.D., et al., *International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(2): p. 244-85.
15. Travis, W.D., E. Brambilla, and G.J. Riely, *New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 992-1001.
16. Klinkovits, T., et al., *Effects of reclassification from the TNM-6 into the TNM-7 staging system in bronchoplastic resection for non-small cell lung cancer*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2011. **13**(1): p. 29-34.
17. Cogen, A., et al., *TNM-classification for lung cancer: from the 7th to the 8th edition*. Acta Chir Belg, 2011. **111**(6): p. 389-92.

18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
19. Barlesi, F., et al., *Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts)*. Journal Clinical oncology, 2013a. **suppl:abstr 8000**.
20. Barbacid, M., *ras genes*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 779-827.
21. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
22. Mascaux, C., et al., *The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*. Br J Cancer, 2005. **92**(1): p. 131-9.
23. Pao, W., et al., *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain*. PLoS Med, 2005. **2**(3): p. e73.
24. Greulich, H., et al., *Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants*. PLoS Med, 2005. **2**(11): p. e313.
25. Okabe, T., et al., *Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2046-53.
26. Sharma, S.V., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(3): p. 169-81.
27. Pao, W. and V.A. Miller, *Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions*. J Clin Oncol, 2005. **23**(11): p. 2556-68.
28. Shigematsu, H., et al., *Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(5): p. 339-46.
29. Shigematsu, H., et al., *Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1642-6.
30. Stewart, E.L., et al., *Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(1): p. 67-81.
31. Zandi, R., et al., *Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2013-23.
32. Soda, M., et al., *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 561-6.
33. Chan, B.A. and B.G. Hughes, *Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(1): p. 36-54.
34. Shaw, A.T., et al., *Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4247-53.
35. Comings, D.E., *A general theory of carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(12): p. 3324-8.

36. Sanchez-Cespedes, M., *Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis*. Lung Cancer, 2003. **40**(2): p. 111-21.
37. Landi, L. and F. Cappuzzo, *Pharmacotherapy targeting the EGFR oncogene in NSCLC*. Expert Opin Pharmacother, 2014. **15**(16): p. 2293-305.
38. Carpenter, G., L. King, Jr., and S. Cohen, *Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro*. Nature, 1978. **276**(5686): p. 409-10.
39. Warren, C.M. and R. Landgraf, *Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control*. Cell Signal, 2006. **18**(7): p. 923-33.
40. Wells, A., *EGF receptor*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(6): p. 637-43.
41. Burgess, A.W., et al., *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 541-52.
42. Massague, J. and A. Pandiella, *Membrane-anchored growth factors*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 515-41.
43. Holbro, T. and N.E. Hynes, *ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 195-217.
44. Beerli, R.R. and N.E. Hynes, *Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6071-6.
45. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-54.
46. Citri, A., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 54-65.
47. Zhang, H., et al., *ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2051-8.
48. Sergina, N.V. and M.M. Moasser, *The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets*. Trends Mol Med, 2007. **13**(12): p. 527-34.
49. Morgillo, F., et al., *Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 10100-11.
50. Hurbin, A., et al., *Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma*. J Pathol, 2011. **225**(1): p. 83-95.
51. Olayioye, M.A., et al., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
52. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 99-110.
53. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. Gene, 2006. **366**(1): p. 2-16.
54. Miettinen, P.J., et al., *Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 337-41.
55. Sibilio, M. and E.F. Wagner, *Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor*. Science, 1995. **269**(5221): p. 234-8.

56. Threadgill, D.W., et al., *Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype*. Science, 1995. **269**(5221): p. 230-4.
57. Herbst, R.S. and P.A. Bunn, Jr., *Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(16 Pt 1): p. 5813-24.
58. Prenzel, N., et al., *The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(1): p. 11-31.
59. Arteaga, C.L., *Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?* Oncologist, 2002. **7 Suppl 4**: p. 31-9.
60. Garcia de Palazzo, I.E., et al., *Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas*. Cancer Res, 1993. **53**(14): p. 3217-20.
61. Rusch, V., et al., *Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung*. Cancer Res, 1993. **53**(10 Suppl): p. 2379-85.
62. Strawn, L.M. and L.K. Shawver, *Tyrosine kinases in disease: overview of kinase inhibitors as therapeutic agents and current drugs in clinical trials*. Expert Opin Investig Drugs, 1998. **7**(4): p. 553-73.
63. Velu, T.J., *Structure, function and transforming potential of the epidermal growth factor receptor*. Mol Cell Endocrinol, 1990. **70**(3): p. 205-16.
64. Volm, M., P. Drings, and W. Wodrich, *Prognostic significance of the expression of c-fos, c-jun and c-erbB-1 oncogene products in human squamous cell lung carcinomas*. J Cancer Res Clin Oncol, 1993. **119**(9): p. 507-10.
65. Hirsch, F.R., et al., *Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis*. J Clin Oncol, 2003. **21**(20): p. 3798-807.
66. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. **19**(3): p. 183-232.
67. Umekita, Y., et al., *Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients*. Int J Cancer, 2000. **89**(6): p. 484-7.
68. Li, S., et al., *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab*. Cancer Cell, 2005. **7**(4): p. 301-11.
69. Kantarjian, H., et al., *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia*. N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 645-52.
70. Solomon, B.J., et al., *First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer*. N Engl J Med, 2014. **371**(23): p. 2167-77.
71. Reguart, N. and J. Remon, *Common EGFR-mutated subgroups (Del19/L858R) in advanced non-small-cell lung cancer: chasing better outcomes with tyrosine kinase inhibitors*. Future Oncol, 2015. **11**(8): p. 1245-57.
72. Yang, J.C.H., et al., *Overall survival (OS) in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring common (Del19/L858R) epidermal growth factor receptor mutations (EGFR mut): Pooled analysis of two large open-label*

- phase III studies (LUX-Lung 3 [LL3] and LUX-Lung 6 [LL6]) comparing afatinib with chemotherapy (CT). J Clin Oncol, 2014. 32(5s).*
73. Costanzo, R., et al., *Advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: current evidence and future perspectives. Expert Rev Anticancer Ther, 2013. 13(10): p. 1207-18.*
 74. Ward, W.H., et al., *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. Biochem Pharmacol, 1994. 48(4): p. 659-66.*
 75. Brehmer, D., et al., *Cellular targets of gefitinib. Cancer Res, 2005. 65(2): p. 379-82.*
 76. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. N Engl J Med, 2005. 353(2): p. 172-87.*
 77. Fry, D.W., *Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. Exp Cell Res, 2003. 284(1): p. 131-9.*
 78. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med, 2009. 361(10): p. 947-57.*
 79. Swaisland, H., et al., *Pharmacokinetics and tolerability of the orally active selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in healthy volunteers. Clin Pharmacokinet, 2001. 40(4): p. 297-306.*
 80. Swaisland, H.C., et al., *Exploring the relationship between expression of cytochrome P450 enzymes and gefitinib pharmacokinetics. Clin Pharmacokinet, 2006. 45(6): p. 633-44.*
 81. Rosell, R., et al., *Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol, 2012. 13(3): p. 239-46.*
 82. Stasi, I. and F. Cappuzzo, *Second generation tyrosine kinase inhibitors for the treatment of metastatic non-small-cell lung cancer. Transl Respir Med, 2014. 2: p. 2.*
 83. Kwak, E.L., et al., *Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(21): p. 7665-70.*
 84. Li, D., et al., *BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. Oncogene, 2008. 27(34): p. 4702-11.*
 85. Sequist, L.V., et al., *Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. J Clin Oncol, 2013. 31(27): p. 3327-34.*
 86. Engelman, J.A., et al., *PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. Cancer Res, 2007. 67(24): p. 11924-32.*
 87. Ramalingam, S.S., et al., *Randomized phase II study of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-human epidermal growth factor receptor inhibitor, versus erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol, 2012. 30(27): p. 3337-44.*

88. Sequist, L.V., et al., *Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(18): p. 3076-83.
89. Rabindran, S.K., et al., *Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3958-65.
90. Miller, V.A., et al., *Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(5): p. 528-38.
91. Katakami, N., et al., *LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both*. J Clin Oncol, 2013. **31**(27): p. 3335-41.
92. Eskens, F.A., et al., *A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours*. Br J Cancer, 2008. **98**(1): p. 80-5.
93. Kim, Y., et al., *The EGFR T790M mutation in acquired resistance to an irreversible second-generation EGFR inhibitor*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(3): p. 784-91.
94. Liao, B.C., C.C. Lin, and J.C. Yang, *Second and third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced nonsmall cell lung cancer*. Curr Opin Oncol, 2015. **27**(2): p. 94-101.
95. Cross, D.A., et al., *AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer*. Cancer Discov, 2014. **4**(9): p. 1046-61.
96. Jiang, T. and C. Zhou, *Clinical activity of the mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 in patients with EGFR inhibitor-resistant non-small cell lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2014. **3**(6): p. 370-2.
97. Walter, A.O., et al., *Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC*. Cancer Discov, 2013. **3**(12): p. 1404-15.
98. Steuer, C.E., F.R. Khuri, and S.S. Ramalingam, *The next generation of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of lung cancer*. Cancer, 2015. **121**(8): p. E1-6.
99. Kobayashi, S., et al., *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 786-92.
100. Balak, M.N., et al., *Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6494-501.
101. Costa, D.B., et al., *BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations*. PLoS Med, 2007. **4**(10): p. 1669-79; discussion 1680.
102. Sasaki, H., et al., *EGFR exon 20 insertion mutation in Japanese lung cancer*. Lung Cancer, 2007. **58**(3): p. 324-8.

103. Yun, C.H., et al., *The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2070-5.
104. Bean, J., et al., *MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20932-7.
105. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
106. Mazieres, J., et al., *Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives*. J Clin Oncol, 2013. **31**(16): p. 1997-2003.
107. Wang, S.E., et al., *HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. Cancer Cell, 2006. **10**(1): p. 25-38.
108. Erjala, K., et al., *Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(13): p. 4103-11.
109. Sos, M.L., et al., *PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3256-61.
110. Fidler, M.J., et al., *PTEN and PIK3CA gene copy numbers and poor outcomes in non-small cell lung cancer patients with gefitinib therapy*. Br J Cancer, 2011. **105**(12): p. 1920-6.
111. Ludovini, V., et al., *Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(4): p. 707-15.
112. Keohavong, P., et al., *Detection of K-ras mutations in lung carcinomas: relationship to prognosis*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(2): p. 411-8.
113. Rodenhuis, S., et al., *Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung*. N Engl J Med, 1987. **317**(15): p. 929-35.
114. Eberhard, D.A., et al., *Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 5900-9.
115. Ohashi, K., et al., *Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. E2127-33.
116. Nakagawa, T., et al., *EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2428-34.
117. Ng, K.P., et al., *A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer*. Nat Med, 2012. **18**(4): p. 521-8.

118. Nurwidya, F., et al., *Epithelial mesenchymal transition in drug resistance and metastasis of lung cancer*. Cancer Res Treat, 2012. **44**(3): p. 151-6.
119. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. Sci Transl Med, 2011. **3**(75): p. 75ra26.
120. Coll, J.L., et al., *Antitumor activity of bax and p53 naked gene transfer in lung cancer: in vitro and in vivo analysis*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(14): p. 2063-74.
121. Dubrez, L., et al., *Cell cycle arrest is sufficient for p53-mediated tumor regression*. Gene therapy, 2001. **8**(22): p. 1705-12.
122. Dubrez, L., et al., *Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(42): p. 38980-7.
123. Hurbin, A., et al., *Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(20): p. 19757-67.
124. Hurbin, A., et al., *Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(51): p. 49127-33.
125. Dubrez, L., et al., *Caffeine sensitizes human H358 cell line to p53-mediated apoptosis by inducing mitochondrial translocation and conformational change of BAX protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38980-7.
126. Addison, C.L., et al., *Plasma Transforming Growth Factor {alpha} and Amphiregulin Protein Levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21*. J Clin Oncol, 2010. **28**.
127. De Luca, A., et al., *Simultaneous blockage of different EGF-like growth factors results in efficient growth inhibition of human colon carcinoma xenografts*. Oncogene, 2000. **19**(51): p. 5863-71.
128. Castillo, J., et al., *Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells*. Cancer research, 2006. **66**(12): p. 6129-38.
129. Eckstein, N., et al., *Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 739-50.
130. Wang, X., et al., *The role of amphiregulin in exemestane-resistant breast cancer cells: evidence of an autocrine loop*. Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2259-65.
131. Ishikawa, N., et al., *Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9176-84.
132. Kakiuchi, S., et al., *Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839)*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(24): p. 3029-43.
133. Busser, B., et al., *Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers*. Molecular therapy, 2010. **18**(3): p. 528-35.

134. Busser, B., et al., *Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation*. Molecular therapy, 2010. **18**(3): p. 536-43.
135. Busser, B., et al., *Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation*. Mol Ther, 2010. **18**(3): p. 536-43.
136. Gomez, J.A., et al., *Bax-inhibiting peptides derived from Ku70 and cell-penetrating pentapeptides*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 4): p. 797-801.
137. Busser, B., et al., *Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers*. Mol Ther, 2010. **18**(3): p. 528-35.
138. Hurbin, A., et al., *Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma*. The Journal of pathology, 2011. **225**(1): p. 83-95.
139. Cadranet, J., et al., *IFCT-0401 Trial: a phase II study of gefitinib administered as first-line treatment in advanced adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma subtype*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(9): p. 1126-35.
140. Berger, S.L., *Molecular biology. The histone modification circus*. Science, 2001. **292**(5514): p. 64-5.
141. Cosgrove, M.S., J.D. Boeke, and C. Wolberger, *Regulated nucleosome mobility and the histone code*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1037-43.
142. Wade, P.A., *Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 693-8.
143. Noma, K., C.D. Allis, and S.I. Grewal, *Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1150-5.
144. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 769-84.
145. Robert, C. and F.V. Rassool, *HDAC inhibitors: roles of DNA damage and repair*. Adv Cancer Res, 2012. **116**: p. 87-129.
146. Buggy, J.J., et al., *Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 199-205.
147. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. Nature, 1999. **401**(6749): p. 188-93.
148. Avalos, J.L., K.M. Bever, and C. Wolberger, *Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme*. Mol Cell, 2005. **17**(6): p. 855-68.
149. Sasaki, H., et al., *Histone deacetylase 1 mRNA expression in lung cancer*. Lung Cancer, 2004. **46**(2): p. 171-8.
150. Minamiya, Y., et al., *Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung*. Lung Cancer, 2011. **74**(2): p. 300-4.

151. Bartling, B., et al., *Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma*. Lung Cancer, 2005. **49**(2): p. 145-54.
152. Jin, Z., et al., *Decreased expression of histone deacetylase 10 predicts poor prognosis of gastric cancer patients*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(9): p. 5872-9.
153. Osada, H., et al., *Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients*. Int J Cancer, 2004. **112**(1): p. 26-32.
154. Okudela, K., et al., *Expression of HDAC9 in lung cancer--potential role in lung carcinogenesis*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(1): p. 213-20.
155. Jung, K.H., et al., *HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins*. J Cell Biochem, 2012. **113**(6): p. 2167-77.
156. Mottamal, M., et al., *Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents*. Molecules, 2015. **20**(3): p. 3898-941.
157. Zhang, J. and Q. Zhong, *Histone deacetylase inhibitors and cell death*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(20): p. 3885-901.
158. Kaewpiboon, C., et al., *Upregulation of Stat1-HDAC4 confers resistance to etoposide through enhanced multidrug resistance 1 expression in human A549 lung cancer cells*. Mol Med Rep, 2015. **11**(3): p. 2315-21.
159. Wang, L., et al., *Depletion of HDAC6 enhances cisplatin-induced DNA damage and apoptosis in non-small cell lung cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44265.
160. Lin, Y.C., et al., *DUSP1 expression induced by HDAC1 inhibition mediates gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancers*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(2): p. 428-38.
161. Gao, Y.S., C.C. Hubbert, and T.P. Yao, *The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11219-26.
162. Kamemura, K., et al., *Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **374**(1): p. 84-9.
163. Subramanian, C., et al., *HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma*. Neoplasia, 2011. **13**(8): p. 726-34.
164. Grbesa, I., et al., *Expression of sirtuin 1 and 2 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124670.
165. Hwang, K.E., et al., *Pemetrexed induces apoptosis in malignant mesothelioma and lung cancer cells through activation of reactive oxygen species and inhibition of sirtuin 1*. Oncol Rep, 2015. **33**(5): p. 2411-9.
166. Cheng, D., et al., *K-Ras promotes the non-small lung cancer cells survival by cooperating with sirtuin 1 and p27 under ROS stimulation*. Tumour Biol, 2015.
167. Sun, L., et al., *A SUMOylation-dependent pathway regulates SIRT1 transcription and lung cancer metastasis*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(12): p. 887-98.
168. Hoffmann, G., et al., *A novel sirtuin 2 (SIRT2) inhibitor with p53-dependent pro-apoptotic activity in non-small cell lung cancer*. J Biol Chem, 2014. **289**(8): p. 5208-16.

169. Li, H., et al., *SIRT3 regulates cell proliferation and apoptosis related to energy metabolism in non-small cell lung cancer cells through deacetylation of NMNAT2*. *Int J Oncol*, 2013. **43**(5): p. 1420-30.
170. Kim, E.J. and Y.S. Juhnn, *Cyclic AMP Signaling Reduces Sirtuin 6 Expression in Non-small Cell Lung Cancer Cells by Promoting Ubiquitin-Proteasomal Degradation via Inhibition of the Raf-MEK-ERK (Raf/Mitogen-activated Extracellular Signal-regulated Kinase/Extracellular Signal-regulated Kinase) Pathway*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(15): p. 9604-13.
171. Miller, T.A., D.J. Witter, and S. Belvedere, *Histone deacetylase inhibitors*. *J Med Chem*, 2003. **46**(24): p. 5097-116.
172. Falkenberg, K.J. and R.W. Johnstone, *Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders*. *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(9): p. 673-91.
173. Mann, B.S., et al., *Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(8): p. 2318-22.
174. Piekarz, R.L., et al., *Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(32): p. 5410-7.
175. Whittaker, S.J., et al., *Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(29): p. 4485-91.
176. Foss, F., et al., *A Phase II trial of Belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory peripheral or cutaneous T-cell lymphoma*. *Br J Haematol*, 2015. **168**(6): p. 811-9.
177. Mann, B.S., et al., *FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma*. *Oncologist*, 2007. **12**(10): p. 1247-52.
178. Villalba, J.M. and F.J. Alcain, *Sirtuin activators and inhibitors*. *Biofactors*, 2012. **38**(5): p. 349-59.
179. Hu, J., H. Jing, and H. Lin, *Sirtuin inhibitors as anticancer agents*. *Future Med Chem*, 2014. **6**(8): p. 945-66.
180. Peng, L. and E. Seto, *Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer*. *Handb Exp Pharmacol*, 2011. **206**: p. 39-56.
181. Traynor, A.M., et al., *Vorinostat (NSC# 701852) in patients with relapsed non-small cell lung cancer: a Wisconsin Oncology Network phase II study*. *J Thorac Oncol*, 2009. **4**(4): p. 522-6.
182. Vansteenkiste, J., et al., *Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer*. *Invest New Drugs*, 2008. **26**(5): p. 483-8.
183. Misset, J., et al., *Vorinostat in combination with gemcitabine plus platinum in patients with advanced non-small-cell lung cancer: A phase I, dose-escalation study*.

Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**.

184. Schneider, B.J., et al., *Phase I study of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, NSC 701852) in combination with docetaxel in patients with advanced and relapsed solid malignancies*. Invest New Drugs, 2012. **30**(1): p. 249-57.
185. Reguart, N., et al., *Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression*. Lung Cancer, 2014. **84**(2): p. 161-7.
186. Ramalingam, S.S., et al., *Carboplatin and Paclitaxel in combination with either vorinostat or placebo for first-line therapy of advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 56-62.
187. Reid, T., et al., *Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2004. **45**(3): p. 381-6.
188. Ruiz, R., L.E. Raez, and C. Rolfo, *Entinostat (SNDX-275) for the treatment of non-small cell lung cancer*. Expert Opin Investig Drugs, 2015: p. 1-9.
189. Vendetti, F.P., et al., *Evaluation of azacitidine and entinostat as sensitization agents to cytotoxic chemotherapy in preclinical models of non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(1): p. 56-70.
190. Juergens, R.A. and C.M. Rudin, *Aberrant epigenetic regulation: a central contributor to lung carcinogenesis and a new therapeutic target*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2013.
191. Prabhu, R.H., V.B. Patravale, and M.D. Joshi, *Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 1001-18.
192. Accardo, A., et al., *Receptor binding peptides for target-selective delivery of nanoparticles encapsulated drugs*. Int J Nanomedicine, 2014. **9**: p. 1537-57.
193. Albanese, A., P.S. Tang, and W.C. Chan, *The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems*. Annu Rev Biomed Eng, 2012. **14**: p. 1-16.
194. Dufort, S., L. Sancey, and J.L. Coll, *Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(2): p. 179-89.
195. Prabhakar, U., et al., *Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2412-7.
196. Maeda, H., H. Nakamura, and J. Fang, *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(1): p. 71-9.
197. Felice, B., et al., *Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **41**: p. 178-95.
198. Choi, C.H., et al., *Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(3): p. 1235-40.

199. Perez-Herrero, E. and A. Fernandez-Medarde, *Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy*. Eur J Pharm Biopharm, 2015.
200. Jatzkewitz, H., [Incorporation of physiologically-active substances into a colloidal blood plasma substitute. I. Incorporation of mescaline peptide into polyvinylpyrrolidone]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1954. **297**(3-6): p. 149-56.
201. Bangham, A.D. and R.W. Horne, *Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope*. J Mol Biol, 1964. **8**: p. 660-8.
202. Scheffel, U., et al., *Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system*. J Nucl Med, 1972. **13**(7): p. 498-503.
203. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 283-318.
204. Moghimi, S.M. and J. Szebeni, *Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(6): p. 463-78.
205. Jokerst, J.V., et al., *Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy*. Nanomedicine (Lond), 2011. **6**(4): p. 715-28.
206. Byrne, J.D., T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas, *Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(15): p. 1615-26.
207. Bozzuto, G. and A. Molinari, *Liposomes as nanomedical devices*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 975-99.
208. Pinto-Alphandary, H., A. Andremont, and P. Couvreur, *Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications*. Int J Antimicrob Agents, 2000. **13**(3): p. 155-68.
209. Hosta-Rigau, L., et al., *Cholesterol--a biological compound as a building block in bionanotechnology*. Nanoscale, 2013. **5**(1): p. 89-109.
210. Milla, P., F. Dosio, and L. Cattel, *PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery*. Curr Drug Metab, 2012. **13**(1): p. 105-19.
211. Gabizon, A. and D. Papahadjopoulos, *Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6949-53.
212. Anton, N., J.P. Benoit, and P. Saulnier, *Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review*. J Control Release, 2008. **128**(3): p. 185-99.
213. Liu, Y., et al., *Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers*. Anal Chem, 2007. **79**(6): p. 2221-9.
214. Alric, C., et al., *Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(18): p. 5908-15.

215. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnol Adv, 2009. **27**(1): p. 76-83.
216. Faure, A.C., et al., *Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings*. Small, 2009. **5**(22): p. 2565-75.
217. Ahren, M., et al., *Synthesis and characterization of PEGylated Gd₂O₃ nanoparticles for MRI contrast enhancement*. Langmuir, 2010. **26**(8): p. 5753-62.
218. Ittrich, H., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy*. Rofo, 2013. **185**(12): p. 1149-66.
219. Maggiorella, L., et al., *Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles*. Future Oncol, 2012. **8**(9): p. 1167-81.
220. Cheon, J. and J.H. Lee, *Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology*. Acc Chem Res, 2008. **41**(12): p. 1630-40.
221. Vallet-Regi, M., F. Balas, and D. Arcos, *Mesoporous materials for drug delivery*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(40): p. 7548-58.
222. Michalet, X., et al., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 2005. **307**(5709): p. 538-44.
223. Cai, W. and X. Chen, *Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging*. Nat Protoc, 2008. **3**(1): p. 89-96.
224. Huang, H.C., et al., *Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy*. J Control Release, 2011. **155**(3): p. 344-57.
225. Upadhyay, K.K., et al., *Biomimetic doxorubicin loaded polymersomes from hyaluronan-block-poly(gamma-benzyl glutamate) copolymers*. Biomacromolecules, 2009. **10**(10): p. 2802-8.
226. Torchilin, V.P., *Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives*. Pharm Res, 2007. **24**(1): p. 1-16.
227. Kwon, G.S., *Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2003. **20**(5): p. 357-403.
228. Sutton, D., et al., *Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery*. Pharm Res, 2007. **24**(6): p. 1029-46.
229. Lee, S.W., et al., *Development of docetaxel-loaded intravenous formulation, Nanoxel-PM using polymer-based delivery system*. J Control Release, 2011. **155**(2): p. 262-71.
230. Cabral, H., et al., *Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size*. Nat Nanotechnol, 2011. **6**(12): p. 815-23.
231. Nishiyama, N., et al., *Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8977-83.
232. Ahn, H.K., et al., *A phase II trial of Cremorphor EL-free paclitaxel (Genexol-PM) and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **74**(2): p. 277-82.
233. Yoo, H.S. and T.G. Park, *Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles*. J Control Release, 2004. **96**(2): p. 273-83.
234. Torchilin, V.P., et al., *Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6039-44.

235. Nasongkla, N., et al., *cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. **43**(46): p. 6323-7.
236. Vega, J., et al., *Targeting doxorubicin to epidermal growth factor receptors by site-specific conjugation of C225 to poly(L-glutamic acid) through a polyethylene glycol spacer*. *Pharm Res*, 2003. **20**(5): p. 826-32.
237. Hoffman, A.S., *Stimuli-responsive polymers: biomedical applications and challenges for clinical translation*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013. **65**(1): p. 10-6.
238. Faisant, N., J. Siepmann, and J.P. Benoit, *PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release*. *Eur J Pharm Sci*, 2002. **15**(4): p. 355-66.
239. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010. **75**(1): p. 1-18.
240. Hasan, A.S., et al., *Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release*. *Int J Pharm*, 2007. **344**(1-2): p. 53-61.
241. Huang, Y.Y., T.W. Chung, and T.W. Tzeng, *A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst*. *Int J Pharm*, 1999. **182**(1): p. 93-100.
242. Cheng, R., et al., *Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery*. *Biomaterials*, 2013. **34**(14): p. 3647-57.
243. Kost, J. and R. Langer, *Responsive polymeric delivery systems*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001. **46**(1-3): p. 125-48.
244. Hofheinz, R.D., et al., *Liposomal encapsulated anti-cancer drugs*. *Anticancer Drugs*, 2005. **16**(7): p. 691-707.
245. Fritze, A., et al., *Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(10): p. 1633-40.
246. Eloy, J.O., et al., *Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014. **123**: p. 345-63.
247. Gabizon, A., et al., *Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes*. *Cancer Res*, 1994. **54**(4): p. 987-92.
248. Muller, H.J., et al., *Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols*. *Br J Haematol*, 2000. **110**(2): p. 379-84.
249. Borghorst, S., et al., *Comparative pharmacokinetic/pharmacodynamic characterisation of a new pegylated recombinant E. coli L-asparaginase preparation (MC0609) in Beagle dog*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014. **74**(2): p. 367-78.
250. Nyman, D.W., et al., *Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(31): p. 7785-93.

251. Behzadi, S., et al., *Protein corona change the drug release profile of nanocarriers: the "overlooked" factor at the nanobio interface*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **123**: p. 143-9.
252. Reimondez-Troitino, S., et al., *Nanotherapies for the treatment of ocular diseases*. Eur J Pharm Biopharm, 2015.
253. do Carmo, F.A., et al., *Therapeutic nanosystems for oral administration of insulin*. Curr Pharm Biotechnol, 2014. **15**(7): p. 620-8.
254. Ensign, L.M., R. Cone, and J. Hanes, *Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review*. J Control Release, 2014. **190**: p. 500-14.
255. Moreno, E., et al., *Nanoparticles as multifunctional devices for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis*. Expert Opin Drug Deliv, 2014. **11**(4): p. 579-97.
256. Paranjpe, M. and C.C. Muller-Goymann, *Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 5852-73.
257. Hureauux, J., et al., *Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel*. Eur J Pharm Biopharm, 2009. **73**(2): p. 239-46.
258. Labiris, N.R. and M.B. Dolovich, *Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications*. Br J Clin Pharmacol, 2003. **56**(6): p. 588-99.
259. Guilleminault, L., et al., *Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system*. J Control Release, 2014. **196**: p. 344-54.
260. Dufort, S., et al., *Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization*. Small, 2015. **11**(2): p. 215-21.
261. Guillon, A., et al., *Aerosol Route to Administer Teicoplanin in Mechanical Ventilation: In Vitro Study, Lung Deposition and Pharmacokinetic Analyses in Pigs*. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2015.
262. Pham, D.D., E. Fattal, and N. Tsapis, *Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment*. Int J Pharm, 2015. **478**(2): p. 517-29.
263. Herve, V., et al., *VEGF neutralizing aerosol therapy in primary pulmonary adenocarcinoma with K-ras activating-mutations*. MAbs, 2014. **6**(6): p. 1638-48.
264. Respaud, R., et al., *Nebulization as a delivery method for mAbs in respiratory diseases*. Drug Deliv, 2014. **12**(6): p. 1027-1039.
265. Hayes, A.J. and S. Bakand, *Toxicological perspectives of inhaled therapeutics and nanoparticles*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2014. **10**(7): p. 933-47.
266. Zarogoulidis, P., et al., *Inhaled chemotherapy in lung cancer: future concept of nanomedicine*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 1551-72.
267. Patton, J.S. and P.R. Byron, *Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(1): p. 67-74.
268. Bitonti, A.J., et al., *Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9763-8.

269. Low, S.C., et al., *Oral and pulmonary delivery of FSH-Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis*. Hum Reprod, 2005. **20**(7): p. 1805-13.
270. Shevchenko, I.T. and G.E. Resnik, *Inhalation of chemical substances and oxygen in radiotherapy of bronchial cancer*. Neoplasma, 1968. **15**(4): p. 419-26.
271. Tatsumura, T., et al., *Further study of nebulisation chemotherapy, a new chemotherapeutic method in the treatment of lung carcinomas: fundamental and clinical*. Br J Cancer, 1993. **68**(6): p. 1146-9.
272. Otterson, G.A., et al., *Phase I study of inhaled Doxorubicin for patients with metastatic tumors to the lungs*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1246-52.
273. Lemarie, E., et al., *Aerosolized gemcitabine in patients with carcinoma of the lung: feasibility and safety study*. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2011. **24**(6): p. 261-70.
274. Verschraegen, C.F., et al., *Clinical evaluation of the delivery and safety of aerosolized liposomal 9-nitro-20(s)-camptothecin in patients with advanced pulmonary malignancies*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(7): p. 2319-26.
275. Wittgen, B.P., et al., *Phase I study of aerosolized SLIT cisplatin in the treatment of patients with carcinoma of the lung*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(8): p. 2414-21.
276. Chou, A.J., et al., *Phase Ib/Ila study of sustained release lipid inhalation targeting cisplatin by inhalation in the treatment of patients with relapsed/progressive osteosarcoma metastatic to the lung*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**.
277. Maillet, A., et al., *The airways, a novel route for delivering monoclonal antibodies to treat lung tumors*. Pharm Res, 2011. **28**(9): p. 2147-56.
278. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. Curr Opin Chem Biol, 2003. **7**(5): p. 626-34.
279. James, M.L. and S.S. Gambhir, *A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications*. Physiol Rev, 2012. **92**(2): p. 897-965.
280. Ntziachristos, V., *Fluorescence molecular imaging*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 1-33.
281. Koenig, A., et al., *Fluorescence diffuse optical tomographic (fDOT) system for small animal studies*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2007. **2007**: p. 2626-9.
282. Koenig, A., et al., *Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies*. J Biomed Opt, 2010. **15**(1): p. 016016.
283. Koenig, A., et al., *In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography*. J Biomed Opt, 2008. **13**(1): p. 011008.
284. Koenig, A., et al., *Whole body small animal examination with a diffuse optical tomography instrument*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2007. **571**(1-2): p. 56-59.
285. McDonald, J.A. and T.D. Camenisch, *Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide*. Glycoconj J, 2002. **19**(4-5): p. 331-9.
286. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.

287. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
288. Tammi, M.I., A.J. Day, and E.A. Turley, *Hyaluronan and homeostasis: a balancing act*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4581-4.
289. Lennon, F.E. and P.A. Singleton, *Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in lung pathobiology*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(2): p. L137-47.
290. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
291. Spicer, A.P. and J.Y. Tien, *Hyaluronan and morphogenesis*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2004. **72**(1): p. 89-108.
292. Moretto, P., et al., *Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 167283.
293. Tammi, R., et al., *Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 35111-22.
294. Culty, M., H.A. Nguyen, and C.B. Underhill, *The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan*. J Cell Biol, 1992. **116**(4): p. 1055-62.
295. Jackson, D.G., et al., *LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis*. Trends Immunol, 2001. **22**(6): p. 317-21.
296. Prevo, R., et al., *Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19420-30.
297. Zhou, B., et al., *Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE)*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37733-41.
298. Deed, R., et al., *Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan*. Int J Cancer, 1997. **71**(2): p. 251-6.
299. Rooney, P., et al., *Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells*. J Cell Sci, 1993. **105 (Pt 1)**: p. 213-8.
300. Sugahara, K.N., et al., *Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32259-65.
301. Dicker, K.T., et al., *Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions*. Acta Biomater, 2014. **10**(4): p. 1558-70.
302. Itano, N. and K. Kimata, *Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(4): p. 268-74.
303. Toole, B.P., *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 528-39.
304. Naor, D., R.V. Sionov, and D. Ish-Shalom, *CD44: structure, function, and association with the malignant process*. Adv Cancer Res, 1997. **71**: p. 241-319.
305. Kaya, G., et al., *Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 996-1007.

306. Naor, D., et al., *CD44 in cancer*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2002. **39**(6): p. 527-79.
307. Isacke, C.M. and H. Yarwood, *The hyaluronan receptor, CD44*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(7): p. 718-21.
308. Naor, D., et al., *Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(4): p. 260-7.
309. English, N.M., J.F. Lesley, and R. Hyman, *Site-specific de-N-glycosylation of CD44 can activate hyaluronan binding, and CD44 activation states show distinct threshold densities for hyaluronan binding*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3736-42.
310. Kaindl, T., et al., *Spatio-temporal patterns of pancreatic cancer cells expressing CD44 isoforms on supported membranes displaying hyaluronic acid oligomers arrays*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42991.
311. Mizrahy, S., et al., *Hyaluronan-coated nanoparticles: the influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response*. J Control Release, 2011. **156**(2): p. 231-8.
312. Lesley, J., et al., *Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 431-7.
313. Orian-Rousseau, V. and J. Sleeman, *CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals*. Adv Cancer Res, 2014. **123**: p. 231-54.
314. Turley, E.A., P.W. Noble, and L.Y. Bourguignon, *Signaling properties of hyaluronan receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4589-92.
315. Green, S.J., G. Tarone, and C.B. Underhill, *Aggregation of macrophages and fibroblasts is inhibited by a monoclonal antibody to the hyaluronate receptor*. Exp Cell Res, 1988. **178**(2): p. 224-32.
316. Underhill, C. and A. Dorfman, *The role of hyaluronic acid in intercellular adhesion of cultured mouse cells*. Exp Cell Res, 1978. **117**(1): p. 155-64.
317. Perschl, A., et al., *Role of CD44 cytoplasmic domain in hyaluronan binding*. Eur J Immunol, 1995. **25**(2): p. 495-501.
318. Knudson, W., G. Chow, and C.B. Knudson, *CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan*. Matrix Biol, 2002. **21**(1): p. 15-23.
319. Caputo, C.B., et al., *Characterization of fragments produced by clostripain digestion of proteoglycans from the Swarm rat chondrosarcoma*. Arch Biochem Biophys, 1980. **204**(1): p. 220-33.
320. Zhao, S., et al., *Prognostic value of CD44 variant exon 6 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(16): p. 6761-6.
321. Luo, Z., et al., *Prognostic value of CD44 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(7): p. 3632-46.
322. Suzuki, H. and K. Yamashiro, *Reduced expression of CD44 v3 and v6 is related to invasion in lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2002. **38**(2): p. 137-41.
323. Pirinen, R., et al., *Reduced expression of CD44v3 variant isoform is associated with unfavorable outcome in non-small cell lung carcinoma*. Hum Pathol, 2000. **31**(9): p. 1088-95.

324. Lakshman, M., V. Subramaniam, and S. Jothy, *CD44 negatively regulates apoptosis in murine colonic epithelium via the mitochondrial pathway*. Exp Mol Pathol, 2004. **76**(3): p. 196-204.
325. Lakshman, M., et al., *CD44 promotes resistance to apoptosis in human colon cancer cells*. Exp Mol Pathol, 2004. **77**(1): p. 18-25.
326. Zhao, P., et al., *CD44 promotes Kras-dependent lung adenocarcinoma*. Oncogene, 2013. **32**(43): p. 5186-90.
327. Yoshida, M., et al., *Induction of apoptosis by anti-CD44 antibody in human chondrosarcoma cell line SW1353*. Biomed Res, 2008. **29**(1): p. 47-52.
328. Song, G., et al., *HI44a, an anti-CD44 monoclonal antibody, induces differentiation and apoptosis of human acute myeloid leukemia cells*. Leuk Res, 2004. **28**(10): p. 1089-96.
329. Rajasagi, M., et al., *Anti-CD44 induces apoptosis in T lymphoma via mitochondrial depolarization*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(6B): p. 1453-67.
330. Bates, R.C., et al., *A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells*. Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5275-83.
331. Lin, Y.H. and H.F. Yang-Yen, *The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46024-30.
332. Ahrens, T., et al., *CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(1): p. 93-101.
333. Bourguignon, L.Y., et al., *Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27913-8.
334. Tsatas, D., et al., *EGF receptor modifies cellular responses to hyaluronan in glioblastoma cell lines*. J Clin Neurosci, 2002. **9**(3): p. 282-8.
335. Yasuda, M., et al., *CD44 stimulation down-regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis of lung cancer cells*. Int Immunol, 2001. **13**(10): p. 1309-19.
336. Ohashi, R., et al., *Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell*. Cancer Lett, 2007. **252**(2): p. 225-34.
337. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 35-48.
338. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 163-76.
339. Okamoto, I., et al., *Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors*. Am J Pathol, 2002. **160**(2): p. 441-7.
340. Sugahara, K.N., et al., *Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5861-8.
341. Bourguignon, L.Y., M. Shiina, and J.J. Li, *Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation*

- resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. Adv Cancer Res, 2014. 123: p. 255-75.*
342. Slevin, M., et al., *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. Matrix Biol, 2007. 26(1): p. 58-68.*
 343. Maxwell, C.A., J. McCarthy, and E. Turley, *Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? J Cell Sci, 2008. 121(Pt 7): p. 925-32.*
 344. Shigeishi, H., K. Higashikawa, and M. Takechi, *Role of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers. J Cancer Res Clin Oncol, 2014. 140(10): p. 1629-40.*
 345. Augustin, F., et al., *Receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) expression is prognostically important in both nodal negative and nodal positive large cell lung cancer. J Clin Pathol, 2015. 68(5): p. 368-73.*
 346. Mouta Carreira, C., et al., *LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. Cancer Res, 2001. 61(22): p. 8079-84.*
 347. Jackson, D.G., *The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. Trends Cardiovasc Med, 2003. 13(1): p. 1-7.*
 348. Jackson, D.G., *Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. APMIS, 2004. 112(7-8): p. 526-38.*
 349. Wu, M., et al., *Low molecular weight hyaluronan induces lymphangiogenesis through LYVE-1-mediated signaling pathways. PLoS One, 2014. 9(3): p. e92857.*
 350. Ramani, P., J.V. Dungwa, and M.T. May, *LYVE-1 upregulation and lymphatic invasion correlate with adverse prognostic factors and lymph node metastasis in neuroblastoma. Virchows Arch, 2012. 460(2): p. 183-91.*
 351. Matsumoto, N., et al., *Prognostic value of LYVE-1-positive lymphatic vessel in tongue squamous cell carcinomas. Anticancer Res, 2010. 30(6): p. 1897-903.*
 352. Ozmen, F., et al., *Relationship between LYVE-1, VEGFR-3 and CD44 gene expressions and lymphatic metastasis in gastric cancer. World J Gastroenterol, 2011. 17(27): p. 3220-8.*
 353. Qin, Z., et al., *Cooperative roles for emmprin and LYVE-1 in the regulation of chemoresistance for primary effusion lymphoma. Leukemia, 2011. 25(10): p. 1598-609.*
 354. Harris, E.N., J.A. Weigel, and P.H. Weigel, *The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin. J Biol Chem, 2008. 283(25): p. 17341-50.*
 355. Weigel, J.A., et al., *A blocking antibody to the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) inhibits hyaluronan clearance by perfused liver. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9808-12.*
 356. Pandey, M.S., et al., *The cytoplasmic domain of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) contains multiple endocytic motifs targeting coated pit-mediated internalization. J Biol Chem, 2008. 283(31): p. 21453-61.*

357. Pandey, M.S. and P.H. Weigel, *A hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) link domain N-glycan is required for extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) signaling in response to the uptake of hyaluronan but not heparin, dermatan sulfate, or acetylated low density lipoprotein (LDL)*. J Biol Chem, 2014. **289**(32): p. 21807-17.
358. Kyosseva, S.V., E.N. Harris, and P.H. Weigel, *The hyaluronan receptor for endocytosis mediates hyaluronan-dependent signal transduction via extracellular signal-regulated kinases*. J Biol Chem, 2008. **283**(22): p. 15047-55.
359. Pandey, M.S., et al., *The hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) activates NF-kappaB-mediated gene expression in response to 40-400-kDa, but not smaller or larger, hyaluronans*. J Biol Chem, 2013. **288**(20): p. 14068-79.
360. Kotteas, E.A., et al., *The intercellular cell adhesion molecule-1 (icam-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis*. Anticancer Res, 2014. **34**(9): p. 4665-72.
361. Shao, Y., et al., *Reduction of intercellular adhesion molecule 1 may play a role in anti-inflammatory effect of hyaluronic acid in a rat model of severe non-bacterial cystitis*. World J Urol, 2013. **31**(3): p. 535-40.
362. Hiramitsu, T., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 mediates the inhibitory effects of hyaluronan on interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts via down-regulation of NF-kappaB and p38*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(7): p. 824-32.
363. McCourt, P.A., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30081-4.
364. Lisignoli, G., et al., *Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1800-7.
365. Ruyschaert, J.M. and C. Loney, *Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling*. Biochim Biophys Acta, 2015.
366. Skandalis, S.S., et al., *Advances and advantages of nanomedicine in the pharmacological targeting of hyaluronan-CD44 interactions and signaling in cancer*. Adv Cancer Res, 2014. **123**: p. 277-317.
367. Ghosh, S.C., S. Neslihan Alpay, and J. Klostergaard, *CD44: a validated target for improved delivery of cancer therapeutics*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(7): p. 635-50.
368. Heider, K.H., et al., *Characterization of a high-affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas*. Cancer Immunol Immunother, 1996. **43**(4): p. 245-53.
369. Stroemer, J.W., et al., *Safety and biodistribution of 99mTechnetium-labeled anti-CD44v6 monoclonal antibody BIWA 1 in head and neck cancer patients*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3046-55.
370. Verel, I., et al., *Tumor targeting properties of monoclonal antibodies with different affinity for target antigen CD44V6 in nude mice bearing head-and-neck cancer xenografts*. Int J Cancer, 2002. **99**(3): p. 396-402.

371. Colnot, D.R., et al., *Safety, biodistribution, pharmacokinetics, and immunogenicity of 99mTc-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.* Cancer Immunol Immunother, 2003. **52**(9): p. 576-82.
372. Borjesson, P.K., et al., *Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 2): p. 3961S-72S.
373. Sauter, A., et al., *Pharmacokinetics, immunogenicity and safety of bivatuzumab mertansine, a novel CD44v6-targeting immunoconjugate, in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.* Int J Oncol, 2007. **30**(4): p. 927-35.
374. Riechelmann, H., et al., *Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma.* Oral Oncol, 2008. **44**(9): p. 823-9.
375. Vugts, D.J., et al., *Preclinical evaluation of 89Zr-labeled anti-CD44 monoclonal antibody RG7356 in mice and cynomolgus monkeys: Prelude to Phase 1 clinical studies.* MAbs, 2014. **6**(2): p. 567-75.
376. Coradini, D., et al., *Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line.* Int J Cancer, 1999. **81**(3): p. 411-6.
377. Coradini, D., et al., *Inhibition of hepatocellular carcinomas in vitro and hepatic metastases in vivo in mice by the histone deacetylase inhibitor HA-But.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(14): p. 4822-30.
378. Luo, Y. and G.D. Prestwich, *Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate.* Bioconjug Chem, 1999. **10**(5): p. 755-63.
379. Luo, Y., M.R. Ziebell, and G.D. Prestwich, *A hyaluronic acid-taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells.* Biomacromolecules, 2000. **1**(2): p. 208-18.
380. Saravanakumar, G., et al., *Hydrotopic hyaluronic acid conjugates: Synthesis, characterization, and implications as a carrier of paclitaxel.* Int J Pharm, 2010. **394**(1-2): p. 154-61.
381. Xin, D., Y. Wang, and J. Xiang, *The use of amino acid linkers in the conjugation of paclitaxel with hyaluronic acid as drug delivery system: synthesis, self-assembled property, drug release, and in vitro efficiency.* Pharm Res, 2010. **27**(2): p. 380-9.
382. Rosato, A., et al., *HYTAD1-p20: a new paclitaxel-hyaluronic acid hydrosoluble bioconjugate for treatment of superficial bladder cancer.* Urol Oncol, 2006. **24**(3): p. 207-15.
383. Banzato, A., et al., *A paclitaxel-hyaluronan bioconjugate targeting ovarian cancer affords a potent in vivo therapeutic activity.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3598-606.
384. Banzato, A., et al., *Biodistribution imaging of a paclitaxel-hyaluronan bioconjugate.* Nucl Med Biol, 2009. **36**(5): p. 525-33.
385. Gibbs, P., et al., *Hyaluronan-Irinotecan improves progression-free survival in 5-fluorouracil refractory patients with metastatic colorectal cancer: a randomized phase II trial.* Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **67**(1): p. 153-63.

386. Rosenthal, M.A., et al., *Phase I and pharmacokinetic evaluation of intravenous hyaluronic acid in combination with doxorubicin or 5-fluorouracil*. Chemotherapy, 2005. **51**(2-3): p. 132-41.
387. Gibbs, P., et al., *A pilot human evaluation of a formulation of irinotecan and hyaluronic acid in 5-fluorouracil-refractory metastatic colorectal cancer patients*. Chemotherapy, 2009. **55**(1): p. 49-59.
388. Lee, H., K. Lee, and T.G. Park, *Hyaluronic acid-paclitaxel conjugate micelles: synthesis, characterization, and antitumor activity*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(6): p. 1319-25.
389. Jain, A. and S.K. Jain, *In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors*. Eur J Pharm Sci, 2008. **35**(5): p. 404-16.
390. Kumar, A., et al., *Development of hyaluronic acid-Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides*. Nanomedicine, 2007. **3**(2): p. 132-7.
391. Bachar, G., et al., *Hyaluronan-grafted particle clusters loaded with Mitomycin C as selective nanovectors for primary head and neck cancers*. Biomaterials, 2011. **32**(21): p. 4840-8.
392. Peer, D. and R. Margalit, *Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models*. Neoplasia, 2004. **6**(4): p. 343-53.
393. Dufay Wojcicki, A., et al., *Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: physico-chemical characterization and in vitro targeting of the CD44 receptor*. J Control Release, 2012. **162**(3): p. 545-52.
394. Taetz, S., et al., *Hyaluronic acid-modified DOTAP/DOPE liposomes for the targeted delivery of anti-telomerase siRNA to CD44-expressing lung cancer cells*. Oligonucleotides, 2009. **19**(2): p. 103-16.
395. Arpicco, S., G. De Rosa, and E. Fattal, *Lipid-Based Nanovectors for Targeting of CD44-Overexpressing Tumor Cells*. J Drug Deliv, 2013. **2013**: p. 860780.
396. Arpicco, S., et al., *Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine*. Eur J Pharm Biopharm, 2013. **85**(3 Pt A): p. 373-80.
397. Dalla Pozza, E., et al., *Targeting gemcitabine containing liposomes to CD44 expressing pancreatic adenocarcinoma cells causes an increase in the antitumoral activity*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(5): p. 1396-404.
398. Surace, C., et al., *Lipoplexes targeting the CD44 hyaluronic acid receptor for efficient transfection of breast cancer cells*. Mol Pharm, 2009. **6**(4): p. 1062-73.
399. Upadhyay, K.K., et al., *In vitro and in vivo evaluation of docetaxel loaded biodegradable polymersomes*. Macromol Biosci, 2010. **10**(5): p. 503-12.
400. Upadhyay, K.K., et al., *The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(gamma-benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes*. Biomaterials, 2010. **31**(10): p. 2882-92.
401. Upadhyay, K.K., et al., *The in vivo behavior and antitumor activity of doxorubicin-loaded poly(gamma-benzyl L-glutamate)-block-hyaluronan polymersomes in Ehrlich ascites tumor-bearing BalB/c mice*. Nanomedicine, 2012. **8**(1): p. 71-80.

402. Hurbin, A., et al., *Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49127-33.
403. Hurbin, A., et al., *Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19757-67.
404. Jeannot, V., et al., *The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism*. Int J Cancer, 2013.
405. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nat Nanotechnol, 2007. **2**(12): p. 751-60.
406. Addison, C.L., et al., *Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21*. J Clin Oncol, 2010. **28**(36): p. 5247-56.
407. Chen, M.C., et al., *The HDAC inhibitor, MPT0E028, enhances erlotinib-induced cell death in EGFR-TKI-resistant NSCLC cells*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e810.
408. Jeannot, V., et al., *The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism*. Int J Cancer, 2014. **134**(11): p. 2560-71.
409. Witta, S.E., et al., *ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC)*. Ann Oncol, 2009. **20**(4): p. 689-95.
410. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2008. **359**(4): p. 378-90.
411. Siegel, A.B., et al., *Sorafenib: where do we go from here?* Hepatology, 2010. **52**(1): p. 360-9.
412. Baradari, V., et al., *Histone deacetylase inhibitor MS-275 alone or combined with bortezomib or sorafenib exhibits strong antiproliferative action in human cholangiocarcinoma cells*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(33): p. 4458-66.
413. Park, M.A., et al., *Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(10): p. 1648-62.
414. Zhang, G., et al., *Vorinostat and sorafenib synergistically kill tumor cells via FLIP suppression and CD95 activation*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5385-99.
415. Heinicke, U. and S. Fulda, *Chemosensitization of rhabdomyosarcoma cells by the histone deacetylase inhibitor SAHA*. Cancer Lett, 2014.
416. Qhattal, H.S. and X. Liu, *Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes*. Mol Pharm, 2011. **8**(4): p. 1233-46.
417. Institut National du, C., *Survie attendue des patients atteints de cancers en France : état des lieux*. 2010.

418. *Note de cadrage-Cancer du poumon: évaluation de la pertinence d'un dépistage des populations fortement exposées au tabac en France* Haute autorité de sante, 2014.
419. Institut National du, C., *Cancer du poumon, Bilan initial, collection Recommandations et référentiels*. 2011.
420. Hirsch, F.R., et al., *Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(3): p. 373-84.
421. Altomare, D.A. and J.R. Testa, *Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7455-64.
422. Bellacosa, A., et al., *Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting*. Adv Cancer Res, 2005. **94**: p. 29-86.
423. Brognard, J., et al., *Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation*. Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 3986-97.
424. Cappuzzo, F., et al., *Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(15): p. 1133-41.
425. Pao, W., et al., *KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib*. PLoS Med, 2005. **2**(1): p. e17.
426. Ihle, N.T., et al., *Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(3): p. 228-39.
427. Roberts, P.J., et al., *Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy?* J Clin Oncol, 2010. **28**(31): p. 4769-77.
428. Gama, V., et al., *Hdm2 is a ubiquitin ligase of Ku70-Akt promotes cell survival by inhibiting Hdm2-dependent Ku70 destabilization*. Cell Death Differ, 2009. **16**(5): p. 758-69.
429. Cohen, H.Y., et al., *Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis*. Mol Cell, 2004. **13**(5): p. 627-38.
430. Jeong, J., et al., *SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70*. Exp Mol Med, 2007. **39**(1): p. 8-13.
431. Sundaresan, N.R., et al., *SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6384-401.
432. Cohen, H.Y., et al., *Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **305**(5682): p. 390-2.
433. Yoshioka, T., et al., *Combination of a novel HDAC inhibitor OBP-801/YM753 and a PI3K inhibitor LY294002 synergistically induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells due to increase of Bim with accumulation of ROS*. Gynecol Oncol, 2013. **129**(2): p. 425-32.
434. Ma, J., et al., *Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines*. Mol Med Rep, 2015. **11**(6): p. 4525-31.

435. Quan, P., et al., *Effects of targeting endometrial stromal sarcoma cells via histone deacetylase and PI3K/AKT/mTOR signaling*. Anticancer Res, 2014. **34**(6): p. 2883-97.
436. Ellis, L., et al., *Combinatorial antitumor effect of HDAC and the PI3K-Akt-mTOR pathway inhibition in a Pten deficient model of prostate cancer*. Oncotarget, 2013. **4**(12): p. 2225-36.
437. Lee, Y., et al., *Inhibition of IGF1R signaling abrogates resistance to afatinib (BIBW2992) in EGFR T790M mutant lung cancer cells*. Mol Carcinog, 2015.
438. Guix, M., et al., *Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins*. J Clin Invest, 2008. **118**(7): p. 2609-19.
439. Robertson, J.F., et al., *Ganitumab with either exemestane or fulvestrant for postmenopausal women with advanced, hormone-receptor-positive breast cancer: a randomised, controlled, double-blind, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2013. **14**(3): p. 228-35.
440. Weickhardt, A., et al., *A phase I/II study of erlotinib in combination with the anti-insulin-like growth factor-1 receptor monoclonal antibody IMC-A12 (cixutumumab) in patients with advanced non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(2): p. 419-26.
441. Xie, M., et al., *gamma Secretase inhibitor BMS-708163 reverses resistance to EGFR inhibitor via the PI3K/Akt pathway in lung cancer*. J Cell Biochem, 2015. **116**(6): p. 1019-27.
442. Gadgeel, S.M. and A. Wozniak, *Preclinical rationale for PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors as therapy for epidermal growth factor receptor inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer*. Clin Lung Cancer, 2013. **14**(4): p. 322-32.
443. Janne, P.A., et al., *Phase I safety and pharmacokinetic study of the PI3K/mTOR inhibitor SAR245409 (XL765) in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumors*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(3): p. 316-23.
444. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors*. Sci Transl Med, 2011. **3**(75): p. 75ra26.
445. Philip, P.A., et al., *Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(27): p. 6657-63.
446. Thomas, M.B., et al., *Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma*. Cancer, 2007. **110**(5): p. 1059-67.
447. Hopfner, M., et al., *Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2004. **41**(6): p. 1008-16.
448. Fuchs, B.C., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells*. Cancer Res, 2008. **68**(7): p. 2391-9.
449. Dingemans, A.M., et al., *A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced (Stage IIIb or IV) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(3): p. 743-51.
450. Kim, E.S., et al., *The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer*. Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 44-53.

451. Paz-Ares, L.G., et al., *Phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of gemcitabine/cisplatin alone or with sorafenib for the first-line treatment of advanced, nonsquamous non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(25): p. 3084-92.
452. Thurn, K.T., et al., *Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer*. Future Oncol, 2011. **7**(2): p. 263-83.
453. Han, J.Y., et al., *Phase I/II study of gefitinib (Iressa((R))) and vorinostat (IVORI) in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **75**(3): p. 475-83.
454. Witta, S.E., et al., *Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy*. J Clin Oncol, 2012. **30**(18): p. 2248-55.
455. Ezzoukhry, Z., et al., *EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib*. Int J Cancer, 2012. **131**(12): p. 2961-9.
456. Dasari, A., et al., *A phase I study of sorafenib and vorinostat in patients with advanced solid tumors with expanded cohorts in renal cell carcinoma and non-small cell lung cancer*. Invest New Drugs, 2013. **31**(1): p. 115-25.
457. Penno, M.B., et al., *Expression of CD44 in human lung tumors*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1381-7.
458. Yang, C., et al., *Selective killing of breast cancer cells expressing activated CD44 using CD44 ligand-coated nanoparticles in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2015.
459. Alshaer, W., et al., *Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells*. Bioconjug Chem, 2014.
460. Gao, F., et al., *Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing*. Clin Invest Med, 2008. **31**(3): p. E106-16.
461. Dang, S., et al., *Stimulation of TLR4 by LMW-HA induces metastasis in human papillary thyroid carcinoma through CXCR7*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 712561.
462. Samadi, A.K., et al., *A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation*. Semin Cancer Biol, 2015.
463. Zarbock, A., et al., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6743-51.
464. Svanovsky, E., et al., *The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with ¹¹¹In after intravenous administration to rats*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2008. **33**(3): p. 149-57.
465. Tseng, C.L., et al., *Targeting efficiency and biodistribution of biotinylated-EGF-conjugated gelatin nanoparticles administered via aerosol delivery in nude mice with lung cancer*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 3014-22.
466. Gagnadoux, F., et al., *Aerosolized chemotherapy*. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2008. **21**(1): p. 61-70.

467. Fattal, E., et al., *Lung toxicity of biodegradable nanoparticles*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(10): p. 2852-64.
468. Sancey, L., et al., *Clustering and internalization of integrin $\alpha v \beta 3$ with a tetrameric RGD-synthetic peptide*. Mol Ther, 2009. **17**(5): p. 837-43.
469. Danhier, F., A. Le Breton, and V. Preat, *RGD-based strategies to target $\alpha v \beta 3$ integrin in cancer therapy and diagnosis*. Mol Pharm, 2012. **9**(11): p. 2961-73.
470. Garanger, E., et al., *New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors*. Mol Ther, 2005. **12**(6): p. 1168-75.
471. Jin, Z.H., et al., *In vivo optical imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 41.
472. Dufort, S., et al., *Targeted delivery of a proapoptotic peptide to tumors in vivo*. J Drug Target, 2011. **19**(7): p. 582-8.
473. Morlieras, J., et al., *Functionalization of small rigid platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors overexpressing $\alpha v \beta 3$ -integrins*. Bioconjug Chem, 2013. **24**(9): p. 1584-97.

Annexes

ANNEXE I – Classification OMS des tumeurs épithéliales malignes pulmonaires
Adaptée d'après (Beasley, Brambilla, et al. 2005).

- Carcinome épidermoïde
 - Papillaire
 - A cellules claires
 - A petites cellules
 - Basaloïde
- Carcinome à petites cellules
- Carcinome à petites cellules combiné
- Adénocarcinome
 - Adénocarcinome sous-type mixte
- Adénocarcinome acineux
 - Adénocarcinome papillaire
 - Carcinome bronchioloalvéolaire
 - Non-mucineux
 - Mucineux
 - Mixte mucineux et non-mucineux ou indéterminé
 - Adénocarcinome solide avec formation de mucine
 - Adénocarcinome fœtal
 - Adénocarcinome mucineux (colloïde)
 - Cystadénocarcinome mucineux
 - Adénocarcinome à cellules en bague à chaton
 - Adénocarcinome à cellules claires
- Carcinome à grandes cellules
 - Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
 - Carcinome neuroendocrine à grandes cellules combiné
 - Carcinome basaloïde
 - Carcinome de type lymphoépithélial
 - Carcinome à cellules claires
 - Carcinome à grandes cellules avec phénotype rhabdoïde
- Carcinome adénoquameux
- Carcinome sarcomatoïde
 - Carcinome pléomorphe
 - Carcinome à cellules fusiformes
 - Carcinome à cellules géantes
 - Carcinosarcome
 - Blastome pulmonaire
- Tumeur carcinoïde
 - Carcinoïde typique
 - Carcinoïde atypique
- Carcinome de type carcinome des glandes salivaires
 - Carcinome mucoépidermoïde
 - Carcinome adénoïde kystique
 - Carcinome épithélial-myoépithélial

ANNEXE II. 7^{ème} édition de la classification pathologique TNM

(Goldstraw, Crowley et al. 2007)

- **TX** : Tumeur ne peut être évaluée ou est démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie.
- **T0** : Pas d'évidence de tumeur primitive.
- **Tis** : Carcinome in situ.
- **T1** : Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronchique lobaire (c'est-à-dire pas la bronche souche).
 - T1a : Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension
 - T1b : Tumeur de plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension
- **T2** : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes :
 - atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène
 - invasion de la plèvre viscérale
 - présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre l'ensemble du poumon.
 - T2a : Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension
 - T2b: Tumeur de plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension
- **T3** : Tumeur de plus de 7 cm ; ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleurale ou pariétale ou le péricarde ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; ou associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe.

- **T4** : Tumeur de toutes tailles envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, coeur, grands vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, oesophage, corps vertébral, carène; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint.
- **NX** : les ganglions ne peuvent pas être évalués
- **N0** : pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale
- **N1** : métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct
- **N2** : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou souscarinaux
- **N3** : métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou controlatéraux

- **MX** : les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées
- **M0** : absence de métastase à distance
- **M1** : métastase à distance
 - M1a : Nodule(s) tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin
 - M1b : Métastases à distance

IDENTIFICATION ET VECTORISATION DE COMBINAISONS DE TRAITEMENTS POUR LA THERAPIE DE TUMEURS PULMONAIRES RESISTANTES AUX INHIBITEURS DE TYROSINE KINASE DE L'EGFR.

Responsable d'environ 30000 décès/an en France, le cancer du poumon est un problème de santé publique majeur. Un des enjeux actuels est d'adapter le traitement du cancer du poumon pour proposer des thérapeutiques ciblées plus efficaces et moins agressives. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (EGFR-TKI, gefitinib et erlotinib) constituent un réel progrès pour le traitement des cancers du poumon. Cependant, des mécanismes de résistance ont été décrits et des traitements combinés de thérapies ciblées avec des EGFR-TKI pourraient permettre de surmonter les résistances dans les cancers du poumon.

Dans ce contexte, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la résistance à ces traitements. Nous montrons que l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT joue un rôle majeur dans la résistance aux EGFR-TKI, en inhibant l'apoptose par des mécanismes dépendant de l'acétylation. Les histones déacétylases (HDACs) et les sirtuines interviennent dans ces mécanismes de résistance, en modulant l'activation de la voie PI3K/AKT et l'apoptose. Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs des HDACs (HDACi) et des sirtuines permettent de restaurer la sensibilité aux EGFR-TKI. Ces résultats confirment l'intérêt thérapeutique de l'association EGFR-TKI/HDACi et montrent le potentiel thérapeutique d'associer des inhibiteurs de l'EGFR et de la voie PI3K/AKT pour contourner la résistance aux EGFR-TKI.

Les molécules thérapeutiques doivent atteindre spécifiquement le site tumoral, nécessitant parfois de les protéger contre leur dégradation, de réduire leurs effets indésirables, et de contrôler leur libération dans le temps et l'espace, à l'aide de transporteurs. Ainsi dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons évalué les capacités de ciblage des tumeurs pulmonaires de nanoparticules à base de copolymère amphiphile, contenant une partie polysaccharidique hydrophile (le hyaluronane) et une partie polypeptidique hydrophobe (le poly(γ -benzyl L-glutamate, PBLG). Nos travaux mettent en évidence la capacité de ciblage tumoral de ces nanoparticules injectées par voie intraveineuse, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques. Notre objectif est de charger les combinaisons de traitements EGFR-TKI/HDACi que nous avons identifiées dans ces vecteurs, afin de traiter les tumeurs pulmonaires résistantes aux EGFR-TKI.

IDENTIFICATION AND VECTORIZATION OF COMBINATIONS OF DRUGS FOR THE TREATMENT OF LUNG TUMORS RESISTANT TO EGFR TYROSINE KINASE INHIBITORS.

Responsible of 30000 deaths each year in France, lung cancer is a major public health problem. One of the current challenges is to adapt the treatment of lung cancer to offer more effective and less aggressive targeted therapies. EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI, gefitinib and erlotinib) represent a real progress in lung cancer therapy. However resistance mechanisms have been described and combination of targeted therapy with EGFR-TKI could overcome resistance in lung cancer.

In this context, we studied mechanisms involved in resistance to EGFR-TKI. We show that PI3K/AKT activation is a major pathway leading to EGFR-TKI resistance leading to apoptosis inhibition through acetylation-dependent mechanisms. Histone deacetylase (HDACs) and sirtuin are involved in these mechanisms and modulate PI3K/AKT activation and apoptosis. The use of HDACs inhibitors (HDACi) and sirtuin inhibitors thus restores the sensitivity to EGFR-TKI. Altogether these results confirm the therapeutic effect of the EGFR-TKI/HDACi combination and show the therapeutic potential of the association of EGFR and PI3K/AKT inhibitors to overcome EGFR-TKI resistance.

Therapeutic molecules must specifically reach the tumor site, sometimes requiring to protect them against degradation, to reduce their side effects, and to control their release in time and space, using transporters. In the second part of this thesis, we have thus evaluated the lung tumors targeting capabilities of amphiphilic copolymer-based nanoparticles, containing an hydrophilic polysaccharidic block (hyaluronan) and an hydrophobic polypeptidic block (the poly(γ -benzyl L-glutamate PBLG). Our work highlights the tumor targeting capability of these nanoparticles injected intravenously, offering new lung cancer therapy perspectives. Our aim is to load the drugs combination (EGFR-TKI/HDACi) in these vectors, to treat the lung tumors resistant to EGFR-TKI.

Mots Clés : Cancer du poumon, Imagerie, Vectorisation, EGFR-TKI, Résistance

Keywords : Lung cancer, Imagery, Drug targeting, EGFR-TKI, Resistance

Centre de recherche INSERM U823 - Institut Albert Bonniot
Equipe 5 : « Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer »