



HAL
open science

Signalisation nucléaire de l'IGF-1R et résistance aux thérapies anti-EGFR dans les cancers du poumon

Marie Guérard

► **To cite this version:**

Marie Guérard. Signalisation nucléaire de l'IGF-1R et résistance aux thérapies anti-EGFR dans les cancers du poumon. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV085 . tel-01685284

HAL Id: tel-01685284

<https://theses.hal.science/tel-01685284>

Submitted on 16 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire et oncogénèse**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marie GUÉRARD

Thèse dirigée par **Dr. Sylvie GAZZERI** et
co-dirigée par **Dr. Amandine HURBIN**

Thèse préparée au sein de l'**Institute for Advanced Biosciences (IAB)**
INSERM U1209 - UMR 5309 - Université Grenoble Alpes

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences pour le Vivant**

Signalisation nucléaire de l'IGF-1R et résistance aux thérapies anti-EGFR dans les cancers du poumon

Thèse soutenue publiquement le **21 septembre 2016**, devant le jury
composé de :

Mme Christelle DESBOIS-MOUTHON

Paris, rapporteur

Mme Véronique MAGUER-SATTA

Lyon, rapporteur

Mme Laurence LAFANECHERE

Grenoble, examinateur

Mme Marie WISLEZ

Paris, examinateur, Président

Mme Amandine HURBIN

Grenoble, Co-directrice de thèse

et Mme Sylvie GAZZERI

Grenoble, Directrice de thèse.



En souvenir d'Adrien & Bébert

Remerciements

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier l'association AGIR A DOM, qui a financé mes trois premières années de thèse, et le Fonds de dotation de "Recherche en Santé Respiratoire" ainsi que la Fondation du Souffle, qui m'ont permis de réaliser ma quatrième année de thèse.

Je remercie vivement le Docteur Christelle DESBOIS-MOUTHON et le Docteur Véronique MAGUER-SATTA d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci également au Docteur Laurence LAFANECHERE et au Professeur Marie WISLEZ d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je tiens à adresser tous mes remerciements à mes deux directrices de thèse : Docteur Sylvie GAZZERI et Docteur Amandine HURBIN. Vous avez été très présentes et vous avez toujours été à l'écoute des problèmes que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse. Merci également de m'avoir donné ma chance, moi qui n'avais pas le profil "classique" pour une thèse en biologie.

Je remercie également le Docteur Béatrice EYMIN et le Docteur Jean-Luc COLL qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans leur équipe respective au sein de l'Institute for Advanced Biosciences. Merci pour votre œil aiguisé et vos questions toujours pertinentes qui nous poussent à ouvrir notre réflexion.

Un énorme merci à mes deux techniciens préférés : Céline BARRIAL-LAMPREIA et Pascal PERRON ! Merci pour votre énergie, votre bonne humeur, tous vos conseils et le temps que vous m'avez accordés. Sans vous le laboratoire ne serait pas le même...

Je souhaite aussi remercier Thomas ROBIN, stagiaire M1 de l'UTC de Compiègne, qui a beaucoup apporté à ce travail en mettant au point une toute nouvelle technique pour l'équipe : la PLA. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi.

Je remercie les autres membres de l'équipe EYMIN : Chérine ABOU-FAYCAL, Floriane ALBERT, Anaïs BEAUMONT, Asma BOUDRIA, Delphine DAYDE, Lola MARQUE, Sophie MICHALLET, Virginie ROUYRE...

Je remercie Sandrine DUFORT, ma comparse de pâtisserie. Je garderai de très bons souvenirs de tous les bons moments que nous avons passés, avec Céline, à cuisiner toutes les trois.

Je remercie les autres membres de l'équipe COLL : Mélanie ARBOLEAS, Mona BELDJOUDI, Benoit BUSSE, Yoon CHOI, Morgane COUVET, Pauline GILSON, Julien GRAVIER, Mélanie GUIDETTI, Maxime HENRY, Thibault JACQUET, Victor JEANNOT, Tao JIA, Véronique JOSSERAND, Jonathan LAVAUD, Xavier LEGUEVEL, Annie MOLLA, Clément MILET, Lucie SANCEY, Fabien THOREAU, Julien VOLLAIRE et Laëtitia VANWONTERGHEM.

Merci à Olivier DESTAING et aux membres de la plateforme de microscopie de l'IAB, Alexei GRICHINE, Mylène PEZET et Jacques MAZZEGA, sans qui mon travail sur l'optogénétique n'aurait pu voir le jour.

Je remercie également les "Rennais" qui malgré les distances qui nous séparent sont présents et en particulier Elodie et Lou pour leurs oreilles attentives.

Je remercie tout particulièrement mes parents et mon frère qui m'ont toujours soutenu dans mes choix.

Enfin, merci à Romain, mon compagnon, qui malgré l'éloignement a toujours été là au quotidien pour m'écouter et m'épauler tout au long de ces quatre années de travail. Maintenant, à nous les voyages !

Sommaire

Sommaire

Publications et Formations	1
Résumé.....	7
Abstract.....	11
Liste des figures et des tableaux.....	15
Liste des abbréviations	21
Introduction	27
I. Le cancer broncho-pulmonaire	29
A. Généralités sur les cancers du poumon	29
1. Le cancer du poumon en quelques chiffres : épidémiologie	29
2. Données étiologiques.....	30
3. Classifications des cancers du poumon	31
1) Classification histologique selon l’OMS.....	31
2) Classification pathologique TNM selon l’UICC.....	33
B. Les cancers bronchiques non-à-petites cellules	35
1. Les caractéristiques de la tumorigenèse	35
2. Les caractéristiques moléculaires des CBNPC.....	36
C. Prise en charge thérapeutique des CBNPC	39
1. Les stades I et II.....	40
2. Le stade III.....	41
3. Le stade IV.....	41
II. Le récepteur de l’EGF dans les CBNPC.....	45
A. L’EGFR, récepteur à activité tyrosine kinase	45
1. La famille HER.....	45
2. Les ligands de la famille HER.....	46
3. Activation de l’EGFR et voies de signalisation.....	47
1) Le mécanisme d’activation de l’EGFR	47
2) Les voies de signalisation de l’EGFR	48

4.	Le trafic intracellulaire de l'EGFR.....	51
1)	L'internalisation de l'EGFR.....	51
2)	Le recyclage et la dégradation de l'EGFR	52
3)	La translocation mitochondriale.....	53
4)	La translocation nucléaire.....	53
5.	La signalisation nucléaire de l'EGFR.....	55
1)	La co-régulation transcriptionnelle.....	55
2)	La phosphorylation de protéines cibles	56
3)	L'interaction protéine-protéine.....	56
B.	Les altérations de l'EGFR dans les CBNPC	59
1.	Les mutations de l'EGFR	59
2.	Haut niveau de copies du gène et surexpression protéique de l'EGFR.....	60
3.	La localisation nucléaire de l'EGFR	61
C.	L'EGFR : une cible thérapeutique privilégiée dans la prise en charge des CBNPC.....	62
1.	Les anticorps monoclonaux anti-EGFR	63
2.	Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR.....	64
1)	Les différents EGFR-TKI.....	64
2)	Les facteurs de sensibilité aux EGFR-TKI.....	67
3)	Les facteurs de résistance primaire aux EGFR-TKI.....	68
4)	La résistance acquise en réponse aux EGFR-TKI.....	70
III.	L'Amphiréguline.....	75
A.	L'Amphiréguline : structure et régulation.....	75
1.	Le gène de l'Areg	75
2.	La structure protéique de l'Areg.....	75
3.	La régulation de l'expression de l'Areg	78
1)	La régulation transcriptionnelle de l'Areg	78
2)	La régulation post-transcriptionnelle de l'Areg	79
4.	La régulation de la distribution subcellulaire de l'Areg	79
B.	Les fonctions de l'amphiréguline.....	81
1.	Le mode d'action de l'Areg.....	81

2. Les fonctions physiologiques de l'Areg	82
3. Le rôle de l'Areg dans les cancers	83
4. Le rôle de l'Areg dans la réponse aux traitements	85
IV. Le Récepteur de l'IGF-1 dans les CBNPC	89
A. L'IGF-1R et l'axe de signalisation de l'IGF	89
1. L'IGF-1R	89
1) La structure de l'IGF-1R	89
2) Les récepteurs hybrides	91
2. Les ligands de l'IGF-1R	91
3. Activation de l'IGF-1R et voies de signalisation	93
1) Le mécanisme d'activation de l'IGF-1R	93
2) Les voies de signalisation de l'IGF-1R	93
4. Le trafic intracellulaire de l'IGF-1R	94
1) La dégradation et le recyclage de l'IGF-1R	95
2) La translocation nucléaire de l'IGF-1R	96
5. La signalisation nucléaire de l'IGF-1R	97
B. IGF-1R et CBNPC	98
1. Les altérations de l'IGF-1R dans les CBNPC	98
2. L'IGF-1R dans la réponse aux traitements	100
3. L'IGF-1R comme cible thérapeutique	101
1) Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R	101
2) Les anticorps anti-IGF-1R	102
3) Les traitements anti-IGF-1R/EGFR-TKI : une combinaison prometteuse ?	103
Objectifs du travail de thèse	105
Résultats	109
A. Présentation de l'étude	111
B. Résultats	112
C. Conclusion	113
D. Article	114

Résultats Complémentaires	157
A. Le mécanisme du transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib.....	160
1. Le rôle de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R dans sa translocation nucléaire ..	160
2. La sumoylation	161
B. Le rôle de l'amphiréguline sécrétée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R	163
1. L'Areg induit l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R.....	164
2. L'EGFR participe-t-il à la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg ?	166
3. Le mécanisme de translocation de l'IGF-1R en réponse à l'Areg implique la voie des MAPK et la sumoylation de l'IGF-1R.....	169
C. L'Optogénétique.....	172
1. Nos objectifs de travail	172
2. Matériel & méthodes	173
3. Résultats.....	178
4. Discussion et perspectives	187
Discussion	189
A. L'IGF-1R nucléaire dans les cancers	192
B. L'IGF-1R nucléaire en réponse au gefitinib	193
C. L'amphiréguline : un acteur majeur du transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib.....	195
1. Le rôle de l'Areg dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib	195
2. La régulation de la distribution subcellulaire de l'Areg par le gefitinib : quelques pistes... ..	197
3. L'Areg sécrétée.....	200
D. Quel est le rôle de la signalisation nucléaire Areg/IGF-1R ?.....	201
E. Les perspectives cliniques	202
Bibliographie	203

Publications et Formations

Publications et formations

Ce travail a été effectué à l'Institut for Advanced Biosciences anciennement connu sous le nom Institut Albert Bonniot (IAB, UGA-Inserm U1209-CNRS UMR 5309), au sein de l'équipe EYMIN "Epissage alternatif des ARNs, signalisation cellulaire et réponse aux thérapies" et de l'équipe COLL "Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer". Il a donné lieu aux manuscrits et communications suivants :

Publications originales

Guérard M., Robin T., Perron P., Hatat A-S., David-Boudet L., Coll J-L., Lantuéjoul S., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear translocation of IGF-1R via amphiregulin as a regulator of lung adenocarcinoma response to EGFR-TKI. **En préparation**

Daydé D., Guérard M., Perron P., Hatat A-S., Barrial C., Eymin B., Gazzeri S. (2015) Nuclear trafficking of EGFR by Vps34 represses Arf expression to promote lung tumor cell survival. **Oncogene**, 2015 Dec 21.

Communications orales

Guérard M., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear IGF1-R signaling and resistance to EGFR-targeted therapies in lung cancer. Comité des thèses, **Institut Albert Bonniot**, 7 novembre 2014, Grenoble, France.

Guérard M., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Signalisation nucléaire de l'IGF-1R et résistance aux thérapies anti-EGFR dans les cancers du poumon. Comité des thèses, **Institut Albert Bonniot**, 29 novembre 2013, Grenoble, France.

Communications affichées

Guérard M., Robin T., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear translocation of IGF-1R by amphiregulin: a regulator of the response of lung adenocarcinoma to EGFR-TKI? **24th congress of the European Association for Cancer Research (EACR)**, 9-12 juillet 2016, Manchester, Royaume-Uni.

Guérard M., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear translocation of IGF1-R and resistance to EGFR-TKI in lung cancer. **Journées de Recherche Respiratoire (J2R)**, 9-10 octobre 2015, Dijon, France.

Guérard M., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear translocation of IGF1-R and resistance to EGFR-TKI in lung cancer. **2nd International Symposium of the Cancer Research Center of Lyon (CRCL)**, 21-23 septembre 2015, Lyon, France.

Guérard M., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Signalisation nucléaire de l'IGF1R et résistance aux EGFR-TKI dans les cancers du poumon. **Journées de la Recherche Médicale 2015 (JRM)**, 5 juin 2015, Grenoble, France.

Guérard M., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear IGF1-R signaling and resistance to EGFR-targeted therapies in lung cancer. **Forum de Cancérologie du CLARA**, 7-8 avril 2015, Lyon, France.

Guérard M., Perron P., Barrial C., Coll J-L., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear IGF1-R signaling and resistance to EGFR-targeted therapies in lung cancer. **Journées de Recherche Respiratoire (J2R)**, 10-11 octobre 2014, Bordeaux, France.

Guérard M., Perron P., Barrial C., Brambilla E., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S. Nuclear IGF1-R signaling and resistance to EGFR-targeted therapies in lung cancer. **Journée des doctorants EDCSV 2014**, 22 avril 2014, Grenoble, France.

Prix

Lauréate 2015 de la "Formation par la Recherche – Printemps 2015" du Fonds de dotation de "Recherche en Santé Respiratoire" et de la Fondation du Souffle.

Formations

Gestion de Projet, avril 2015, 24 heures, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Management Stratégique et Technologie, mars 2014, 18 heures, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Marketing Industriel - Marketing dans les Activités De Recherche & Développement, mars 2014, 24 heures, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Initiation à la Cytométrie en Flux, janvier 2013, 14 heures, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Résumé

Résumé

Responsable de 1,6 million de décès par an dans le monde, le cancer du poumon constitue aujourd'hui la première cause de mortalité par cancer. Les cancers bronchiques non-à-petites cellules représentent 85% des cancers du poumon et ont un pronostic vital très mauvais. Les EGFR-TKI (inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, gefitinib) constituent un réel progrès thérapeutique pour le traitement des cancers du poumon. Cependant, ces traitements ne sont efficaces que dans un petit sous-groupe de patients. Un des enjeux actuels est donc d'identifier les mécanismes de résistance primaire mis en jeu par les tumeurs.

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) activent des voies de signalisation intracellulaires depuis la membrane plasmique. Ces dernières années, une translocation nucléaire des RTK a également été mise en évidence. Ces travaux récents suggèrent que la signalisation nucléaire des RTK pourrait contribuer à la résistance des tumeurs en réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

Dans l'équipe, il a été montré que l'activation de l'IGF-1R est associée à la progression tumorale des adénocarcinomes pulmonaires et que le gefitinib induit une accumulation nucléaire de l'IGF-1R dans un modèle d'adénocarcinome mucineux. Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'IGF-1R nucléaire pourrait jouer un rôle dans la résistance aux EGFR-TKI des adénocarcinomes pulmonaires mucineux.

Nos résultats indiquent que plus de 70% des adénocarcinomes pulmonaires présentent un marquage nucléaire de l'IGF-1R. A l'aide de différents modèles cellulaires résistants aux EGFR-TKI, nous montrons que le gefitinib induit l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R dans les adénocarcinomes pulmonaires mucineux. Cette translocation nucléaire implique l'endocytose clathrine-dépendante de l'IGF-1R et la formation d'un complexe entre l'IGF-1R, l'importine β 1 et l'amphiréguline. La neutralisation de l'amphiréguline prévient le transport nucléaire de l'IGF-1R et resensibilise les cellules à l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro* et *in vivo*. L'ensemble de ces résultats identifie le trafic intracellulaire de l'IGF-1R comme un nouveau composant de la réponse aux EGFR-TKI et suggère que la signalisation nucléaire IGF-1R/Areg contribue à la progression des adénocarcinomes mucineux sous EGFR-TKI.

Mots clés : IGF-1R nucléaire, amphiréguline, cancer du poumon, résistance, EGFR-TKI

Abstract

Abstract

Responsible of 1.6 million deaths each year worldwide, lung cancer is today the leading cause of cancer mortality in the world. Non-small-cell lung cancers account for about 85% of lung cancer and have a very bad prognosis (5-year survival rate inferior to 10%). EGFR-TKI (EGFR tyrosine kinase inhibitors, gefitinib) are a real medical advance for lung cancers treatment. However, these treatments are efficient in a small subgroup of patients. So, one of the current issues is to identify primary resistance mechanisms involved in tumors.

Tyrosine kinase receptors (RTK) activate intracellular signaling pathways from the plasma membrane. These last years, a nuclear translocation of the RTK was shown. Recent works suggest that RTK nuclear signaling could contribute to tumors resistance in response to anti-cancerous therapies.

In our team, it was shown that activation of IGF-1R signaling is associated with lung adenocarcinoma progression and that gefitinib induces IGF-1R nuclear accumulation in a mucinous adenocarcinoma cell line. On the basis of these results, we hypothesize that nuclear IGF-1R could play a role in the resistance of mucinous lung adenocarcinoma to EGFR-TKI.

Our results indicate that more than 70% lung adenocarcinoma tumors present a positive IGF-1R nuclear staining. Thanks to EGFR-TKI-resistant cell lines, we show that gefitinib induces the nuclear accumulation of IGF-1R in mucinous adenocarcinoma. This nuclear translocation involves clathrin-mediated endocytosis and a complex between IGF-1R, importin β 1 and amphiregulin. Amphiregulin silencing prevents IGF-1R nuclear translocation in response to gefitinib and restores gefitinib-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. Our whole results identify that IGF-1R intracellular trafficking is a new component of response to EGFR-TKI and strongly suggest that a nuclear IGF-1R/amphiregulin signaling contributes to mucinous lung adenocarcinoma progression in response to EGFR-TKI.

Key words: Nuclear IGF-1R, amphiregulin, lung cancer, resistance, EGFR-TKI

Liste des figures et des tableaux

Figures

Figure 1 : Estimations de l'incidence et de la mortalité des principaux cancers en fonction du sexe dans le monde pour 2015	29
Figure 2 : Cellules épithéliales composant le système pulmonaire.....	33
Figure 3 : Classification TNM	34
Figure 4 : Correspondance entre la classification TNM et les stades anatomiques	34
Figure 5 : Les hallmarks of cancer.	35
Figure 6 : Les principaux oncogènes connus chez les carcinomes squameux (SCC) et les adénocarcinomes (ADC)	37
Figure 7 : Algorithme immunohistochimique et moléculaire du diagnostic des carcinomes pulmonaires	39
Figure 8 : Fréquence et survie par des CBNPC	40
Figure 9 : Modalités thérapeutiques d'un CBNPC	43
Figure 10 : Structure des récepteurs de la famille HER.....	46
Figure 11 : Structure conformationnelle des récepteurs de la famille HER.....	48
Figure 12 : Sites de phosphorylation des différents membres de la famille HER	48
Figure 13 : L'EGFR et ses voies de signalisation.....	50
Figure 14 : Mécanismes de recyclage et la dégradation de l'EGFR.....	52
Figure 15 : Mécanisme de translocation nucléaire de l'EGFR depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau	54
Figure 16 : La signalisation nucléaire de l'EGFR.	57
Figure 17 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR et des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI).....	62
Figure 18 : Mutations de sensibilité et de résistance de l'EGFR pour le gefitinib et l'erlotinib dans le CBNPC.....	68
Figure 19 : Les différentes hypothèses d'apparition de la résistance acquise.....	71
Figure 20 : Principaux mécanismes de résistance primaire et acquise aux EGFR-TKI chez les CBNPC	73
Figure 21 : Une proposition de modèle pour l'origine des différentes formes d'amphiréguline membranaires et sécrétés	77
Figure 22 : Structure de la pro-Areg	78
Figure 23 : Représentation schématique du trafic intracellulaire de la pro-Areg	80

Figure 24 : Représentation schématique des différents modes de signalisation de l'Areg.....	82
Figure 25: Représentation schématique de la structure de l'IGF-1R.....	90
Figure 26 : Régulation des IGF par les IGFBP et les IGFBF protéases.....	92
Figure 27 : L'axe de l'IGF et signalisation de l'IGF-1R.....	94
Figure 28 : Schéma du mécanisme de translocation nucléaire de l'IGF-1R.....	96
Figure 29 : L'accumulation nucléaire de l'IGF-1R dépend partiellement de son activité tyrosine kinase.....	161
Figure 30 : La SUMOylation est impliquée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R.....	162
Figure 31 : Niveau d'expression d'Areg sécrétée dans différents modèles cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires.....	163
Figure 32 : L'Areg induit l'activation et l'accumulation nucléaire de l'EGFR et de l'IGF-1R.....	165
Figure 33 : L'EGFR et l'IGF-1R s'hétérodimérisent en réponse à l'Areg..	167
Figure 34 : L'EGFR régule la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg.....	168
Figure 35 : L'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg est dépendante de l'activation de ERK.....	170
Figure 36 : L'Areg induit la SUMOylation de l'IGF-1R.....	171
Figure 37 : La station OBFR.....	174
Figure 38 : Les plasmides exprimant la protéine d'intérêt EGFR couplée aux fluorophores PA-GFP et mEOS.....	175
Figure 39 : Photo-activation et photo-conversion de molécules photoactivables.....	176
Figure 40 : La modification de l'EGFR n'empêche pas sa phosphorylation et son transport nucléaire.....	179
Figure 41 : L'illumination des cellules H358 par le laser 405 nm active l'EGFR-PA-GFP..	180
Figure 42 : Le laser 405nm active localement dans le volume de la cellule l'EGFR-PA-GFP..	181
Figure 43 : Le mode TIRF 405nm active localement l'EGFR-PA-GFP.....	183
Figure 44 : Déplacement des cellules après activation par le laser et la stimulation par le ligand.....	184
Figure 45 : l'EGF induit une modification de la localisation subcellulaire de l'EGFR-PA-GFP..	186
Figure 46 : Les EGFR-TKI induisent le transport nucléaire de l'IGF-1R chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux.....	194

Figure 47: Le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux dépend de l'Areg..... 196

Figure 48 : Les EGFR-TKI pourraient inhiber le transport de la pro-Areg mature à la membrane plasmique après sa synthèse protéique ou induire son internalisation 198

Figure 49 : Les EGFR-TKI pourraient réguler la distribution subcellulaire de la pro-Areg au travers de son ubiquitination. 198

Figure 50 : Les EGFR-TKI pourraient réguler la distribution subcellulaire de la pro-Areg au travers des annexines..... 199

Figure 51 : Identification des cibles de l'IGF-1R nucléaire..... 201

Figure 52 : Des pistes pour l'inhibition du transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux..... 203

Tableaux

Tableau 1: Classification OMS 2015 des adénocarcinomes	32
Tableau 2 : Les récepteurs de la famille HER et leurs ligands	47
Tableau 3 : Expression nucléaire de l'EGFR dans différents types de cancers.....	58
Tableau 4 : Surexpression de l'Areg au niveau de l'ARN messager ou au niveau protéique ..	84
Tableau 5: Domaines de la structure de l'IGF-1R.....	91

Liste des abbréviations

ADAM	<u>A</u> <u>d</u> esintegrin <u>a</u> nd <u>m</u> etalloproteinase family
ADC	<u>A</u> dénocarcinome
ADN	<u>A</u> cide <u>d</u> éoxyribonucléique
Akt/ PKB	<u>P</u> rotein <u>k</u> inase <u>B</u>
ALK	<u>A</u> naplastic lymphoma <u>k</u> inase
AMM	<u>A</u> utorisation de <u>m</u> ise sur le <u>m</u> arché
APD	<u>A</u> valanche photodiode
Areg	<u>A</u> mphiréguline
Areg-CTF	<u>A</u> reg-cy <u>t</u> osolic <u>f</u> ragment, fragment résiduel membranaire après clivage de la pro-Areg
ARN	<u>A</u> cide <u>r</u> ibonucléique
ATP	<u>A</u> dénosine <u>t</u> ri-phosphate
ATRS	<u>A</u> T <u>r</u> ich consensus <u>s</u> equences
Aurora-A	<u>A</u> urora kinase <u>A</u>
BAD	<u>B</u> cl2-associated <u>d</u> eath promoter
BCRP	<u>B</u> reast <u>c</u> ancer <u>r</u> esistant <u>p</u> rotein
BRCA1	<u>B</u> reast <u>c</u> ancer <u>1</u>
BTC	<u>B</u> étacelluline
Cav1	<u>C</u> aveolin <u>1</u>
Cbl	<u>C</u> asitas <u>B</u> -lineage lymphoma
CBNPC	<u>C</u> ancers <u>b</u> ronchiques <u>n</u> on-à- <u>p</u> etites <u>c</u> ellules
CBPC	<u>C</u> ancer <u>b</u> ronchique à <u>p</u> etites- <u>c</u> ellules
CIE	<u>C</u> lathrin- <u>i</u> ndependent <u>e</u> ndocytosis
CME	<u>C</u> lathrin- <u>m</u> ediated <u>e</u> ndocytosis
CMV	<u>C</u> orps <u>m</u> ulti- <u>v</u> ésiculaires
COPI	<u>C</u> oat <u>p</u> rotein complex <u>I</u>
COX-2	<u>C</u> yclooxygenase- <u>2</u>
CoxII	Sous-unité <u>II</u> du <u>c</u> ytochrome <u>c</u>
CR	<u>C</u> ysteine <u>r</u> ich
DAG	<u>D</u> iacylglycérol
Del19	<u>D</u> élétion de quelques Aas au niveau de l'exon <u>19</u>
DNA-PK	<u>D</u> NA-dependent <u>p</u> rotein <u>k</u> inase
EEA1	<u>E</u> arly <u>e</u> ndosome <u>a</u> ntigen <u>1</u>
EGF	<u>E</u> pidermal growth <u>f</u> actor

EGFR	<u>E</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
EGFR-TKI	<u>I</u> nhibiteurs de l'activité tyrosine <u>k</u> inase de l' <u>E</u> GF <u>R</u>
EMA	<u>E</u> uropean <u>M</u> edicines <u>A</u> gency
EML4	<u>E</u> chinoderm <u>m</u> icrotubule <u>l</u> ike protein <u>4</u>
EPG	<u>E</u> pigène
EPR	<u>E</u> piréguline
ESCRT	<u>E</u> ndosomal <u>s</u> orting <u>c</u> omplex <u>r</u> equired for <u>t</u> ransport- <u>I</u>
FAK	<u>F</u> ocal <u>a</u> dhesion <u>k</u> inase
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration)
FGFR	<u>F</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
FHIT	<u>F</u> ragile <u>h</u> istidine <u>t</u> riad gene
FLEX	<u>F</u> irst-line <u>E</u> rbitux in lung cancer
FnIII	<u>F</u> ibronectine de type <u>III</u>
FRAP	<u>F</u> luorescence <u>r</u> ecovery <u>a</u> fter photo-bleaching
GDP	<u>G</u> uanosine <u>d</u> iphosphate
GFP	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GH	<u>G</u> rowth <u>h</u> ormone
Grb10	<u>G</u> rowth factor <u>r</u> eceptor- <u>b</u> ound protein <u>10</u>
Grb2	<u>G</u> rowth factor <u>r</u> eceptor- <u>b</u> ound protein <u>2</u>
GTP	<u>G</u> uanosine <u>t</u> riphosphate
HAS	<u>H</u> aute <u>A</u> utorité de <u>S</u> anté
HAT	<u>H</u> uman <u>a</u> irway <u>t</u> rypsin-like protease
HB-EGF	<u>H</u> eparin- <u>b</u> inding <u>E</u> GF
HER	<u>H</u> uman <u>e</u> pidermal <u>r</u> eceptor
HGF	<u>H</u> epatocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
HRS	<u>H</u> epatocyte <u>r</u> eceptor <u>s</u> ubstrate
IAB	<u>I</u> nstitut <u>A</u> lbert <u>B</u> onniot/ <u>I</u> nstitute for <u>A</u> dvanced <u>B</u> iosciences
IARC	<u>I</u> nternational <u>A</u> gency for <u>R</u> esearch on <u>C</u> ancer
IGF-1/2	<u>I</u> nsulin-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- <u>1/2</u>
IGF-1R	<u>I</u> nsulin-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- <u>1</u> <u>r</u> eceptor
IGF-2R	<u>I</u> nsulin-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- <u>2</u> <u>r</u> eceptor
IGFBP	<u>I</u> GF <u>B</u> inding <u>P</u> roteins
iNOS	<u>I</u> nducible <u>n</u> itric <u>o</u> xide <u>s</u> ynthase
INTERNET	<u>I</u> ntegral <u>t</u> rafficking from the <u>ER</u> to the <u>n</u> uclear <u>e</u> nveloppe <u>t</u> ransport

IP3	<u>I</u> nositol 1,4,5- <u>t</u> risphosphate
IPASS	<u>I</u> ressa <u>p</u> an- <u>A</u> sia <u>s</u> tudy
IR	<u>I</u> nsulin <u>r</u> eceptor
IRS-1 à 4	<u>I</u> nsulin- <u>r</u> eceptor <u>s</u> ubstrate- <u>1</u> à <u>4</u>
JAK	<u>J</u> anus <u>k</u> inase
KO	<u>K</u> nock <u>o</u> ut
K-RAS	<u>K</u> irsten <u>r</u> at <u>s</u> arcoma viral oncogene homolog
L858R	Substitution de la <u>L</u> eucine <u>858</u> en <u>A</u> rginine
LEF1	<u>L</u> ymphoid <u>e</u> nhancer <u>f</u> actor <u>1</u>
LKB1	<u>L</u> iver <u>k</u> inase <u>B1</u>
MAPK	<u>M</u> itogen- <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inases
MET/HGFR	<u>H</u> epatocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
mTOR	<u>M</u> ammalian <u>t</u> arget <u>o</u> f <u>r</u> apamycin
MUC1	<u>M</u> ucin- <u>1</u>
Nedd4	<u>N</u> eural precursor cell <u>e</u> xpressed <u>d</u> evelopmentally <u>d</u> own-regulated protein <u>4</u>
NFκB	<u>N</u> uclear <u>f</u> actor <u>k</u> appa <u>B</u>
NLS	<u>N</u> uclear <u>l</u> ocalization <u>s</u> ignal
NPC	<u>N</u> uclear <u>p</u> ore <u>c</u> omplex
NRG	<u>N</u> euré <u>g</u> ulines
OBFR	<u>O</u> ptogénétique <u>b</u> ifocale <u>r</u> apide
OMS	<u>O</u> rganisation <u>M</u> ondiale de la <u>S</u> anté
PA-GFP	<u>P</u> hoto- <u>a</u> ctivable- <u>G</u> FP
PAR2	<u>P</u> rotease- <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor <u>2</u>
Pc2	<u>P</u> oly <u>c</u> omb <u>2</u>
PCNA	<u>P</u> roliferating <u>c</u> ell <u>n</u> uclear <u>a</u> ntigen
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PD-1	<u>P</u> rogrammed cell <u>d</u> eath protein- <u>1</u>
PD-L1	<u>P</u> rogrammed <u>d</u> eath <u>l</u> igand- <u>1</u>
PDGFR	<u>P</u> latelet- <u>d</u> erived growth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
PDK1	<u>P</u> hoshoinositide- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase <u>1</u>
PI3K	<u>P</u> hoshoinositide <u>3</u> - <u>k</u> inase
PI3KCA	<u>P</u> hoshoinositide- <u>3</u> - <u>k</u> inase, <u>c</u> atalytic, <u>a</u> lpha polypeptide
PIAS	<u>P</u> rotein <u>i</u> nhibitor of <u>a</u> ctivated <u>S</u> TAT
PIP2	<u>P</u> hospha <u>t</u> idylinositol 4,5- <u>b</u> isphosphate

PIP3	<u>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</u>
PKC	<u>Protein-serine/threonine kinase C</u>
PLA	<u>Proximity ligation assay</u>
PMA	<u>Phorbol 12-myristate 13-acetate</u>
PMLIV	<u>Promyelocytic leukemia isoform IV</u>
PPP/AXL1717	<u>Picropodophyllotoxin</u>
PTB	<u>Phosphotyrosine binding</u>
PTEN	<u>Phosphatase and tensin homolog</u>
RAR β	<u>Retinoic acid receptor β</u>
RASSF1	<u>Ras association domain family member 1</u>
RCPG	<u>Récepteurs couplés aux protéines G</u>
RE	<u>Réticulum endoplasmique</u>
RFP	<u>Red fluorescent protein</u>
RTK	<u>Récepteur à activité tyrosine kinase</u>
SCC	<u>Squamous cell carcinoma/Carcinome squameux</u>
SENP	<u>Sentrin/SUMO-specific proteases</u>
SH2	<u>Src homology domain 2</u>
Shc	<u>Src homology and collagen domain protein</u>
Sos	<u>Son of sevenless</u>
STAM	<u>Signal-transducing adaptor molecule</u>
STAT	<u>Signal transducer and activator of transcription</u>
SUMO	<u>Small-ubiquitin-like modifier</u>
TACE/ ADAM17	<u>Tumor necrosis factor-α (TNF-α)-converting enzyme</u>
TCF	<u>T cell factor</u>
TEM	<u>Transition épithélio-mésenchymateuse</u>
TGF α	<u>Transforming growth factor α</u>
TIRF	<u>Total internal reflection fluorescence</u>
TNM	<u>Tumor, Node, Metastasis</u>
UGA	<u>Université Grenoble Alpes</u>
UICC	<u>Union for International Cancer Control</u>
VEGFR	<u>Vascular endothelial growth factor receptor</u>
Vps34	<u>Vacuolar protein sorting 34</u>

Introduction

I. Le cancer broncho-pulmonaire

Dans ce chapitre, nous décrirons l'épidémiologie, l'étiologie et les classifications du cancer du poumon. Puis, nous nous intéresserons plus particulièrement aux cancers bronchiques non-à-petites cellules (CBNPC) en nous attardant notamment sur leur caractérisation moléculaire et leur prise en charge thérapeutique.

A. Généralités sur les cancers du poumon

Les cancers du poumon sont presque exclusivement des carcinomes, des tumeurs se formant à partir de l'épithélium de la trachée, des bronches ou des poumons. Le tabac est la cause principale de cette pathologie. Le cancer bronchique est subdivisé en différents sous-types histologiques.

1. Le cancer du poumon en quelques chiffres : épidémiologie

Le cancer du poumon représente aujourd'hui la première cause de mortalité en France et dans le monde. En 2012, il a représenté 1,6 million de décès, soit environ **20% des cas de décès par cancer**, pour 1,8 millions de nouveaux cas diagnostiqués (OMS, 2013).

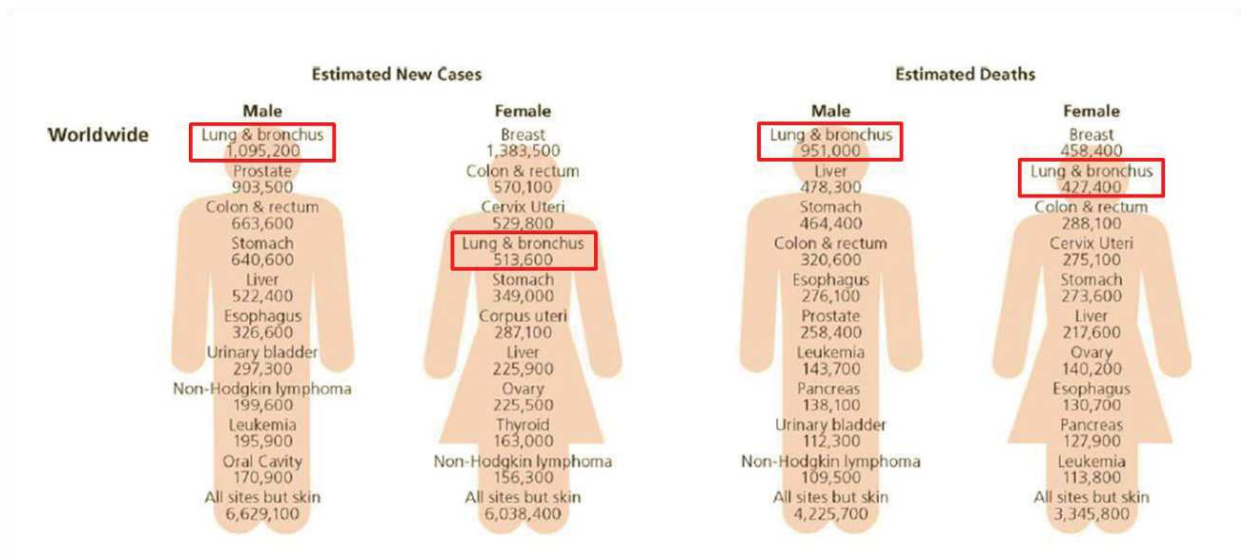


Figure 1 : Estimations de l'incidence et de la mortalité des principaux cancers en fonction du sexe dans le monde pour 2015 (Torre, 2015)

Le cancer du poumon est actuellement la première cause de décès par cancer pour les hommes et la seconde cause de mortalité par cancer chez les femmes après le cancer du sein (cf. [Figure 1](#)) et il touche plus particulièrement les pays développés. Au cours des trente-cinq dernières années, le nombre de cancer du poumon dans le monde a augmenté de près de 44% chez les hommes et de 76% pour les femmes. Cependant, dans les pays industrialisés, son incidence chez les hommes tend aujourd’hui à diminuer alors qu’il est en constante augmentation chez les femmes.

D’autre part, malgré les avancées dans le diagnostic, la chirurgie et les traitements, le taux de survie à cinq ans des patients atteints de cancer de poumon reste très faible avec un taux d’environ 9% en Europe (*DelaCruz, 2011*). Ce mauvais pronostic peut-être expliqué par de nombreux diagnostics tardifs puisque lors du diagnostic près de 70% des patients ont déjà une tumeur à un stade avancé.

2. [Données étiologiques](#)

Le lien entre cancer bronchique et tabagisme a été démontré dès les années 1950 (*Doll, 1950*). Les fumeurs ont en moyenne **10 à 15 fois plus de risque** de développer un cancer du poumon. Le tabac est à l’origine de 90% des décès pour cette pathologie. Plus de 5000 composés ont été identifiés dans la fumée de cigarette dont près de 80 sont considérés comme des carcinogènes par l’International Agency for Research on Cancer (*Wang, 2015*). Ces carcinogènes, dont les plus connus sont les hydrocarbures polycycliques aromatiques et les nitrosamines, sont associés au développement du cancer du poumon en induisant une succession de mutations génétiques (*Brambilla, 2009*).

Même si le risque de survenue du cancer du poumon est lié à l’âge de début du tabagisme et au nombre de cigarettes fumées par jour, le facteur principal est la durée du tabagisme (*LeFaou, 2005*). En effet, un triplement du nombre de cigarettes fumées par jour multiplie par trois le risque de cancer alors qu’un triplement de la durée du tabagisme multiplie par 100 le risque de développer un cancer du poumon (*Peto, 1986*). Le tabagisme passif augmente le risque de développer un cancer bronchique de 26% (*Quoix, 2011*).

D’autre part, le cannabis est maintenant aussi décrit comme pouvant être un facteur de risque pour le cancer du poumon. Sa fumée a une concentration en carcinogènes plus importante que celle du tabac. Ainsi, l’exposition aux fumées de cannabis multiplie, au moins, par deux le risque de développer un cancer bronchique (*Underner, 2014*).

Bien que la plupart des cas soient attribuables au tabac, 25% des cas de cancer dans le monde ne résultent pas de cette consommation.

On trouve notamment au deuxième rang des facteurs de risque, le radon, un gaz incolore et indolore. La désintégration de ce gaz radioactif s'accompagne d'émission de rayons ionisants qui vont endommager l'ADN (Choi, 2014). D'autres substances chimiques comme l'amiante, les composés du chrome, du nickel, de l'arsenic et les particules fines dans la pollution atmosphérique ont été identifiées comme facteurs de risque. Enfin, la pollution intérieure due aux vapeurs d'huile de cuisson et la fumée de charbon de bois pourrait expliquer les nombreux cas de cancer du poumon des femmes chinoises non fumeuses comparativement aux femmes européennes non fumeuses (Torre, 2015). Les traitements hormonaux chez les femmes seraient aussi un facteur de risque (Quoix, 2011).

3. Classifications des cancers du poumon

Deux classifications sont actuellement utilisées pour caractériser les cancers du poumon. La première, proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est une classification histologique des tumeurs alors que la seconde, développée par l'Union for International Cancer Control (UICC) est basée sur les caractéristiques pathologiques des tumeurs.

Ces classifications permettent de prévoir l'évolution de la maladie et donc d'établir un pronostic ainsi que de mettre en place une stratégie thérapeutique.

1) Classification histologique selon l'OMS

La classification de l'OMS distingue deux formes majeures de cancer du poumon : le cancer bronchique à petites-cellules (CBPC) et le cancer bronchique non-à-petites-cellules (CBNPC) représentant, respectivement, 15% et 85% des cancers du poumon (Herbst, 2008).

Les CBPC sont des tumeurs malignes épithéliales qui se développent à partir de cellules neuroendocrines (cf. Figure 2) présentes dans les voies aériennes les plus grandes (Yokota, 2010). Dans 98% des cas, les patients qui développent un CBPC sont des fumeurs (Brambilla, 2009). Du fait de l'agressivité de ce sous-type et de la croissance très rapide des tumeurs, le pronostic pour ce type de pathologie est très mauvais avec une survie médiane

sans traitement de 2 à 4 mois. Selon l'avancée de la maladie au moment du diagnostic, la survie moyenne à 2 ans est de 5 à 20% (*Van Meerbeeck, 2011*).

Les **CBNPC** sont des tumeurs malignes épithéliales dues dans 85% des cas à la consommation de tabac. Ils sont eux-mêmes sous-divisés en trois sous-types histologiques : les carcinomes squameux (SCC, squamous cell carcinoma), les adénocarcinomes (ADC) et les carcinomes à grandes cellules.

Les **adénocarcinomes bronchiques (ADC)** représentent 40% à 50% des CBNPC et sont le sous-type le plus répandu parmi les cancers pulmonaires. Les adénocarcinomes se développent à partir des pneumocytes de type II, les cellules Clara ou les cellules souches bronchio-alvéolaires dans des nodules périphériques (cf. Figure 2). Ils touchent préférentiellement les hommes et ils représentent la forme la plus fréquente chez les non-fumeurs. (*Brambilla, 2009, Travis, 2011*). Le Tableau 1 récapitule les différents adénocarcinomes selon la dernière classification de l'OMS.

Lésions pré-invasives
Hyperplasie atypique adénomateuse
Adénocarcinome <i>in situ</i> (AIS)
Non-mucineux
Mucineux (très rare)
Adénocarcinome à invasion minimale (MIA)
Non-mucineux
Mucineux
Adénocarcinome lépidique
Adénocarcinome acinaire
Adénocarcinome papillaire
Adénocarcinome micro-papillaire
Adénocarcinome solide
Adénocarcinome invasif mucineux
Mélange d'adénocarcinome invasif mucineux et non mucineux
Adénocarcinome colloïde
Adénocarcinome fœtal
Adénocarcinome entérique

Tableau 1: Classification OMS 2015 des adénocarcinomes (d'après *Travis, 2015*)

Les **carcinomes squameux (SCC)** (ou épidermoïdes ou malphigien) représentent 30 à 40% des CBNPC. Ils se développent dans la plupart des cas à partir des cellules basales (cf. [Figure 2](#)) dans de grosses bronches au centre du poumon (*Brambilla, 2009, Travis, 2004*).

Les **carcinomes à grandes cellules** représentent environ 20% des CBNPC. Ce sous-type est caractérisé par un aspect indifférencié et notamment ne possédant pas les caractéristiques histologiques des adénocarcinomes, des carcinomes squameux ou des CBPC. Ces grosses tumeurs nécrotiques sont plus généralement situées dans le parenchyme pulmonaire (composé des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires et des alvéoles).

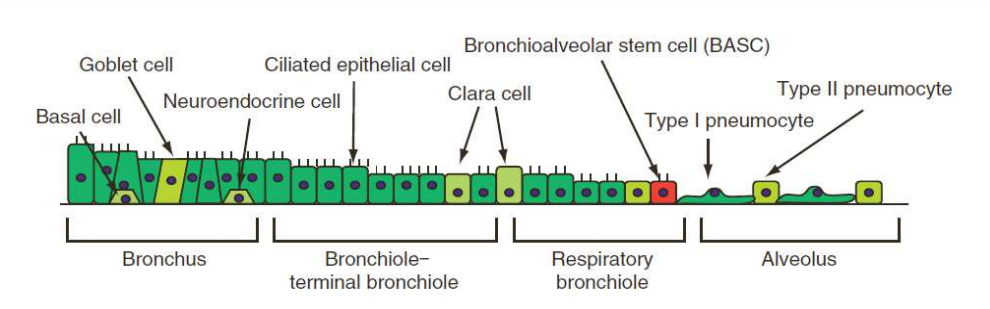


Figure 2 : Cellules épithéliales composant le système pulmonaire (Yokota, 2010).

Le poumon se compose de deux secteurs anatomiques : l'arbre bronchique (de la trachée à la bronchiole) et le poumon périphérique (de la bronchiole terminale à l'alvéole). L'arbre bronchique a un rôle essentiel dans la conduction et le conditionnement de l'air. Les bronchioles sont constituées de cellules épithéliales de quatre types : les cellules ciliées, calciforme ("goblet"), basales et neuroendocrine. Le poumon périphérique permet les échanges gazeux. Les parois sont revêtues d'un épithélium cylindrique simple fait de cellules Clara et de cellules ciliées. L'épithélium alvéolaire se compose de pneumocytes de type I et II.

Les cellules précurseurs des CBPC, carcinomes squameux et adénocarcinomes sont respectivement les cellules neuroendocrines, basales et Clara/cellules souches (BASC)/Pneumocytes de type II.

2) Classification pathologique TNM selon l'UICC

La seconde classification utilisée pour le cancer est la classification TNM pour Tumor, Node, Metastasis (Tumeur, Ganglion, Métastases). Cette classification anatomique des cancers du poumon permet d'évaluer l'étendue de la tumeur au sein de l'organe malade et de tout l'organisme. Elle permet d'estimer le pronostic du malade et de déterminer la thérapeutique à mettre en œuvre.

Elle prend en compte trois caractéristiques anatomiques (*Rami-Porta, 2015*) :

- "tumor" : la taille et la localisation de la tumeur primitive dans l'organe malade,
- "node" : l'absence ou la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques voisins, ainsi que leur localisation,

- "metastasis" : l'absence ou la présence de métastases éloignées dans l'organe et dans tout l'organisme. (cf. [Figure 3](#))

La classification TNM permet d'évaluer l'avancement de la pathologie et de l'associer à un stade, du stade 0 au stade IV (cf. [Figure 4](#)). Les différents stades sont les suivants :

- Stade 0 : cancer *in situ* non invasif
- Stade I : invasion très localisée, sans métastase
- 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 métastases.

Tableau 5 Classification TNM (septième édition) des tumeurs pulmonaires (les modifications par rapport à la sixième édition sont indiquées en italiques).
TNM classification (seventh edition) of lung tumors (the modifications from the sixth edition are italicized).

T1	Taille < 3 cm
<i>T1a</i>	< 2 cm
<i>T1b</i>	> 2–3 cm
T2	Bronche principale > 2 cm de la carène, envahissement de la plèvre viscérale, atelectasie partielle
<i>T2a</i>	> 3–5 cm
<i>T2b</i>	> 5 cm–7 cm
T3	> 7 cm ; envahissement de la paroi thoracique, du diaphragme, du péricarde, de la plèvre médiastinale ; bronche principale, < 2 cm de la carène, atelectasie totale ; <i>nodule(s) satellite(s) dans le même lobe (était T4)</i>
T4	Envahissement du médiastin, du cœur, des gros vaisseaux, de la carène, de l'oesophage, des vertèbres ; <i>nodule(s) satellite(s) dans un lobe différent homolatéral (était M1)</i>
N1	Siège homolatéral, péribronchique, hilare
N2	Siège homolatéral, médiastinal, sous-carénaire
N3	Siège controlatéral, médiastinal ou hilare, scalène ou supraclaviculaire
M1a	<i>Nodule(s) satellite(s) dans un lobe controlatéral ; nodule(s) pleural(aux) ; épanchement malin pleural ou péricardique (était T4)</i>
M1b	Métastase à distance

Figure 3 : Classification TNM (Scaozec, 2010).

	N0	N1	N2	N3	M1a-b Tout N	M1c Tout N
T1a	IA-1	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1b	IA-2	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1c	IA-3	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B

Figure 4 : Correspondance entre la classification TNM et les stades anatomiques (adapté de *Goldstraw, 2015*). (Proposition pour la 8ième classification de 2016).

Le CBNPC est le cancer pulmonaire diagnostiqué dans la majorité des cas et ce à des stades souvent avancés. Ce type histologique sera l'objet d'étude de cette thèse et sera développé dans le paragraphe suivant.

B. Les cancers bronchiques non-à-petites cellules

Nous décrivons dans ce chapitre les principales mutations oncogéniques et altérations des gènes suppresseurs de tumeurs connues dans les CBNPC.

1. Les caractéristiques de la tumorigenèse

La tumorigenèse est un processus multi-étapes qui est dû à l'accumulation d'une suite d'altérations génétiques et épigénétiques qui vont induire une transformation progressive de la cellule normale vers une cellule cancéreuse. Suite à ces modifications, les cellules vont acquérir de nouvelles caractéristiques biologiques et la prolifération cellulaire va devenir incontrôlée.

Les caractéristiques biologiques acquises par les cellules ou les "**Hallmarks of cancer**" sont (cf. [Figure 5](#)) : 1) l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance qui permet aux cellules de rester dans un état de prolifération constant, 2) l'insensibilité vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs, 3) la capacité à échapper à la mort programmée (apoptose), 4) un potentiel répliatif illimité, 5) la capacité à induire une néo-vascularisation (angiogenèse), 6) l'acquisition d'un phénotype invasif et métastasant (*Hanahan, 2000*). Récemment, deux nouvelles caractéristiques se sont ajoutées à ces propriétés : la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule et l'échappement au système immunitaire. (*Hanahan, 2011*)

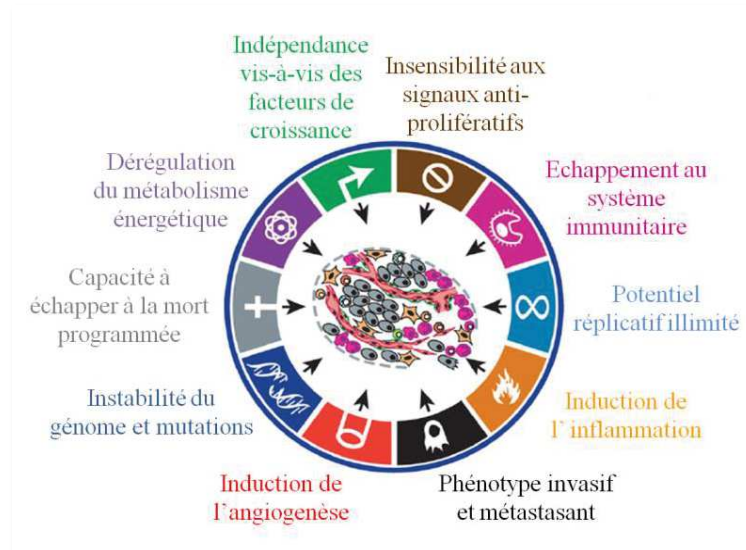


Figure 5 : Les hallmarks of cancer (Hanahan, 2011).

Les hallmarks du cancer représentent les caractéristiques que doivent acquérir les cellules pour devenir cancéreuses. A la base de ces "hallmarks", on trouve l'instabilité du génome qui favorise leur acquisition. L'inflammation des tissus favorise nombre de ces fonctions. Deux nouvelles caractéristiques se sont récemment ajoutées aux six propriétés énoncées par *Hanahan et al.* en 2000 : la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule et l'échappement au système immunitaire

2. Les caractéristiques moléculaires des CBNPC

Comme dit précédemment, les cellules cancéreuses possèdent de multiples anomalies génétiques. Ces modifications génétiques vont principalement toucher deux types de gènes : les proto-oncogènes (oncogène après activation) et les gènes suppresseurs de tumeur. Les **oncogènes** sont des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire, qui favorisent la division et la différenciation cellulaire alors que les **gènes suppresseurs de tumeur** sont des régulateurs négatifs qui freinent la prolifération cellulaire. En général, le développement d'un cancer nécessite l'activation d'au moins un oncogène et l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur.

L'activation des oncogènes peut être due soit à une mutation, soit à une amplification génique, soit à un réarrangement chromosomique. L'altération d'un seul allèle est suffisante à l'activation de l'oncogène. Ceci conduit à l'addiction oncogénique de la cellule c'est-à-dire que les cellules tumorales dépendent entièrement de ce gène pour leur survie et leur prolifération. Cet oncogène est donc le "talon d'Achille" de la cellule ce qui en fait une potentielle cible thérapeutique (*Weinstein, 2008*). Les principaux oncogènes identifiés dans les CBNPC sont *K-RAS, EGFR, ALK, HER2, FGFR1, B-Raf, PI3KCA...* (*Barlesi, 2016*) (cf. Figure 6)

La mutation de *K-RAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) au niveau du codon 12 est présente dans plus de 30% des ADC et 6% des SCC. Cette anomalie conduit à une activation constitutive de la protéine et de sa voie d'aval, la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinases), impliquée dans la prolifération cellulaire. Elle est principalement associée à la consommation de tabac et est exclusive des mutations de l'EGFR et de la translocation de ALK. (*Brambilla, 2009*)

L'EGFR est surexprimé dans plus de 60% des CBNPC (*Hirsch, 2003*) et est muté dans 12 à 31% des cas selon l'origine des patients (*Lantuéjoul, 2011*). Ces mutations appelées "activatrices" sont majoritairement la mutation L858R sur l'exon 21 et la délétion au niveau de l'exon 19 (Del19). Cela induit l'activation constitutive de l'EGFR et ainsi l'activation de ses voies d'aval (MAPK, PI3K/Akt). Les mutations de l'*EGFR* sont plus généralement retrouvées chez la femme, les non-fumeurs, les patients d'origine asiatique et les patients porteurs d'adénocarcinome. L'EGFR et ses mutations seront l'objet du chapitre suivant.

Le gène de *HER2*, un autre récepteur de la famille HER, présente une mutation dans

2% des CBNPC. Cela va conduire, comme pour l'EGFR, à l'activation constitutive du récepteur et de ses voies d'aval.

La mutation de *B-Raf* induit une mutation activation constitutive de la voie des MAPK. Cette mutation est retrouvée dans 2% des CBNPC.

Le réarrangement de *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) provient de l'inversion du bras court du chromosome 2 et de la fusion avec le gène *EML4* (echinoderm microtubule like protein 4) (Luo, 2013). La formation du gène de fusion *EML4-ALK* conduit à l'activation constitutive de la protéine ALK et à l'activation de ses voies d'aval (PI3K/Akt, STAT3, JAK2) impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire (Mano, 2008). L'incidence de ce réarrangement est de 3 à 7% et prédomine chez les patients non ou peu fumeurs, porteurs d'un adénocarcinome (Lantuéjoul, 2011).

Dans les carcinomes squameux, l'oncogène prépondérant est FGFR1 dont l'amplification est présente dans 15 à 20% des cas. (Sos, 2012)

D'autres anomalies généralement retrouvées dans moins de 1% des cas ont été décrites dans les CBNPC. On retrouve les translocations de *ROS1*, les mutations de *PI3K*, l'amplification de *MET*.

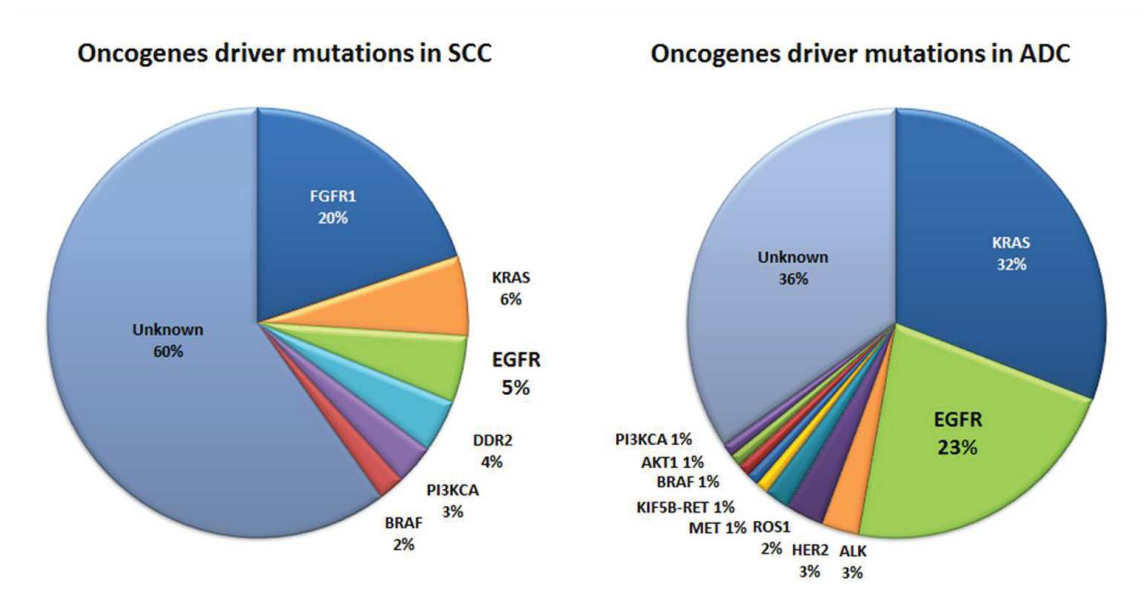


Figure 6 : Les principaux oncogènes connus chez les carcinomes squameux (SCC) et les adénocarcinomes (ADC) (Pao, 2012 et Sos, 2012)

A l'inverse des oncogènes qui deviennent hyperactifs, les **gènes suppresseurs de tumeur**, régulateurs négatifs de la prolifération, perdent leur fonction dans les cellules cancéreuses. Pour que la fonction soit perdue, il faut que leurs deux allèles soient altérés généralement par une délétion d'une région du chromosome contenant le premier allèle du gène et par une mutation ou une hyper-méthylation du promoteur qui vont inactiver le second allèle. Les principaux gènes suppresseurs de tumeurs inactivés dans les CBNPC sont *p53*, *p14 ARF*, *p16 INK4A*, *PTEN* et *LKB1*.

P53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers du poumon. On le retrouve notamment muté dans 50% des CBNPC et ce dans 90% des cas au niveau de son domaine de liaison à l'ADN. (Olivier, 2009, Brambilla, 2009). Cette mutation est davantage présente dans les carcinomes squameux que dans les adénocarcinomes. De plus, il a été montré que la mutation de *p53* est davantage présente chez les patients fumeurs (26% à 71% des cas) que chez les patients non-fumeurs (8% à 47% des cas) (Mogi, 2011).

De plus, *p14 ARF* et *p16 INK4A* sont souvent dérégulés dans les cancers du poumon. La délétion homozygote du locus *INK4-ARF* ou la perte d'hétérozygotie suivie de l'inactivation du second allèle par des mécanismes propres à chaque protéine (hyperméthylation, mutation) affecte leur expression. On trouve notamment qu'une perte d'expression de *p14^{ARF}* est présente dans 44% des adénocarcinomes et qu'elle est plus souvent présente chez les femmes et chez les non-fumeurs (Cortot, 2014). Quant à l'expression de *p16^{INK4a}*, elle est perdue dans 40 à 50% des CBNPC.

La perte d'expression de *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), de par l'hyperméthylation de son promoteur, existe dans environ 10% des CBNPC et est fortement associée à la consommation de tabac (Jin, 2010).

LKB1 (liver kinase B1) est muté dans 34% des adénocarcinomes et 20% des carcinomes squameux. Il est connu pour jouer un rôle dans la différenciation cellulaire au début de la tumorigenèse et le développement des métastases. Ces mutations sont davantage associées avec le tabagisme et les mutations de *K-RAS* et sont exclusives des mutations de l'*EGFR*. (Herbst, 2008)

La très haute fréquence de la perte allélique au niveau du bras court du chromosome 3 (70% des CBNPC) a permis d'identifier d'autres gènes suppresseurs de tumeurs, parmi lesquels on trouve *FHIT* (fragile histidine triad gene) (40% des CBNPC), *RASSF1* (Ras association domain family member 1) (30-40% des CBNPC), *RARβ* (retinoic acid receptor β). (Panani, 2006 et Li, 2014)

C. Prise en charge thérapeutique des CBNPC

La caractérisation moléculaire des CBNPC a permis de faire émerger de nouvelles approches thérapeutiques et d'améliorer ainsi la prise en charge des patients.

Le diagnostic du cancer bronchique se fait soit de manière fortuite lors d'examens médicaux pour une autre pathologie car très souvent asymptomatique, soit parce que le patient présente des symptômes évoquant le cancer pulmonaire. Les symptômes les plus fréquents spécifiques du cancer du poumon sont la toux, l'augmentation des expectorations, l'essoufflement, l'enrouement, les douleurs thoraciques et la présence de sang dans les crachats. Ils peuvent être accompagnés de symptômes non spécifiques de cette pathologie comme une perte d'appétit, une perte de poids ou une fatigue. (*ESMO/FAC, 2014*)

Le diagnostic final du cancer bronchique repose sur l'examen anatomopathologique grâce à la biopsie de la tumeur. Cette étude détermine l'histologie de la tumeur du patient. Dans les cas d'un cancer non squameux ou squameux avec un passif de tabagisme, une recherche systématique d'altérations moléculaires (mutation de l'*EGFR*, *K-RAS*, *B-RAF*, *HER2*, les réarrangements de *ALK* et *ROS1*) sera réalisée. (cf. [Figure 7](#))

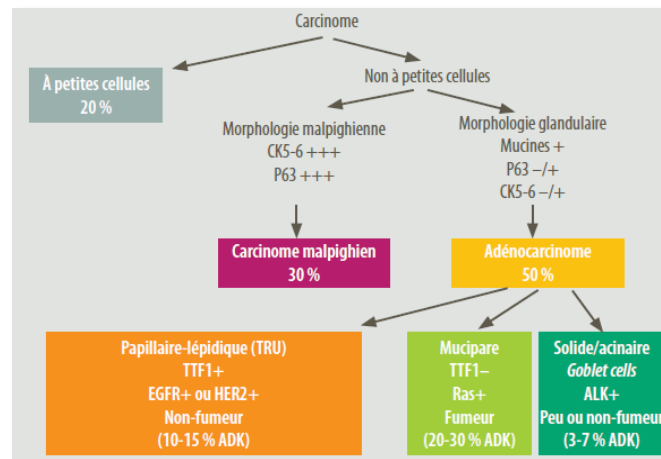


Figure 7 : Algorithme immunohistochimique et moléculaire du diagnostic des carcinomes pulmonaires (*Lantuéjoul, 2011*)

Enfin, un bilan d'extension permettra de déterminer la taille et l'extension locorégionale de la tumeur (T), la présence de métastases ganglionnaires (N) ou de métastases

thoraciques ou extra-thoracique (M) ce qui permettra d'estimer le stade de la maladie et le pronostic vital du patient (HAS, 2013).

Il n'existe pas de marqueur de dépistage du cancer du poumon. Etant souvent asymptomatiques, les patients sont très souvent diagnostiqués à des stades avancés de la maladie comme le montrent les données suivantes de la Haute Autorité de Santé (HAS, 2013) (cf. [Figure 8](#))

	Localisé Stades I et II	Localement avancé Stade III	Métastatique Stade IV
Fréquence au diagnostic	15 à 30 %	20 %	40 % à 55 %
Survie relative à 5 ans	52,6 %	23,7 %	3,8 %

Figure 8 : Fréquence et survie par des CBNPC (HAS, 2013)

L'approche thérapeutique sera alors adaptée selon l'histologie et le stade d'avancement de la maladie. (cf. [Figure 9](#)) (ARISTOT, 2016 et Masters, 2015)

1. [Les stades I et II](#)

Les CBNPC de stades I et II représentent seulement 15 à 30% des cas et sont curables dans plus de la moitié des cas. (cf. [Figure 8](#))

La chirurgie est la prise en charge de référence pour les cancers de stade I et II. Elle a pour objectif d'enlever la tumeur dans son intégralité, ainsi que les ganglions correspondants. Le chirurgien pratiquera alors soit une lobectomie qui consiste à enlever le lobe de poumon où siège la tumeur, ou une pneumonectomie qui consiste en l'ablation totale d'un poumon. Cette chirurgie s'accompagne d'un curage ganglionnaire qui permet d'enlever les ganglions lymphatiques situés dans la zone de la tumeur.

En cas d'exérèse incomplète, si le résidu est macroscopique une radio-chimiothérapie est indiquée et si le résidu est microscopique une radiothérapie seule est recommandée. Elle est également utilisée à visée curative dans les cas inopérables. Une chimiothérapie post-opératoire est indiquée chez les patients de stade II en état physique de le recevoir.

2. Le stade III

L'attitude thérapeutique dépend de la possibilité d'une résection complète de la tumeur. La chirurgie ne peut concerner que les stades IIIA, les stades IIIB étant jugés inopérables.

Dans le cas des stades IIIA résécables, soit la chirurgie avec curage ganglionnaire est réalisée après deux à quatre cycles de chimiothérapie à base de cisplatine, soit elle est suivie d'une chimiothérapie post-opératoire.

Dans les cas des stades IIIA non opérables ou des stade IIIB, le traitement de référence est la radiothérapie associée à la chimiothérapie. La radiothérapie est un traitement locorégional qui utilise des rayons ionisants pour cibler les cellules tumorales. Ces rayons vont induire des cassures de l'ADN et engendrer la mort des cellules. La chimiothérapie, quant à elle, permet de traiter les tumeurs à l'aide de produit chimique. Ces produits sont le plus souvent des sels de platine tels que le cisplatine et dans une moindre mesure le carboplatine. Ces deux agents alkylants induisent un blocage de la réplication de l'ADN de part la formation de liaisons entre les bases guanine de l'ADN qui l'empêchent ainsi de se dérouler. Les trois schémas de chimiothérapie les plus utilisés dans ces cas en combinaison avec la radiothérapie sont cisplatine/vinorelbine, cisplatine/etoposide et carboplatine/paclitaxel.

3. Le stade IV

La prise en charge des CBNPC métastatiques est critique car les stades IV représentent la moitié des cancers bronchiques diagnostiqués (cf. [Figure 8](#)). Elle fait l'objet de nombreuses recherches et a beaucoup évolué ces dernières années. On distingue les cancers squameux des non squameux dans la prise en charge thérapeutique. Pour les cancers non-squameux et cancers squameux avec un passif de tabagisme, la recherche systématique des six mutations et translocations est recommandée : *EGFR*, *K-RAS*, *B-RAF*, *HER2*, et réarrangement *ALK/ROS1*.

Pour les cancers squameux et les non-squameux sans mutation de l'*EGFR*, la thérapeutique de référence est la chimiothérapie en première ligne de traitement. Il s'agit d'une bithérapie comprenant un sel de platine. Il s'agit, par exemple, d'associations du cisplatine avec la vinorelbine, la gemcitabine, le docétaxel ou le pemetrexed ou du carboplatine avec le paclitaxel.

De plus, pour les non-squameux, le bevacizumab, un anticorps monoclonal qui empêche le VEGF, acteur majeur de l'angiogenèse, de se fixer à son récepteur, peut être ajouté à la chimiothérapie, en traitement de première ligne des CBNPC avancés et métastatiques (*Langer, 2010*).

En deuxième et troisième lignée de traitement, le nivolumab, un anticorps anti PD-1, peut être utilisé pour le traitement des cancers squameux et des adénocarcinomes. L'anticorps bloque l'interaction entre PD-L1 et PD-1 (une protéine présente à la surface des cellules T) ce qui permet aux cellules T de rester active. En effet, un essai de phase III a montré que le nivolumab améliorait la survie globale (42% vs 24%), le taux de réponse (20% vs 9%) et la survie sans progression (3,5 mois vs 2,8 mois) comparativement au docétaxel (*Brahmer, 2015*). Ainsi, le nivolumab a obtenu une AMM (autorisation de mise sur le marché) en septembre 2015 pour les patients atteints d'un cancer bronchique non-à-petites cellules de stade IIIB ou IV après au moins un échec d'une ligne de traitement à base de sels de platine.

Le nintedanib, inhibiteur de tyrosine kinase qui cible VEGFR, FGFR et PDGFR, a montré un bénéfice en deuxième ligne de traitement en combinaison avec le docétaxel pour les adénocarcinomes. Il a reçu une AMM en novembre 2014.

Pour les patients atteints d'un cancer avec une mutation de l'EGFR, le traitement de première ligne est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR. A l'heure actuelle, trois molécules ont reçu une AMM pour être utilisées dans les CBNPC : le gefitinib, l'erlotinib et l'afatinib. Le chapitre II s'intéressera plus particulièrement à l'EGFR et aux traitements anti-EGFR. En cas de ré-évolution tumorale, une chimiothérapie à base de sels de platine pourra être utilisée en deuxième ligne de traitement. Dans le cas où une seconde altération moléculaire est détectée (T790M, amplification de *MET*), le patient pourra se voir proposer un essai thérapeutique.

Pour les patients atteints d'un cancer avec un réarrangement de ALK, le crizotinib (inhibiteur de ALK, MET et ROS1) est indiqué en première ligne de traitement en cas d'adénocarcinome. Le ceritinib est un inhibiteur de ALK de seconde génération qui a été développé en réponse aux nombreux cas de résistance apparus avec le crizotinib et qui peut être utilisé en seconde ligne de traitement (*Doebbele, 2012*).

	Tnm	Chirurgie	Radiothérapie	Chimiothérapie ou thérapie ciblée
Stade IA	T1 N0	☒		
Stade IB	T2 N0	☒		○
Stade II	T1,2 N1 T3 N0	☒	○	☒
Stade I ou II Non opérable			☒	○
Stade IIIA	T3 N1	☒	○	○
	T1,3 N2	○	○	○
	T4 N0,1		☒	☒
Stade IIIB	Tous T, N3		☒	☒
	T4, N2		☒	☒
Stade IV ⁶	Tous T, N, M1			☒

☒ Modalité thérapeutique de référence, systématique (sauf si contre-indication) ;
 ○ Selon les situations : peut être parfois envisagée, en association au traitement de référence.

Figure 9 : Modalités thérapeutiques d'un CBNPC (INCa, 2010)

- Le Cancer du poumon : 1^{ère} cause de mortalité par cancer avec 1,6 millions de victimes par an dans le monde
- Le tabac : principal facteur de risque du cancer du poumon
- Deux classifications : histologique (OMS) et anatomique (TNM)
- Le cancer bronchique non-à-petites cellules (CBNPC) représente 85% des cas de cancer du poumon
- K-RAS et EGFR : deux oncogènes prépondérants des adénocarcinomes
- L'EGFR est la principale cible des thérapies ciblées (cf. Chapitre II)

II. Le récepteur de l'EGF dans les CBNPC

Le récepteur de l'EGF ou EGFR est une cible privilégiée des thérapies ciblées utilisées dans le traitement des CBNPC.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la famille de l'EGFR, ses ligands et ses voies de signalisations canoniques et nucléaire. Nous étudierons plus en détail les altérations de l'EGFR dans les CBNPC et les traitements développés pour le cibler.

A. L'EGFR, récepteur à activité tyrosine kinase

1. La famille HER

Le récepteur de l'EGF ou EGFR (Epidermal growth factor receptor) est une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase de 170kDa découverte dans les années 1970 par Stanley Cohen (*Cohen, 1982*). Cette protéine, aussi connue sous les noms HER1 ou ErbB1, appartient à la famille HER (Human epidermal receptor). La famille HER comprend quatre membres : EGFR, HER2 (Neu, ErbB2), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Cette famille de récepteurs à activité tyrosine kinase est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules épithéliales, les cellules neuronales, les cellules cardiaques et les cellules mésenchymateuses.

Les quatre récepteurs de la famille HER partagent 40 à 45% d'homologie de structure ce qui se traduit par une organisation structurale commune (*Hubert, 2006*). Leur structure se compose d'une région extracellulaire, d'une partie transmembranaire et d'une région intracellulaire. (cf. [Figure 10](#))

La partie extracellulaire se compose de quatre domaines. Les domaines I et III (L1 et L2) sont analogues. Ils sont riches en résidus leucine et participent à la fixation des ligands. Les domaines II et IV (CR1 et CR2) sont caractérisés par leur abondance en résidus cystéines qui participent à la formation de ponts disulfure. Le domaine II est impliqué dans la dimérisation des récepteurs. La partie transmembranaire de 19 à 24 acides aminés est très hydrophobe et permet l'ancrage du récepteur à la membrane plasmique des cellules. Enfin, la partie intracellulaire est composée d'un domaine juxtamembranaire, d'un domaine à activité tyrosine kinase et d'un domaine C-terminal riche en sites de phosphorylation. (*Roskoski, 2014*)

D'autre part, il est à noter que HER2 n'a pas de ligand connu et que HER3 est décrit comme n'ayant pas d'activité tyrosine kinase (ou très faible). HER3 aurait mille fois moins d'activité de phosphorylation que l'EGFR mais le dimère HER3/HER3 pourrait tout de même être fonctionnel (*Shi, 2010*).

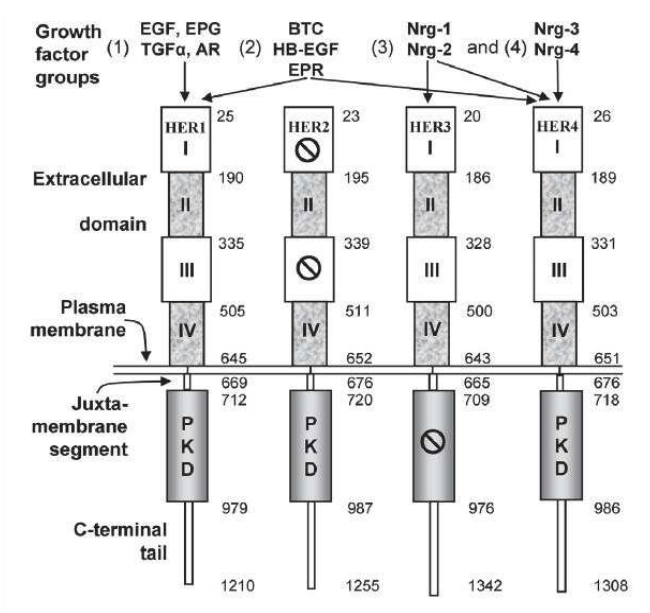


Figure 10 : Structure des récepteurs de la famille HER (Roskoski, 2014)

Les domaines I et III participent à la fixation du ligand sauf pour HER2 qui n'a pas de ligand connu. Le domaine II participe à la formation des dimères. Les récepteurs possèdent un domaine tyrosine kinase (PKD). Celui de HER3 est non fonctionnel. Les nombres correspondent aux numéros des acides aminés.

2. Les ligands de la famille HER

La famille des ligands de HER est composée de onze membres. Ils sont classés en trois groupes selon leur affinité pour les différents récepteurs. Il y a : les ligands spécifiques de l'EGFR : EGF (Epidermal growth factor), EPG (Epigène), TGF α (Transforming growth factor α) et Areg (Amphiréguline) ; les ligands de l'EGFR et de HER4 : BTC (Bétacelluline), HB-EGF (Heparin-binding EGF), EPR (Epiréguline) ; et les neurégulines : NRG-1 et 2 qui lient HER3 et HER4 et NRG-3 et 4 qui lient HER4. (cf. Tableau 2)

Ces ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires. Ces précurseurs possèdent une partie extracellulaire, un domaine transmembranaire et une petite partie intracellulaire. Le futur facteur de croissance est présent dans la partie extracellulaire du précurseur et est libéré après un clivage, appelé "ectodomain shedding", dû à l'activation d'une métalloprotéase appartenant à la famille ADAM en réponse à divers stimuli. Les facteurs de croissance sécrétés vont alors pouvoir se fixer aux différents récepteurs de la famille HER, les activer et induire une signalisation intracellulaire. (*Burguess, 2008*)

Récepteur	Ligands reconnus		
EGFR	EGF, EPG, TGF α , Areg	BTC, HB-EGF, EPR	
HER2			
HER3		NRG-1, NRG-2	NRG-3, NRG-4
HER4	BTC, HB-EGF, EPR	NRG-1, NRG-2	NRG-3, NRG-4

EGF = epidermal growth factor, EPG = épigène, TGF α = transforming growth factor, Areg = amphiréguline, BTC = bétacelluline, HB-EGF = heparin-binding EGF, EPR = épiréguline, NRG 1 à 4 = neuréguline

Tableau 2 : Les récepteurs de la famille HER et leurs ligands (Adapté d'après Roskoski, 2014)

3. Activation de l'EGFR et voies de signalisation

1) Le mécanisme d'activation de l'EGFR

En l'absence de ligand, l'EGFR existe sous forme de monomère inactif. Le domaine extracellulaire de l'EGFR est replié sur lui-même ("closed conformation") à cause d'une interaction entre ses domaines II et IV ce qui empêche la dimérisation (cf. [Figure 11](#)).

En présence de facteur de croissance, la fixation d'un ligand aux domaines I et III du récepteur monomérique va permettre son déploiement ("extended conformation") et ainsi rendre le domaine II libre pour une interaction avec un autre monomère (*Sergina, 2008*) (cf. [Figure 11](#)). Cela va induire un dimère actif qui sera soit un homodimère, composé de deux monomères identiques, soit un hétérodimère, composé de deux monomères différents. Il est à noter que les dimères les plus actifs comprennent HER2. Il est le partenaire privilégié pour la formation d'hétérodimères et la signalisation du complexe HER2/HER3 persiste plus longtemps que celle des complexes comprenant l'EGFR (*Burguess, 2008*).

La dimérisation permet aux domaines intracellulaires de se rapprocher et à leur domaine tyrosine kinase d'interagir (*Sergina, 2008*) (cf. [Figure 11](#)). L'activation des domaines tyrosine kinase des récepteurs induit l'auto- ou la trans-phosphorylation d'un résidu tyrosine de la queue C-terminal d'un des deux monomères grâce au transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers un résidu tyrosine du dimère. Les résidus tyrosine phosphorylés vont servir de site de reconnaissance et de recrutement des protéines adaptatrices et initiateuses possédant des motifs de reconnaissance spécifique des phosphotyrosines : domaines SH2 (Src homology domain 2) et PTB (phosphotyrosine binding). Ces événements vont entraîner l'activation de diverses cascades de signalisation dont principalement les voies des MAPK, de la PI3K/Akt et de la phospholipase C (PLC- γ).

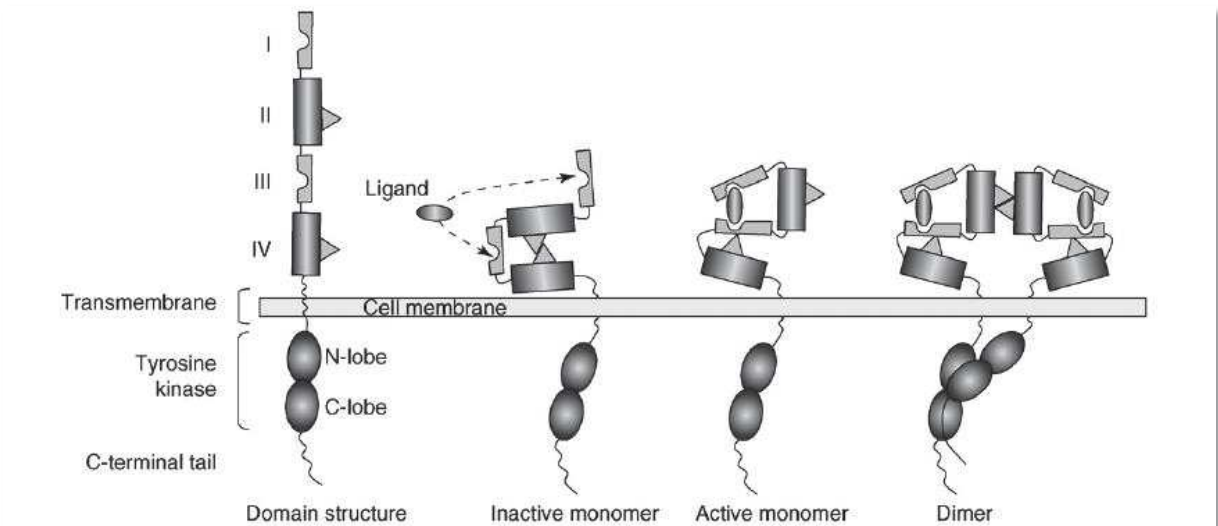


Figure 11 : Structure conformationnelle des récepteurs de la famille HER (Sergina, 2008).

2) Les voies de signalisation de l'EGFR

L'EGFR possède de multiples sites de phosphorylation (cf. Figure 12). Selon le site de phosphorylation, le recrutement de la protéine adaptatrice variera et la voie de signalisation activée en aval également (cf. Figure 13). (Roskoski, 2014)

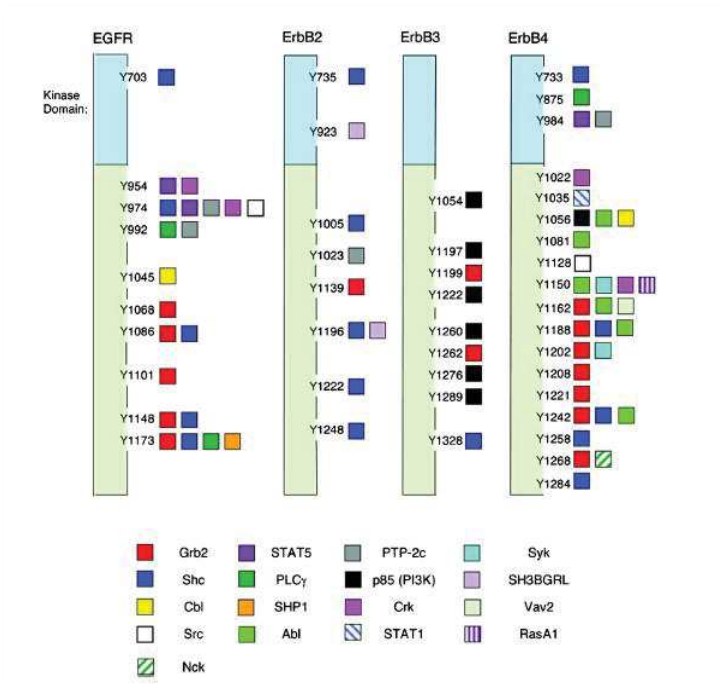


Figure 12 : Sites de phosphorylation des différents membres de la famille HER (Roskoski, 2014)

La voie MAPK

L'EGFR active la voie des MAPK principalement après la phosphorylation des tyrosines 1068 et 1086 (*Jorissen, 2003*). Ce résidu phosphorylé permet la fixation de la protéine Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), possédant un domaine SH2, puis l'activation de Sos (son of sevenless), un facteur d'échange. En favorisant la fixation de Ras à une GTP, Sos active Ras. Ras active alors Raf (serine/threonine protein kinase), qui se dimérise, s'autophosphoryle et à son tour active MEK1/2 (mitogen/extracellular signal-related kinase 1/2), puis ERK1/2 (extracellular signal-related kinase 1/2). Il subit alors une translocation jusque dans le noyau où il va alors pouvoir activer d'autres kinases ou des facteurs de transcription. La voie des MAPK est surtout connue pour agir sur la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

La voie PI3K/Akt

La PI3K (phosphoinositide 3-kinase) est un hétérodimère à activité kinase constitué de deux protéines dont une régulatrice (p85) et une catalytique (p110 ou PI3KCA). PI3K peut être activée indirectement par l'intermédiaire de Grb2 (Gab1). Il est à noter que HER3 peut l'activer directement grâce à six sites de fixation de p85 sur le récepteur (*Roskoski, 2014*). PI3K activée induit alors la phosphorylation de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) ce qui conduit à la formation de PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) qui recrute Akt (protein serine/threonine kinase), aussi connu sous le nom de PKB (protein kinase B). Akt catalyse la phosphorylation et l'activation de mTOR (mammalian target of rapamycin) et la phosphorylation et l'inhibition de BAD (Bcl2-associated death promoter). Cette voie régule la survie cellulaire, l'apoptose. (*Dreyer, 2009*)

Il est à noter que *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) catalyse l'hydrolyse de PIP3 en PIP2 ce qui régule négativement la voie PI3K/Akt.

La voie PLC- γ /PKC

Le domaine SH2 de PLC- γ lui permet de se fixer directement à l'EGFR au niveau de ses tyrosines 992 et/ou 1173 et de s'activer. Son activation lui permet de catalyser l'hydrolyse de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) et en DAG (diacylglycérol). IP3 favorise la libération des ions calcium et DAG active PKC (protein-serine/threonine kinase C). A son tour, PKC phosphoryle des substrats qui agissent sur de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la survie cellulaire, la migration et l'adhésion cellulaire. (*Roskosky, 2014*)

Autres voies de signalisation

L'EGFR est également capable d'activer la voie des STAT (signal transducer and activator of transcription). Les STAT sont phosphorylés par l'EGFR ce qui permet leur homo- ou hétérodimérisation, et leur translocation dans le noyau où ils vont agir comme facteur de transcription contrôlant la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose. (Jorissen, 2003).

Enfin, l'EGFR peut activer la voie de Src. Il possède un domaine SH2, qui lui permet de se fixer à l'EGFR, et un domaine à activité tyrosine kinase. Cette voie est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire. Elle peut activer la voie des STAT. Elle joue également un rôle dans la migration des cellules de part l'activation de FAK (focal adhesion kinase) et la phosphorylation de Cav1 (caveolin 1) (Jones, 2014).

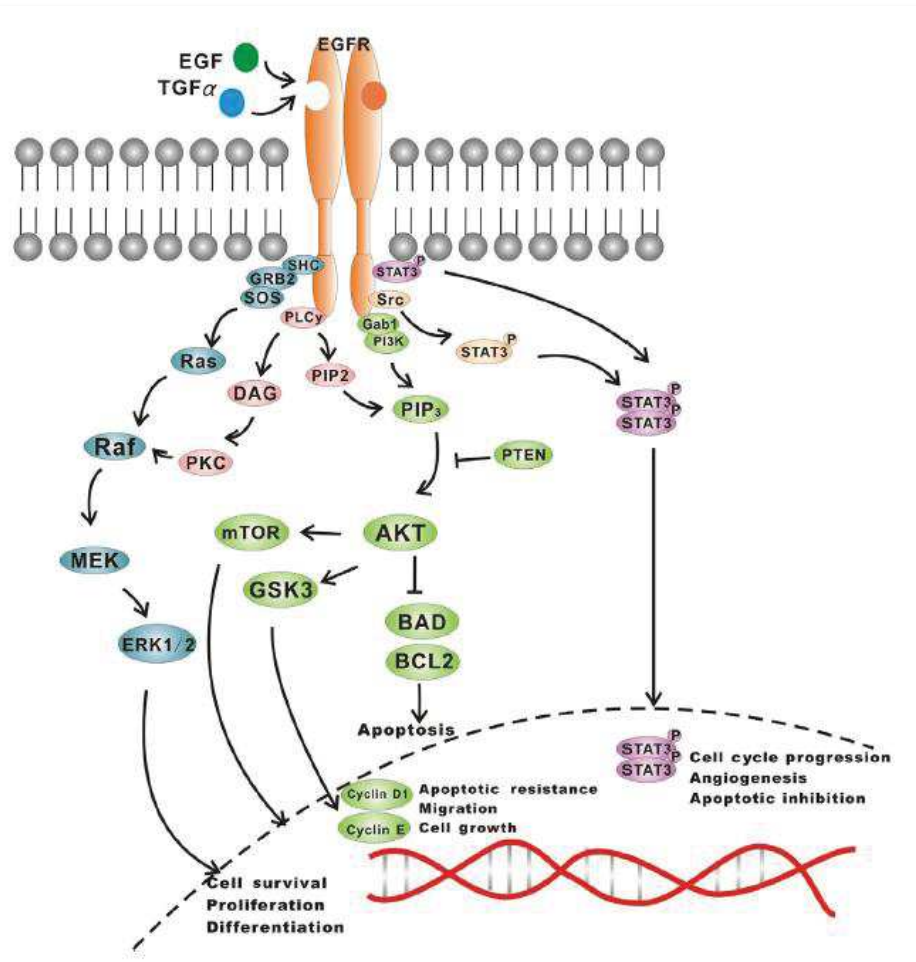


Figure 13 : L'EGFR et ses voies de signalisation (Huang, 2015).

L'autophosphorylation de l'EGFR permet l'activation de voies de signalisation grâce à des protéines adaptatrices. Les principales voies de signalisation sont les voies (1) des MAPK (RAS/RAF/MEK) ; (2) de la PI3K/AKT ; (3) des PLC-γ/PKC et (4) des STAT.

4. Le trafic intracellulaire de l'EGFR

Après l'activation du récepteur par son ligand, le récepteur est internalisé. Il est ensuite soit recyclé à la membrane plasmique, soit dégradé, soit transporté vers des compartiments intracellulaires tels que la mitochondrie ou le noyau.

1) L'internalisation de l'EGFR

A la suite de l'activation par ses ligands, l'EGFR reste environ dix minutes à la membrane plasmique et est ensuite internalisé dans des endosomes.

L'endocytose du récepteur peut faire intervenir deux mécanismes différents. L'endocytose médiée par la clathrine (CME, clathrin-mediated endocytosis) est la principale voie d'internalisation de l'EGFR et la plus rapide. Elle permet la prolongation de la signalisation et mène essentiellement au recyclage (*Sigismund, 2008*). Cette voie est privilégiée lorsque la concentration en ligand est faible (1-2ng/mL) (concentration physiologique) (*Sigismund, 2005*). A l'inverse, lorsque la concentration en ligand est plus importante (20ng/mL), l'EGFR est internalisé par un mécanisme indépendant des clathrines (CIE, clathrin-independent endocytosis). Ce mécanisme est plus lent (*Tomas, 2014*) et conduit préférentiellement à la dégradation du récepteur (*Jones, 2014*).

Dans les endosomes, le récepteur peut interagir avec la majorité de ses effecteurs. En effet, l'EGFR endocyté est capable d'activer des voies de signalisation telles que les voies MAPK, PI3K/Akt ou PLC γ (*Sebastian, 2006*). Mais, l'endocytose est aussi un mécanisme de régulation négative du signal, puisqu'elle peut moduler la durée et l'intensité du signal médié par l'activation du récepteur par ses ligands et mener soit à la dégradation, soit au recyclage du récepteur.

De plus, le devenir du récepteur après l'endocytose est influencé par le type de ligand et le dimère formé après l'activation par le ligand. Par exemple, en réponse à l'EGF, les homodimères EGFR/EGFR sont davantage dégradés alors que les hétérodimères de l'EGFR sont recyclés (*Peschard, 2003*). De même, certains ligands vont favoriser le recyclage du récepteur alors que d'autres vont davantage conduire à sa dégradation. Ceci est dû à l'affinité du ligand pour son récepteur. Par exemple, l'EGF, qui a une grande affinité pour l'EGFR, reste lié plus longtemps à son récepteur ce qui entraîne une phosphorylation plus longue et une dégradation du récepteur. A l'inverse, le TGF α induit davantage de recyclage (*Longva,*

2002) car sa faible affinité pour son récepteur conduit à une rapide dissociation du complexe TGF α /EGFR au niveau des endosomes précoces. De même, l'Areg de par sa faible affinité diminue la dégradation du récepteur.

2) Le recyclage et la dégradation de l'EGFR

Après l'activation du récepteur et son internalisation, l'EGFR est transporté dans des endosomes précoces à partir desquels il peut avoir différents devenir.

Dégradation de l'EGFR

Après l'activation du récepteur par ses ligands, l'ubiquitine ligase E3 Cbl (C_{asitas} B-lineage lymphoma) est recrutée (cf. Figure 14) soit au niveau de la tyrosine 1045 de l'EGFR grâce à son domaine PTB (cf. Figure 12), soit *via* la protéine adaptatrice Grb2. Cbl ubiquitinye l'EGFR au niveau de certains de ses résidus lysine. Le récepteur est ensuite endocyté *via* un mécanisme CME ou CIE. Au sein des endosomes précoces, l'EGFR ubiquitinyé est reconnu par les protéines HRS (hepatocyte receptor substrate) et STAM (signal-transducing adaptor molecule). Ces protéines vont permettre l'adressage de l'EGFR au complexe ESCRT (endosomal sorting complex required for transport-I) qui permet le transfert de l'EGFR vers les CMV (corps multi-vésiculaires) puis les lysosomes où le récepteur sera dégradé. (Sebastian, 2006 et Madhus, 2009)

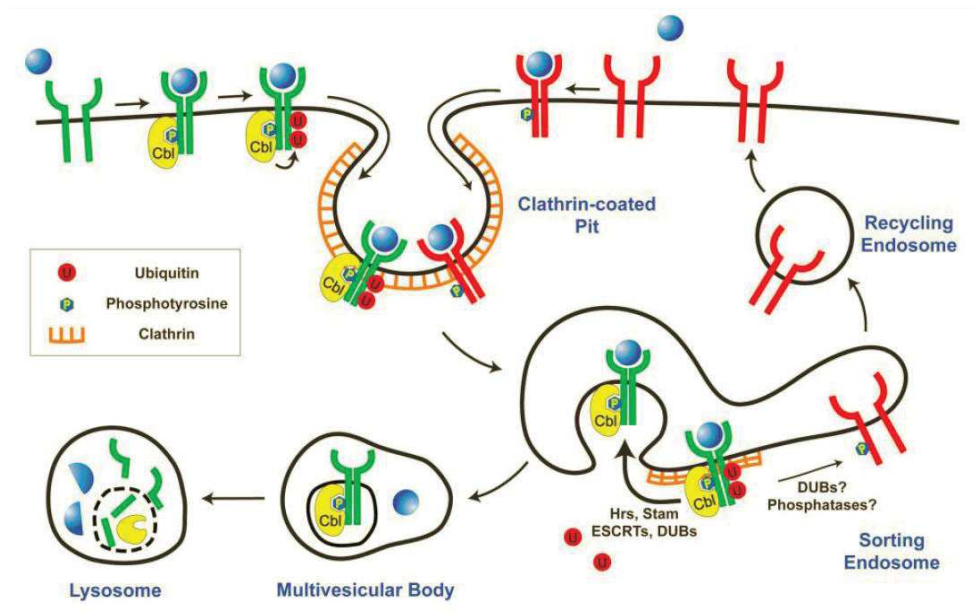


Figure 14 : Mécanismes de recyclage et la dégradation de l'EGFR (Peschard, 2003)

Recyclage de l'EGFR

Les récepteurs qui ne sont pas ubiquitinylés peuvent être recyclés et retourner à la membrane pour entrer dans un nouveau cycle d'activation/signalisation/endocytose. L'EGFR recyclé provient soit d'endosomes précoces directement (mécanisme plus rapide), soit de CMV (mécanisme plus lent). (*Sorkin, 2009*)

3) La translocation mitochondriale

L'EGFR peut aussi être adressé à la membrane de la mitochondrie. La translocation de l'EGFR à la mitochondrie implique une endocytose de type CME, l'activité de Src et une séquence de localisation mitochondriale (mitochondrial localization signal) située au niveau du domaine juxtamembranaire de l'EGFR (acides aminés 645 à 666) (*Demory, 2009*). Cependant, le mécanisme de ce transport mitochondrial n'est pas encore complètement élucidé (*Wang, 2012*).

Le rôle de l'EGFR mitochondrial reste largement méconnu mais il semblerait réguler l'apoptose et l'autophagie (*Han, 2012*). En effet, en réponse à l'EGF, l'EGFR mitochondrial est directement associé à la sous-unité II du cytochrome c (CoxII) qui est impliquée dans la régulation de l'apoptose (*Boerner, 2004*). Plus récemment, il a été montré que l'EGFR mitochondrial régule la dynamique mitochondriale et favorise l'invasion et les métastases dans les CBNPC (*Che, 2015*).

4) La translocation nucléaire

L'EGFR peut également être transporté jusque dans le noyau. Pour cela, après activation par un ligand, l'EGFR est internalisé par une endocytose clathrine-dépendante (*De Angelis Campos, 2011*).

Après son internalisation, l'EGFR interagit avec l'importine β 1 grâce à ses séquences NLS (nuclear localization signal) situées au niveau de sa partie juxtamembranaire et composées de trois groupes d'acides aminés basiques ⁶⁴⁵RRRHIVRKRTLRR⁶⁵⁷ (*Lo, 2006*). Les vésicules contenant le complexe EGFR/importine β 1 sont transportées vers l'appareil de Golgi par un transport rétrograde impliquant les microtubules et la dynéine. La syntaxine 6 permet la fusion des vésicules d'endosomes avec le Golgi (*Du, 2012*). Puis, le transport vésiculaire

entre le Golgi et le RE (réticulum endoplasmique) fait intervenir le complexe COPI (coat protein complex I) (Wang, 2010a). Enfin, l'interaction entre le complexe EGFR/importine β 1 et la nucléoporine Sec61 β permet le passage depuis la membrane externe du noyau à la membrane interne du noyau grâce au mécanisme de transport dit "INTERNET" (integral trafficking from the ER to the nuclear envelope transport) (Wang, 2010b et 2010c). Ce mécanisme permet au récepteur de passer à travers le pore nucléaire (NPC, nuclear pore complex) et ensuite d'être relâché dans le nucléoplasme. (cf. Figure 15)

La translocation nucléaire de l'EGFR est dépendante de Vps34 (vacuolar protein sorting 34), une enzyme de la famille des PI3K de classe III (Daydé, 2015).

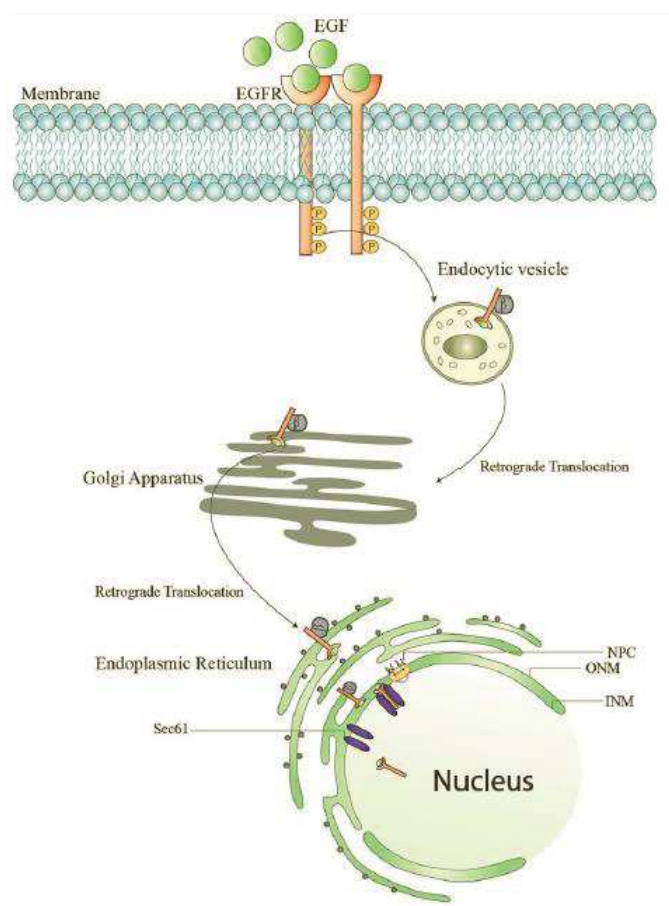


Figure 15 : Mécanisme de translocation nucléaire de l'EGFR depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau (Brand, 2011)

Il est également connu que la translocation nucléaire est possible pour les autres membres de la famille HER et d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase tels que FGFR, VEGFR, MET, IGF-1R... (Mills, 2012) Le mécanisme de translocation de l'IGF-1R sera détaillé dans le Chapitre IV.

5. La signalisation nucléaire de l'EGFR

Une fois dans le noyau, l'EGFR nucléaire peut : 1) agir en tant que co-régulateur transcriptionnel, 2) phosphoryler des protéines cibles et 3) interagir physiquement avec d'autres protéines afin de modifier leur activité. Il joue alors un rôle dans la prolifération cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN. (cf. [Figure 16](#))

1) La co-régulation transcriptionnelle

L'EGFR nucléaire agit comme un co-régulateur transcriptionnel pour de nombreux gènes. Cependant, l'EGFR ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, il doit s'associer à d'autres facteurs de transcription pour pouvoir interagir avec le génome. Le complexe EGFR nucléaire/régulateur transcriptionnel se lie à des séquences consensus riches en nucléotides AT (AT rich consensus sequences ou ATRS). Les motifs de ces séquences sont TNTTT ou TTTNT, où N est un nucléotide quelconque.

Jusqu'à présent, l'EGFR nucléaire a été décrit pour activer, grâce à différents facteurs de transcription, l'expression de sept gènes impliqués dans des mécanismes oncogéniques, tels que la prolifération et la survie cellulaire, ce qui peut induire des résistances aux traitements (*Brand, 2010*).

L'interaction de l'EGFR avec le promoteur des gènes de la cyclineD1 (*Lin, 2001*), de B-Myb (*Hanada, 2006*) et c-Myc (*Jaganathan, 2011*) favorise la prolifération cellulaire (*Brand, 2010*). La fixation de l'EGFR nucléaire au promoteur du gène de la cyclineD1 (*CCND1*) est régulée par MUC1 (mucin-1) (*Bitler, 2010*) ou par la RNA hélicase. Les promoteurs des gènes de B-Myb et c-Myc sont, respectivement, les cibles des complexes EGFR nucléaire/E2F1 et EGFR nucléaire/Src/STAT3. Ce dernier a notamment été identifié dans des modèles de cancer du pancréas et son inhibition permet de diminuer la croissance cellulaire.

A l'inverse, l'EGFR nucléaire peut former un complexe répresseur de la transcription du gène de la CyclineD1 par association à la protéine suppressive de tumeur PMLIV (promyelocytic leukemia isoform IV). La surexpression de PMLIV réprime la croissance cellulaire de modèle de cancer du poumon (A549). (*Kuo, 2013*)

Le complexe EGFR nucléaire/STAT3 se lie au promoteur du gène de iNOS (inducible nitric oxide synthase) qui est impliqué dans l'angiogenèse et le pouvoir métastasant. L'expression de iNOS et de l'EGFR nucléaire dans des tumeurs de cancers du sein est corrélée à une moins bonne survie globale. (Lo, 2005). L'EGFR nucléaire/STAT3 peut également activer l'expression de COX-2 (cyclooxygenase-2) (Lo, 2010) ce qui est associé à la tumorigenèse des glioblastomes. Aurora-A (aurora kinase A) (Hung, 2008) est aussi connu pour être la cible du complexe EGFR nucléaire/STAT5. Sa surexpression produit une instabilité chromosomique en dérégulant la formation des fuseaux mitotiques.

L'EGFR nucléaire réprime l'expression de p14^{ARF} pour inhiber ses fonctions pro-apoptotiques dans des modèles de cancer du poumon ce qui contribue à la survie cellulaire de ces cellules cancéreuses (Daydé, 2015).

L'EGFR nucléaire régule positivement l'expression de BCRP (breast cancer resistant protein) aussi appelé ABCG2, qui joue un rôle dans l'efflux des molécules. Ceci contribue à la résistance acquise au gefitinib dans des cellules de cancer du sein (Huang, 2011).

2) La phosphorylation de protéines cibles

L'EGFR nucléaire conserve son activité tyrosine kinase dans le noyau, il peut ainsi phosphoryler des protéines. Il phosphoryle directement PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ce qui stabilise la protéine et permet le recrutement de l'ADN polymérase, de l'ADN ligase et la réparation de l'ADN pendant la réplication.

3) L'interaction protéine-protéine

La DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) est une serine/threonine kinase qui est impliquée dans la réparation des cassures de l'ADN double brin par jonction d'extrémités non homologues (non-homologous end joining DNA repair). L'interaction entre l'EGFR nucléaire et la DNA-PK initie la réparation des dommages à l'ADN. Il a été montré que l'association entre ces protéines est fortement accrue en présence de cisplatine et rayonnements ionisants (Liccardi, 2011) ce qui indique que l'EGFR nucléaire joue un rôle dans la résistance à la radiothérapie. (Brand, 2010)

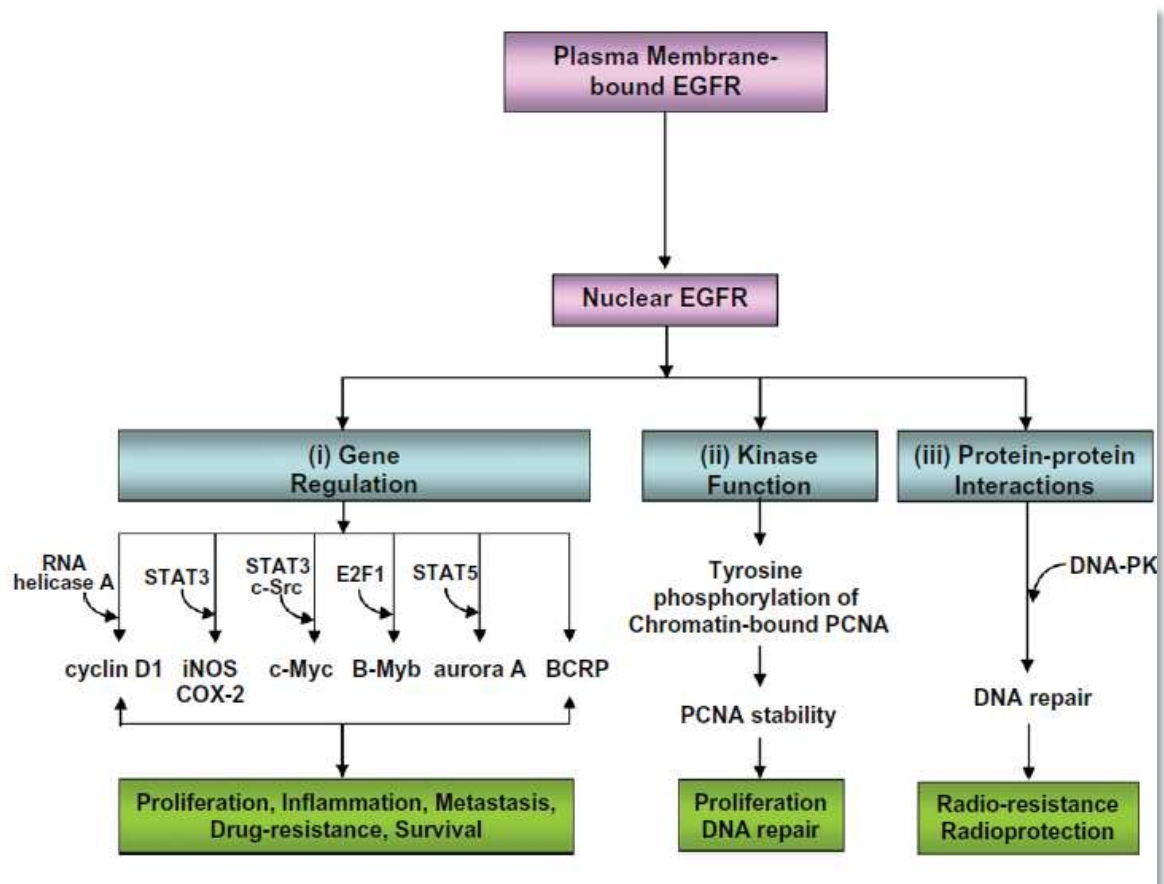


Figure 16 : La signalisation nucléaire de l'EGFR (Han, 2012).

Une fois dans le noyau, l'EGFR nucléaire peut (i) agir en tant que co-régulateur transcriptionnel, (ii) peut phosphoryler des protéines cibles et peut (iii) également interagir physiquement avec d'autres protéines afin de modifier leur activité

Cancer	Publication	Nombre de patients	% d'EGFR nucléaire	Corrélation
Bouche	Lo, 2005	37	24%	Mauvais taux de survie
Col de l'utérus	Tervahauta, 1994	97	37%	
Ovaire	Xia, 2009	221	28%	Mauvais taux de survie
Pharynx	Psyrrri, 2005	67	49%	Peu ou pas de réponse aux chimiothérapies en 1 ^{ère} ligne
Poumon	Traynor, 2013	88	26%	Stade avancé de la tumeur, survie globale plus courte
Sein	Hadzisejdic, 2010	113	40%	Taille de la tumeur
Sein	Lo, 2005	130	38%	Mauvais taux de survie, prolifération cellulaire
Vésicule biliaire	Li, 2011	104	24%	Mauvais taux de survie
Vessie	Lipponen, 1994	234	31%	Stade avancé de la tumeur prolifération cellulaire

Tableau 3 : Expression nucléaire de l'EGFR dans différents types de cancers. (Adapté de Brand, 2011)

L'EGFR nucléaire est surexprimé dans de nombreux cancers tels que les cancers de la vessie, du col de l'utérus, du sein, de l'ovaire, de la bouche, du pharynx, de la vésicule biliaire et du poumon. Il est associé à la prolifération cellulaire et à un mauvais taux de survie. (Brand, 2011) (cf. [Tableau 3](#))

Pour conclure, il est important de noter que l'EGFR nucléaire joue un rôle dans la résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie, au gefitinib dans le cancer du sein et également au cetuximab dans le cancer du poumon comme nous le verrons dans la partie suivante. (Brand, 2011)

B. Les altérations de l'EGFR dans les CBNPC

Dans cette partie, nous énumérerons les différentes altérations de l'EGFR dans les cancers bronchiques et leur impact sur la carcinogenèse bronchique.

1. Les mutations de l'EGFR

L'EGFR peut présenter des mutations au niveau de son domaine tyrosine kinase dans sa partie intracellulaire et des mutations sur son domaine extracellulaire.

Les mutations du domaine tyrosine kinase de l'EGFR sont présentes dans 10 à 20% des CBNPC selon les populations et les sous-types histologiques étudiés.

Les mutations les plus fréquentes sont les mutations activatrices de l'*EGFR*. Elles ont lieu principalement sur les exons 18 à 21 au niveau du domaine tyrosine kinase de l'EGFR. La substitution d'une leucine en arginine au niveau du codon 858 (mutation **L858R**) représente environ 40% de ces mutations et les délétions au niveau de l'exon 19 (**Del19**) d'au moins cinq codons 746 à 750 comptent pour 40 à 45% d'entre elles. Elles sont retrouvées dans 60 à 80% des cas chez des femmes, non fumeuses, d'origine asiatiques et ayant un adénocarcinome (*Rosell, 2009*). D'autres mutations activatrices plus rares ont été décrites comme des substitutions au niveau de l'exon 18 dans 5% des cas (G719C, G719S, G719A, V689M...) ou au niveau de l'exon 20 dans moins de 1% des cas. Ces mutations induisent l'activation constitutive de l'EGFR et de ses voies d'aval ce qui permet la prolifération et la survie des cellules tumorales. D'autre part, du fait de ces mutations activatrices, l'EGFR a une meilleure affinité pour les EGFR-TKI (inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR) que pour l'ATP lui-même au niveau de sa poche à ATP. Ainsi, les cellules tumorales avec ces mutations auront une plus grande sensibilité à ces traitements que les cellules sans mutation.

Dans moins de 5% des cas, des mutations ponctuelles (T790M...) ou des insertions au niveau de l'exon 20 du domaine tyrosine kinase de l'EGFR sont associées à la résistance primaire aux EGFR-TKI. La mutation T790M favorise la fixation de l'ATP à celle de l'EGFR-TKI ce qui a pour conséquence l'activation du récepteur (*Soria, 2012*).

L'EGFR peut aussi être muté sur son domaine extracellulaire. Le mutant le plus fréquent est l'EGFRvIII. Il s'agit d'une délétion des exons 2 à 7, la jonction entre les exons 1

et 8 est réalisée grâce à l'ajout d'une nouvelle glycine. Cette mutation entraîne une perte de 267 acides aminés et un variant muté de 145kDa, et a pour conséquence la perte du domaine de fixation du ligand et l'activation du récepteur en l'absence de ligand. Cette mutation est présente chez 5% des carcinomes squameux et très rare dans les adénocarcinomes (*Langer, 2010*).

2. Haut niveau de copies du gène et surexpression protéique de l'EGFR

Une augmentation du niveau d'expression de l'EGFR a été observée dans de nombreux cancers tels que les cancers de la tête et du cou, de l'ovaire, du col de l'utérus, du sein, de l'estomac, du colon et du poumon. Elle est fréquemment liée à un pronostic défavorable. Dans le cas des CBNPC, l'EGFR est surexprimé dans 62% des cas et son expression est associée à un mauvais pronostic (*Sharma, 2007*). Cette surexpression est plus fréquente dans les cancers squameux que dans les adénocarcinomes (*Hirsch, 2003*).

L'amplification du gène de l'*EGFR* est présente dans un quart des cancers du poumon. L'augmentation du nombre de copies du gène est due soit à une amplification génique, soit à une polysomie du chromosome 7 porteur du gène de l'*EGFR*. Il existe une augmentation du nombre de copies dans 42% des adénocarcinomes. (*Hirsch, 2003 ; Liang, 2010*). L'amplification induit une surexpression de la protéine et est souvent présente en même temps qu'une mutation de l'*EGFR*.

La surexpression et le haut niveau de copies du gène sont associés à un meilleur taux de réponse aux EGFR-TKI (*Hirsch, 2007*). A l'inverse, une autre étude a montré que l'amplification génique n'était pas un marqueur prédictif de réponse aux EGFR-TKI (*Fiala, 2016*). Ces différences peuvent être expliquées par la différence de technique utilisée dans ces deux études. De plus, l'influence d'un haut niveau de copie du gène sur le pronostic reste aussi très controversée. Il semble qu'un haut niveau de copie du gène soit davantage en faveur d'un marqueur de bon pronostic pour les patients traités aux EGFR-TKI (*Hirsch, 2007 ; Dahabreh, 2010*). Cependant, dans les populations asiatiques, bien que 41% des CBNPC présentent un haut niveau de copies, il n'est pas associé à un bénéfice sur la survie (*De Cunha Santos, 2011*).

Les ligands de l'EGFR sont aussi fréquemment surexprimés dans les CBNPC. L'EGF, le TGF α et l'Areg établissent une boucle autocrine qui conduit à une hyperactivation du récepteur. Ceci est plutôt associé à un mauvais pronostic. (*Salomon, 1995*)

3. La localisation nucléaire de l'EGFR

Dans les CBNPC, une seule étude a mis en évidence l'impact de l'expression nucléaire de l'EGFR sur le pronostic des patients (*Traynor, 2013*). Cette étude a porté sur 88 échantillons de patients réévalués de stades I et II. La localisation nucléaire de l'EGFR est davantage présente dans les cancers squameux (40%) que dans les adénocarcinomes (17%). Elle est associée à un stade plus avancé de la maladie. La survie sans progression en présence d'EGFR nucléaire est plus courte (8,7 mois) que lorsqu'il n'y a pas d'EGFR nucléaire (14,5 mois). De même, pour la survie globale qui est de 14,1 mois en présence de marquage nucléaire de l'EGFR au lieu de 23,4 mois lorsqu'il n'a pas de marquage.

D'autre part, dans les CBNPC, l'EGFR nucléaire a été observé dans un modèle de lignées de tumeurs pulmonaires rendues résistantes au cetuximab. Il a été démontré que son accumulation nucléaire, activée par les kinases Yes et Lyn (famille des Src), contribue à la résistance au cetuximab. L'utilisation d'un inhibiteur des kinases de la famille des Src, le dasatinib, induit une diminution de l'expression nucléaire de l'EGFR, l'augmentation de son expression à la membrane plasmique et la resensibilisation au cetuximab. (*Li, 2009* et *Iida, 2012*)

C. L'EGFR : une cible thérapeutique privilégiée dans la prise en charge des CBNPC

De par le rôle clé que joue l'EGFR dans la carcinogenèse pulmonaire, des thérapies ciblées visant à le bloquer ont été développées.

Dans cette partie, nous développerons les deux types de thérapies ciblées visant l'EGFR : les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (cf. [Figure 17](#)). Puis, nous nous intéresserons plus particulièrement aux facteurs de sensibilité et de résistance aux EGFR-TKI.

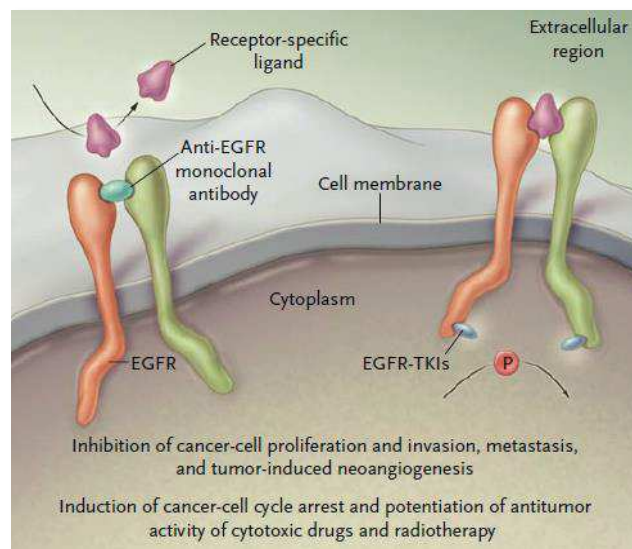


Figure 17 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-EGFR et des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI) (Ciardiello, 2008)

Les anticorps empêchent la fixation du ligand au récepteur et les inhibiteurs empêchent l'activation du récepteur en rendant impossible la fixation de l'ATP et donc sa phosphorylation. Dans les deux cas, la signalisation de l'EGFR est inactive.

1. Les anticorps monoclonaux anti-EGFR

Les anticorps monoclonaux, visant spécifiquement l'EGFR, se lient au récepteur au niveau du domaine III (site de fixation du ligand) de sa partie extracellulaire. Ceci va alors empêcher la fixation d'un ligand, la dimérisation, la phosphorylation et l'activation du récepteur (Li, 2005). Ensuite, soit l'anticorps anti-EGFR suscite une réponse immune et la mort de la cellule, soit le complexe anticorps/EGFR est internalisé et dégradé (Ciardiello, 2008). (cf. Figure 17)

Le cetuximab (Erbitux®) est actuellement utilisé dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR et possédant un *K-RAS* sauvage et dans le traitement des patients présentant un carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HAS, 2009). Pour le CBNPC, le cetuximab est toujours en phase d'essai clinique. L'essai clinique de phase III FLEX (first-line Erbitux in lung cancer) a montré que le cetuximab combiné à une chimiothérapie améliorait la survie globale comparativement à la chimiothérapie seule chez les patients atteints d'un CBNPC de stade avancé (Pirker, 2012). Il apporte aussi un bénéfice de survie sans progression, en combinaison avec une chimiothérapie, chez des patients qui ont eu un TKI pendant plus de six mois et qui ont échappé au traitement (Zhang, 2015).

De même, le panitumumab (Vectibix®) est indiqué pour le traitement des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique avec un *K-RAS* sauvage. Dans le cas du CBNPC, les premiers essais cliniques combinant le panitumumab à une chimiothérapie n'ont pas montré d'avantage sur la survie sans progression (Crawford, 2013). D'autres essais ont actuellement lieu pour étudier, par exemple, l'effet d'une combinaison de traitement panitumumab/carboplatine/pemetrexed chez des patients avec un cancer squameux avancé et avec *K-RAS* sauvage (NCT01042288).

D'autre part, plus récemment, le necitumumab (Portrazza®), un anticorps monoclonal anti-EGFR de seconde génération, a montré une amélioration de la survie globale et de la survie sans progression de la maladie en combinaison avec une double chimiothérapie (gemcitabine et cisplatine) comparativement à la chimiothérapie seule, chez des patients atteints de carcinomes squameux. Il a reçu l'AMM de la FDA (Food and Drug Administration) et de la EMA (European Medicines Agency) en décembre 2015 pour une

indication, en combinaison avec la gemcitabine et le cisplatine, dans le traitement des CBNPC squameux localement avancés ou métastatiques et chimio-naïfs. (Losanno, 2016)

2. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR

Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR ou EGFR-TKI (EGFR-tyrosine kinase receptor) sont des petites molécules pharmacologiques capables d'inhiber l'activité du domaine tyrosine kinase du récepteur. Les EGFR-TKI sont composés d'un noyau quinazoline qui entre en compétition avec l'ATP (adenosine triphosphate). Ils se fixent, de manière réversible ou irréversible, au niveau de la poche à ATP de l'EGFR empêchant ainsi la fixation de l'ATP. L'échange de phosphate n'étant plus possible entre l'EGFR et l'ATP, la phosphorylation de l'EGFR est inhibée et les voies de signalisation en aval du récepteur ne peuvent pas être activées. (Ciardiello, 2008) (cf. Figure 17)

1) Les différents EGFR-TKI

Les premiers EGFR-TKI qui ont été développés sont le gefitinib (Iressa[®]) et l'erlotinib (Tarceva[®]).

A la suite de deux essais cliniques de phase II montrant l'activité clinique antitumorale du gefitinib chez des patients atteints de CBNPC non répondeurs à une ou plusieurs lignes de chimiothérapie, la FDA a autorisé l'utilisation du gefitinib en 2003 en tant que traitement de troisième ligne des CBNPC avancés en progression après échec de deux lignes de chimiothérapie. Cependant, les essais cliniques suivants de phase III (ISEL) n'ont pas permis de confirmer l'avantage du gefitinib face à la chimiothérapie et ont contraint la FDA à restreindre l'utilisation aux seuls patients déjà sous traitement (Cataldo, 2011). Même si ISEL n'a pas montré un bénéfice sur la survie du gefitinib, l'analyse de sous-groupes de patients a montré une amélioration de la survie chez les femmes, les individus non-fumeurs et les patients porteurs d'un adénocarcinome ou d'origine asiatique. Ces observations ont conduit à l'essai clinique de phase III IPASS (Iressa pan-Asia study) comparant le gefitinib à la chimiothérapie (carboplatine/paclitaxel) en première ligne pour des CBNPC sélectionnés (patients avec un adénocarcinome et non-fumeurs). Cette étude a permis de mettre en évidence que les patients porteurs d'une mutation activatrice de l'EGFR avaient un meilleur taux de réponse au gefitinib (71,2% vs 1,1%) et une meilleure survie sans

progression (9,5 mois vs 6,3 mois) comparativement aux patients avec un EGFR sauvage. A l'inverse, les patients avec un EGFR sauvage ont montré une meilleure survie sans progression sous chimiothérapie (5,5 mois vs 1,5 mois pour le gefitinib). (Mok, 2009).

De même pour l'erlotinib, plusieurs essais cliniques de phase III (dont TITAN) n'ont pas montré de bénéfice de la thérapie ciblée comparativement à une chimiothérapie dans un groupe de patients atteints de CBNPC (non sélectionnés). Cependant, l'essai OPTIMAL a mis en évidence que l'erlotinib en première ligne de traitement améliorait de manière significative le taux de réponse et la survie sans progression chez des patients chinois porteurs de mutations activatrices de l'EGFR (en comparaison avec un traitement carboplatine/gemcitabine) (Zhou, 2011).

Ces études ont amené l'EMA à autoriser la mise sur le marché du gefitinib et de l'erlotinib en première ligne de traitement pour les patients ayant un CBNPC, localement avancé ou métastatique, et porteurs d'une mutation activatrice de l'EGFR.

Cependant, il a été montré que chez les patients répondeurs, les EGFR-TKI ne stabilisent la maladie que 6 à 12 mois (Stella, 2012). En effet, les patients finissent par développer une résistance au traitement. Le mécanisme de résistance acquise le plus commun est la mutation T790M sur l'exon 20 présente chez 50 à 60% des patients.

Pour pallier à ce problème, des EGFR-TKI de seconde et de troisième générations ont été développés. Les EGFR-TKI de seconde génération sont capables de cibler plusieurs membres de la famille HER et sont irréversibles. Ils forment une liaison covalente avec le récepteur. On compte parmi les TKI de seconde génération le dacomitinib (PF-00299804) et l'afatinib (Giotrif®).

Le dacomitinib inhibe de manière irréversible EGFR, HER2 et HER4 et est capable de bloquer les signalisations des différents homo- et hétérodimères de la famille (Carpenter, 2012). Les études précliniques ont rapporté qu'il était capable d'inhiber l'EGFR muté y compris la mutation T790M. En clinique, un essai de phase II a montré que le dacomitinib en seconde ligne de traitement prolongeait la survie sans progression comparativement à l'erlotinib (12,4 mois vs 8,3 mois). Un essai de phase III est actuellement en cours avec le gefitinib dans les mêmes conditions. Le dacomitinib a montré des effets prometteurs chez les patients non-fumeurs qui ont une mutation activatrice de l'EGFR et un gène *K-RAS* sauvage (Ou, 2012). (Hirsh, 2015)

L'afatinib se lie de manière covalente à l'EGFR, à HER2 et à HER4 et inhibe les signalisations des différents dimères de la famille HER. LUX-lung 3, un essai de phase III, a

mis en évidence que l'afatinib avait un bénéfice sur la survie sans progression chez des patients avec un adénocarcinome et une mutation de l'*EGFR* en comparaison avec la chimiothérapie. En effet, elle est de 11,1 mois sous afatinib contre 6,9 mois sous cisplatine/pemetrexed (*Sequist, 2013*). De même, au cours de l'essai LUX-lung 6, les patients possédant une mutation de l'*EGFR* ont montré une progression sans survie de 11 mois avec l'afatinib et de 5,5 mois avec le traitement gemcitabine/cisplatine. Ces études ont alors mené l'EMA à autoriser la mise sur le marché de l'afatinib pour une indication en monothérapie dans le traitement des patients naïfs pour les EGFR-TKI avec un CBNPC localement avancé ou métastatique et porteurs d'une mutation activatrice de l'*EGFR* (*HAS, 2014*). (*Hirsh, 2015* et *Lopes, 2015*)

La troisième génération d'EGFR-TKI se fixe de manière irréversible à l'*EGFR* muté T790M. On trouve notamment l'AZD9291 (osimertinib, Tagrisso®) et le rociletinib (CO-1686). (*Brosseau, 2015*)

L'AZD9291 se lie au domaine tyrosine kinase de l'EGFR de façon irréversible en ciblant le résidu cystéine Cys797 du site de liaison à l'ATP *via* la formation d'une liaison covalente (*Cross, 2014*). Il montre des effets secondaires peu fréquents et de faible grade comparativement aux EGFR-TKI de première génération. Les patients avec un *EGFR* muté T790M présentent un meilleur taux de réponse (61%) et de survie sans progression (9,6 mois) que les patients non mutés (21% et 4,3 mois) (*Jänne, 2015*). Il a reçu une AMM conditionnelle de l'EMA en février 2016 pour le traitement des patients atteints d'un CBNPC de stade avancé ou métastatique avec un *EGFR* muté T790M.

Le rociletinib cible sélectivement les formes mutées de l'*EGFR*. Ses effets secondaires sont essentiellement les diarrhées et l'hyperglycémie retrouvée chez plus de la moitié des patients. Ceci est dû à un métabolite actif du rociletinib qui bloque le récepteur de l'insuline et de l'IGF-1. Au cours d'une phase II comptant 130 patients présentant un CBNPC en progression après traitement par un EGFR-TKI de première génération, le taux de réponse était de 59% chez les patients porteurs de la mutation T790M contre 29% chez les patients n'ayant pas la mutation. Il permet aussi une meilleure survie sans progression chez les patients mutés (13,1 mois contre 5,6 mois chez les patients non mutés) (*Sequist, 2015*).

Des essais de phase III sont en cours pour ces deux molécules. Ils permettront certainement de définir une nouvelle approche thérapeutique.

2) Les facteurs de sensibilité aux EGFR-TKI

Les mutations de l'*EGFR* au niveau de son domaine tyrosine kinase sont le premier facteur de sensibilité aux EGFR-TKI. Ces mutations induisent une activation constitutive du récepteur. Chez les patients atteints d'un CBNPC, elles représentent environ 10% des cas en Europe et 30 à 40% des cas en Asie (*Roskoski, 2014*). Comme cela a déjà été dit précédemment, deux mutations très majoritaires ont été mises en évidence dans les cas de sensibilité aux EGFR-TKI : la substitution L858R et la délétion Del19. Ces deux mutations comptent pour 80 à 90% des cas. Il a été montré que les tumeurs exprimant un *EGFR* avec la délétion 19 répondent mieux aux traitements que ceux porteurs de la mutation L858R (*Cohen, 2010*) sans qu'aucune explication ne soit connue pour le moment.

Il existe d'autres mutations, plus rares, qui peuvent également être des facteurs de sensibilité. Notamment, on trouve les substitutions de la guanine 719 au niveau de l'exon 20 (G719C, G719S, G719A), les insertions d'acides aminés au niveau de l'exon 19, la substitution de la leucine 861 au niveau de l'exon 21 (L861Q) (*Wu, 2011*). (cf. [Figure 18](#))

Cependant, à l'inverse, une petite proportion de patients (1 à 20% selon les études cliniques) n'ayant pas de mutation activatrice de l'*EGFR* montre une réponse quand ils sont traités avec un EGFR-TKI (*Stella, 2012*). Les mutations activatrices ne semblent donc pas être le seul facteur à prendre en compte, notamment pour les patients avec un *EGFR* sauvage.

Il semble également que l'amplification de l'*EGFR* soit un facteur de sensibilité. Même si une augmentation du nombre de copies du gène ne permet pas de prédire une meilleure survie globale, il a été montré que les patients avec un haut niveau de copies du gène ont une survie sans progression plus longue et surtout un meilleur taux de réponse aux EGFR-TKI (*Hirsch, 2008* et *John, 2009*). Il semble que cela soit surtout le cas pour les populations caucasiennes (*Dahabreh, 2011*).

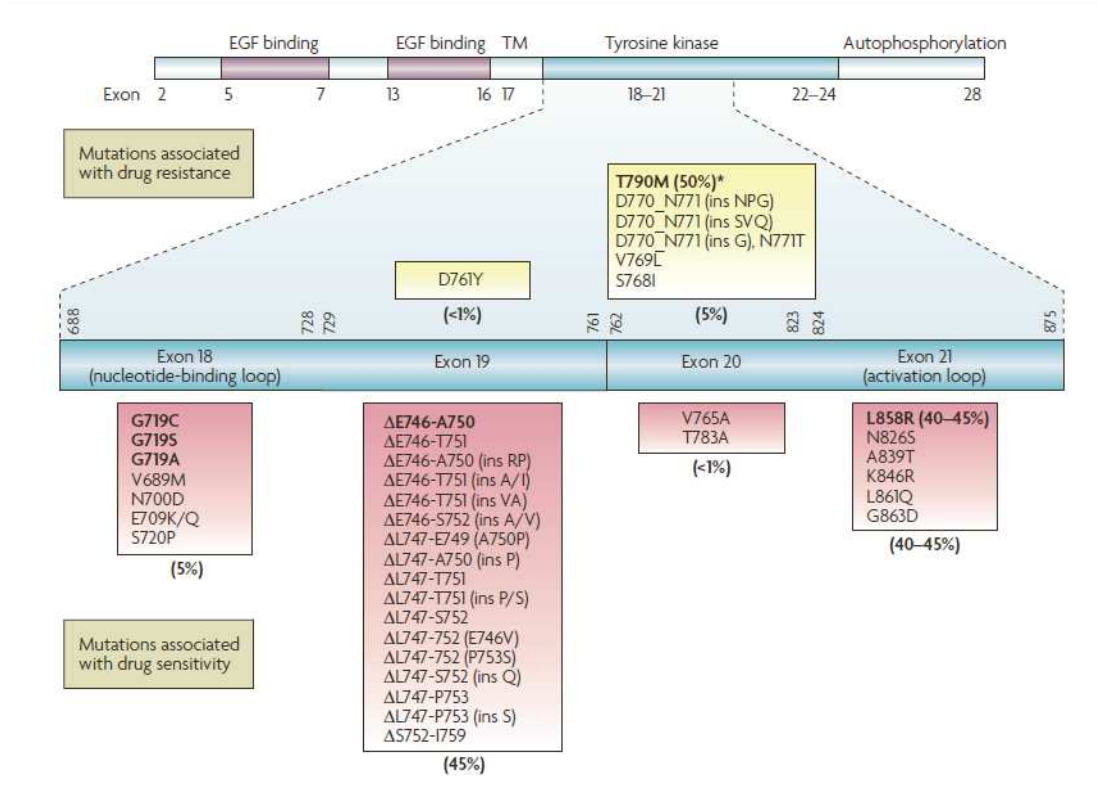


Figure 18 : Mutations de sensibilité et de résistance de l'EGFR pour le gefitinib et l'erlotinib dans le CBNPC (Sharma, 2007).

Représentation de l'EGFR et de la distribution de ses différents exons. Les mutations des exons 18 à 21 du domaine tyrosine kinase sont détaillées.

Les mutations de résistance sont représentées dans les cadres jaunes. La principale est la T790M présente dans plus de 50% des cas.

Les mutations de résistance, dans les cadres roses. Les mutations les plus fréquentes sont la L858R et Del 19.

3) Les facteurs de résistance primaire aux EGFR-TKI

Les patients atteints de CBNPC qui ne présentent pas de réponse initiale en réponse aux EGFR-TKI montrent une **résistance primaire**.

L'essai clinique IPASS a démontré que la majorité des tumeurs possédant un gène sauvage de l'EGFR ne sont pas sensibles au gefitinib. Ces tumeurs qui possèdent un *EGFR* sauvage présentent souvent une mutation sur un autre gène codant pour des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. L'absence de mutation activatrice de l'*EGFR* et *a fortiori* la mutation d'un autre de ces gènes induisent une résistance primaire aux EGFR-TKI.

Parmi ces altérations, on trouve la mutation activatrice de *K-RAS* au niveau de ses codons 12 et 13. Elle est présente dans 15 à 25% des CBNPC et on la retrouve préférentiellement chez les fumeurs et chez les caucasiens. *B-Raf* est muté chez 2 à 3% des

patients porteurs d'un CBNPC. La mutation la plus commune est la substitution V600E d'une valine par un acide glutamique. Ainsi, la kinase B-Raf est constitutivement activée, ainsi que les autres kinases de la voie MAPK. Pour pallier à cette résistance, des inhibiteurs de MEK sont utilisés.

Enfin, la translocation de *ALK* existe chez 5% CBNPC. Il existe de multiples réarrangements de *ALK* avec *EML4* (EML4-ALK) mais ils conduisent tous à l'activation constitutive de la protéine ALK et de ses voies d'aval impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire.

Les mutations de *K-RAS* et *B-Raf* et la translocation de *ALK* sont mutuellement exclusives des mutations de l'*EGFR*. (Pao, 2010)

D'autre part, parmi les 10 à 20% de patients qui présentent une mutation activatrice de l'EGFR, 70% d'entre eux vont montrer une régression de la tumeur et 30% d'entre eux vont présenter une résistance primaire. Deux mécanismes généraux de résistance primaire existent : 1) une seconde altération de l'EGFR qui va empêcher l'inhibition du récepteur par l'EGFR-TKI ou 2) l'altération d'un autre acteur de la signalisation. (cf. [Figure 20](#))

Seconde altération de l'EGFR

Certaines mutations secondaires de l'*EGFR*, plus rares que la substitution L858R ou la délétion Del19, sont présentes dans environ 5% des CBNPC et peuvent conférer une résistance primaire. Il s'agit notamment de mutations d'insertion ou de duplication sur l'exon 20 ou de la substitution D761Y de l'exon 19. La mutation T790M, bien que plus caractéristique de la résistance acquise, peut également être trouvée chez les patients TKI-naïfs. (Pao, 2010) (cf. [Figure 18](#))

Activation d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase

Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que l'IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor) est capable de s'hétérodimériser à l'EGFR en présence d'EGFR-TKI ce qui entraîne l'augmentation de l'expression de l'EGFR et l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK (Morgillo, 2006 et Morgillo, 2007). D'autre part, en réponse au gefitinib, l'Areg, l'EGFR et l'IGF-1R coopèrent pour activer la voie PI3K/Akt (Busser 2010, Hurbin, 2011 et Jeannot, 2014). Ces mécanismes seront davantage développés dans le Chapitre IV sur l'IGF-1R.

L'amplification de *MET* est associée à la résistance primaire dans environ 4% des CBNPC (Yu, 2014). Une surexpression de HGF (h_epatocyte growth factor), le ligand de MET, conduit à l'activation du récepteur et de la voie PI3K/Akt (Lin, 2012).

Activation de voies de signalisation

L'altération des voies de signalisation en aval de l'EGFR peut aussi induire une résistance primaire. Les cellules tumorales qui sont sensibles aux EGFR-TKI montrent normalement une diminution rapide de l'activité d'Akt en réponse au traitement. Or, la perte d'expression de *PTEN*, qui a lieu dans moins de 5% des CBNPC, empêche l'inactivation de la voie PI3K/Akt. De plus, la mutation de *PI3KCA* (sous-unité catalytique p110 de PI3K), présente dans 2% des CBNPC, va induire l'activation constitutive de PI3K. (Pao, 2010). Ces altérations permettent le maintien de l'activation de la voie PI3K/Akt impliquée dans la survie cellulaire.

D'autre part, l'hyperactivation de la voie de signalisation de NFκB (nuclear factor kappa B) pourrait aussi être une cause de résistance primaire chez les patients avec une mutation activatrice de l'*EGFR* (Pao, 2010).

Inhibition des voies d'apoptose

Le polymorphisme de BIM peut conférer une résistance aux EGFR-TKI (Hrustanovic, 2013). Ceci est possible grâce à la délétion d'un intron sur le gène de BIM qui résulte en l'expression d'une isoforme de BIM qui n'a pas son domaine pro-apoptotique BH3 (BCL2-homology domain 3) (Ng, 2012).

4) La résistance acquise en réponse aux EGFR-TKI

Les patients porteurs d'un CBNPC et d'une mutation activatrice de l'EGFR traités avec un EGFR-TKI finissent par développer une résistance au traitement après 6 à 12 mois de traitement. On parle de **résistance acquise** (cf. Figure 20). Une définition clinique de cette résistance acquise en réponse aux EGFR-TKI dans les CBNPC a été établie par Jackman *et al.* en 2009 (Jackman, 2009). Les patients doivent (1) avoir reçu un traitement avec un EGFR-TKI en monothérapie, (2) avoir soit une mutation activatrice de l'EGFR, soit un bénéfice clinique objectif avec un EGFR-TKI (significatif et pendant plus de 6 mois), (3) avoir une progression systémique de la maladie alors que le patient était sous traitement au maximum

30 jours plus tôt et (4) ne pas avoir eu de traitement systémique entre l'arrêt de l'EGFR-TKI et la nouvelle thérapie.

Une très large littérature recense ces mécanismes de résistance acquise mais tous ces articles ne présentent pas les mêmes mécanismes et tous ne les indiquent pas dans les mêmes proportions chez les patients. D'autre part, certains de ces mécanismes ont été validés chez les patients mais d'autres ont pour l'instant été mis en évidence seulement dans des modèles cellulaires.

A l'heure actuelle, on ne sait pas comment les tumeurs développent ces mécanismes de résistance acquise. Deux hypothèses ont été émises (cf. [Figure 19](#)) : 1) Il existe un sous-clone dans la tumeur qui possède déjà le mécanisme de résistance et le traitement aux EGFR-TKI favorise la sélection clonale de ces cellules. Elles deviennent alors majoritaires, ce qui conduit à l'échappement au traitement ; ou 2) Les mécanismes de résistance sont acquis en réponse aux facteurs environnementaux (*Oxnard, 2016*). Selon l'hypothèse, on peut imaginer que l'approche thérapeutique développée ne sera pas la même. Par exemple, dans le cas de la première hypothèse, les analyses des anomalies des tumeurs de patients devront être plus fines pour identifier des clones minoritaires et on peut supposer qu'un double traitement (EGFR-TKI + inhibiteur du mécanisme de résistance) pourra être souhaitable dès la première ligne de traitement. *A contrario*, dans le cas de la deuxième hypothèse, la tumeur du patient devra être régulièrement biopsiée et la thérapeutique ajustée en conséquence. Un double traitement en première ligne ne semblerait pas adapté.

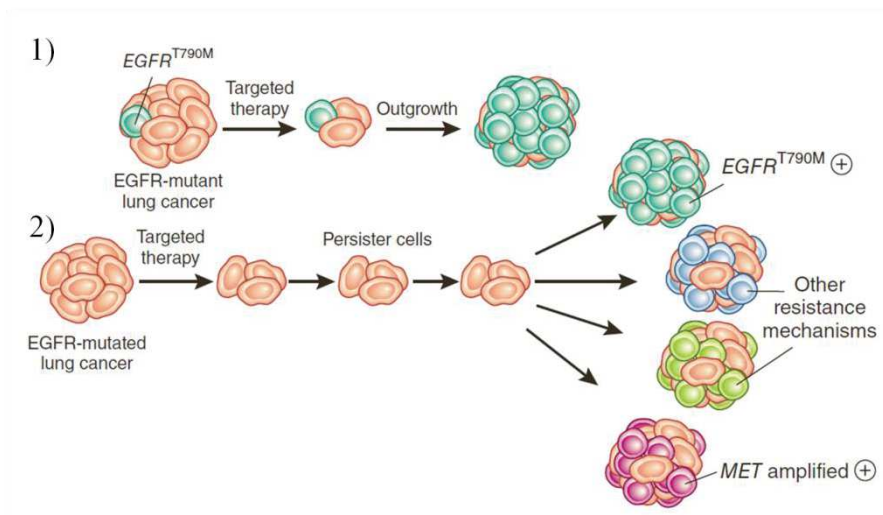


Figure 19 : Les différentes hypothèses d'apparition de la résistance acquise (*Oxnard, 2016*)

Seconde altération de l'EGFR

La mutation de résistance acquise la plus courante dans les tumeurs de patients est la mutation secondaire de l'*EGFR* T790M (substitution de la thréonine 790 en méthionine au niveau de l'exon 20). Cette mutation est présente dans 50 à 60% des cas de résistance. D'autres mutations ponctuelles de résistance peuvent apparaître comme la substitution D761Y sur l'exon 19. (cf. [Figure 18](#))

Activation d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase

L'amplification de *HER2* présente dans 12% des tumeurs et celle de *MET* dans 5% des tumeurs jouent aussi un rôle important. L'amplification de *MET* confère une résistance grâce à l'activation de la voie PI3K/AKT ([Engelman, 2007](#)). Environ 60% des cas d'amplification de *MET* sont présents en même temps que la mutation T790M ([Remon, 2014](#)). *MET* peut aussi être activé par la surexpression de son ligand. Quant à *HER2*, il est capable de s'hétérodimériser avec l'EGFR muté L858R/T790M et de maintenir l'activation des voies d'aval de l'EGFR. ([Cortot, 2014](#))

Une signalisation accrue de l'IGF-1R, au travers de l'inhibition des IGFBP (IGF-binding proteins), joue un rôle dans la résistance acquise de modèles *in vitro* de CBNPC avec un *EGFR* muté rendus résistants à des EGFR-TKI ([Cortot, 2012](#)). (cf. Chapitre IV)

Enfin, l'activation de FGFR et la surexpression de ses ligands ont été démontrées dans des lignées de CBNPC avec un *EGFR* muté rendues résistantes au gefitinib. Cependant, ce mécanisme n'a pas encore été validé dans des modèles cliniques.

Activation de voies de signalisation

L'activation de la voie des MAPK induit une résistance aux EGFR-TKI. Ce mécanisme a été validé dans des modèles pré-cliniques et dans des tumeurs de patients. La mutation *B-Raf* a lieu dans 1% des cas. ([Yu, 2014](#))

De même, la voie PI3K/Akt est impliquée dans des cas de résistance. Ceci est dû à la mutation activatrice de *PI3KCA* présente dans 5% des CBNPC et à la perte de *PTEN* ([Lin, 2012](#)).

Pour contourner l'activation de ces voies, des essais cliniques combinant un EGFR-TKI et soit un inhibiteur de MEK, soit un inhibiteur d'Akt sont en cours.

Transformation histologique des tumeurs

Un autre phénomène important est la modification phénotypique. On retrouve notamment la transition histologique du CBNPC vers le CBPC chez 2 à 14% des patients (*Cortot, 2014b*) et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) chez 5% d'entre eux. Le mécanisme de la transformation en cancer à petites cellules n'est pas connu à l'heure actuelle. La TEM est marquée à la fois par la perte de marqueurs de cellules épithéliales (E-cadhérine) et le gain de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine, fibronectine). Pour le moment, le mécanisme n'est pas élucidé mais des études ont montré que la surexpression de Notch-1, de TGF- β ou d'AXL favorisaient la TEM. (*Remon, 2014*)

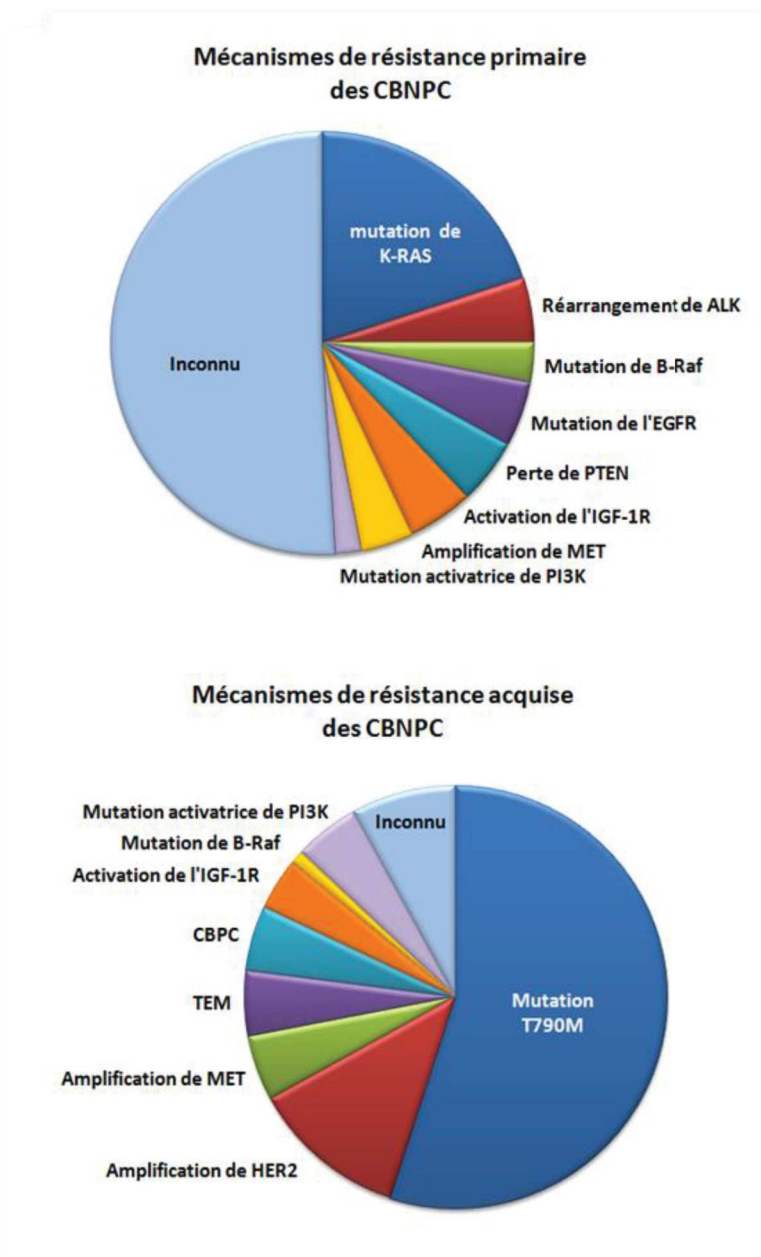


Figure 20 : Principaux mécanismes de résistance primaire et acquise aux EGFR-TKI chez les CBNPC.

- L'EGFR a une signalisation à la membrane plasmique et une signalisation dans le noyau
- L'EGFR nucléaire a un rôle dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN, dans la résistance aux thérapies anti-EGFR et aux radio-chimiothérapies
- L'EGFR est surexprimé dans plus de 60% des CBNPC
- Les mutations activatrices de l'EGFR (L858R, Del19) permettent l'utilisation des EGFR-TKI
- Des résistances acquises en réponse aux EGFR-TKI apparaissent quasi systématiquement ; la mutation T790M est le mécanisme prépondérant

III. L'Amphiréguline

L'Amphiréguline (Areg) est principalement connue pour son rôle comme ligand de l'EGFR. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux différentes formes de l'Areg et à son rôle dans la tumorigenèse.

A. L'Amphiréguline : structure et régulation

L'Amphiréguline ou Areg est un ligand de l'EGFR qui a été découvert par Shoyab *et al.* en 1988. Elle a été isolée dans le milieu de culture de cellules du cancer de sein humain MCF-7 traitées par du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Shoyab, 1988).

1. Le gène de l'Areg

Dans le génome humain, il existe deux copies du gène de l'Areg (*AREG* et *AREGB*). Ces deux copies sont situées sur le bras long du chromosome 4, ont une taille de 10 000 paires de bases et sont à une distance l'une de l'autre de 160 000 paires de bases. La contribution de chaque copie du gène sur l'expression totale de l'Areg est pour le moment inconnue. Le gène *AREG* est composé de six exons. La transcription de son ARNm (1 400bp) va permettre la synthèse d'un précurseur membranaire de 252 acides aminés : la pro-Areg. (Berasain, 2014)

2. La structure protéique de l'Areg

La pro-amphiréguline ou pro-Areg est formée de plusieurs domaines : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire (cf. [Figure 22](#)).

La partie extracellulaire se compose d'un peptide signal hydrophobe (acides aminés 1 à 20), d'une pro-région N-terminale (aa 20 à 101) contenant un site de glycosylation, d'un domaine de liaison à l'héparine (HB-binding domain) (aa 102 à 140) contenant un second site de glycosylation et une séquence NLS (nuclear localization signal), d'un domaine EGF-like (aa 141 à 181) et d'un domaine juxtamembranaire (aa 182 à 198) qui contient le principal site de clivage protéolytique (Lys187). Le domaine EGF-like se compose notamment de six cystéines, conservées par tous les membres de la famille des ligands de l'EGFR, qui

permettent la formation de ponts disulfure et ainsi de trois boucles (loop) au niveau de la structure secondaire de la protéine qui sont communes à tous les ligands de la famille. Pour la pro-Areg, les ponts disulfures sont formés entre les acides aminés 146 et 159, 154 et 170 et 172 et 181.

Le domaine transmembranaire est hydrophobe (aa 199 à 221) et la partie intracellulaire (aa 222 à 252) se compose d'une seconde séquence NLS et d'un site d'ubiquitinylation (Lys240) qui est impliqué dans l'endocytose de la pro-Areg. (*Berasain, 2014*)

La pro-Areg, précurseur transmembranaire, est clivée par l'enzyme TACE (tumor necrosis factor-α (TNF-α)-converting enzyme), une métalloprotéase de la famille ADAM (a desintegrin and metalloproteinase family) et aussi connue sous le nom d'ADAM17. Ce processus est appelé clivage protéolytique (ectodomain shedding).

Un premier clivage de cette pro-Areg (50kDa) N-glycosylée au niveau du site distal induit la libération d'une Areg soluble de 43kDa N-glycosylée et un clivage secondaire au niveau du site proximal induit deux pro-formes membranaires N-glycosylées de 26 et 28kDa. Ensuite, de la même manière, le clivage au niveau du site distal de ces deux formes de 26 et 28kDa induit la libération de deux composés solubles N-glycosylés de 19 et 21kDa et le clivage au niveau du site proximal induit une forme membranaire de 16kDa. Enfin, le clivage de la forme membranaire de 16kDa au niveau du site distal libère une forme soluble de 9kDa, qui a perdu une partie de domaine de liaison à l'héparine. (*Brown, 1998*) (cf. [Figure 21](#))

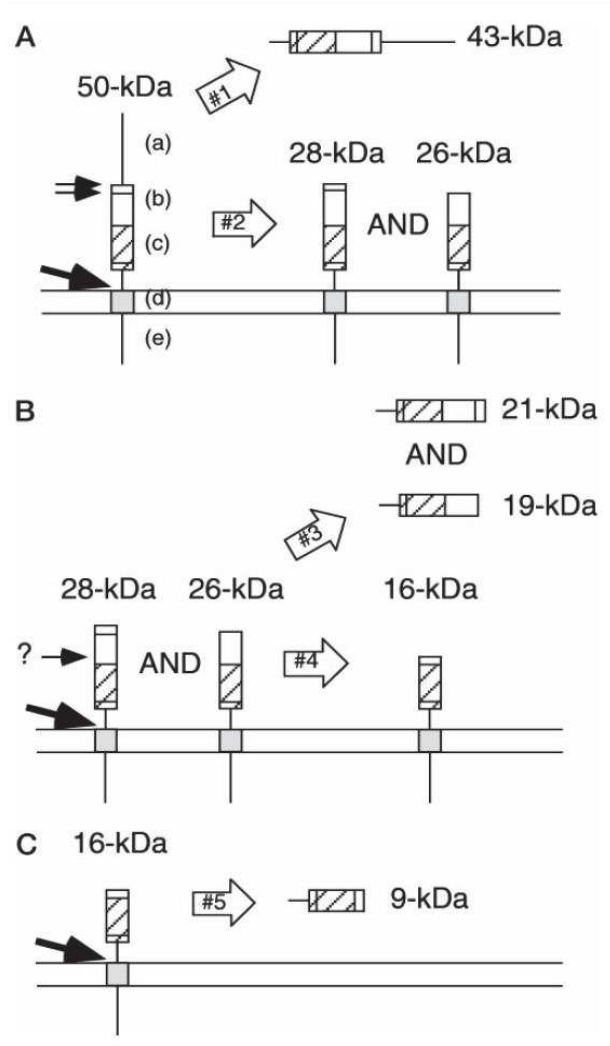


Figure 21 : Une proposition de modèle pour l'origine des différentes formes d'amphiréguline membranaires et sécrétées (Brown, 1998)

La pro-Areg transmembranaire de 50kDa est composée (a) d'une pro-région N-terminale, (b) d'un domaine de liaison à l'héparine, (c) d'un domaine EGF-like, (d) d'un domaine transmembranaire et (e) d'un fragment cytoplasmique. A/ Un premier clivage de la pro-Areg (50kDa) au niveau du site distal induit la libération d'un Areg soluble de 43kDa (#1) et un clivage secondaire au niveau du site proximal induit deux pro-formes membranaires de 26 et 28kDa (#2). B/ De même, le clivage au niveau du site distal de ces deux formes de 26 et 28kDa induit la libération de deux solubles de 19 et 21kDa (#3) et le clivage au niveau du site proximal induit une forme membranaire de 16kDa (#4). C/ Le clivage de la forme membranaire de 16kDa au niveau du site distal libère une forme soluble de 9kDa, qui a perdu une partie de domaine de liaison à l'héparine (#5).

Le clivage protéolytique de la pro-Areg conduit à la libération de différentes formes solubles de l'Areg dont la majoritaire a un poids moléculaire d'environ 20kDa et à l'apparition d'un fragment résiduel membranaire (Areg-CTF). (*Brown, 1998*) (cf. [Figure 22](#))

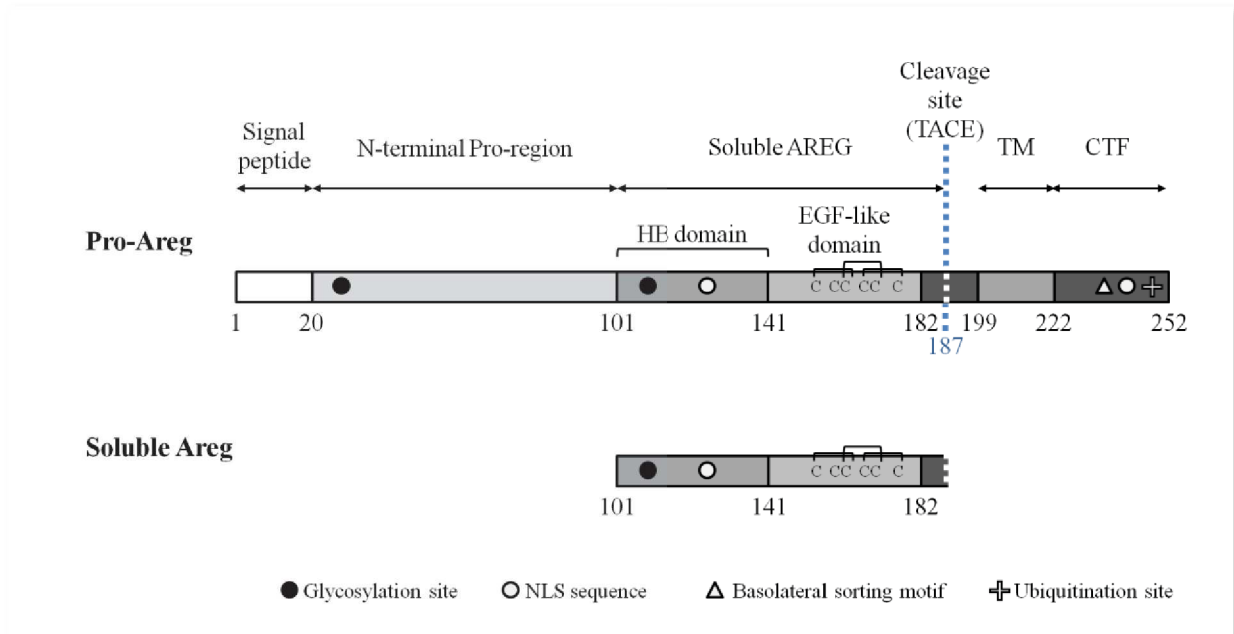


Figure 22 : Structure de la pro-Areg (adapté de *Berasain, 2014*)

Les différents domaines, les sites de modification post-traductionnelle et le principal site de clivage protéolytique sont indiqués. Les nombres indiquent les acides aminés. TM, transmembrane domain ; CTF, cytosolic fragment ; NLS, nuclear localization signal ; HB, heparin binding ; EGF, epidermal growth factor.

3. La régulation de l'expression de l'Areg

L'Areg est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. (*Berasain, 2014*)

1) La régulation transcriptionnelle de l'Areg

Le recrutement de facteurs de transcription au niveau du promoteur de l'*AREG* peut moduler l'expression du gène. Par exemple, l'expression du gène est activée par les signaux suivants : l'activation des voies de signalisation (cAMP/PKA, PKC), le tabac, l'hypoxie, des cytokines, des bactéries, des virus, des hormones (insuline, œstrogènes). (*Berasain, 2014*)

Pour l'appareil respiratoire, l'expression du gène de l'*AREG* est stimulée par de multiples facteurs. L'activation du récepteur PAR2 (protease-activated receptor 2) par l'enzyme HAT (human airway trypsin-like protease) favorise l'expression de l'Areg dans les

cellules épithéliales des voies respiratoires. De même, les xénobiotiques et les particules émises par les gaz d'échappement du gasoil activent son expression dans les cellules épithéliales bronchiques. (Berasain, 2014)

De plus, de manière intéressante, la transcription de l'*AREG* peut être induite par l'activation de l'EGFR par l'Areg elle-même par un mécanisme d'auto-stimulation ou par d'autres ligands de la famille HER (Barnard, 1994).

A contrario, l'activité du promoteur peut être réprimée. C'est le cas, par exemple, dans le cancer du sein où le gène suppresseur de tumeur *BRCA1* (breast cancer 1) se lie au promoteur de l'*AREG* et réprime son expression, suggérant que la perte d'expression de *BRCA1* pourrait contribuer à la tumorigenèse à travers l'induction de l'expression de l'*AREG*.

2) La régulation post-transcriptionnelle de l'Areg

L'expression du gène de l'*AREG* est aussi modulée par la régulation de la stabilité de l'ARNm de l'Areg. Il a été montré que le traitement de kératinocytes avec des ligands de l'EGFR induit non seulement une activation de la transcription du gène mais également une stabilisation de l'ARNm de l'Areg bien que le mécanisme impliqué reste inconnu (Stoll, 1999). Le traitement par du PMA de cellules cancéreuses de sein a montré une stabilisation de l'ARNm de l'Areg et également de manière intéressante la dégradation de l'ARNm empêche l'invasion médiée par l'Areg dans ce même modèle (Saeki, 2013).

4. La régulation de la distribution subcellulaire de l'Areg

L'Areg est synthétisée sous forme d'un précurseur (pro-Areg) qui est présent à la membrane plasmique et dont le clivage génère des formes solubles. La génération de ces formes solubles est influencée par l'activité protéolytique de TACE. Il est notamment activé par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) liés à leur ligand. (cf. Figure 24). Cependant, cette activation ne conduit pas au clivage de toutes les pro-Areg situées à la membrane plasmique ; une partie restera non clivée (Higashiyama, 2011).

La quantité d'Areg soluble est aussi moins importante lorsque l'Areg est ubiquitinylée sur sa lysine 240. En effet, l'Areg ubiquitinylée est rapidement endocytée et adressée aux

endosomes précoces. Il y a ainsi moins de pro-Areg clivées et par conséquent d'Areg solubles (Fukuda, 2012).

D'autre part, après le stimulus de clivage, les Areg-CTF et les pro-Areg non clivées peuvent être internalisées par endocytose. Ensuite, l'Areg-CTF peut être transférée jusqu'au lysosome et la pro-Areg non clivée jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) puis à la paroi interne de la membrane nucléaire (cf. Figure 23). La pro-Areg non clivée est adressée au RE après la perte de ses onze derniers acides aminés. Cette perte d'acides aminés conduit à l'exposition d'une séquence RKKL²⁴¹ au niveau de sa partie C-terminale. Cette séquence est un signal de rétention au RE (ER-retrieval signal) et elle permet le transport rétrograde depuis l'appareil de Golgi jusqu'au RE. (Isokane, 2008)

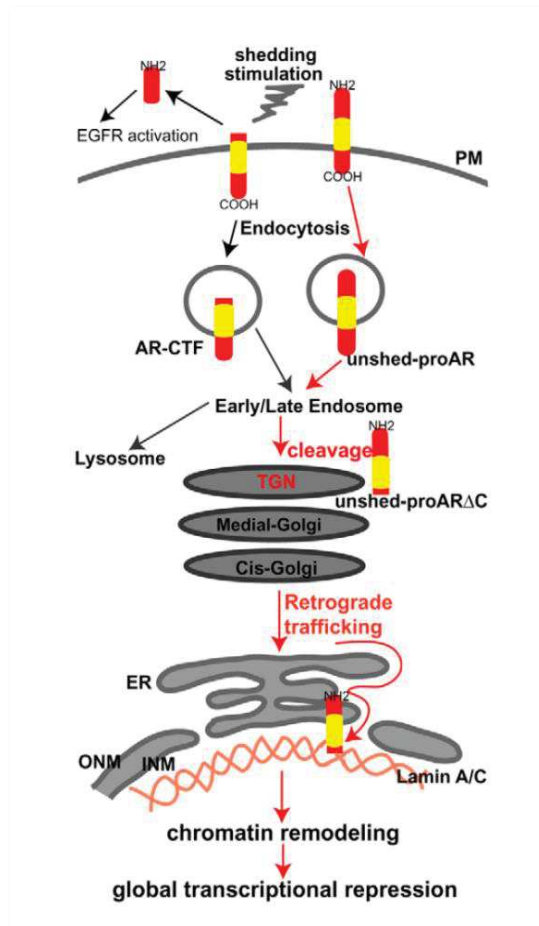


Figure 23 : Représentation schématique du trafic intracellulaire de la pro-Areg (Isokane, 2008)

La pro-Areg est essentiellement localisée à la membrane plasmique. Après l'activation du clivage par un stimulus, seule une partie des pro-Areg membranaires est clivée résultant en la formation d'un ligand soluble et d'un fragment C-terminal (Areg-CTF). Le reste des pro-Areg membranaires et les Areg-CTF est internalisé par endocytose puis adressé, soit au réticulum endoplasmique (endoplasmic reticulum, RE) puis à la membrane nucléaire soit au lysosome. La pro-Areg localisée à la membrane interne du noyau interagit avec la lamine A et réprime la transcription.

AR, amphiréguline; PM, plasma membrane; TGN, trans-Golgi Network; ONM, outer nuclear membrane; INM, inner nuclear membrane.

B. Les fonctions de l'amphiréguline

1. Le mode d'action de l'Areg

L'Areg montre une grande homologie avec les autres ligands de la famille HER, notamment avec l'EGF (38% d'homologie) ou le TGF α (32% d'homologie) (*Busser, 2011*). Comme eux, l'Areg est capable d'activer l'EGFR grâce à différents mécanismes.

Tout d'abord, l'Areg peut activer l'EGFR de manière autocrine et/ou paracrine (cf. Figure 24). L'Areg est un ligand spécifique de l'EGFR. Cependant, elle est aussi capable d'activer les autres membres de la famille HER grâce à la formation d'hétérodimères de l'EGFR. L'activation par l'Areg conduit autant à la formation de dimères EGFR/EGFR qu'EGFR/HER2 contrairement à l'activation par l'EGF qui conduit davantage à la formation de l'hétérodimère EGFR/HER2. La formation de dimères est plus rapide après l'activation des récepteurs par l'Areg que par l'EGF. Cependant, les dimères formés par l'Areg sont beaucoup moins stables dans le temps que ceux formés par l'EGF (*MacDonald, 2014*). De plus, l'affinité de l'Areg pour l'EGFR est cent fois plus faible que celle de l'EGF pour le récepteur (*MacDonald, 2014* et *Shoyab, 1989*) ce qui a pour conséquence que, à faible concentration, l'Areg induit moins facilement la phosphorylation du récepteur. Enfin, à des concentrations physiologiques, l'activation de l'EGFR par l'Areg conduit préférentiellement au recyclage du récepteur contrairement à l'EGF qui conduit préférentiellement à sa dégradation (*Baldys, 2009*).

Quant à la pro-Areg, elle peut aussi activer l'EGFR via un mécanisme juxtacrine. Mais elle peut également avoir un rôle indépendamment de l'EGFR. En effet, la pro-Areg, ainsi que l'Areg-CTF, peuvent être internalisés et avoir des fonctions nucléaires (cf. Figure 24). Cependant, les fonctions de l'Areg à la membrane nucléaire restent à l'heure actuelle encore très largement méconnues.

Enfin, l'Areg est présente dans le sang et peut ainsi agir comme facteur de croissance par un mécanisme endocrine.

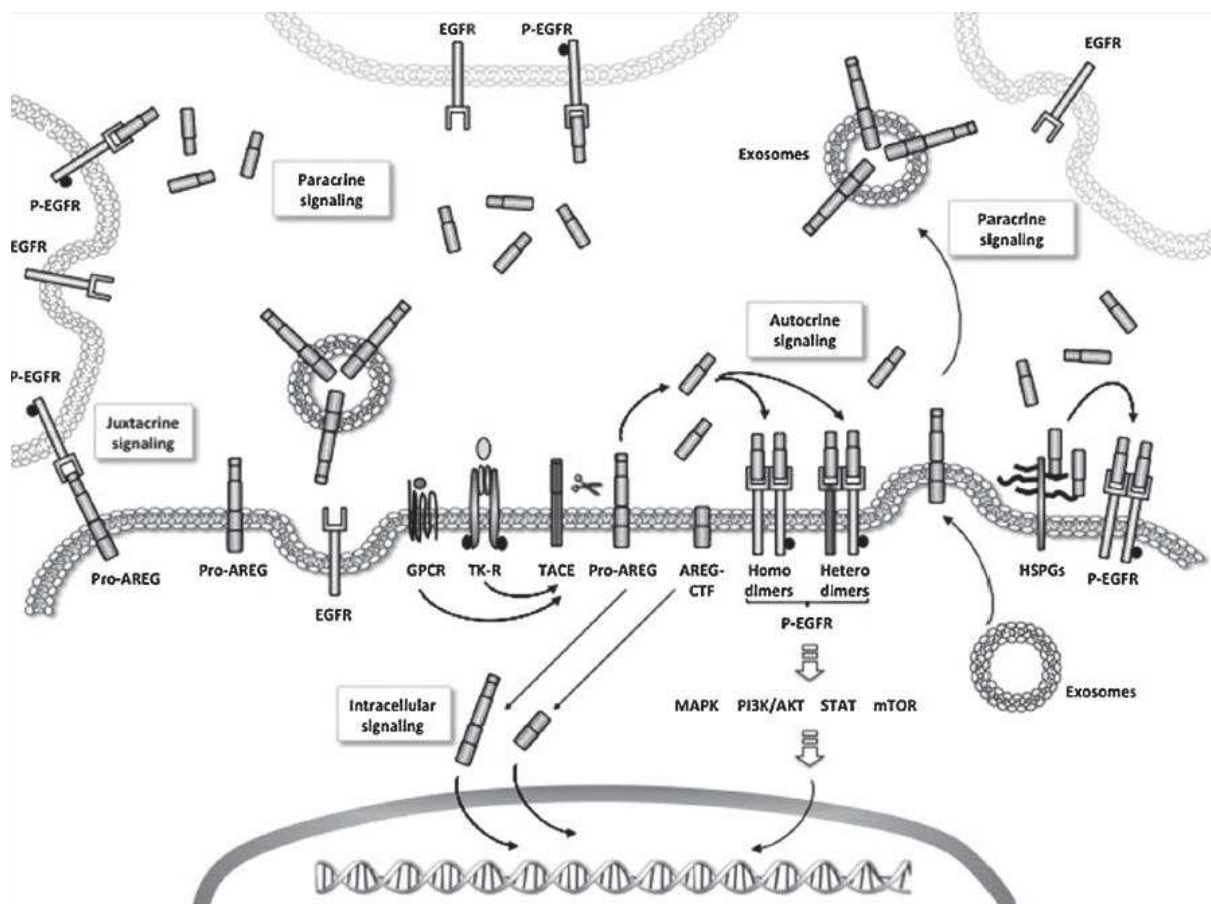


Figure 24 : Représentation schématique des différents modes de signalisation de l'Areg (Berasain, 2014) Le clivage de la pro-Areg par TACE est stimulé par les ligands de RTK (RTK) ou de RCPG (GPCR) et conduit à la sécrétion d'une Areg soluble. L'Areg soluble active l'EGFR par une signalisation autocrine ou paracrine. La pro-Areg peut aussi l'activation de manière juxtacrine. La signalisation intracellulaire est principalement transmise à travers la signalisation de l'EGFR (MAPK, PI3K/AKT, STAT). La pro-Areg et la partie CTF peuvent être internalisées et transportées jusque dans le noyau.

2. Les fonctions physiologiques de l'Areg

L'Areg module la prolifération cellulaire, l'invasion, la motilité, l'angiogenèse et l'inhibition de l'apoptose. (Berasain, 2014)

L'Areg est constitutivement exprimée dans de nombreux tissus, principalement dans les systèmes urinaire et reproductif (sein, ovaire, utérus, placenta, prostate), le système vasculaire (parois vasculaires, moelle osseuse, sang, lymph), le tractus gastro-intestinal (œsophage, foie, estomac, intestins) et le tractus respiratoire (poumon, trachée-artère).

Elle est importante notamment dans des processus biologiques tels que la morphogenèse de la prostate, des reins et des poumons, la formation des tissus osseux et neuronaux et la formation des canaux lactifères. (Busser, 2011)

Des souris KO (knock out) pour l'Areg sont viables et fertiles ce qui suggère que les fonctions de l'Areg peuvent être, au moins partiellement, compensées par les autres ligands de l'EGFR. Cependant, ces souris présentent des dommages chroniques du foie (Berasain, 2005). Elles souffrent aussi d'un problème dans le développement de leurs glandes mammaires et plus particulièrement dans la formation de leurs canaux lactifères ce qui suggère le rôle central de l'Areg dans la morphogenèse et la maturation des glandes mammaires au cours de la puberté. Cette anomalie entraîne une activité de lactation inefficace qui a des répercussions graves sur la progéniture qui souffre de malnutrition post-partum (Sternlich, 2005).

L'Areg joue également un rôle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire de cellules épithéliales mammaires, de fibroblastes, de kératinocytes.

Très récemment, il a d'ailleurs été montré que l'internalisation de la pro-Areg peut avoir un rôle dans la croissance cellulaire des kératinocytes. En effet, l'arrêt de la croissance cellulaire induite par la neutralisation de l'Areg (shAreg), et médié par un arrêt de la mitose, ne peut pas être contrecarré par l'ajout d'Areg recombinant (soluble). Par contre, la transfection de plasmides exprimant une pro-Areg ou une Areg-CTF conduit à leur localisation nucléaire et à la restauration de la prolifération cellulaire. (Stoll, 2016). Ces résultats indiquent donc que l'Areg intracellulaire peut avoir par elle-même des fonctions et notamment peut agir sur le cycle cellulaire.

3. Le rôle de l'Areg dans les cancers

Outre son rôle physiologique dans les cellules normales, l'Areg est aussi décrit comme ayant un rôle dans des pathologies comme le cancer. En effet, elle est surexprimée dans de nombreux cancers tels que les cancers du colon, du sein, du poumon, du foie, de la prostate, de l'estomac, de la vessie, de la tête et du cou, de la peau, de l'ovaire et du pancréas. (cf. Tableau 4)

Cancer épithélial	Publication	Type d'échantillons	Surexpression d'Areg
Sein	<i>Normanno, 1995</i>	H	ARNm
Poumon	<i>Fontanini, 1998</i>	H	Protéine
Colon	<i>Ciardello, 1991</i>	C, H	ARNm, protéine
Foie	<i>Han, 2014</i>	H	Protéine
Ovaire	<i>D'Antonio, 2002</i>	H	ARNm, protéine
Prostate	<i>Bostwick, 2004</i>	H	Protéine
Pancréas	<i>Ebert, 1994</i>	C, H	ARNm, protéine
Estomac	<i>Cook, 1992</i>	H	ARNm
Vésicule biliaire	<i>Hansel, 2003</i>	C, H	ARNm
Peau	<i>Billings, 2003</i>	C, X, H	Protéine
Tête et cou	<i>O-Charoenrat, 2000</i>	C	ARNm

C = lignée cellulaire, X = xélogreffe, H = prélèvement humain (biopsie, résection ou cellules primaires)

Tableau 4 : Surexpression de l'Areg au niveau de l'ARN messager (ARNm) ou au niveau protéique (Protéine) (Adapté de Busser, 2011)

L'Areg peut être considérée comme un facteur pro-oncogénique en jouant sur les "hallmarks" du cancer. Par exemple, la surexpression de l'Areg permet une autosuffisance en facteurs de croissance dans les cancers du foie (*Castillo, 2006*), du poumon (*Hurbin, 2002*), du sein (*Willmarth, 2006*), du colon (*Johnson, 1992*) et du pancréas (*Funatomi, 1997*). L'Areg participe également à l'inflammation chronique qui est présente dans les cancers du poumon, du colon et du foie (*Berasain, 2014*). Son expression est aussi associée à l'envahissement tissulaire et métastatique dans le cancer du colon (*Yamada, 2008*) et du sein (*Baillo, 2011*).

Dans des modèles cellulaires de cancer du poumon, l'Areg active une boucle autocrine ce qui confère aux cellules à la fois une autosuffisance en facteurs de croissance et une résistance à l'apoptose car elle active une signalisation qui inhibe les molécules pro-apoptotiques Bax et Bad (*Hurbin, 2005*).

Chez les CBNPC, une étude menée sur 195 patients de stade I à IIIA a mis en évidence des corrélations entre l'expression protéique de l'Areg et des données clinico-pathologiques (*Fontanini, 1998*). Elle a montré que l'expression de l'Areg est corrélée avec un stade plus avancé et donc à la taille de la tumeur ce qui illustre son activité proliférative en tant que facteur de croissance. Elle est davantage présente chez les adénocarcinomes et notamment chez les adénocarcinomes mucineux (*Hurbin, 2011*). La surexpression de l'Areg est associée à une moins bonne survie globale ce qui suggère un rôle intéressant de l'Areg en tant que marqueur pronostic (*Fontanini, 1998*).

De plus, un haut niveau d'Areg dans le plasma sanguin est associé à une diminution de la survie globale. On retrouve ce haut niveau d'Areg chez les patients fumeurs et d'origine non-asiatique. (*Addison, 2010*)

D'autre part, l'activité de l'Areg ne se limite pas à l'action de ses formes solubles mais elle dépend aussi des actions de l'Areg-CTF et de la pro-Areg non clivée. Cependant, à l'heure actuelle, on sait très peu de chose sur leurs fonctions une fois internalisées et notamment à la membrane nucléaire. Un article de la littérature montre que la pro-Areg nucléaire peut interagir avec la lamine A ce qui conduit à la modification conformationnelle de la chromatine et notamment à une augmentation de la méthylation de H3K9 (H3K9me3). Cette modification induit la répression de la transcription et de la prolifération (*Isokane, 2008*) ainsi que la migration cellulaire dans des modèles de cancer du sein (*Tanaka, 2012*). La capacité d'agir sur la migration cellulaire n'implique pas l'activation de l'EGFR (*Tanaka, 2012*).

La signalisation extracellulaire de l'Areg qui active l'EGFR montre une activité proliférative alors que la signalisation intracellulaire de l'Areg (au niveau de la membrane nucléaire) montre une répression de la prolifération et une activation de la migration. On pourrait donc imaginer que les différentes signalisations (extracellulaire et intracellulaire) de l'Areg n'entrent pas en jeu au même moment dans l'évolution des tumeurs et ont des rôles complémentaires.

4. Le rôle de l'Areg dans la réponse aux traitements

Dans les CBNPC, l'Areg est un marqueur de mauvais pronostic. Cependant, son rôle dans la réponse aux traitements anti-EGFR est beaucoup plus complexe. En effet, il existe des contradictions dans la littérature. Selon les cas, elle peut être soit un marqueur prédictif de réponse, soit un marqueur prédictif de résistance aux traitements anti-EGFR.

L'Areg peut être considérée comme un facteur de réponse aux traitements. C'est le cas, par exemple, pour les cancers colorectaux métastatiques en réponse au cetuximab (*Yonesaka, 2015*), pour les cancers colorectaux avec un gène *K-RAS* sauvage en réponse au panitumumab (*Seligmann, 2016*), pour les cancers gastriques de stades II/III en réponse à une chimiothérapie adjuvante (*Ichikawa, 2016*). A l'inverse, elle est considérée comme un facteur

de résistance, par exemple, au traitement par la doxorubicine dans les cancers du foie (Castillo, 2006), le cisplatine dans de cellules de cancer du foie (Chang, 2009) et du sein (Eckstein, 2008), l'exemestane dans le cancer du sein (Wang, 2008) et le sorafenib dans les hépatocarcinomes (Blivet-VanEggelpoël, 2012).

Dans le cas des CBNPC, un haut niveau d'Areg dans des lignées exprimant un *EGFR* sauvage est associé à une efficacité du gefitinib et du cetuximab et donc à une inhibition de la croissance en réponse à ces traitements (Yonesaka, 2008). Concernant les données cliniques, la survie sans progression et la survie globale en réponse aux EGFR-TKI (gefitinib, erlotinib) sont significativement meilleures chez les patients avec une tumeur présentant un *EGFR* sauvage et une surexpression de l'Areg en comparaison avec les patients qui n'expriment pas l'Areg (Chang, 2010). Cela suggère que les patients possédant une tumeur présentant un gène *EGFR* sauvage et une surexpression de l'Areg pourraient avoir un bénéfice à recevoir un EGFR-TKI en traitement. *A contrario*, un haut niveau d'expression de l'Areg peut être à l'origine de résistance. Par exemple, la résistance acquise au cetuximab est corrélée avec une augmentation de la translocation nucléaire de l'EGFR due à une augmentation du niveau d'Areg (Li, 2009). L'analyse de biopsies chez les patients porteurs d'un CBNPC a montré que l'Areg est surexprimée chez ceux qui ne répondent pas au gefitinib et est indétectable chez les patients répondeurs (Kakiuchi, 2004). Au sein de l'équipe, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que l'Areg joue un rôle dans la résistance au gefitinib des cellules d'adénocarcinome pulmonaire exprimant un haut niveau d'Areg (Busser, 2010a). Cliniquement, un haut niveau d'Areg est associé à un sous-type histologique d'adénocarcinome mucineux, très résistant aux EGFR-TKI (*EGFR* sauvage, *K-RAS* muté) (Hurbin, 2011).

Concernant le niveau d'Areg sérique, l'étude d'Ishikawa *et al.* indique que les patients avec un CBNPC qui ont un haut niveau d'Areg dans leur sérum ont un pronostic moins bon en réponse au gefitinib que ceux avec un faible niveau d'Areg. Ce groupe de patients non-répondeurs est principalement composé d'hommes, fumeurs, avec des CBNPC autres que des adénocarcinomes (Ishikawa, 2005). Contradictoirement, dans l'étude de Vollebergh *et al.*, un haut niveau sérique d'Areg est associé à une meilleure survie des patients en réponse aux EGFR-TKI comparativement à des patients qui n'ont pas eu de traitement. Les patients avec un niveau sérique bas d'Areg et ayant reçu un EGFR-TKI et le groupe contrôle (sans EGFR-TKI) ne montrent pas de différence significative (Vollebergh, 2010). La méthode de détection est la même pour les deux études (ELISA) cependant les tests statistiques ne sont pas les

mêmes. Ces deux études portent sur des cohortes de patients non sélectionnés. Or, on peut penser que le caractère prédictif de l'Areg pourrait n'être que dans un sous-groupe de patients et dans un sous-type histologique.

Ainsi, à l'heure actuelle, un haut niveau d'Areg dans le sérum ne permet pas plus de définir avec certitude le rôle de l'Areg dans la réponse aux traitements.

Enfin, l'expression nucléaire de l'Areg peut elle aussi jouer un rôle dans la réponse au traitement et ce notamment dans la chimiorésistance comme, par exemple, en réponse au cisplatine, au paclitaxel et au 5-fluorouracil *in vitro* et *in vivo* dans les cancers gastriques (Yoshida, 2012).

- L'amphiréguline est synthétisée sous forme d'un précurseur transmembranaire : la pro-Areg
- Le clivage protéolytique de la pro-Areg par TACE conduit à la libération de différentes formes solubles d'Areg et à l'apparition d'un fragment résiduel membranaire (Areg-CTF)
- La pro-Areg et l'Areg-CTF peuvent être internalisées et adressées à différents compartiments cellulaires
- La pro-Areg interagit avec la lamine A à la membrane nucléaire et induit la formation d'hétérochromatine ce qui réprime la transcription.
- L'Areg nucléaire joue un rôle dans la migration de cellules du cancer du sein et dans la résistance aux chimiothérapies

IV. Le Récepteur de l'IGF-1 dans les CBNPC

Le récepteur de l'IGF-1 fait partie de la grande famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Il est un acteur majeur de la signalisation cellulaire en participant à des processus fondamentaux tels que la croissance, prolifération et la différenciation cellulaire et à l'apoptose. Le récepteur a également un rôle majeur dans la tumorigenèse ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante.

Dans ce chapitre, nous décrirons les principaux composants de la signalisation associée à l'IGF-1R. Nous nous intéresserons aussi aux fonctions du récepteur principalement dans un contexte tumoral, ainsi que les stratégies thérapeutiques ciblant l'IGF-1R en cancérologie.

A. L'IGF-1R et l'axe de signalisation de l'IGF

L'axe de signalisation de l'IGF (Insulin-like Growth Factor) implique deux ligands (IGF-1 et IGF-2), trois récepteurs (IGF-1R, IGF-2R et IR), six IGF Binding Proteins (IGFBP) et des IGFBP protéases.

1. L'IGF-1R

1) La structure de l'IGF-1R

Le récepteur de l'IGF-1 ou IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase identifié en 1986 (*Ullrich, 1986*). Le gène de l'*IGF-1R*, situé sur le chromosome 15, code pour une protéine de 1367 acides aminés. L'IGF-1R est synthétisé sous forme d'un précurseur pré-pro-récepteur composé d'une chaîne unique comportant un peptide signal de 30 acides aminés. Ce peptide signal est perdu juste après la traduction. Le pro-récepteur est alors glycosylé, dimérisé et transporté jusqu'à l'appareil de Golgi où il est clivé au niveau d'un site de clivage ⁷⁰⁸Arg-Lys-Arg-Arg⁷¹¹ par une furine. Ce clivage génère pour chaque monomère une sous-unité α de 135kDa, et une sous-unité β de 95kDa, qui vont être reliées par un pont disulfure. Le récepteur mature transmembranaire se compose de deux hétérodimères d'IGF-1R, reliés par un pont disulfure

(cf. [Figure 25](#)). Le récepteur possède une partie extracellulaire composée des deux sous-unités α et des 195 premiers résidus des deux sous-unités β , d'une partie transmembranaire, et d'une partie intracellulaire faisant toutes deux partie des sous-unités β . (*Adams, 2000*)

Les sous-unités α se composent : (1) de deux domaines L1 et L2 homologues qui participent à la liaison au ligand, (2) d'un domaine riche en cystéines (CR, cysteine rich) qui permet la formation de ponts disulfure, et (3) de deux domaines dits Fibronectine de type III (FnIII-1 et FnIII-2a) qui sont les médiateurs des interactions protéine-protéine en positionnant correctement les régions extracellulaires. Les sous-unités β se composent : (1) de deux domaines dits Fibronectine de type III (FnIII-2b et FnIII-3), (2) d'un domaine trans- et juxta-membranaire, (3) d'un domaine tyrosine kinase et (4) d'une queue C-terminale. (cf. [Figure 25](#) et [Tableau 5](#))

La partie intracellulaire comporte un site de liaison au substrat au niveau de la tyrosine Tyr950 (Shc/IRS1-4 binding site) qui a un rôle dans la transmission du signal, un site de liaison à l'ATP au niveau de la lysine Lys1003 et trois tyrosines majeures (Tyr1131, 1135, 1136) qui jouent un rôle dans la signalisation de l'IGF-1R. (*Haisa, 2013*) (cf. [Figure 25](#))

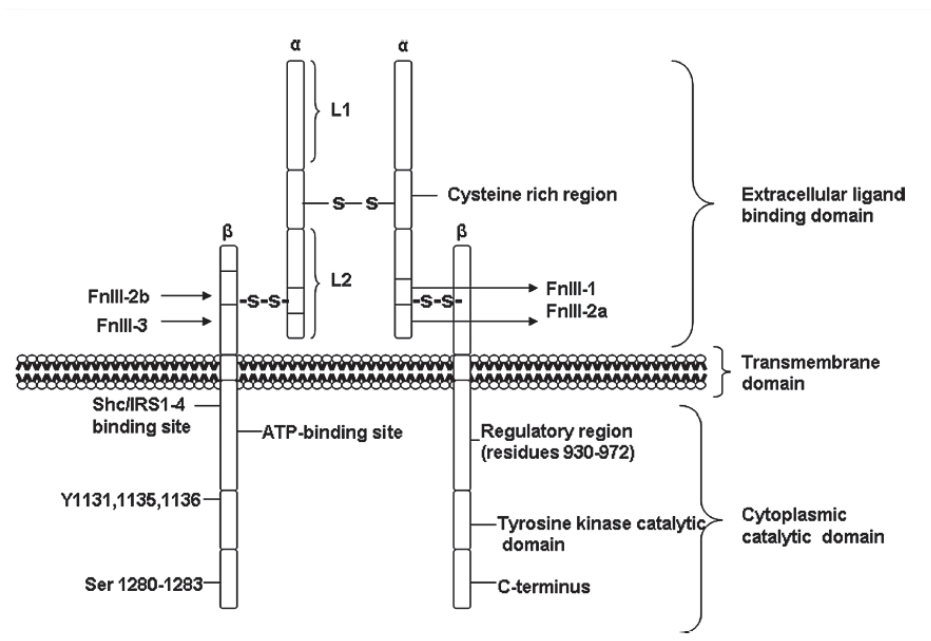


Figure 25 : Représentation schématique de la structure de l'IGF-1R (*Vardatsikos, 2009*)

L'IGF-1R est un récepteur transmembranaire composé de deux sous-unités α et deux sous-unités β . Les sous-unités extracellulaires α se composent de deux domaines homologues L1 et L2 (liaison à l'IGF-1), d'un domaine riche en cystéine (Cysteine rich region), et de deux domaines dits Fibronectine de type III (FnIII-1 et FnIII-2a). Les sous-unités β se composent de deux domaines extramembranaires dits Fibronectine de type III (FnIII-2b et FnIII-3), d'un domaine trans- et juxta-membranaire, d'un domaine tyrosine kinase et d'une queue C-terminale. La partie intracellulaire se compose d'un site de liaison au substrat (Shc/IRS1-4 binding site), d'un site de liaison à l'ATP (ATP-binding site), de trois tyrosines (Y1131, 1135, 1136) et de 4 sérines (Ser1280-1283).

Acides-aminés	Sous-unité	Domaine
1 - 148	α	L1
149 - 300	α	CR
301 - 480	α	L2
461 - 579	α	FnIII-1
580 - 707	α	FnIII-2a
712 - 798	β	FnIII-2b
799 - 901	β	FnIII-3
906 - 929	β	TM
930 - 972	β	JD
973 - 1229	β	TKD
1230 - 1337	β	Queue C-terminale

CR, domaine riche en cystéines (cystein rich); FnIII, domaine dit Fibronectine de type III; TM, domaine transmembranaire; JD, domaine juxtamembranaire; TKD, domaine tyrosine kinase.

Tableau 5 : Domaines de la structure de l'IGF-1R (d'après Adams, 2000)

2) Les récepteurs hybrides

L'IGF-1R est très proche structurellement et fonctionnellement du récepteur de l'insuline (IR, Insulin Receptor). En effet, leur structure est homologue à 70%, avec des domaines tyrosine kinase homologues à 84% (Baserga, 2005) et des poches à ATP presque complètement identiques (Haisa, 2013). Les pro-récepteurs de l'IGF-1R et de l'IR peuvent s'hétérodimériser et former des récepteurs hybrides. L'IR possède deux isoformes IR-A et IR-B qui peuvent toutes les deux s'associer à l'IGF-1R. Les hybrides IR-B/IGF-1R et IR-A/IGF-1R peuvent être activés par IGF-1 et IGF-2 (Buck, 2011).

Dans la suite de ce travail, le dimère IGF-1R/IGF-1R nous intéressera tout particulièrement et sera appelé IGF-1R.

2. Les ligands de l'IGF-1R

Les ligands de l'IGF-1R sont principalement l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) et l'IGF-2 (insulin-like growth factor-2). La terminologie "insulin-like" a été utilisée car ils sont capables de stimuler l'assimilation du glucose dans les cellules graisseuses et les muscles et également parce qu'ils présentent environ 50% d'homologie avec l'insuline (Brahmkhatri, 2014).

L'IGF-1 et l'IGF-2 ont 62% d'homologie structurelle (Haisa, 2013) mais l'IGF-1 a une plus grande affinité pour l'IGF-1R. En effet, la constante de dissociation de l'IGF-1 avec l'IGF-1R est de 1nM alors que celle de l'IGF-2 est de 15 à 20nM. L'insuline peut également se fixer à l'IGF-1R mais son affinité est cent fois moins grande que celle de l'IGF-1. (Tognon, 2012)

Ces hormones sont majoritairement sécrétées par le foie après stimulation de ce dernier par l'hormone de croissance (GH, growth hormone). Elles sont libérées dans la circulation sanguine et leur biodisponibilité est régulée par les IGF Binding Proteins (IGFBP) et les IGFBP protéases. Les IGF circulants sont protégés de la dégradation en formant des complexes avec les IGFBP de par une plus grande affinité des IGF pour les IGFBP que pour l'IGF-1R. La protéolyse du complexe IGFBP/IGF par les IGFBP protéases va permettre la libération des ligands et l'activation des récepteurs à la surface des cellules (Brahmkhatri, 2014) (cf. Figure 26). Les IGF peuvent également être synthétisés localement par les cellules.

La biodisponibilité de l'IGF-2 est aussi régulée par l'IGF-2R (Insulin-like Growth Factor-2 Receptor). L'IGF-2R est un récepteur monomérique, structurellement très différent de l'IGF-1R et de l'IR, qui ne possède pas d'activité tyrosine kinase. Il fixe le ligand, l'internalise induisant sa dégradation lysosomale ce qui a pour conséquence la diminution de la quantité d'IGF-2 pouvant activer l'IGF-1R. (Brahmkhatri, 2014)

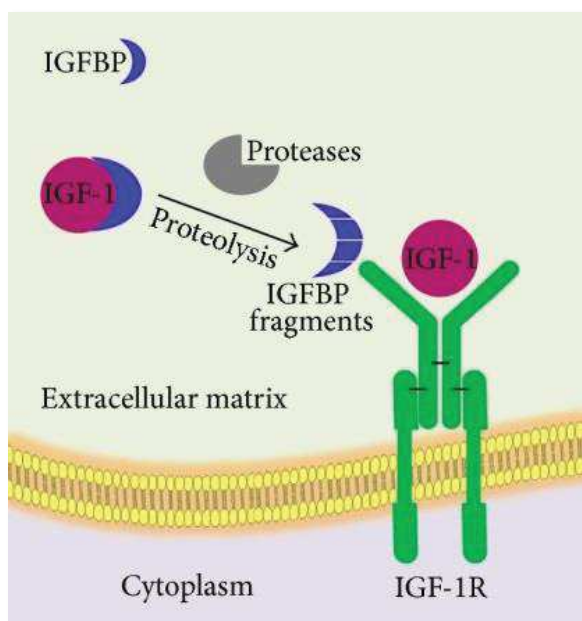


Figure 26 : Régulation des IGF par les IGFBP et les IGFBP protéases (Brahmkhatri, 2014) Les IGF circulants sont protégés de la dégradation en formant des complexes avec les IGFBP. La protéolyse du complexe IGFBP/IGF par les IGFBP protéases va permettre la libération des ligands et l'activation des récepteurs à la surface des cellules.

3. Activation de l'IGF-1R et voies de signalisation

1) Le mécanisme d'activation de l'IGF-1R

L'IGF-1R est activé par la fixation d'un ligand au niveau de la sous-unité α de la partie extracellulaire du récepteur. Cette fixation va induire une modification conformationnelle de la sous-unité β de la partie intracellulaire du récepteur. Grâce à la fixation de l'ATP au niveau de la lysine Lys1003, les résidus tyrosine Tyr1131, 1135 et 1136 sont transphosphorylés ce qui permet l'activité tyrosine kinase (*Lopaczynski, 1999*). Puis, la phosphorylation de la tyrosine Tyr950 sert de site de reconnaissance et de recrutement de protéines adaptatrices telles que IRS-1 à 4 (insulin-receptor substrate-1 à 4) et Shc (Src homology and collagen domain protein). Le recrutement de ces protéines va permettre l'activation de deux voies principales de signalisation PI3K/AKT et MAPK. (cf. Figure 27)

2) Les voies de signalisation de l'IGF-1R

Suite à l'activation de l'IGF-1R, la tyrosine Tyr 950 est phosphorylée et recrute IRS-1 qui est à son tour phosphorylé. IRS-1 s'associe à la sous-unité p85 de PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui active p110, la sous-unité catalytique de PI3K. p110 induit la phosphorylation de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) pour former PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate). PIP3 recrute la protéine PDK1 (serine/threonine phosphoinositide-dependent kinase 1) qui phosphoryle et active Akt. Ce dernier est connu pour jouer un rôle dans la survie cellulaire et l'apoptose. L'activation d'Akt conduit à l'augmentation de la synthèse protéique requise pour la prolifération cellulaire via l'activation de mTOR. Il a aussi un effet anti-apoptotique grâce à la phosphorylation et l'inactivation de la molécule pro-apoptotique BAD. (*Haisa, 2013*)

Le complexe Grb2/Sos (growth factor receptor-bound protein 2/ son of sevenless) peut également être phosphorylé soit par IRS-1 et IRS-2, soit par Shc. Le recrutement de ce complexe depuis le cytoplasme vers la membrane va permettre que Sos soit en proximité immédiate de Ras. Cela favorise l'activation de Ras par la perte d'une GDP et la fixation d'une GTP et conduit à l'activation de la cascade de phosphorylations successives de Raf, MEK1/2 et ERK1/2. Ce dernier est alors transporté jusque dans le noyau où il phosphoryle

des facteurs de transcription (Elk, c-Fos) impliqués dans l'activation de gènes agissant sur la prolifération cellulaire (p38, c-Myc, JNK). (Frasca, 2008 et Riedemann, 2006).

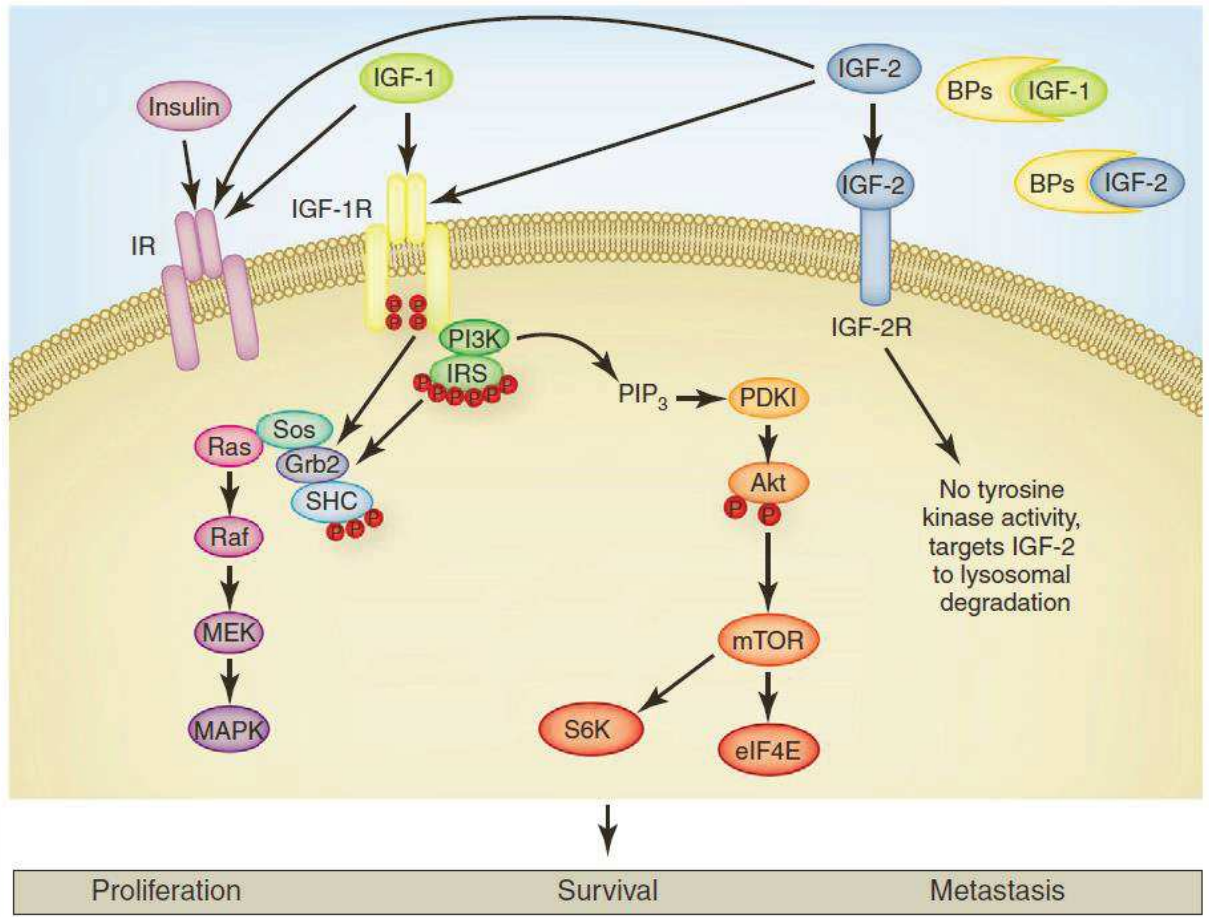


Figure 27 : L'axe de l'IGF et signalisation de l'IGF-1R (Alberini, 2012)

L'axe de l'IGF est composé de 3 ligands (l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2). Ces ligands sont régulés par les IGFBP (BP sur le schéma). Les ligands activent les différents récepteurs. L'IGF-1R est plus particulièrement activé par IGF-1 et IGF-2 ce qui active la phosphorylation de protéines adaptatrices (IRS et Shc) et l'activation des voies de signalisation en aval PI3K/AKT et MAPK (Ras, Raf, MEK, ERK).

4. Le trafic intracellulaire de l'IGF-1R

Suite à l'activation de l'IGF-1R par ses ligands, le récepteur est internalisé. Il est ensuite soit dégradé, soit recyclé, soit transporté jusqu'au noyau. (Morcavallo, 2014 et Sarfstein, 2013)

1) La dégradation et le recyclage de l'IGF-1R

L'internalisation de l'IGF-1R est médiée par un mécanisme clathrine-dépendant ou indépendant (Monami, 2008). Elle est maximale 15 à 30 minutes après l'activation par son ligand selon les lignées cellulaires (Romanelli, 2007). Les effets de son internalisation, médiée par l'activation de son ligand, sur la signalisation du récepteur sont complexes. En effet, le blocage de l'internalisation du récepteur inhibe l'activation de la voie MAPK sans affecter l'activation de la voie PI3K/Akt (Chow, 1998). Cela suggère que la voie des MAPK ne peut être activée par l'IGF-1R que lorsque celui est internalisé alors que la voie PI3K/Akt est activée que le récepteur soit à la membrane plasmique, soit à la surface d'endosomes.

L'internalisation de l'IGF-1R peut mener au recyclage du récepteur. Le recyclage de l'IGF-1R fait intervenir le mécanisme classique de recyclage des RTK : l'IGF-1R est adressé aux endosomes précoces puis aux endosomes de recyclage et retourne à la membrane.

L'internalisation peut aussi conduire à la dégradation du récepteur après son ubiquitinylation. Les mécanismes de dégradation sont nombreux et ne semblent pas avoir tous été clairement identifiés. Parmi les mécanismes d'ubiquitinylation de l'IGF-1R, on trouve :

(1) En réponse à l'activation par son ligand, l'IGF-1R recrute la protéine adaptatrice Grb10 (growth factor receptor-bound protein 10) et l'ubiquitine-ligase E3 Nedd4 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4). L'IGF-1R est ubiquitinylé par le complexe Grb10/Nedd4, endocyté et dégradé grâce à des mécanismes impliquant soit le protéasome, soit le lysosome (Vecchione, 2003).

(2) Mdm2, une ubiquitine ligase connue pour réguler le niveau d'expression de p53, favorise aussi l'ubiquitinylation de l'IGF-1R au niveau de sa lysine Lys63 via la protéine adaptatrice β -arrestin 1 (Girnita, 2005a et b) et entraîne sa dégradation par le protéasome (Girnita, 2003).

(3) L'IGF-1R peut aussi être ubiquitinylé par l'ubiquitine-ligase E3 Cbl (casitas B-lineage lymphoma) au niveau de sa lysine Lys48.

Ces mécanismes n'ont pas lieu dans les mêmes conditions. En effet, l'ubiquitinylation médiée par Mdm2 a lieu lorsque les cellules sont stimulées avec une faible concentration en IGF-1 (5ng/mL) à travers un mécanisme clathrine-dépendant alors qu'avec Cbl, elle a lieu lorsque la concentration en ligand est importante (50-100ng/mL) au travers d'un mécanisme cavéoline-dépendant (Sehat, 2008).

2) La translocation nucléaire de l'IGF-1R

Comme vu pour l'EGFR, en réponse à l'activation par un ligand, l'endocytose de l'IGF-1R ne mène pas uniquement à la dégradation ou au recyclage du récepteur. En effet, des travaux rapportent également un transport du récepteur vers le noyau. Cependant, le mécanisme de ce transport nucléaire n'est pas encore complètement élucidé.

La translocation nucléaire de l'IGF-1R est dépendante de son activation par un ligand ce qui suggère que l'activité tyrosine kinase du récepteur est nécessaire à sa translocation (Aleksic, 2010).

Pour être transporté au noyau, l'IGF-1R est d'abord endocyté via un mécanisme CME (Aleksic, 2010). Il est transporté dans les vésicules d'endocytose le long des microtubules vers leur extrémité (-). Ce transport est dépendant de la dynéine et requiert la dynactine, protéine dont la plus grande sous-unité est p150^{Glued}. Cette sous-unité interagit avec l'IGF-1R pour permettre son acheminement jusqu'à la membrane externe du noyau où il est capté par l'importine $\beta 1$ qui va le positionner au niveau du pore nucléaire. Le récepteur est alors SUMOylé par Ubc9 (ligase de type E2) et RanBP2 (ligase de type E3) au niveau de trois résidus lysines (Lys 1025, 1100, 1120) (Sehat, 2010) pour être internalisé. (Packham, 2015) (cf. [Figure 28](#))

La forme complète de l'IGF-1R est retrouvée dans le noyau c'est-à-dire que les deux sous-unités α et β sont détectées dans la fraction nucléaire des cellules (Aleksic, 2010).

Contrairement à l'EGFR, l'IGF-1R ne possède pas de séquence NLS pour interagir avec l'importine $\beta 1$ ce qui suggère que, pour cette translocation, il a besoin d'un partenaire qu'il reste à identifier.

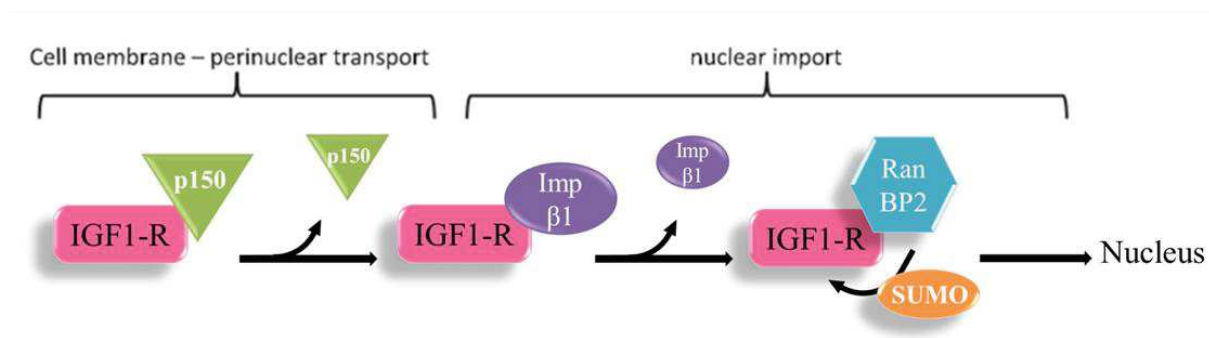


Figure 28 : Schéma du mécanisme de translocation nucléaire de l'IGF-1R (Packham, 2015)

5. La signalisation nucléaire de l'IGF-1R

La signalisation nucléaire de l'IGF-1R a, à l'heure actuelle, été très peu étudiée et ce notamment dans les modèles de cellules normales. L'IGF-1R nucléaire se lie à l'ADN génomique (*Robertson, 2012*) ce qui suggère un rôle dans la transcription des gènes. De plus, l'expression nucléaire de l'IGF-1R a été rapportée dans des tissus non malins et est associée à la prolifération (*Aleksic, 2010*).

D'autre part, dans des modèles cancéreux, l'IGF-1R nucléaire peut aussi se lier à l'ADN et activer la transcription (*Sehat, 2010*). Par exemple, l'IGF-1R est capable d'agir comme facteur activateur de la transcription de son propre promoteur dans des cellules de cancer du sein (*Sarfstein, 2012*).

De plus, dans des modèles cellulaires de mélanome, de cancer du col de l'utérus et de cancer du poumon, l'IGF-1R se lie aux facteurs de transcription LEF1/TCF (lymphoid enhancer factor 1/T cell factor) connus pour activer la transcription de gènes importants pour la tumorigenèse en réponse à l'activation de la voie Wnt. Le complexe IGF-1R nucléaire/LEF1/TCF favorise l'activation du promoteur des gènes de la *cycline D1* et l'*axin2* et augmente l'expression des deux protéines (*Warsito, 2012*). Cela suggère que l'IGF-1R nucléaire pourrait notamment être impliqué dans la régulation anormale du cycle cellulaire et dans la régulation de la β -caténine impliquée dans la voie Wnt.

B. IGF-1R et CBNPC

L'IGF-1R joue un rôle majeur dans la cancérogenèse. Il est impliqué dans la progression des tumeurs, ainsi que dans la formation de métastases dans une grande variété de cancers (*Arcaro, 2013*). L'IGF-1R est aussi impliqué dans la résistance aux traitements anti-cancéreux ce qui en fait une cible thérapeutique prometteuse.

1. Les altérations de l'IGF-1R dans les CBNPC

Nombre de copies du gène

La fréquence d'un haut niveau de copie du gène de l'*IGF-1R* chez les CBNPC, ainsi que l'impact de cette altération sur le pronostic des patients restent très controversés.

Dans des tumeurs réséquées de CBNPC de stades I, II et III, un haut niveau du nombre de copies du gène de l'*IGF-1R* a été détecté dans 29% des cas. Il est davantage présent dans les cancers squameux mais ne semble pas avoir d'impact sur le pronostic (*Tran, 2014*). Une autre étude menée sur une cohorte de patients japonais a montré que ces événements sont rares dans les CBNPC (8%). Et ils ne sont également pas corrélés aux paramètres clinico-pathologiques et à la survie globale (*Tsuta, 2013*). *A contrario*, dans une autre étude réalisée sur une cohorte de type caucasienne (polonais), un haut niveau de copies du gène est associé cette fois-ci à un bon pronostic pour des patients réséqués (*Dziadziuszko, 2010*). La seule différence importante entre ces deux groupes d'études pouvant expliquer les conclusions divergentes concernant le pronostic des patients est la proportion de cancers squameux intégrés aux études. Le nombre de cancers squameux est bien plus important et majoritaire dans l'étude menée par *Dziadziuszko et al.*

Une étude menée sur 125 patients (stades I, II et IIIA) a montré que 30% des tumeurs ont un haut niveau de copies, à la fois, de l'*IGF-1R* et de l'*EGFR*. Ceci est associé à un sous-type squameux et à un mauvais pronostic. (*Ludovini, 2009* et *Ludovini, 2013*)

Expression du gène

Un haut niveau d'ARNm est plus souvent retrouvé chez les patients avec un cancer squameux que dans les autres sous-types histologiques. Cependant, aucune association entre le niveau d'ARNm et les paramètres clinico-pathologiques n'avait pu être établie. (*Dziadziuszko, 2010*). Cependant, plus récemment, une étude menée sur des patients atteints

d'adénocarcinomes a mis en évidence que le temps de survie moyen et le temps de survie sans progression des patients sont environ deux fois plus courts lorsqu'il y a une surexpression d'ARNm. La survie passe alors de 48 mois à 26 mois. (Kim, 2015)

Expression protéique de l'IGF-1R

Dans les CBNPC, la surexpression protéique de l'IGF-1R est plus présente dans les tumeurs squameuses (70%) que dans les adénocarcinomes (25%). Il existe une corrélation entre l'expression de la protéine et le haut niveau de copies du gène. Un haut niveau d'expression de l'IGF-1R est généralement associé au tabagisme et à un stade plus avancé (Tsuta, 2013). La surexpression de l'IGF-1R n'est pas associée à d'autres paramètres clinicopathologiques (Tsuta, 2013 et Tran, 2014).

Niveau plasmatique de l'IGF-1

On observe qu'un haut niveau plasmatique d'IGF-1 est corrélé avec un risque accru de développement de cancer du poumon et que ce risque est dose-dépendant (Yu, 1999).

Expression nucléaire de l'IGF-1R

L'IGF-1R nucléaire est détectable dans de nombreux modèles cellulaires de cancer comme le poumon (Packham, 2015), le mélanome (Sehat, 2010), la prostate, le rein, le sein (Aleksic, 2010) et le rhabdomyosarcome alvéolaire (Aslam, 2013). Par exemple, il y a treize fois plus d'IGF-1R nucléaire dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7 comparativement à des cellules épithéliales mammaires et également une augmentation de l'expression de l'enzyme de conjugaison Ubc9 ce qui traduit une SUMOylation du récepteur plus importante. L'IGF-1R nucléaire se lie à des régions promotrices et active la transcription (cf. Partie A.5) ce qui dérégule les fonctions des cellules (Deng, 2011). Les cellules ayant un haut niveau d'IGF-1R nucléaire présentent une plus grande capacité à développer des tumeurs (Aslam, 2013).

Sur le plan clinique, l'IGF-1R nucléaire est présent dans les rhabdomyosarcomes alvéolaires (Aslam, 2013), les tumeurs du rein (Aleksic, 2010). Plus particulièrement, l'analyse d'une série de coupes de carcinomes rénaux à cellules claires a révélé qu'un haut niveau d'IGF-1R nucléaire dans les tumeurs est associé à un mauvais pronostic (Aleksic, 2010).

Cependant, le marquage exclusivement nucléaire de l'IGF-1R dans certains sarcomes (sarcome d'Ewing et ostéosarcome) de stade avancé après un traitement avec un anticorps

anti-IGF-1R est associé à une meilleure survie sans progression et à une meilleure survie globale comparativement à un marquage cytoplasme/noyau de l'IGF-1R (Asmane, 2012).

Ainsi, même si l'étude d'Aleksic *et al.* montre que l'IGF-1R nucléaire est associé à un mauvais pronostic, l'étude menée par Asmane *et al.* suggère par contre qu'il pourrait être un marqueur de réponse aux traitements anti-IGF-1R. Ces résultats contradictoires supposent que le rôle de l'IGF-1R nucléaire dépend certainement aussi du type de tumeur.

2. L'IGF-1R dans la réponse aux traitements

L'IGF-1R est un facteur de résistance en réponse à la radiothérapie dans les gliomes et les ostéosarcomes, aux thérapies endocrines (tamoxifène) dans le cancer du sein et aux chimiothérapies dans les cancers gastriques (cisplatine), les gliomes (témozolomide), les ostéosarcomes (docetaxel, cisplatine, doxorubicine) et les cancers ovariens (cisplatine, taxol) (Denduluri, 2015).

Outre son implication dans la résistance aux thérapies plus conventionnelles, l'IGF-1R est également un facteur de résistance aux thérapies ciblées comme le trastuzumab, un anticorps anti-HER2, dans les cancers du sein surexprimant HER2 (Lu, 2001). De plus, il est impliqué dans la résistance aux EGFR-TKI dans le CBNPC (Morgillo, 2006, Morgillo, 2007, Hurbin, 2011, Busser, 2010 et Jeannot, 2014) et dans les carcinomes hépatocellulaires (Desbois-Mouthon, 2006). Pour médier cette résistance, l'IGF-1R interagit et s'hétérodimérise avec d'autres récepteurs (EGFR, HER2) et/ou active leur signalisation (signalisation croisée ou "cross talk") (Desbois-Mouthon, 2009).

Dans les CBNPC, le traitement à l'erlotinib ou au gefitinib induit l'hétérodimérisation IGF-1R/EGFR. Ceci active l'IGF-1R et ses voies d'aval ce qui conduit, *via* l'activation de mTOR, à une augmentation de la synthèse de la protéine anti-apoptotique survivine. Dans ce cas de résistance, l'inhibition de l'IGF-1R permet de resensibiliser les cellules à l'erlotinib *in vitro* et *in vivo*. (Morgillo, 2006 et Morgillo, 2007). De même, dans un modèle d'adénocarcinome mucineux, en réponse au gefitinib, l'hétérodimérisation entre l'IGF-1R et l'EGFR, dépendante de l'Areg, conduit à l'activation de la voie PI3K/Akt ce qui inhibe l'apoptose (par inhibition de BAX). Un traitement avec un inhibiteur de l'IGF-1R (linsitinib et R1507) couplé au gefitinib permet de restaurer l'apoptose dans ces cellules résistantes *in vitro*. (Busser 2010, Hurbin, 2011 et Jeannot, 2014). Dans ce cas des

patients porteurs d'adénocarcinomes mucineux, la surexpression de l'IGF-1R est associée à une progression de la maladie sous traitement au gefitinib (*Hurbin, 2011*).

L'IGF-1R est également impliqué dans la résistance acquise de cellules de CBNPC avec un EGFR muté en réponse au dacomitinib et au WZ4002, un EGFR-TKI de troisième génération. La perte d'expression d'IGFBP3 active la signalisation de l'IGF-1R (*Cortot, 2013*). L'inhibition de l'IGF-1R par shARN, par TKI ou par anticorps bloquant permet de restaurer la sensibilité au WZ4002 *in vitro* et *in vivo* (*Park, 2016*). Enfin, des cellules de CBNPC avec un EGFR muté et ayant développé une mutation de résistance T790M en réponse à l'afatinib montrent une resensibilisation lorsque que le linsitinib (IGF-1R-TKI) est combiné au traitement *in vitro* et *in vivo* (*Lee, 2015*).

3. L'IGF-1R comme cible thérapeutique

Une signalisation exacerbée de l'IGF-1R a été associée à un risque accru de développer un cancer et à une pathologie plus agressive. L'IGF-1R étant surexprimé dans un grand nombre de cancers du poumon, cela en fait une bonne cible pour le développement de nouvelles thérapeutiques. Les approches de ciblage de l'IGF-1R impliquent soit l'inhibition de son activation, soit l'inhibition de son activité tyrosine kinase. Parmi les traitements anti-IGF-1R, les deux approches les plus avancées sont les anticorps bloquants anti-IGF-1R et les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur. Elles seront développées dans ce paragraphe. Cependant, d'autres approches existent comme par exemple la neutralisation des ligands de l'IGF-1R par des anticorps (*Chen, 2013, Iams, 2015, Sachdev, 2007*).

1) Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R

Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R ou IGF-1R-TKI (*Singh, 2014*) sont classés en deux catégories : les inhibiteurs qui entrent en compétition avec l'ATP en se fixant à la poche à ATP du domaine tyrosine kinase de l'IGF-1R ou les inhibiteurs qui se fixent à une poche allostérique (par exemple poche du site de liaison au substrat) (*Jin, 2013*). La mise au point d'inhibiteurs spécifiques de l'IGF-1R est délicate de par la très grande homologie des domaines tyrosine kinase de l'IGF-1R et de l'IR. Ainsi, la plupart des IGF-1R-TKI ciblent l'IGF-1R et l'IR. Cependant, certains inhibiteurs montrent une plus grande affinité pour l'IGF-1R que pour l'IR.

AXL1717 (PPP, picropodophyllotoxin) est l'inhibiteur le plus sélectif pour l'IGF-1R. Il favorise la dégradation de l'IGF-1R (Buck, 2011). Il est actuellement en phase II en comparaison avec le docétaxel chez des patients déjà traités avec un CBNPC avancé ou métastatique de type squameux ou adénocarcinome et en phase I en combinaison avec la gemcitabine et le carboplatine chez des patients chimio-naïfs avec un cancer squameux avancé ou métastatique. (Jin, 2013).

Le linsitinib (OSI-906) est un inhibiteur qui cible à la fois l'IGF-1R et l'IR. Il a montré un effet anti-prolifératif sur des lignées de cellules tumorales et une efficacité anti-tumorale sur des modèles de xénogreffes (Mulvihill, 2009). Les premiers résultats cliniques ont montré une bonne tolérance du linsitinib par les patients.

2) Les anticorps anti-IGF-1R

Les anticorps bloquants anti-IGF-1R ciblent le domaine extracellulaire du récepteur, bloquent la fixation du ligand ce qui empêche l'activation des voies d'aval du récepteur. De nombreuses molécules (figitumumab, R1507, cixutumumab, dalotuzumab, BIB0022) sont actuellement en cours d'évaluation à travers différents essais cliniques. (Iams, 2015, Scagliotti, 2012 et Jin, 2013)

Les essais de phase I et II du figitumumab (CP-751,871) (Gualberto, 2010) ont montré des résultats encourageants et une bonne tolérance chez les patients (Goto, 2012). En phase II, le figitumumab a été évalué en combinaison avec le paclitaxel et le carboplatine chez des patients chimio-naïfs avec des CBNPC de stades IIIB et IV. La combinaison améliore la survie sans progression et le taux de réponse. 54% des patients ont montré une réponse avec la combinaison figitumumab/chimiothérapie alors que 42% ont montré une réponse avec la chimiothérapie seule. Le sous-groupe de patients avec une histologie squameuse a présenté une réponse dans 64% des cas. Ces chiffres étaient donc encourageants. Cependant, l'essai de phase III (NCT00596830) qui comparait la combinaison figitumumab/chimiothérapie à la chimiothérapie seule a été interrompu. En effet, le figitumumab n'a apporté aucun bénéfice sur la survie et des effets secondaires très sérieux et même des décès liés à l'utilisation du figitumumab ont été observés. Cet essai, contrairement à ceux de phase I et II, a été mené dans une population sélectionnée de CBNPC n'ayant pas une histologie d'adénocarcinome.

D'autres essais cliniques sont actuellement en cours. Notamment, des essais de phase I/II dans les CBNPC du cixutumumab (IMC-A12) en combinaison avec le paclitaxel/carboplatine/bevacizumab ou cisplatine/pemetrexed ou carboplatine/pemetrexed ou erlotinib (clinicaltrials.gov), du dalotuzumab (MK-0646) seul ou en combinaison avec gemcitabine/carboplatine et de BIB0022 en combinaison avec paclitaxel/carboplatine.

Les résultats des premiers essais cliniques n'ont pas montré pas les effets escomptés. En effet, les patients atteints de CBNPC squameux qui dans 70% des cas présentent une surexpression de l'IGF-1R n'ont pas montré une meilleure survie en réponse au figitumumab contrairement à ce qui était attendu. Ainsi, il est important d'identifier (1) les marqueurs biologiques de sensibilité aux traitements anti-IGF-1R et/ou (2) les mécanismes de résistance développés par les tumeurs pour pouvoir les inhiber.

3) Les traitements anti-IGF-1R/EGFR-TKI : une combinaison prometteuse ?

Les données évoquées précédemment suggèrent que l'utilisation de thérapies ciblées anti-IGF-1R en combinaison avec les EGFR-TKI pourrait éviter l'apparition de résistance. Ainsi, on peut espérer une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale pour les patients. Des essais cliniques ont été développés pour tester cette hypothèse.

Un essai de phase III (NCT00673049) comparant le traitement figitumumab/erlotinib à l'erlotinib a été suspendu (Jin, 2013). Les patients (non-adénocarcinomes, déjà traités avec un sel de platine) ont développé de graves effets secondaires et n'ont montré aucun bénéfice de survie (Scagliotti, 2015).

De même, l'essai de phase II comparant l'anticorps R1507 en combinaison avec l'erlotinib ne montre pas d'amélioration de la survie sans progression et de la survie globale en comparaison avec l'erlotinib seul dans une population non sélectionnée de CBNPC. Cependant, les patients ayant une mutation de *K-RAS* montrent dans 36% des cas une amélioration de la survie sans progression avec la combinaison de traitement alors qu'elle est de 0% en réponse à l'erlotinib seul (Ramalingam, 2011). La question est donc de savoir si une mutation du gène *K-RAS* pourrait être un bio-marqueur de réponse aux traitements anti-IGF-1R. Les premiers résultats *in vitro* sur le statut de *K-RAS* restent très controversés. Un modèle

cellulaire exprimant un gène *K-RAS* muté (H358) est plus sensible à un traitement anti-IGF-1R (R1507 et linsitinib) en combinaison avec un EGFR-TKI comparativement à un modèle avec un *K-RAS* sauvage (Hurbin, 2011 et Jeannot, 2014). *A contrario*, l'étude de 16 lignées de CBNPC (dont H358) exprimant un *K-RAS* sauvage ou muté indique que celles avec un *K-RAS* muté sont moins sensibles au linsitinib que celles avec un *K-RAS* sauvage (Kim, 2012b). Ces résultats indiquent que le statut de *K-RAS* n'est pas suffisant pour prédire la réponse au traitement.

D'autres essais cliniques combinant un EGFR-TKI et le linsitinib sont actuellement en cours. Le linsitinib est testé en combinaison avec l'erlotinib dans deux essais de phase II. Le premier (NCT01221077) compare l'efficacité du linsitinib en combinaison avec l'erlotinib chez des patients chimio-naïfs avec un CBNPC de stade avancé ayant une mutation activatrice de l'*EGFR*. Le second (NCT01186861) évalue l'intérêt d'un traitement de maintenance linsitinib/erlotinib chez des patients ayant reçu en première ligne un sel de platine et qui n'ont montré aucune progression tumorale après ce traitement.

Ces combinaisons de traitements anti-IGF-1R/EGFR-TKI pourraient être très prometteuses mais comme les EGFR-TKI elles demandent encore des études et du recul pour identifier les patients les plus à même d'en bénéficier.

- L'IGF-1R a une signalisation à la membrane plasmique et une signalisation dans le noyau
- L'IGF-1R ne possède pas de séquence NLS
- L'IGF-1R nucléaire est un co-activateur transcriptionnel. Un haut niveau d'IGF-1R nucléaire est présent dans de nombreux cancers
- Il est associé à un mauvais pronostic dans les cancers du rein et est un marqueur de réponse aux traitements anti-IGF-1R dans les sarcomes
- Les premiers essais avec des traitements anti-IGF-1R ne montrent pas les effets escomptés ; il semble important d'identifier (1) les marqueurs biologiques de sensibilité aux traitements anti-IGF-1R et/ou (2) les mécanismes de résistance développés par les tumeurs

Objectifs du travail de thèse

Objectifs du travail de thèse

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Les cancers bronchiques non-à-petites cellules (CBNPC) représentent 85% des cancers du poumon et ont un pronostic vital très mauvais puisque moins d'un patient sur dix est encore en vie cinq ans après le diagnostic de la maladie. L'activation de l'EGFR, soit par une mutation, soit par une surexpression, est présente dans plus de 60% des cas de CBNPC ce qui a conduit au développement de traitements ciblant ce récepteur. L'émergence des EGFR-TKI (gefitinib, erlotinib, afatinib) a constitué un réel progrès thérapeutique chez les patients porteurs d'une mutation activatrice du domaine tyrosine kinase de l'EGFR (10 à 20% des CBNPC) pour lesquels ils sont actuellement utilisés en première ligne de traitement. Cependant, une résistance intrinsèque (primaire) est observée chez environ 30% de ces patients porteurs d'un *EGFR* muté et chez la quasi-totalité des patients sans mutation activatrice.

Une des problématiques actuelles est donc de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances primaires de ces tumeurs qui échappent aux EGFR-TKI. La connaissance de ces mécanismes permettra de conduire à la définition de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques visant à contourner la résistance aux thérapies anti-EGFR dans des populations de patients sélectionnés et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients. Dans ce contexte, l'équipe a montré que l'activation de l'IGF-1R est associée à la progression tumorale chez le sous-type histologique des adénocarcinomes mucineux en réponse au gefitinib (*Hurbin, 2011*). De plus, ces tumeurs se caractérisent par de hauts niveaux d'expression d'IGF-1R et d'amphiréguline et ces deux protéines coopèrent pour induire une résistance au gefitinib par un mécanisme actuellement inconnu.

Il est maintenant connu que de nombreux RTK (EGFR, IGF-1R, VEGFR, MET...) sont capables d'être transportés jusqu'au noyau où ils exercent une signalisation dite "nucléaire". Ainsi, l'EGFR nucléaire est exprimé dans de nombreux cancers dont le cancer du poumon pour lequel il est un marqueur de mauvais pronostic (*Brand, 2011* et *Traynor, 2013*). Au sein de l'équipe, il a été mis en évidence que l'expression nucléaire de l'EGFR favorise la progression des tumeurs pulmonaires en réprimant les fonctions pro-apoptotiques du suppresseur de tumeur p14^{ARF} (*Dayde, 2015*). Enfin, l'EGFR nucléaire est connu pour être

impliqué dans la résistance acquise au gefitinib dans le cancer du sein (Huang, 2011) et au cetuximab dans le cancer du poumon (Li, 2009).

De même, l'IGF-1R nucléaire a été détecté dans différents cancers. Il a notamment été associé à un mauvais pronostic dans les carcinomes rénaux (Aleksic, 2010). De plus, un marquage de l'IGF-1R exclusivement nucléaire est un marqueur prédictif de réponse aux traitements anti-IGF-1R dans les sarcomes (Asmane, 2012). Ces résultats contradictoires supposent donc que le rôle de l'IGF-1R nucléaire dépend du type de tumeur ce qui justifie l'étude dans d'autres modèles tumoraux comme celui du poumon.

Sur la base des travaux du laboratoire et de la littérature, nous avons émis l'hypothèse qu'une signalisation nucléaire des RTK pourrait être impliquée dans la progression tumorale des cancers pulmonaires en réponse aux EGFR-TKI.

A mon arrivée au laboratoire, des résultats préliminaires ont mis en évidence que le gefitinib induit une accumulation nucléaire de l'IGF-1R et pas de l'EGFR dans un modèle cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire mucineux très résistant aux EGFR-TKI.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient : (1) de rechercher la présence d'une expression nucléaire de l'IGF-1R dans les tumeurs pulmonaires humaines ; (2) de valider dans différents modèles cellulaires l'existence d'une accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib et de caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu pour sa translocation ; (3) d'étudier le rôle de l'expression nucléaire de l'IGF-1R dans la progression tumorale des cancers pulmonaires en réponse au gefitinib.

Résultats

Article

L'IGF-1R régule la réponse des adénocarcinomes pulmonaires aux EGFR-TKI au travers d'un transport nucléaire dépendant de l'amphiréguline.

Guérard M., Robin T., Perron P., Hatat A-S., David-Boudet L., Coll J-L., Lantuéjoul S., Eymin B., Hurbin A., Gazzeri S.

A. Présentation de l'étude

Les RTK sont connus pour activer un ensemble de voies de signalisation à partir de la membrane plasmique afin de réguler divers processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire ou l'apoptose. Cependant, il est moins connu que ces récepteurs ont également la capacité d'être internalisés pour être transportés depuis la membrane jusqu'au noyau cellulaire où ils exercent des fonctions nucléaires. Ils peuvent notamment agir en tant que co-régulateur transcriptionnel, phosphoryler des protéines cibles ou interagir directement avec d'autres protéines afin de modifier leur activité. Parmi les RTK, on sait qu'EGFR, HER2, VEGFR, FGFR, MET, ou encore IGF-1R peuvent être nucléaires. (*Mills, 2012*)

L'IGF-1R est impliqué dans l'activation de voies de signalisation jouant un rôle notamment dans la prolifération et la différenciation cellulaire (*Riedemann, 2006*). Une surexpression de l'IGF-1R ou une signalisation exacerbée de l'IGF-1R sont présentes dans le cancer du poumon (*Arcaro, 2013*). La surexpression de l'IGF-1R est associée au tabagisme et à un stade plus avancé (*Tsuta, 2013*) et une augmentation de l'expression d'ARNm est associée à une diminution significative de la survie moyenne des patients atteints de CBNPC (*Kim, 2015*). La présence d'IGF-1R nucléaire est décrite dans différents cancers, en particulier dans les rhabdomyosarcomes (*Aslam, 2013*) et les tumeurs rénales où il est associé à un mauvais pronostic (*Aleksic, 2010*). Peu de choses sont connues sur le mécanisme de transport nucléaire de l'IGF-1R. Seules quelques études rapportent le rôle de la p150^{Glued}, de l'importine β 1, de RanBP2 au travers de la sumoylation du récepteur dans le mécanisme de la translocation nucléaire de l'IGF-1R (*Sehat, 2010, Packham, 2015*). A l'heure actuelle, le rôle de l'IGF-1R nucléaire dans les pathologies cancéreuses reste peu étudié et son implication dans la réponse aux thérapies anticancéreuses reste à élucider.

L'IGF-1R est un facteur de résistance aux thérapies ciblées notamment dans les CBNPC en réponse aux EGFR-TKI (*Morgillo, 2006, Morgillo, 2007, Hurbin, 2011*). Il a été précédemment montré par l'équipe qu'une signalisation IGF-1R est associée à la progression tumorale des adénocarcinomes pulmonaires mucineux sous gefitinib (*Hurbin, 2011*). Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que l'IGF-1R nucléaire pourrait être impliqué dans la résistance aux EGFR-TKI de certains adénocarcinomes pulmonaires.

B. Résultats

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si l'IGF-1R nucléaire était détectable dans les modèles cellulaires de cancer du poumon et dans des tumeurs pulmonaires humaines. L'IGF-1R nucléaire est exprimé dans différents modèles d'adénocarcinomes avec des niveaux d'expression hétérogènes. De plus, grâce à des échantillons de tumeurs de patients, nous montrons par immunohistochimie que l'IGF-1R est exprimé dans le noyau de plus de 70% des adénocarcinomes pulmonaires, suggérant un rôle important de l'IGF-1R nucléaire dans ce type histologique.

Dans un second temps, nous avons souhaité étudier le rôle de l'IGF-1R nucléaire dans la réponse aux traitements et notamment en réponse aux EGFR-TKI. A l'aide de différents modèles cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires, nous montrons par fractionnement subcellulaire et immunofluorescence que les EGFR-TKI (gefitinib, dacomitinib) sont capables d'induire une accumulation nucléaire de l'IGF-1R persistante dans le temps dans les adénocarcinomes mucineux résistants aux EGFR-TKI (H358, H441), mais pas dans les adénocarcinomes non mucineux. Nous montrons aussi que le gefitinib induit le transport de l'IGF-1R depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau par un mécanisme moléculaire impliquant son association avec l'importine $\beta 1$. Comme dans ces modèles mucineux, l'équipe a identifié l'amphiréguline comme un élément important de la réponse au gefitinib (*Hurbin, 2011*), nous avons étudié son rôle dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R. En utilisant des siARN dirigés contre l'Areg, nous montrons que la neutralisation de l'Areg empêche l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib et prévient la formation d'un complexe IGF-1R/importine $\beta 1$. Ces résultats suggèrent le rôle majeur de l'Areg dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R induite par le gefitinib.

L'Areg existant sous plusieurs formes (soluble, membranaire et intracellulaire), nous avons cherché quelle forme pouvait jouer un rôle dans le transport nucléaire de l'IGF-1R. En

utilisant des dosages ELISA et une technique d'immunofluorescence, nous montrons que le gefitinib inhibe la sécrétion de l'Areg mais stimule son trafic intracellulaire vers le noyau. L'expression d'une pro-Areg tronquée, qui est transportée spontanément à la membrane nucléaire, entraîne l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R, validant le rôle de l'Areg dans le transport nucléaire de l'IGF-1R. Ces données suggèrent que la pro-Areg pourrait être un partenaire de l'IGF-1R dans son transport nucléaire. En accord avec ces résultats, nous montrons par co-immunoprécipitation et proximity ligation assay (PLA) que le gefitinib favorise la formation d'un complexe entre l'IGF-1R, l'Areg intracellulaire et l'importine $\beta 1$. Nous avons utilisé des xéno greffes de cellules humaines d'adénocarcinome chez la souris et traitées avec du gefitinib et ou des siARN dirigés contre l'Areg (Busser, 2010) et nous avons étudié la présence d'IGF-1R nucléaire. Nous montrons par immunohistochimie que le gefitinib induit l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R qui s'accompagne d'une augmentation de la prolifération cellulaire (marquage Ki67). La neutralisation de l'Areg prévient l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R et de Ki67 indiquant que le gefitinib induit l'activation d'une signalisation nucléaire IGF-1R/Areg stimulant la prolifération.

C. Conclusion

Pour la première fois, grâce à cette étude, nous mettons en évidence l'expression nucléaire de l'IGF-1R dans les tumeurs pulmonaires. De plus, nous montrons que les EGFR-TKI induisent une accumulation nucléaire de l'IGF-1R dépendante de l'Areg dans des modèles d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux. Le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib implique l'importine $\beta 1$ et la pro-Areg. Notre étude est la première à proposer comme partenaire potentiel de l'IGF-1R pour son transport nucléaire l'Areg intracellulaire qui possède une séquence NLS. En réponse au gefitinib, la signalisation nucléaire Areg/IGF-1R stimule la prolifération cellulaire dans les tumeurs *in vivo*. Ces résultats identifient le trafic intracellulaire de l'IGF-1R comme un nouveau composant de la réponse aux EGFR-TKI et suggèrent que la signalisation nucléaire IGF-1R/Areg contribue à la progression des adénocarcinomes mucineux sous EGFR-TKI.

D. Article

Nuclear translocation of IGF-1R via amphiregulin as a regulator of lung adenocarcinoma response to EGFR-TKI

Marie Guerard^{1,2}, Thomas Robin^{1,2}, Pascal Perron^{1,2}, Anne-Sophie Hatat¹, Laurence David-Boudet³, Jean-Luc Coll², Sylvie Lantuejoul³, Beatrice Eymin¹, Amandine Hurbin^{2*} and Sylvie Gazzeri^{1*}

*Co-last authors

¹ Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, UMR-CNRS5309 Institute for Advanced Biosciences, team “RNA slicing, cell signaling and response to therapies”, Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, INSERM U1209, UMR-CNRS5309 Institute for Advanced Biosciences, team “Cancer targets and experimental therapeutics”, Grenoble, France

³ Grenoble Univ. Hospital, Grenoble, France

Corresponding author:

Sylvie Gazzeri

Phone: 33 4 76 54 94 76, Fax: 33 4 76 54 94 13, Sylvie.Gazzeri@univ-grenoble-alpes.fr

Running Title: nuclear IGF-1R in resistance of lung tumors to EGFR-TKI

Abstract

Nuclear trafficking of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) has been associated with poor clinical outcome in some tumor types. Recent data suggest that it may also play a role in cancer therapy. In this study we showed the expression of nuclear IGF-1R in non-small cell lung cancer cell lines and primary tumors. In lung adenocarcinoma cell lines with wild type EGFR and resistant to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), we found that the EGFR-TKI gefitinib induces the endocytosis and nuclear accumulation of IGF-1R by a mechanism involving its association with importin- β 1. Neutralisation of the EGF family member growth factor amphiregulin (Areg) using siRNA disrupts importin- β 1/IGF-1R association induced by gefitinib, thereby identifying Areg as a critical mediator of IGF-1R nuclear shuttling. Gefitinib inhibits proAreg shedding and promotes intracellular migration of Areg allowing the formation of an importin- β 1/Areg/IGF-1R complex. Using mice xenografts, we validated the role of Areg in nuclear IGF-1R accumulation by gefitinib *in vitro* and showed that nuclear IGF-1R staining is associated with increased Ki-67 proliferation index in this context. These results suggest that nuclear expression of IGF-1R is an important determinant of resistance to EGFR-TKI-based therapy and identify amphiregulin as a critical regulator of nuclear IGF-1R proliferative pathway.

Introduction

Receptor tyrosine kinases (RTK) are known to initiate at the plasma membrane a network of intracellular signalling pathways that relay cell surface information to the nucleus and/or to other intracellular compartments. During the recent years, nuclear trafficking of several RTKs has been gradually deciphered, in which intact or cleaved cell surface receptors shuttle from the cell surface to the nucleus after endocytosis. The most studied is the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) whose aberrant nuclear localisation has been linked with bad overall survival in numerous cancers (breast, ovary, lung...), with enhanced tumor growth as well as resistance to therapeutic agents including radiation, chemotherapy and more recently targeted therapy [1,2].

Insulin-like Growth Factor type 1 Receptor (IGF-1R) is a RTK whose signaling has a crucial role in cancer biology. Following ligand binding IGF-1R triggers the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and regulates cell growth, proliferation, differentiation, and apoptosis [3,4]. In addition, IGF-1R translocates to the cell nucleus where it may be responsible of aberrant cell-cycle progression [5]. Little is known about the mechanism behind the nuclear translocation of IGF-1R. Some studies reported that sumoylation, microtubules and Importin- β 1 mediates transport of the receptor to the nucleus [6,7,8]. During the past few years, nuclear expression of IGF-1R has been reported in primary tumors and associated with aggressive clinical outcome in renal cancer and embryonal rhabdomyosarcoma patients [9,10]. In addition, nuclear IGF-1R has been reported as a predictive biomarker for anti-IGF-1R therapy in sarcoma patients [11]. To date there is no data regarding the nuclear role of IGF-1R in lung tumors.

Despite the clinical success of EGFR-targeted therapy, resistance to treatment is a significant barrier to the optimal use of EGFR inhibitors to cure patients with lung cancer. In this respect, activation of IGF-1R has been identified as a by-pass mechanism of acquired resistance to EGFR-TKI in EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC) [12]. Furthermore, we and others showed that IGF-1R pathway is also associated to the progression of NSCLC with wild-type EGFR following gefitinib treatment [13,14]. In this study, we wondered whether nuclear localization of IGF-1R plays a role in the response of lung tumors under EGFR-TKI exposure. Our results show that gefitinib induces the nuclear accumulation of IGF-1R in resistant lung adenocarcinoma cell lines expressing wild-type EGFR *in vitro* and *in vivo*, and identify Areg as a critical determinant of IGF-1R nuclear transport in this context. *In vivo* the nuclear IGF-1R/Areg pathway stimulates proliferation in response to gefitinib treatment suggesting a role in lung cancer progression.

Results

Nuclear IGF-1R is expressed in NSCLC cell lines and primary tumors

We investigated whether IGF-1R was expressed in the nucleus of lung tumor cell lines by using cell fractionation and western blotting. IGF-1R was found in nuclear extracts of all cellular models although with various expression level (Fig 1A). Of note the detection of nuclear IGF-1R expression was independent of EGFR mutational status. To study whether nuclear IGF-1R occurs in human lung tumors, we analyzed the subcellular distribution of IGF-1R using immunohistochemistry in a series of lung adenocarcinoma (Sup Table 1). We observed that 12 out of 17 (71%) samples had nuclear expression of IGF-1R (>10% nuclei of section with positive staining). Tumor sections showed membrane, cytosolic and/or nuclear IGF-1R staining (Fig 1B). Nuclear IGF-1R was also detectable in normal bronchial epithelia adjacent to tumor cells on sections. IGF-1R was highly expressed in lymphocytes which served as positive controls. Heterogeneous staining of nuclear IGF-1R was observed between and within tumors with no significant difference in the different histologic subtypes within this series of lung adenocarcinoma. Altogether, these results showed that nuclear IGF-1R is a common feature of lung tumors.

Gefitinib promotes nuclear accumulation of IGF-1R in mucinous lung adenocarcinoma cell lines

To investigate whether nuclear localisation of IGF-1R plays a role in the response of lung adenocarcinoma to EGFR-TKI, we exposed various cell lines to gefitinib and performed western blotting of IGF-1R after cell fractionation. A 24 hours gefitinib treatment induced a significant accumulation of IGF-1R in the nuclear extracts of H358 and H441 cells (Figure 2A upper panel and B). In contrast, the expression level of nuclear IGF-1R did not

significantly vary in all other tumor cell lines (Figure 1A upper panel and B, and Sup Fig1). Nuclear accumulation of EGFR was not observed in H358 and H441 cells indicating that gefitinib specifically targets IGF-1R to the nucleus. Moreover, the expression level of IGF-1R was not affected by gefitinib when total protein extracts were used, demonstrating that nuclear accumulation was not due to a global increase of IGF-1R expression (Figure 2A lower panel). Accumulation of nuclear IGF-1R was clearly detected following 4 hours of gefitinib treatment and persisted even after 96 hours (Figure 2C). Increased level of IGF-1R in the nuclear extracts fraction was also observed when H358 cells were treated with dacomitinib, suggesting that the nuclear localization of IGF1R is not restricted to gefitinib and could be a general effect of EGFR-TKIs (figure 2D). Immunolocalization studies indicated that IGF-1R is mainly located at the plasma membrane and in the cytoplasm in untreated cells whereas it was observed at the nuclear membrane and in the nucleus after gefitinib treatment (Figure 2E). High salt extraction procedure showed the presence of IGF-1R in the nuclear soluble fraction of H358 cells under gefitinib exposure (figure 2F), in agreement with the immunolocalization studies. Interestingly H358 and H441 lines were derived from mucinous lung adenocarcinoma which are resistant to EGFR-TKI. Altogether these results demonstrated that EGFR-TKIs induce the nuclear accumulation of IGF-1R in mucinous lung adenocarcinoma cell lines.

Gefitinib induces the transport of IGF-1R from the plasma membrane to the nucleus through importin- β 1 association

It was previously shown that nuclear IGF-1R is dependent on clathrin-dependent endocytosis [9]. To further characterize the mechanisms of IGF-1R relocation by gefitinib, we used dansylcadaverine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis. Pre-treating H358 cells with dansylcadaverine prevented the nuclear accumulation of IGF-1R induced by

gefitinib (Figure 3A). Same results were obtained with the H441 line (Figure 3B). As importin- β 1 has been reported as a key element for the nuclear translocation of IGF-1R [8], we wondered whether it may also play a role in response to gefitinib. Using *in situ* Proximity Ligation Assays (PLA) we observed interaction between importin- β 1 and IGF-1R in H358 cells and showed that gefitinib strongly increases complex formation (Fig 3B and C). To confirm these results we performed co-immunoprecipitation experiments. In agreement with the PLA data, gefitinib induced the co-precipitation of importin- β 1 with IGF-1R (Figure 3D). Taken together, these results showed that gefitinib induces the transport of IGF-1R from the plasma membrane to the nucleus by a mechanism involving importin- β 1.

Nuclear accumulation of IGF-1R by gefitinib requires amphiregulin

We previously identified Areg as a key component of the response of H358 cells to gefitinib [13,15]. To study whether it may play a role in the nuclear accumulation of IGF-1R by gefitinib, we transfected H358 cells with specific siRNA against Areg, and studied the localization of IGF-1R by immunoblotting. Areg neutralization was verified by RT/qPCR. We found that Areg knock-down prevented the nuclear accumulation of IGF-1R induced by gefitinib (Fig 4A-B). Same results were obtained using the H441 cells (Fig 4C-D). Using PLA in H358 cells, we showed that Areg neutralisation also decreased gefitinib-induced interaction between importin- β 1 and IGF-1R (Figure 4E and F). These results were supported by co-immunoprecipitation assays. Transfecting cells with Areg siRNA prevented importin- β 1/IGF-1R complex formation in response to gefitinib (Figure 4G). As a whole these results demonstrated that gefitinib promotes the nuclear accumulation of IGF-1R by a mechanism depending on Areg.

Gefitinib induces the formation of an importin- β 1/IGF-1R/Areg complex.

Next we analyzed the effect of gefitinib on Areg. Using Elisa assays, we observed that gefitinib strongly downregulated the level of secreted Areg in H358 cells (Figure 5A). Same results were found using dacomitinib. Although less pronounced, this effect was also observed in H441 cells (Sup Fig 2). Therefore, these results suggested that intra-cellular Areg isoform may play a role in nuclear accumulation of IGF-1R induced by gefitinib. To respond, we first used immunofluorescence to study the effect of gefitinib on Areg localization. H358 cells were transiently transfected with wild-type Areg-V5 expression vector and Areg localization was analyzed using anti-V5 antibody. Areg-V5-positive staining was detected at the plasma membrane under steady-state conditions (Figure 5B). In the presence of gefitinib, the Areg-V5 signal was observed inside the cell close to the nuclear membrane. Based on these results, we speculated that intracellular traffic of Areg controlled IGF-1R nuclear translocation. Therefore, we used an expression vector that encodes a truncated mutant Areg (Areg-V5- Δ C11) which spontaneously localizes at the endoplasmic reticulum and the nuclear envelope [16]. Cells were transfected with Areg-V5- Δ C11 vector and nuclear IGF-1R was analyzed after fractionation. H322 and A549 cells were used in these settings because they physiologically express very low level of Areg (Sup Fig 3). As illustrated a huge accumulation of IGF-1R was observed in the nuclear extracts of both cell lines expressing the Areg-V5- Δ C11 mutant compared to cells transfected with an empty vector (Fig 5C). Then we investigated protein interactions by using PLA. We observed that gefitinib significantly increases the co-localization between Areg and IGF-1R in H358 cells (Fig 5D and E), as well as between Areg and importin- β 1 (Fig 5D and F). Collectively these results strongly suggested that gefitinib promotes IGF1R nuclear translocation through the formation of an importin- β 1/IGF-1R/Areg complex.

Gefitinib induces a proliferative nuclear IGF-1R/Areg signaling pathway in lung tumor xenografts

We previously showed that Areg knockdown inhibits the growth and overcomes resistance of H358 tumors to gefitinib [15]. Therefore, we took advantage of these experiments to investigate the role of nuclear IGF-1R. We used H358 xenograft tumors established in nude mice treated with vehicle (control), gefitinib, Areg siRNA, or their combination [15] and performed IHC studies. In the control mice group, a strong IGF-1R membrane staining was mainly observed (Fig 6A). Strikingly, all tumors from mice receiving gefitinib had positive perinuclear and/or nuclear IGF-1R staining, confirming our *in vitro* data. Combination of gefitinib with Areg siRNA prevented the appearance of nuclear IGF-1R staining in all xenografts indicating that Areg is involved in nuclear IGF-1R accumulation by gefitinib in that case ($p = 0.0046$). Of note, tumors from mice treated with Areg siRNA alone mainly showed membrane IGF-1R staining, although the presence of nuclear IGF-1R staining was observed in 2 out of 6 xenografts. Importantly, nuclear IGF-1R localization induced by gefitinib treatment was associated with a higher Ki67 proliferation index (Fig 6B). Combined treatment with Areg siRNA prevented the increase of Ki67 positive cells. Collectively these results indicated that gefitinib induces a proliferative nuclear IGF-1R/Areg pathway in mucinous lung adenocarcinoma.

Discussion

A substantial body of evidence indicates that many full-length RTKs are translocated to the nucleus. If several papers have reported nuclear RTKs as adverse prognostic biomarkers in several types of tumors, their role in the response to cancer treatment is largely unknown. Since many of these RTKs are therapeutic targets, this area of research may have important clinical implication. In this study, we demonstrate that EGFR-TKIs induce a specific translocation of IGF-1R in the nucleus of some resistant lung adenocarcinoma. Furthermore, we identify Areg as an important regulator of nuclear IGF-1R accumulation *in vitro* and *in vivo*, and show that the Areg/IGF-1R pathway stimulates proliferation of lung tumor xenografts under gefitinib exposure. Together these results identify the nuclear IGF-1R/Areg module as a new bypass mechanism of resistance to EGFR-TKI in lung adenocarcinoma.

We demonstrate that gefitinib induces clathrin-dependent endocytosis and binding of IGF-1R with importin- β 1. Since importin- β 1 was previously reported as an important player of IGF-1R nuclear translocation following ligand stimulation [8], our results highlight the importin- β 1/IGF-1R module as a general determinant for nuclear transport of IGF-1R. IGF-1R does not carry nuclear localization sequence (NLS) and it is supposed that importin- β 1 binding requires a yet unknown NLS-containing protein [8]. In this study, we demonstrate that Areg knockdown prevents the formation of the IGF-1R/importin- β 1 complex following gefitinib treatment and inhibits the nuclear accumulation of IGF-1R. Areg is expressed as a membrane-anchored precursor protein (proAreg) on cell surface and then is proteolytically converted to soluble Areg isoforms by membrane proteases, mainly TACE/ADAM17 [17]. Soluble Areg can then engage in autocrine or paracrine signalling through EGFR binding. In

addition, un-shed proAreg and Areg-cytosolic fragment generated after TACE processing can be internalized and translocated to the nucleus as part of signal effects. Unlike IGF-1R, Areg contains canonical Nuclear Localization signals (NLS) allowing its direct binding to importin- β 1. We show here that gefitinib inhibits proAreg shedding, induces intracellular migration of Areg and stimulates the formation of Areg/importin- β 1 and Areg/IGF-1R complexes. Collectively, our results indicate that Areg enables the binding of IGF-1R to importin- β 1 and strongly suggest that gefitinib promotes nuclear translocation of IGF-1R by inducing the formation of an importin- β 1/Areg/IGF-1R complex.

One question that remains to elucidate is how gefitinib inhibits proAreg shedding to induce the intracellular Areg/importin- β 1/IGF-1R pathway. Our preliminary results show that inhibition of the ADAM17 enzyme by using pharmacological inhibitors does not promote nuclear translocation of IGF-1R (Sup Fig 4). These data suggest that gefitinib regulates proAreg cleavage independently of a major effect on ADAM17 protease activity. A recent study demonstrated that signaling components regulate the cleavage of ADAM17 substrates, including Areg, without significantly affecting protease activity [18]. It is thus possible that gefitinib activates a signaling module that inhibits ADAM17 cleavage of proAreg to promote intracellular migration of Areg.

Although there is preliminary evidence that nuclear IGF-1R may constitute a potential biomarker in cancer [9,19], this study is the first to thoroughly examine IGF-1R nuclear immunostaining in a series of lung tumors. We found 71% of lung adenocarcinoma positive for nuclear IGF-1R staining highlighting the need to further study the relevance of IGF-1R nuclear signaling in lung tumor development. Importantly, we unravel the nuclear Areg/IGF-1R pathway as a mechanism of tumor progression in response to gefitinib in mucinous lung adenocarcinoma. These results provide a mechanistic explanation to our previous observation that inactivation of Areg or IGF-1R overcome resistance of mucinous lung adenocarcinoma

cell line to gefitinib [13]. Overall our study highlight nuclear trafficking of IGF-1R as an important component of lung cancer biology, and suggest that it is a new bypass mechanism of tumor resistance to EGFR-TKI. In keeping with previous reports [20,21], this highlights the need to further characterize the role of nuclear RTK signaling in the context of therapeutic resistance. This may open the way toward the development of new therapeutic strategies in lung cancer regarding drugs resistance.

Materials and methods

Tissue samples and Immunohistochemistry

Seventeen human samples of adenocarcinoma were taken at surgical resection of lung tumors. Tissue banking and research conduct was approved by the ministry of Research (approval AC-2010-1129) and by the regional IRB (CPP 5 Sud-Est). Histopathology diagnosis was made on formalin-fixed, paraffin-embedded samples using the current WHO classification [22,23]. Immunostaining was performed on 3 μ m tissue sections on an automated instrument (Bench-Mark, Ventana Medical Systems, Strasbourg, France) according to the manufacturer's instructions. Tissue sections were deparaffinized, dehydrated, and subjected to antigen retrieval in CC1 buffer (pH 8.0). This antibody is raised against the β -subunit extracellular domain of IGF-1R and recognizes both membrane and nuclear IGF-1R. In the study of mice xenografts, an antibody against Ki67 (MIB1, DAKO, Trappes, France, dilution 1/75) was also used. Detection was performed using Optiview DAB IHC detection kit (IGF-1R) or Ultraview DAB IHC detection kit (Ki-67). Negative control consisted in omission of the primary antibody and incubation with immunoglobulins of the same species and isotype. Immunostaining was evaluated independently by two pathologists (SL, DLB) who were blinded to all clinico-pathological variables. Scoring of immunoreactivity of IGF-1R in the nucleus was assessed as the percentage of tumor cells with nuclear IGF-1R staining. Tumor sections with more than 10% of cells with nuclear IGF-1R staining were considered as positive. For Ki67, the degree of staining was calculated as the proportion of positive cells using a objective 20x in 10 high power fields.

Cell culture, transient transfections and drug treatments

H358, H441, H322, A549 were human lung adenocarcinoma cell lines from ATCC. HCC827, PC9, H1975 and H1719 were human lung adenocarcinoma cell lines kindly provided by Pr A. Gazdar. All cells were mycoplasma free and maintained in RPMI-1640 + GlutaMAX medium (GIBCO, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. Transfection of cells was performed with jetPEI (OZYME, Saint Quentin en Yvelines, France). pME18S-AR-V5 Δ 11C vector was kindly provided by Dr Shigeki Higashiyama. Transfection with siRNA was carried out using jetPrime reagent (OZYME, Saint Quentin en Yvelines, France) and the cells were analyzed 72 hours post-transfection. The sequences designed to specifically target human *Amphiregulin* RNAs were as follows: siAreg1 5'-CGAACCACAAAUACCUGGC -3' and siAreg2, 5'-CCUGGAAGCAGUAACAUGC-3'. For all interference experiments, the mismatch siRNA oligonucleotide used as a control was 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAA-3'. Gefitinib and dacomitinib were purchased from Selleckchem (Souffelweyersheim, France) and dansylcadaverin from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France),.

Cell fractionation Immunoprecipitation and Immunoblotting

Cell fractionation was performed as described previously [24]. The high salts nuclear fraction protocol was as previously reported [25]. RIPA buffer was used for total proteins extracts. Analysis of protein expression was performed by western blotting. IGF-1R and laminB/H3 intensities were quantified using the Image J software and the relative densitometric areas for IGF-1R were determined according to Lamin B/H3 signal in each condition.

Antibodies

The anti-EGFR (D38B1), anti-IGF-1R (cs3027) and anti-lamin B1 (D4Q4Z) antibodies were purchased from Cell Signaling (OZYME, Saint Quentin Yvelines, France). The anti-IGF-1R (sc713), anti-Importin β 1 (sc11367), anti-Amphiregulin (sc2534) and anti- α tubulin (B-5-1-2) antibodies were purchased from Santa-Cruz (Clinisciences, Montrouge, France). Anti-Histone H3 was from Millipore (Molsheim, France) and anti-V5 was from Thermo-fisher (Villebon-sur-Yvette, France).

RNA extraction, reverse transcription and real-time quantitative PCR analysis

RNA was extracted using High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol and subjected to Reverse Transcription using iScript RT supermix (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Quantitative PCR (qPCR) was performed with iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad). The primers used for cDNA amplification were *Areg* F: 5'-ATATCACATTGGAGTCACTGCCCA-3'; *Areg* R: 5'-GGGTCCATTGTCTTATGATCCAC-3'; *GAPDH* S: 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'; *GAPDH* AS: 5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGG-3'. Amplification of *GAPDH* was performed in all experiments and used as reference gene. Relative gene expression was calculated for each sample as the ratio of target cDNA copy number to *GAPDH* cDNA copy number. The data represent the mean \pm SD of at least three independent experiments.

Indirect immunofluorescence

For immunolocalization studies, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 10 min at 4°C, washed three times with PBS, and permeabilized with acetone for 1min at room temperature. Blocking was performed in 5% BSA and primary antibodies were

incubated overnight at 4°C. Cells were visualised with an Axioimager microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) and the AxioVision® software at a 60x magnification and processed with Image J software.

Proximity Ligation Assays (PLA)

PLA was performed using the Duolink® In Situ kit from Olink Bioscience (SIGMA Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The PLA was conducted according to the manufacturer's recommendations. A multiphoton Zeiss (Oberkochen, Germany) LSM510 META NLO confocal microscope was used for analyzing all IF experiment, at 60x magnification. Images were acquired with AxioCam digital microscope camera and analyzed in Icy 1.7. All images are z-stacked.

Statistical analysis

All the data represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. All statistical analyses were performed using *t*-test (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

Acknowledgements

We thank Dr Shigeki Higashiyama for providing us with the pME18S-AR-V5 Δ 11C vector. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1209, the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (grant n° 20131200109), la Fondation de France and la Ligue Nationale contre Le Cancer Comité de Savoie. M.G was supported by le Fonds Agir pour les Maladies Chroniques and la Fondation du Souffle/Fond de recherche Respiratoire. A.S.H was supported by the French Research Ministry.

Legends

Figure 1: Nuclear expression of IGF-1R in NSCLC cell lines and primary tumors

A, Western blotting was performed on nuclear protein extracts after cell fractionation in various lung tumor cell lines expressing wild-type or mutant (*) EGFR. Lamin B was used a control loading marker. B, Immunohistochemical analysis of IGF-1R status in human lung adenocarcinoma showing heterogeneous nuclear IGF-1R staining. a, bronchus; b, normal lung adjacent to tumor cells on section; c and d, mucinous adenocarcinoma with score of 50; e, adenocarcinoma with score of 70; f, adenocarcinoma with score of 30. Original magnification: 20x

Figure 2: Gefitinib induces nuclear accumulation of IGF-1R in lung adenocarcinoma cell lines

A and B, Cells were treated with 1 μ M gefitinib for 24h. IGF-1R and EGFR were evaluated by western blot on nuclear protein extracts (upper panel) and total protein extracts (lower panel). Lamin B and tubulin were used as loading controls. B, Quantification of nuclear IGF-1R (NucIGF-1R) was performed as described in the methods section and NucIGF-1R/LaminB ratio is presented. Data represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. NT, not treated. **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001. C, H358 cells were treated with 1 μ M gefitinib for the indicated times. Western blotting was performed on nuclear protein extracts. Values indicate relative NucIGF-1R/lamin B ratio. D, H358 cells were treated with 1 μ M gefitinib (Gef) or dacomitinib (Daco) for 24 hours. Western blotting was performed on nuclear protein extracts. Values indicate relative NucIGF-1R/lamin B ratio. E. Immunolocalisation of IGF-1R (Red) was performed in H358 cells treated with 1 μ M gefitinib for 6 hours using confocal microscopy. DAPI (Blue) was used to counterstained nuclei.

Magnification: 60x. F, Immunoblotting of IGF-1R in nuclear soluble fractions (Ns) of H358 cells treated with 1 μ M gefitinib for 6 hours. Histone 3 was used as loading control. Values indicate relative NuIGF-1R/lamin B ratio. NT: not treated

Figure 3: Gefitinib induces importin- β 1-dependent nuclear transport of IGF-1R

A, B, H358 (A) and H441 (B) cells were pre-treated for 30 min with 0.1 μ M dansylcadaverine before 1 μ M gefitinib treatment for 24 hours. IGF-1R was evaluated by western blotting was performed on nuclear extracts. Lamin B was used as a loading control. Quantification of nuclear IGF-1R is numerically indicated below each lane. B, Co-localization between IGF-1R and importin- β 1 was detected by PLA (red dots) in H358 cells treated or not with 1 μ M gefitinib. In blue: DAPI staining of nuclei. Magnification: 60 X. Two different importin- β 1 antibodies were used as positive control and one importin- β 1 antibody alone was used as negative control. C, Quantification of PLA interactions (n = 50 cells). Data represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. **p \leq 0.01. D, gefitinib induces the interaction of IGF-1R with importin- β 1 as determined by coimmunoprecipitation of IGF-1R and importin- β 1. IgG: negative control.

Figure 4: Nuclear accumulation of IGF-1R by gefitinib requires amphiregulin

A-D, H358 (A and B) or H441 (C and D) cells were transfected with control (siCtl) or siRNA against amphiregulin (siAreg) and treated with or without 1 μ M gefitinib for 72 hours. Immunoblotting was performed on nuclear extracts (left panels). Neutralization of amphiregulin was assessed by quantitative PCR (right panels). Histograms represent relative Areg mRNA levels. Areg mRNA levels in cells transfected with control siRNA which were arbitrarily assigned to 1. B and D, Quantification of nuclear IGF-1R protein levels was performed as described in the methods section ***p \leq 0.001. E, Co-localization between IGF-

1R and importin- β 1 was detected by PLA (red dots) in H358 cells transfected with control (siCtl) or Areg siRNA (siAreg) for 48 hours and treated for 24 additional hours with or without 1 μ M Gefitinib. Two different importin- β 1 antibodies were used as positive control and one importin- β 1 antibody alone was used as negative control. F, Quantification of PLA interactions (n = 50 cells). Data represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. *** $p \leq 0.001$. G, Areg siRNA disrupts the interaction between IGF-1R and importin- β 1 as determined by coimmunoprecipitation of IGF-1R and importin- β 1. IgG: negative control.

Figure 5: Gefitinib induces the formation of an importin- β 1/IGF-1R/Areg complex.

A, Secretion of Areg was studied by Elisa assays in H358 cells treated or not with 1 μ M gefitinib (Gef) or dacomitinib (Daco) for 24 hours. B, H358 cells were transfected with Areg-V5 vector and treated or not with 1 μ M gefitinib. Immunolocalisation of Areg-V5 was performed using confocal microscopy. In red: Areg-V5, in blue: nuclei staining with DAPI. Magnification: 60X. C, Nuclear extracts of H322 and A549 cells transfected with control empty vector or mutant Areg-V5- Δ C11 were subjected to IGF-1R and V5 immunoblotting. Lamin B was used as loading control. D, Co-localizations between Areg and IGF-1R or importin- β 1 were detected by PLA (red dots) in H358 cells cultured with or without gefitinib for 24 hours. Two different importin- β 1 antibodies were used as positive control and one Areg antibody alone was used as negative control. E, Quantification of Areg/IGF-1R PLA interactions (n = 50 cells). F, Quantification of PLA Areg/importin- β 1 PLA interactions (n = 50 cells). Data represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$.

Figure 6: Gefitinib induces a proliferative nuclear IGF-1R/Areg signaling pathway in lung tumor xenografts

Immunohistochemical staining of IGF-1R (A) or Ki67 (B) was performed in H358 xenografts in athymic nude mice subjected to combined treatment with gefitinib or vehicle and control (siCtl) or Areg siRNA (siAreg) as indicated. B Right panel, The percentages of mice with positive (in black) or without (in white) nuclear IGF-1R staining were shown for each group of mice (n=6 mice/group).

References

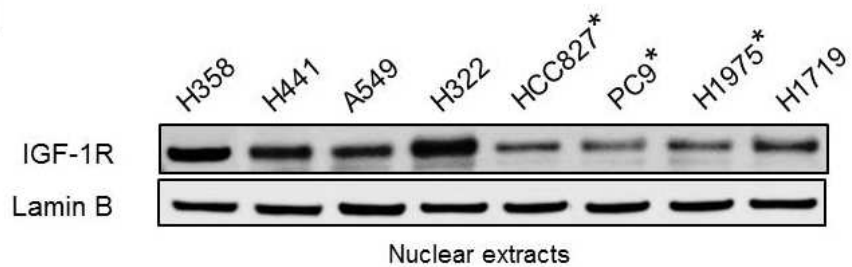
1. Brand TM, Iida M, Li C, Wheeler DL (2011) The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov Med* 12: 419-432.
2. Lo HW (2010) Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications. *Discov Med* 10: 44-51.
3. Baserga R (1996) Controlling IGF-receptor function: a possible strategy for tumor therapy. *Trends Biotechnol* 14: 150-152.
4. Werner H, LeRoith D (1996) The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res* 68: 183-223.
5. Warsito D, Sjostrom S, Andersson S, Larsson O, Sehat B (2012) Nuclear IGF1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF. *EMBO Rep* 13: 244-250.
6. Sehat B, Tofigh A, Lin Y, Trocme E, Liljedahl U, et al. (2010) SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci Signal* 3: ra10.
7. Deng H, Lin Y, Badin M, Vasilcanu D, Stromberg T, et al. (2011) Over-accumulation of nuclear IGF-1 receptor in tumor cells requires elevated expression of the receptor and the SUMO-conjugating enzyme Ubc9. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 667-671.
8. Packham S, Warsito D, Lin Y, Sadi S, Karlsson R, et al. (2015) Nuclear translocation of IGF-1R via p150(Glued) and an importin-beta/RanBP2-dependent pathway in cancer cells. *Oncogene* 34: 2227-2238.
9. Aleksic T, Chitnis MM, Perestenko OV, Gao S, Thomas PH, et al. (2010) Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. *Cancer Res* 70: 6412-6419.
10. van Gaal JC, Roeffen MH, Flucke UE, van der Laak JA, van der Heijden G, et al. (2013) Simultaneous targeting of insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma: a rational choice. *Eur J Cancer* 49: 3462-3470.
11. Asmane I, Watkin E, Alberti L, Duc A, Marec-Berard P, et al. (2012) Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) exclusive nuclear staining: a predictive biomarker for IGF-1R monoclonal antibody (Ab) therapy in sarcomas. *Eur J Cancer* 48: 3027-3035.
12. Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, Capelletti M, Zejnullahu K, et al. (2012) Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway. *Cancer Res* 73: 834-843.

13. Hurbin A, Wislez M, Busser B, Antoine M, Tenaud C, et al. (2011) Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma. *J Pathol* 225: 83-95.
14. Morgillo F, Kim WY, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, et al. (2007) Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* 13: 2795-2803.
15. Busser B, Sancey L, Josserand V, Niang C, Khochbin S, et al. (2010) Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in nonsmall cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation. *Mol Ther* 18: 536-543.
16. Isokane M, Hieda M, Hirakawa S, Shudou M, Nakashiro K, et al. (2008) Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription. *J Cell Sci* 121: 3608-3618.
17. Berasain C, Avila MA (2014) Amphiregulin. *Semin Cell Dev Biol* 28: 31-41.
18. Dang M, Armbruster N, Miller MA, Cermenio E, Hartmann M, et al. (2013) Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9776-9781.
19. Aslam MI, Hettmer S, Abraham J, Latocha D, Soundararajan A, et al. (2013) Dynamic and nuclear expression of PDGFR α and IGF-1R in alveolar Rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Res* 11: 1303-1313.
20. Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL (2009) Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28: 3801-3813.
21. Huang WC, Chen YJ, Li LY, Wei YL, Hsu SC, et al. (2011) Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells. *J Biol Chem* 286: 20558-20568.
22. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, et al. (2004) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 6: 244-285.
23. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD (2005) The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 40: 90-97.
24. Dayde D, Guerard M, Perron P, Hatat AS, Barrial C, et al. (2015) Nuclear trafficking of EGFR by Vps34 represses Arf expression to promote lung tumor cell survival. *Oncogene*.

25. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, et al. (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3: 802-808.

Figure 1

A



B

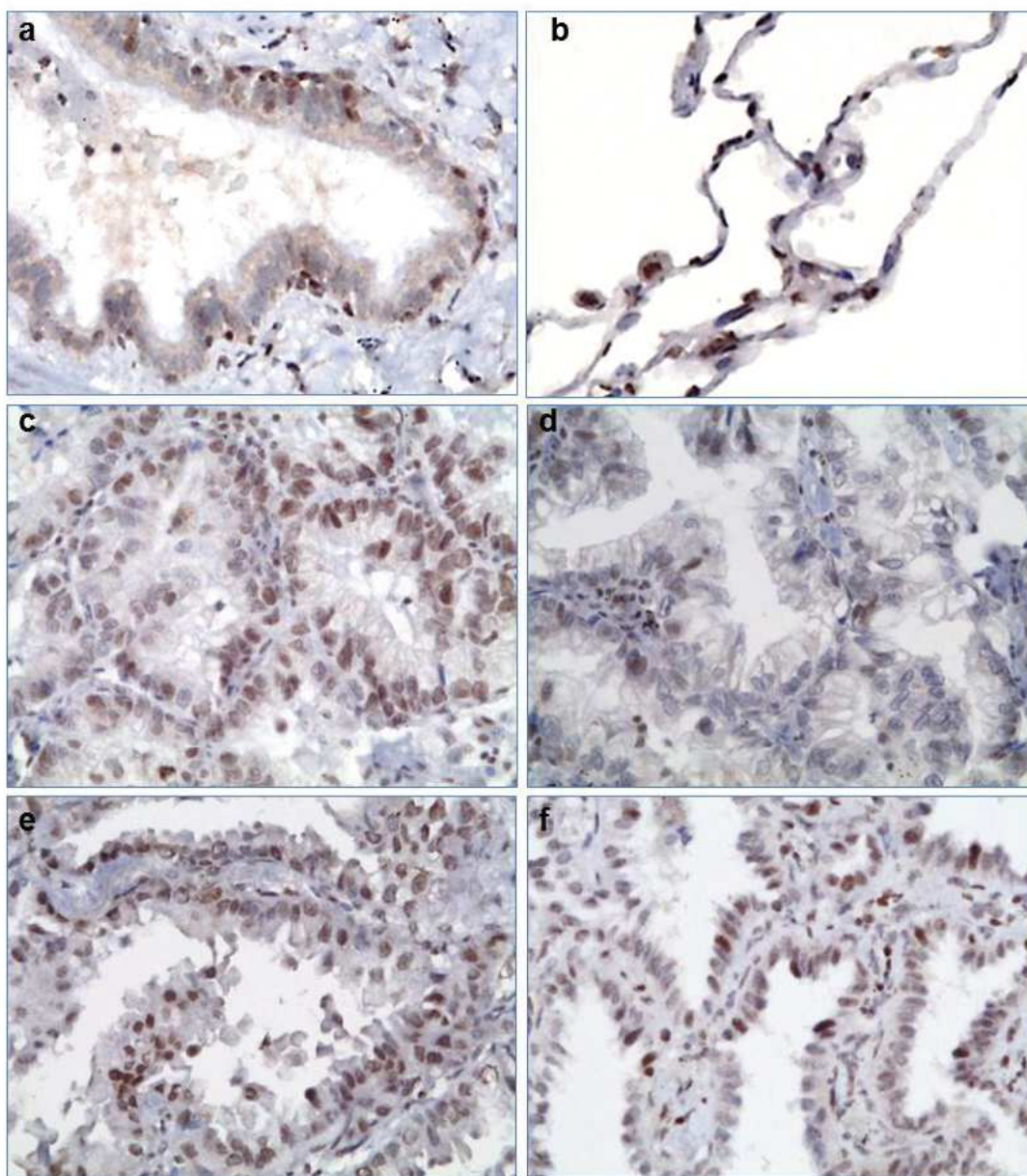


Figure 2

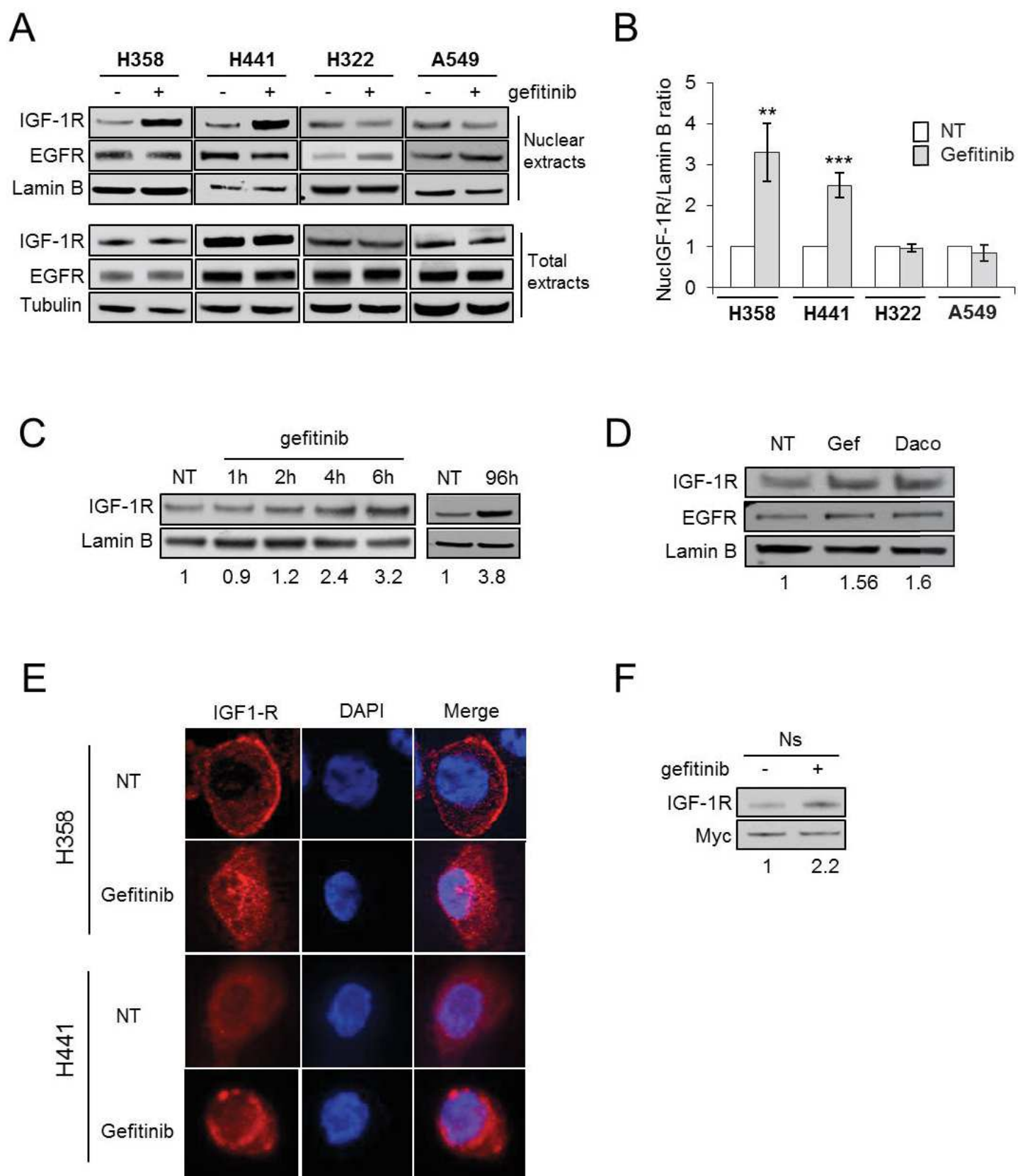


Figure 3

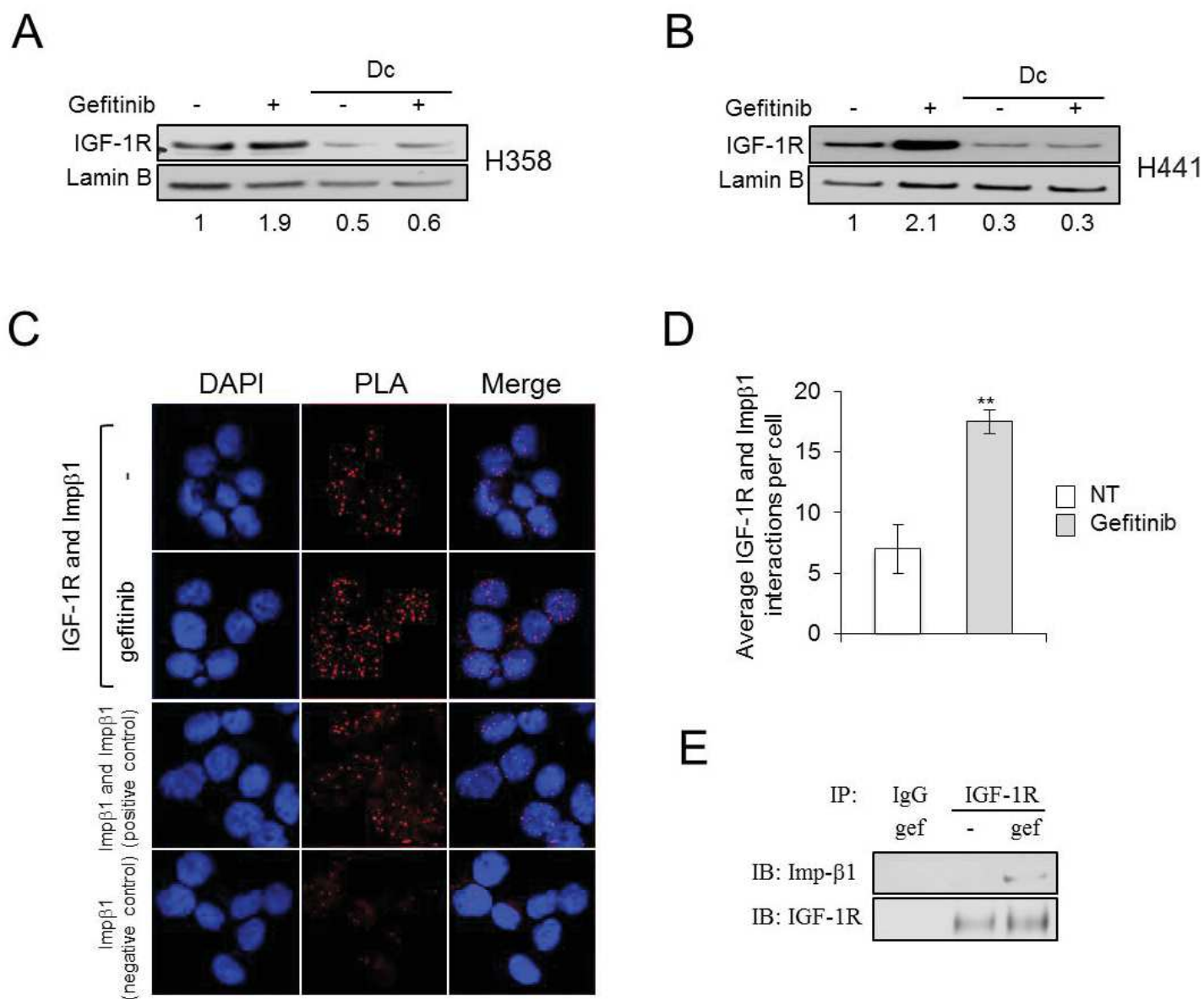


Figure 4

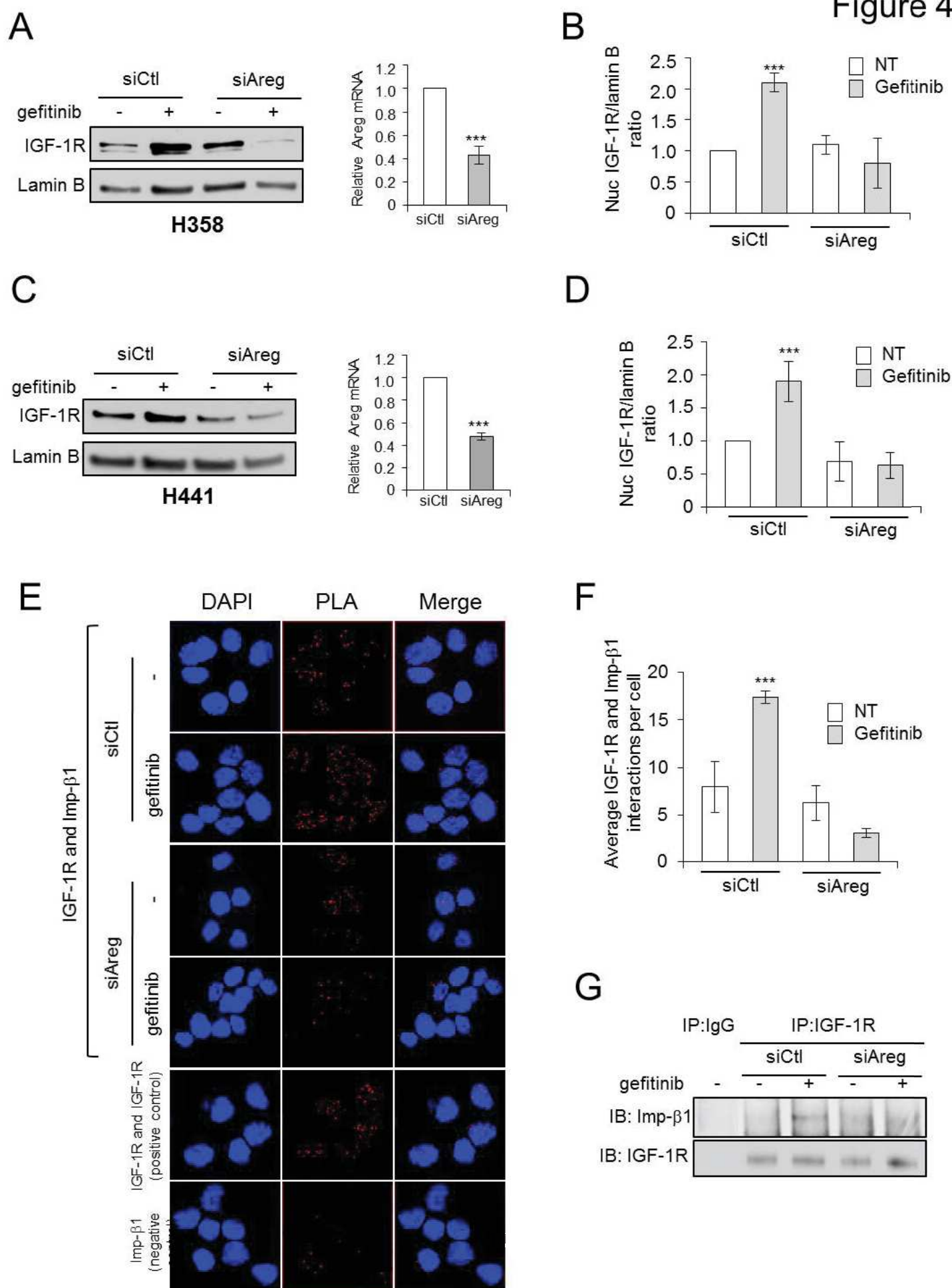


Figure 5

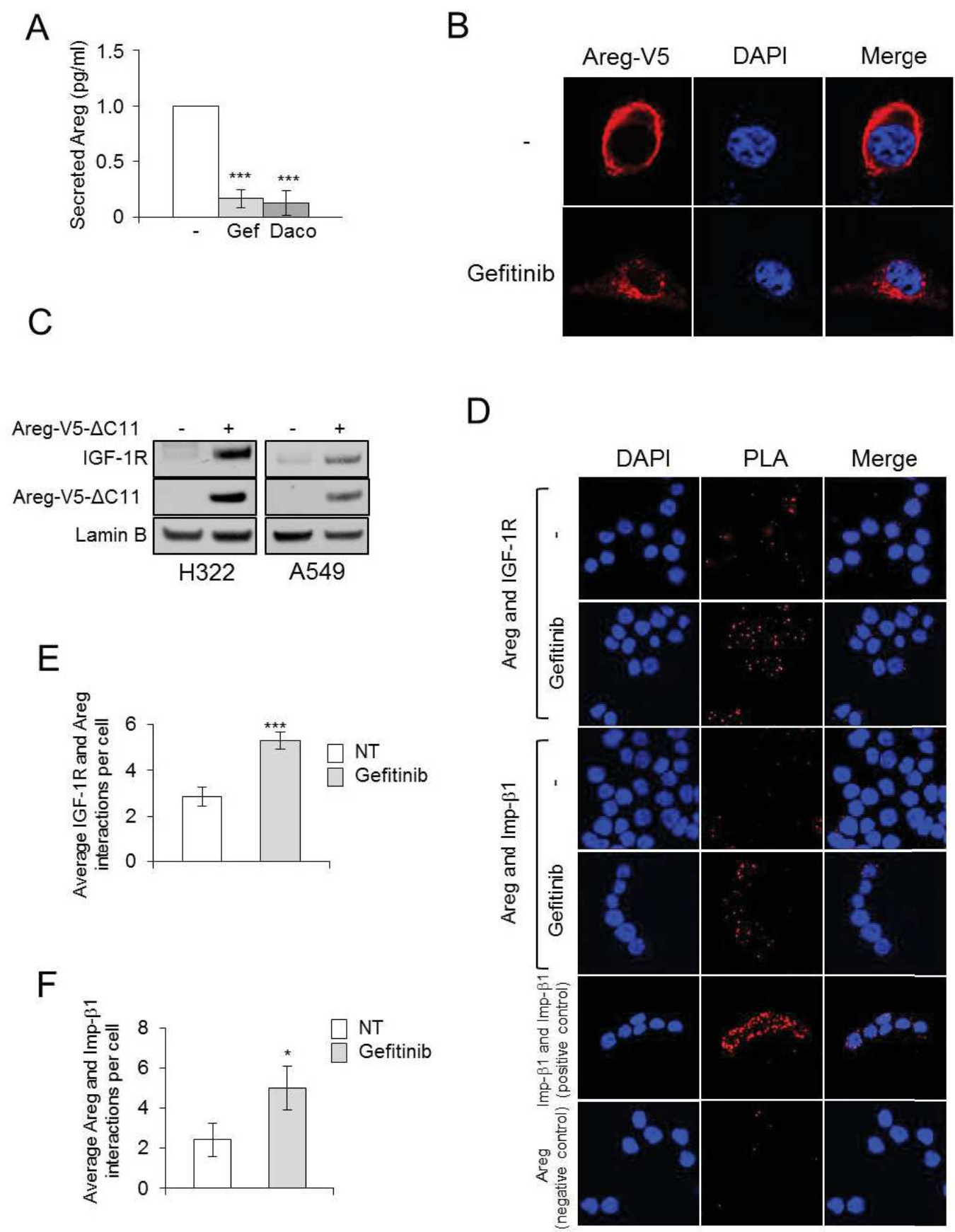
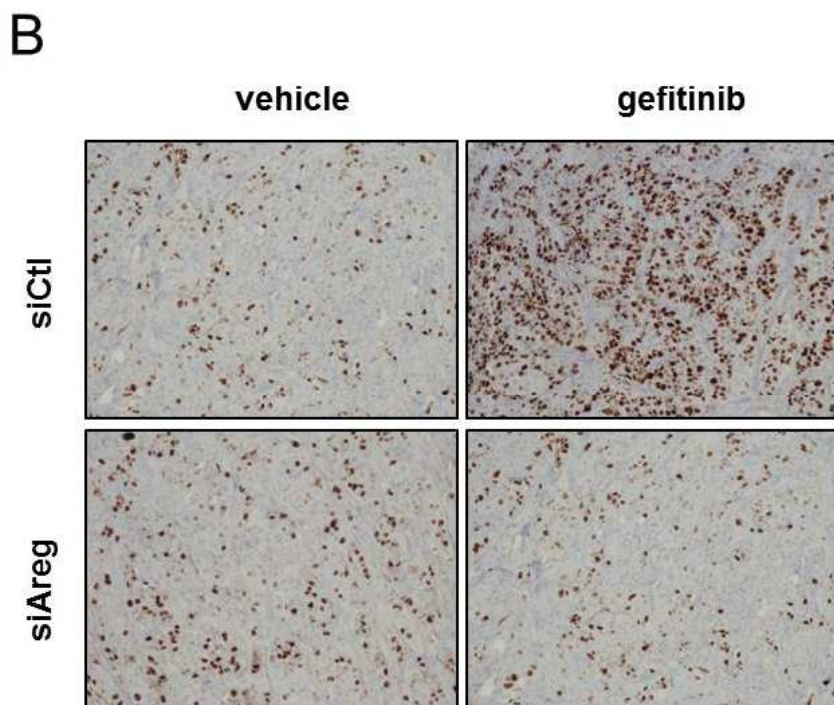
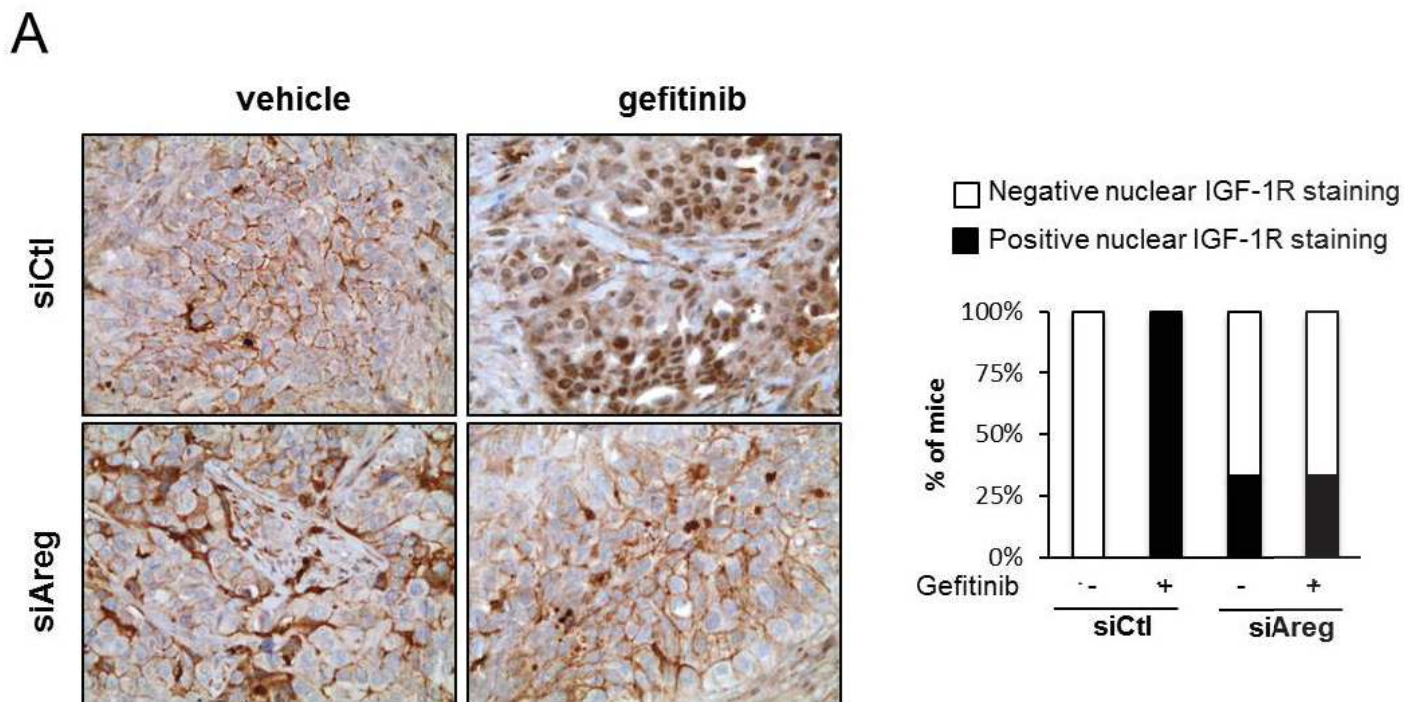
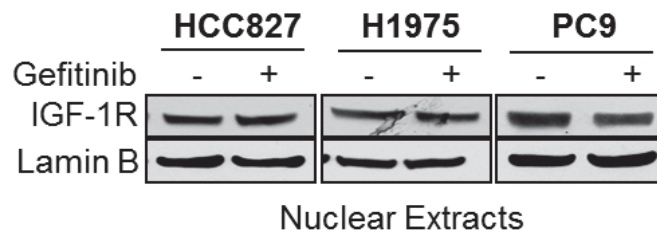


Figure 6

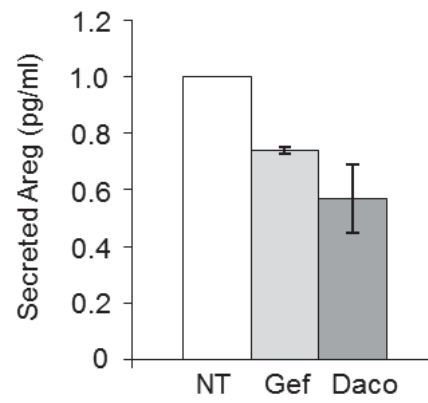


Supplementary Figure 1



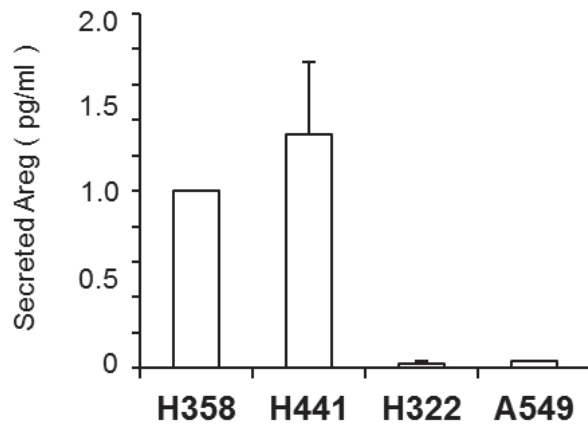
HCC827, H1975 and PC9 are lung adenocarcinoma cells lines with an activating mutation of EGFR. Cells were cultured or not with gefitinib (1 μ M) for 24 hours. Immunoblotting was performed on nuclear extracts. Lamin B was used as a loading control.

Supplementary Figure 2



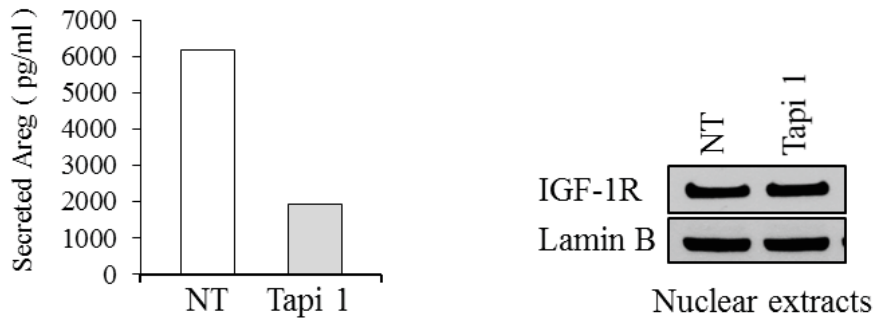
H441 cells were cultured with or without gefitinib or dacomitinib (1 μ M) for 24 hours. Culture media were collected and Areg dosage was performed using Elisa assay. Data represent the mean \pm s.d. of three independent experiments.

Supplementary Figure 3



Secreted Areg was measured in culture media of indicated cell lines using Elisa assays. Data represent the mean \pm s.d. of three independent experiments.

Supplementary Figure 4



H358 cells were incubated with Tapi 1 (10 μ M) for 24 hours. Secreted Areg was measured in culture media using Elisa assays. Expression of nuclear IGF-1R was studied by western blotting after cell fractionation.

Supplementary Table 1

Clinical and biological characteristics of patients	
	All patients (n=17) n (%)
Gender	
Female	8 (50%)
Male	8 (50%)
missing	1
Age, years	
< 70	12 (75%)
≥ 70	4 (25%)
missing	1
median (range)	65 (39-80)
Stage	
I-II	8 (50%)
III-IV	8 (50%)
missing	1
EGFR mutation	
Mutation	0 (0%)
No mutation	17 (100%)
KRAS mutation	
Mutation	6 (35%)
No mutation	11 (65%)

Résultats Complémentaires

Résultats complémentaires

Le mécanisme de transport nucléaire de l'IGF-1R dans notre modèle en réponse aux EGFR-TKI n'est pas totalement élucidé. Des études montrent l'implication de l'activité tyrosine kinase et de la sumoylation de l'IGF-1R dans son transport nucléaire (*Aleksic, 2010, Sehat, 2010*). Nous les avons étudiés dans le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI.

De plus, l'ensemble de nos résultats montre le rôle majeur joué par l'Areg dans l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib chez les adénocarcinomes mucineux. Nous nous sommes alors intéressés au rôle de l'Areg seule dans l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R.

Enfin, une part importante de mon travail de thèse a consisté à mettre au point une technique d'optogénétique dans le but ensuite de visualiser en temps réel le trafic intracellulaire de l'IGF-1R au sein de la cellule en réponse au gefitinib.

A. Le mécanisme du transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib

Les premières études sur le mécanisme de translocation nucléaire de l'IGF-1R montrent que ce transport est médié par la sumoylation du récepteur (*Sehat, 2010*) et est dépendante de l'activation par son ligand ce qui suggère que l'activité tyrosine kinase est nécessaire à sa translocation (*Aleksic, 2010*). Plus récemment, *Packham et al.* ont montré le rôle de p150^{Glued}, de l'importine β 1 et de RanBP2 dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R (*Packham, 2015*). Pour caractériser le mécanisme moléculaire mis en jeu dans le transport nucléaire de l'IGF-1R dans notre modèle d'étude, je me suis intéressée aux rôles que peuvent jouer l'activité tyrosine kinase et la sumoylation du récepteur dans la translocation de l'IGF-1R en réponse au gefitinib.

1. Le rôle de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R dans sa translocation nucléaire

Dans un premier temps, nous avons montré que le gefitinib induit à la fois la phosphorylation de l'IGF-1R et sa translocation nucléaire dans nos modèles cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire mucineux (cf. Figure 29A et B).

Pour étudier le rôle de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R (OSI-906 ou linsitinib). L'inhibition de la phosphorylation de l'IGF-1R est validée par western blot. Lorsque l'on traite nos cellules avec à la fois du gefitinib et de l'OSI-906, on observe une diminution de l'expression nucléaire de l'IGF-1R comparativement avec un traitement avec du gefitinib seul (cf. Figure 29C). Cette diminution est de l'ordre de 25 à 30% (cf. Figure 29D). Ainsi, l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R dépend partiellement de l'activité tyrosine kinase du récepteur.

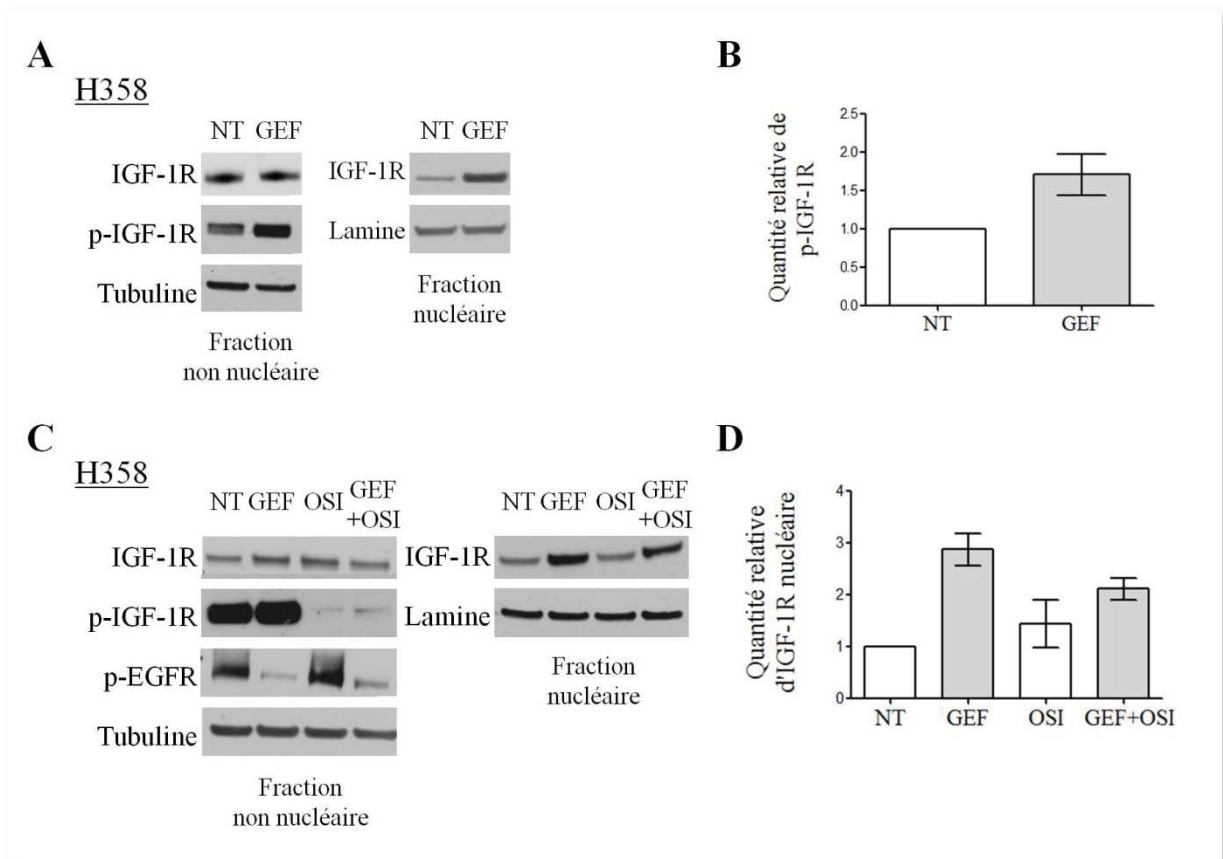


Figure 29 : L'accumulation nucléaire de l'IGF-1R dépend partiellement de son activité tyrosine kinase. A/B- Les cellules H358 sont traitées au gefitinib (1 μ M) pendant 96 heures. A- Après un fractionnement subcellulaire, l'expression protéique est étudiée par western blot. La tubuline et la lamine sont des marqueurs spécifiques, respectivement, de la fraction non nucléaire et de la fraction nucléaire. B- L'expression de p-IGF-1R est quantifiée par rapport à l'expression de la tubuline (n=3). C/D- Les cellules H358 sont traitées pendant 96 heures avec du gefitinib (1 μ M) et/ou de l'OSI-906 (1 μ M). (n=2). C- Après un fractionnement subcellulaire, l'expression protéique est étudiée par western blot. La tubuline et la lamine servent de contrôle de charge. D-L'expression nucléaire de l'IGF-1R est quantifiée par rapport à l'expression de la lamine.

2. La sumoylation

Outre la phosphorylation du récepteur, une autre modification post-traductionnelle peut être impliquée dans la translocation nucléaire du récepteur ; il s'agit de la SUMOylation. Elle consiste en l'addition d'un groupement SUMO (small-ubiquitin-like modifier) sur des résidus lysines d'une protéine cible. La liaison covalente entre le résidu SUMO et la protéine cible est formée à la suite d'une cascade protéique impliquant trois enzymes. L'enzyme E1 active SUMO et le transfère à l'enzyme Ubc9, seule enzyme E2 connue à l'heure actuelle pour la sumoylation. Puis, l'enzyme E3 ligase catalyse le transfert du groupement SUMO

d'Ubc9 à la protéine cible. Les enzymes E3 connues pour la sumoylation sont notamment la nucléoporine RanBP2, la famille PIAS (protein inhibitor of activated STAT) et la protéine Pc2 (polycomb 2). (Wilkinson, 2012)

Pour étudier l'hypothèse du rôle de la sumoylation dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R, nous avons étudié l'interaction entre IGF-1R et RanBP2 en réponse au gefitinib. Nos résultats d'immunoprécipitation nous indiquent qu'après 24 heures de traitement, il y a une augmentation importante de l'interaction entre IGF-1R et RanBP2 (cf. Figure 30A). En effet, la quantification relative indique qu'il y a deux fois et demie plus d'interaction entre IGF-1R et RanBP2 en réponse au gefitinib (cf. Figure 30B) ce qui veut dire que la sumoylation de l'IGF-1R joue un rôle dans la translocation du récepteur en réponse au gefitinib.

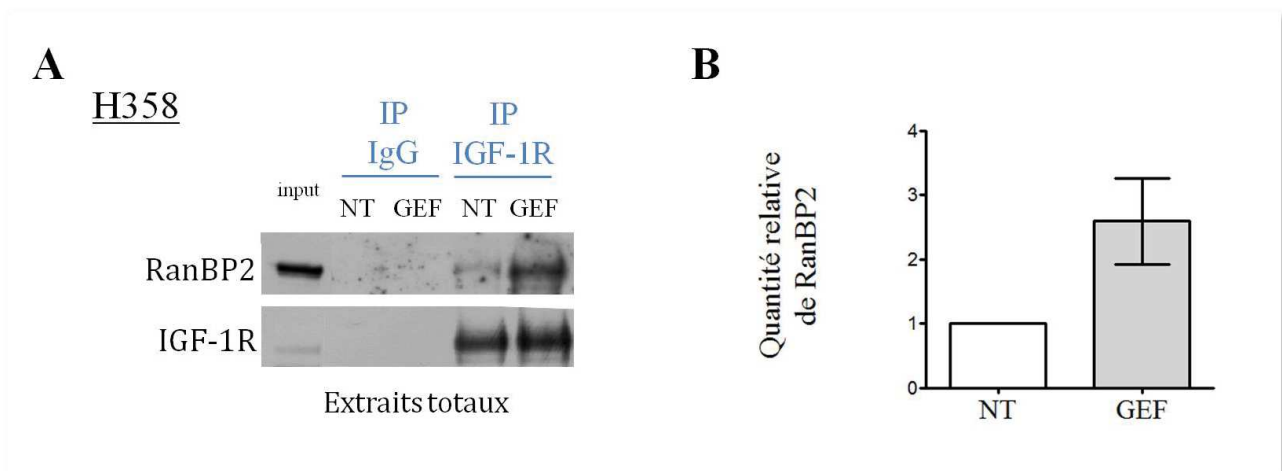


Figure 30 : La SUMOylation est impliquée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R.

A/B- Les cellules H358 sont traitées pendant 24 heures au gefitinib (1 μ M). A- L'étude de l'interaction entre l'IGF-1R et RanBP2 (niveaux endogènes) est réalisée par co-immunoprécipitation (extraits totaux), puis western blot. (n=2). B- L'expression de RanBP2 est quantifiée par rapport à l'expression de l'IGF-1R.

B. Le rôle de l'amphiréguline sécrétée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R

Le gefitinib induit la translocation nucléaire de l'IGF-1R dans les adénocarcinomes pulmonaires mucineux. Nous avons démontré le rôle important de l'Areg dans cette translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib. Or, les modèles d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux sécrètent de hauts niveaux d'Areg, contrairement aux non mucineux (cf. [Figure 31](#)). Nous avons donc voulu savoir si l'Areg seule pouvait être impliquée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R, indépendamment du gefitinib.

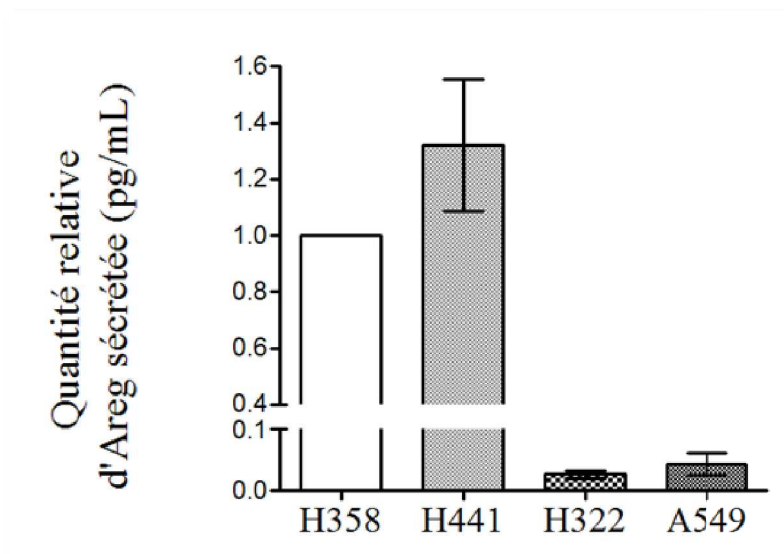


Figure 31 : Niveau d'expression d'Areg sécrétée dans différents modèles cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires.

Le niveau d'expression d'Areg sécrétée a été mesuré par dosage ELISA (Human Amphiregulin DuoSet ELISA, R&D systems) dans des modèles d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux (H358, H441) et non mucineux (H322, A549) (n=3).

1. L'Areg induit l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R

Afin d'étudier la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg, nous avons privé de sérum puis traité avec de l'Areg recombinant (50ng/mL) les cellules H358 et H322 à différents temps. L'Areg est un ligand spécifique de l'EGFR. Les résultats obtenus montrent que l'Areg active l'EGFR, mais également l'IGF-1R dans les deux modèles cellulaires (cf. Figure 32A et B). On observe une augmentation de l'expression nucléaire de l'IGF-1R, en réponse à l'Areg, uniquement dans les cellules mucineuses H358 (cf. Figure 32A). De plus, l'Areg induit l'accumulation nucléaire de l'EGFR dans les deux modèles cellulaires. Cette accumulation nucléaire de l'EGFR est transitoire et atteint un pic entre 5 et 15 minutes après le traitement selon les cellules (cf. Figure 32 A et B). Nous montrons donc ici que l'Areg seule est capable d'induire le transport nucléaire de l'IGF-1R.

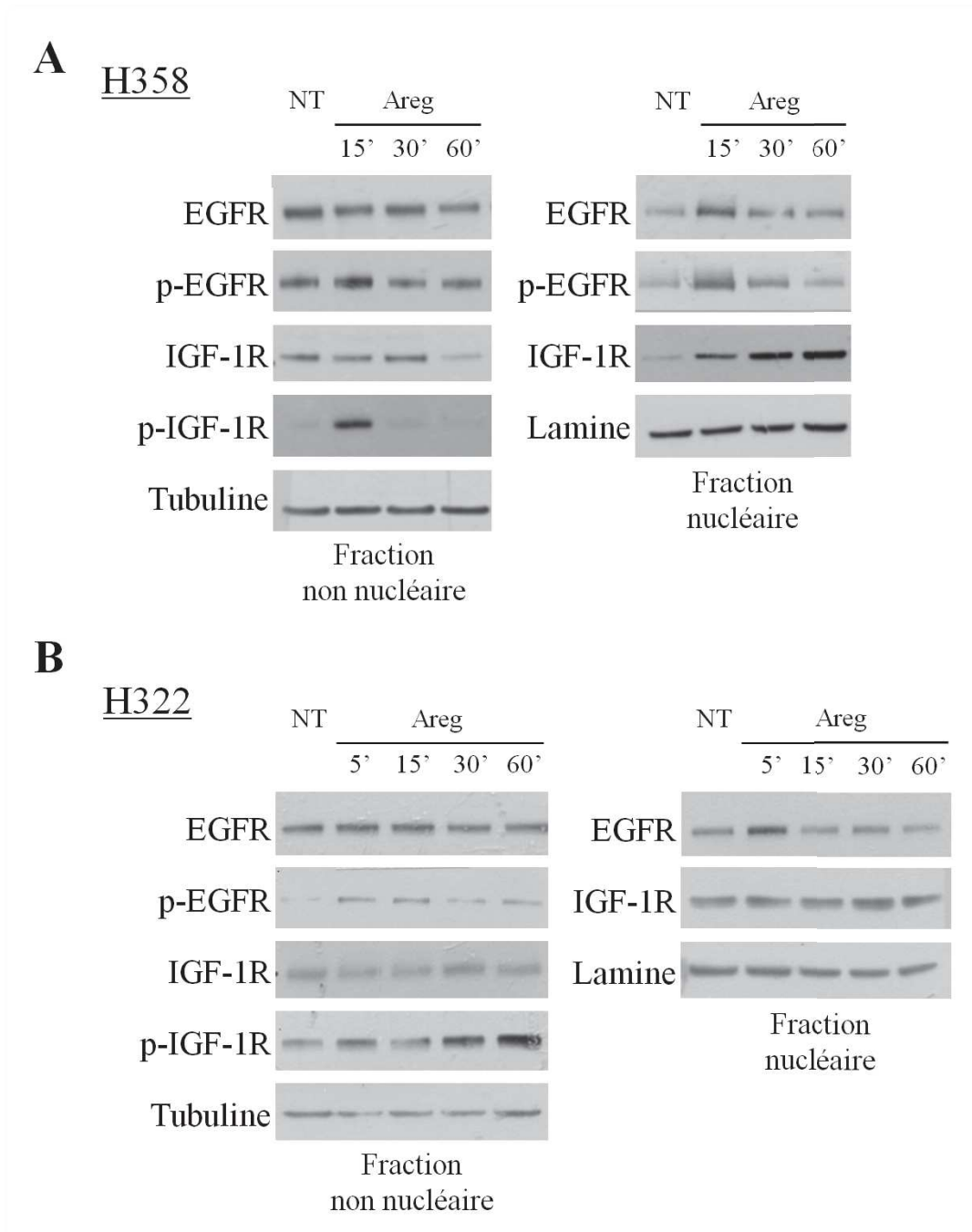


Figure 32 : L'Areg induit l'activation et l'accumulation nucléaire de l'EGFR et de l'IGF-1R. Les cellules H358 (A) ou H322 (B) sont privées de sérum pendant 24 heures puis traitées ou non à l'Areg (50ng/mL) selon les temps indiqués. (H358, n=3 ; H322, n=2). Après un fractionnement subcellulaire, les expressions de l'EGFR, de l'IGF-1R et de leurs formes phosphorylées sont étudiée par western blot. La tubuline et la lamine servent de contrôle de charge.

Nous pouvons voir ici qu'un traitement avec de l'Areg recombinant est également capable d'activer l'IGF-1R. Ainsi, plusieurs hypothèses peuvent être émises : (1) soit la fixation de l'Areg à l'EGFR induit la formation d'un hétérodimère EGFR/IGF-1R ce qui conduit à la phosphorylation de l'IGF-1R ; (2) soit la signalisation de l'EGFR active des mécanismes qui ont pour conséquence l'activation de l'IGF-1R (trans-activation) ; (3) soit l'Areg est également capable de se fixer à l'IGF-1R et de l'activer directement.

2. L'EGFR participe-t-il à la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg ?

1) L'Areg induit une interaction EGFR/IGF-1R

Pour tester l'hypothèse d'une hétérodimérisation EGFR/IGF-1R en réponse à l'Areg, nous avons privé de sérum les cellules H358 pendant 24 heures puis traité avec de l'Areg recombinant (50ng/mL) pendant 5, 15, 30 et 60 minutes. Les résultats de l'immunoprécipitation montrent qu'en réponse à l'Areg, l'EGFR et l'IGF-1R interagissent après 15 minutes de traitement pour atteindre un pic après 30 minutes de traitement (cf. [Figure 33A](#)). De manière intéressante, cette interaction s'accompagne d'une augmentation de l'expression nucléaire de l'IGF-1R (cf. [Figure 33B](#)). La stimulation par l'Areg induit dans les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux l'hétérodimérisation EGFR/IGF-1R et l'activation des récepteurs.

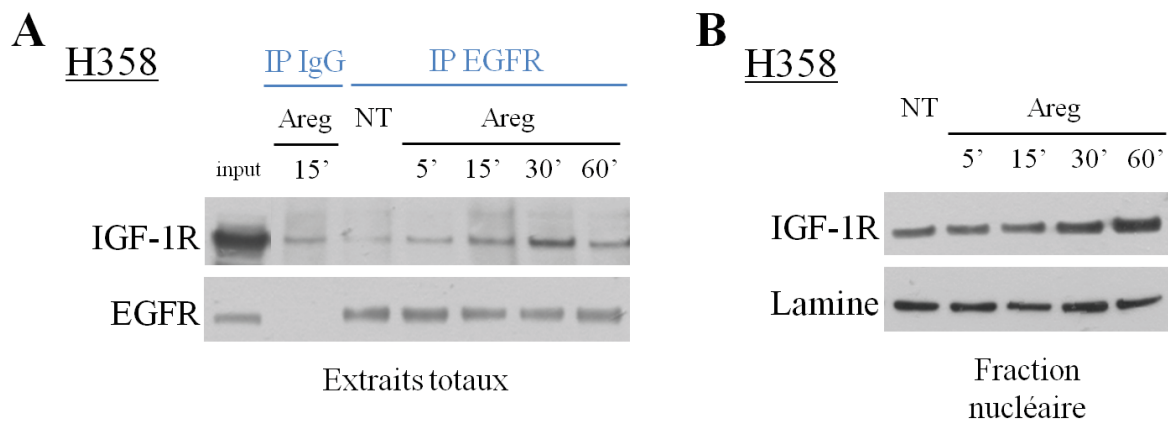


Figure 33 : L'EGFR et l'IGF-1R s'hétérodimérisent en réponse à l'Areg. A/B- Les cellules H358 sont privées de sérum pendant 24 heures puis traitées à l'Areg (50ng/mL) selon les temps indiqués. Une extraction protéique par un tampon de lyse RIPA est réalisée sur une partie des cellules et un fractionnement subcellulaire est réalisé sur l'autre partie des cellules. A- L'étude de l'interaction entre l'EGFR et l'IGF-1R (niveaux endogènes) est réalisée par co-immunoprécipitation (extraits totaux), puis western blot. B- L'expression protéique de l'IGF-1R nucléaire est étudiée par western blot.

2) L'EGFR n'est pas le partenaire du transport nucléaire de l'IGF-1R mais régule sa translocation en réponse à l'Areg

Contrairement à l'EGFR, l'IGF-1R ne possède pas de séquence NLS pour pouvoir interagir avec l'importine $\beta 1$ et être transporté jusqu'au noyau cellulaire. Ainsi, l'EGFR pourrait être un partenaire de l'IGF-1R et permettre le transport de l'IGF-1R vers le noyau cellulaire au travers de l'hétérodimérisation EGFR/IGF-1R.

Pour étudier la participation de l'EGFR dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg, nous avons transfecté nos cellules H358 et H441 avec des siARN dirigés contre EGFR pendant 48 heures, et après 24 heures de privation sérique, nous les avons traitées avec de l'Areg recombinant (50 ng/mL) pendant 1 heure. La neutralisation de l'EGFR a été contrôlée par western blot. En réponse à l'Areg après neutralisation de l'EGFR, on n'observe pas de diminution de l'expression nucléaire de l'IGF-1R mais plutôt une augmentation d'expression nucléaire (13% pour les H358 et 44% pour les H441) (cf. [Figure 34](#)). Ainsi, la neutralisation de l'EGFR n'empêche pas la translocation nucléaire de l'IGF-1R. Au contraire, nous montrons que l'EGFR inhibe la translocation nucléaire de l'IGF-1R. Cela

suggère que l'EGFR n'est pas le partenaire de l'IGF-1R. Par contre, il peut réguler le transport nucléaire de l'IGF-1R.

Par ailleurs, il est envisageable que la neutralisation de l'EGFR soit compensée par les autres membres de la famille HER. Ainsi, il faudrait pouvoir neutraliser l'ensemble des membres de la famille HER pour pouvoir valider l'hypothèse que ces récepteurs ne sont pas les partenaires de l'IGF-1R dans son transport nucléaire.

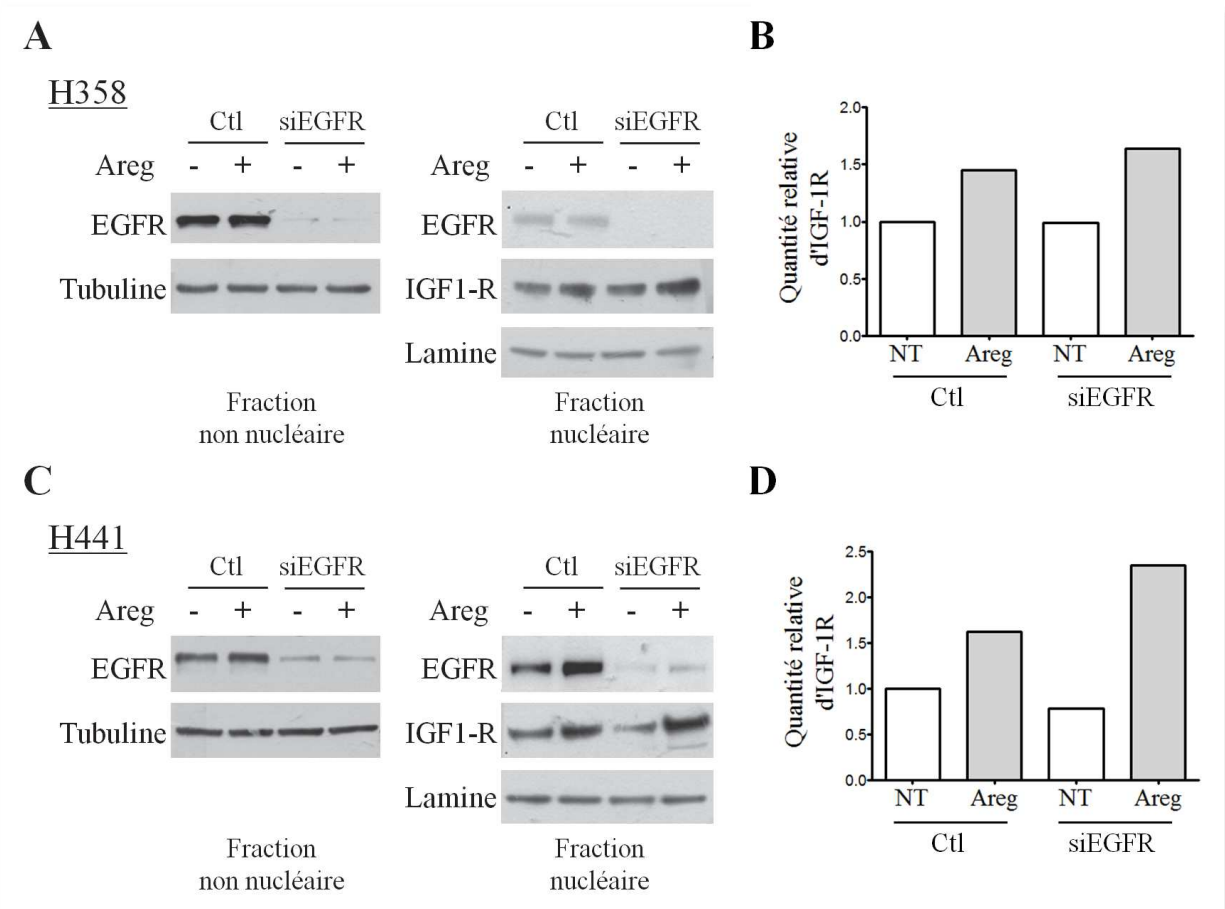


Figure 34 : L'EGFR régule la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg. Les cellules H358 (A/B) et H441 (C/D) sont transfectées avec des siARN dirigés contre EGFR pendant 72 heures, et après 24 heures de privation de sérum, elles sont traitées avec de l'Areg recombinant (50 ng/mL) pendant 1 heure (n=1). Après fractionnement subcellulaire, la neutralisation de l'EGFR et l'expression protéique de nos protéines d'intérêt ont été évaluées par western blot. B/D- L'expression d'IGF-1R est quantifiée par rapport à l'expression de la lamine.

3. Le mécanisme de translocation de l'IGF-1R en réponse à l'Areg implique la voie des MAPK et la sumoylation de l'IGF-1R

1) L'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg est dépendante de l'activation de ERK

Nous avons cherché à savoir si une voie de transduction du signal pouvait être impliquée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg. Pour cela, nous avons privé de sérum et traité les cellules H358 et H441 avec de l'Areg et analysés les voies de signalisation activées. Les résultats obtenus montrent que l'Areg active ERK et Akt et n'active pas Stat3 et PKC δ (cf. [Figure 35A](#) et [B](#)). Nous nous sommes donc demandé si l'activation de la voie des MAPK pouvait être impliquée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R. Pour cela, après privation sérique, nous avons traité nos cellules avec de l'Areg (50ng/mL) et/ou de l'U0126 (10 μ M), un inhibiteur pharmacologique de MEK1/2. L'inhibition de la voie des MAPK a été vérifiée par western blot. On observe, qu'en réponse à l'Areg, l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R est perdue quand on ajoute l'U0126 (cf. [Figure 35C](#)). L'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg pourrait donc dépendre de la voie des MAPK.

Le rôle de la voie PI3K/Akt dans le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg devra également être étudié.

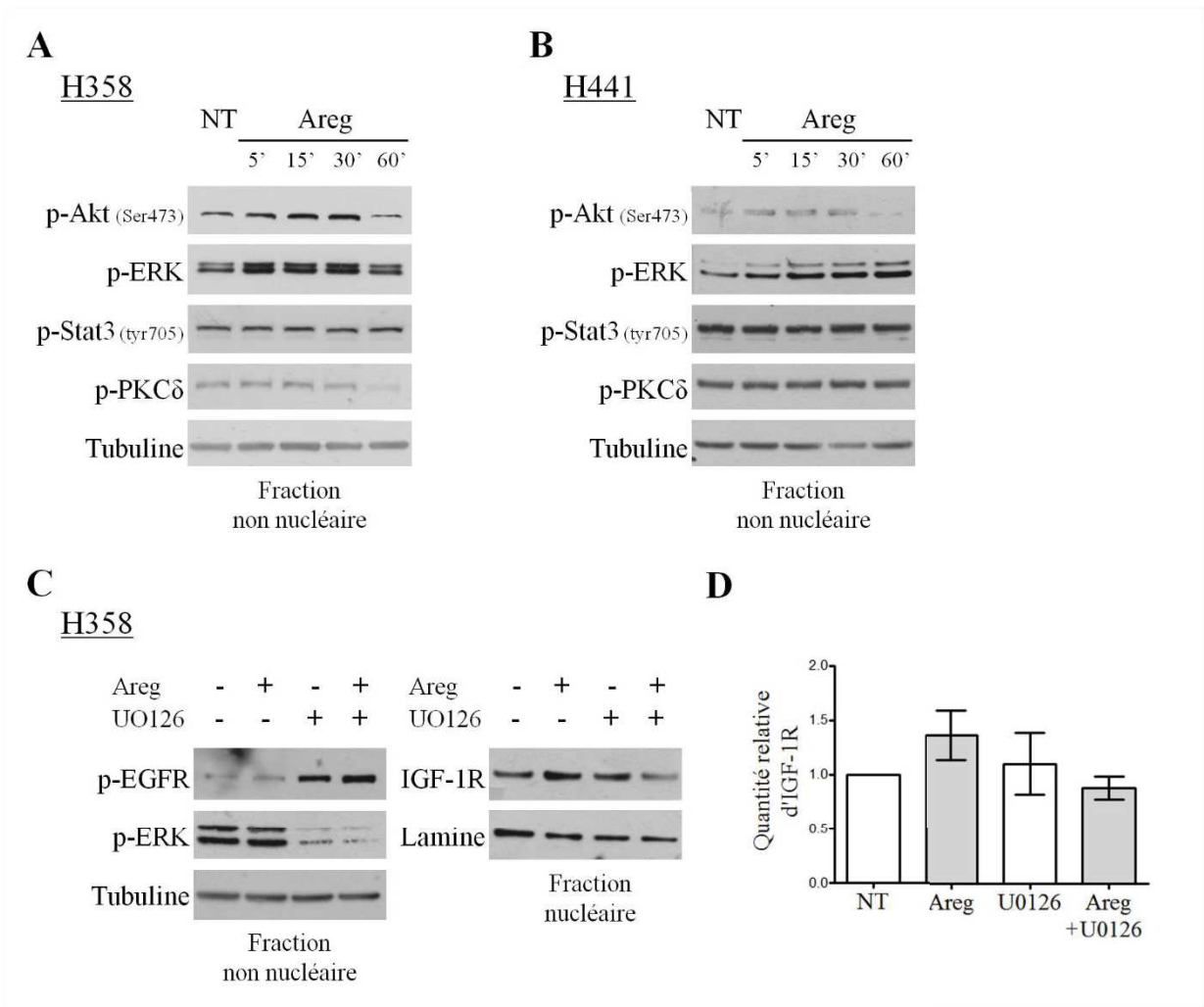


Figure 35 : L'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg est dépendante de l'activation de ERK. A/B- Les cellules H358 et H441 sont privées de sérum pendant 24 heures puis traitées avec de l'Areg (50ng/mL) pendant les temps indiqués. C/D- Les cellules H358 sont privées de sérum, puis traitées ou non avec de l'U0126 (10µM) pendant 1 heure puis avec ou non de l'Areg (50ng/mL) pendant encore 1 heure (n=2). A/B/C- Après un fractionnement subcellulaire, l'inhibition de p-ERK et l'expression de nos protéines d'intérêt sont évaluées par western blot. D- L'expression d'IGF-1R est quantifiée par rapport à l'expression de la lamine.

2) L'Areg induit la SUMOylation de l'IGF-1R

Nous voulons savoir si dans notre modèle la sumoylation du récepteur est impliquée dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg. Les cellules H358 et H441 sont transfectées par un vecteur His-SUMO, puis 24 heures après les cellules sont privées de sérum pendant 24 heures et traitées à l'Areg (50ng/mL) pendant 1 heure. Grâce à des billes de nickel/agarose (Ni-NTA agarose, Quiagen), toutes les protéines tagguées "His-SUMO" sont retenues. L'expression protéique de l'IGF-1R est étudiée par western blot. Les résultats

obtenus montrent plusieurs bandes avec des poids moléculaires d'environ 112, 125 et 145kDa ce qui correspond à des protéines IGF-1R β mono-, di- ou tri-sumoylées (cf. [Figure 36](#)). Les bandes à 112 et 125kDa sont plus difficiles à détecter ce qui peut être expliqué par le fait que les protéines sumoylées se désomoylent très rapidement. Comme dans la littérature (*Sehat, 2010*), on détecte l'IGF-1R non sumoylé (bande à 95kDa) sans que cela puisse être expliqué. Nos résultats montrent que l'Areg induit la sumoylation de l'IGF-1R.

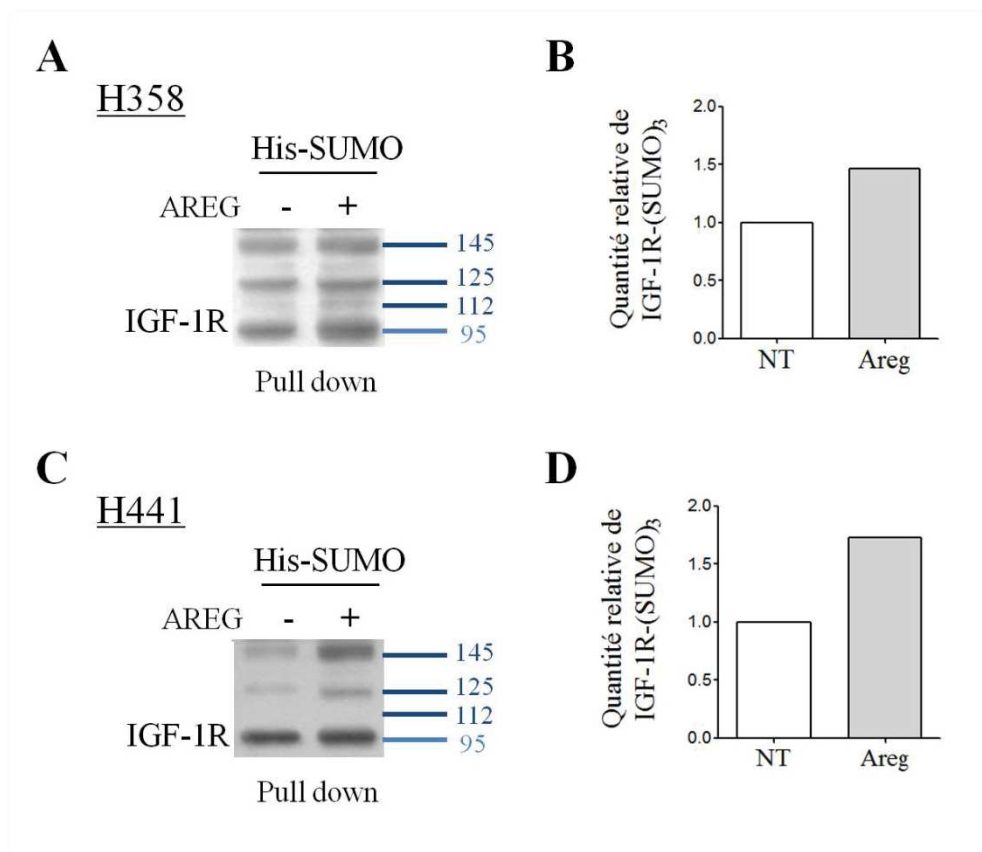


Figure 36 : L'Areg induit la SUMOylation de l'IGF-1R. Les cellules H358 (A/B) et H441 (C/D) sont transfectées par un vecteur His-SUMO, puis 24 heures après les cellules sont privées de sérum pendant 24 heures et traitées à l'Areg (50ng/mL) pendant 1 heure. A/C- Une pull-down est réalisée sur un nombre de cellules identique pour chaque condition et l'expression des protéines retenues par les billes de nickel-agarose sont étudiées par western blot. B/D- L'IGF-1R tri-sumoylé est quantifié par ImageJ.

C. L'Optogénétique

L'Optogénétique combine l'optique et la génétique. Cette technique, élue méthode de l'année 2010 par le journal *Nature Methods* (*Nature Methods*, 8(1), janvier 2011), est une technique biologique qui utilise la lumière pour suivre et/ou contrôler des événements dans des cellules vivantes qui ont été génétiquement modifiées. Ces cellules ont été modifiées dans le but d'exprimer des molécules sensibles à la lumière dites "photo-activables".

Pour pouvoir visualiser et/ou contrôler des événements dans des modèles cellulaires vivants, l'optogénétique requiert quatre étapes : (1) développer des vecteurs d'expression de protéines photosensibles, (2) développer des stratégies pour délivrer l'ADN codant pour ces protéines aux cellules d'intérêt, (3) ajuster l'activation lumineuse de ces protéines cibles à la zone cellulaire d'intérêt et (4) visualiser et mesurer les modifications des protéines cibles dans les cellules (*Pastrana, 2011*).

1. Nos objectifs de travail

Dans un premier temps, nous validerons l'utilisation de l'optogénétique pour la visualisation du trafic intracellulaire des RTK exprimés à la membrane plasmique. Pour cela, nous avons utilisé le système EGF/EGFR car son transport nucléaire est très bien décrit dans la littérature scientifique et car les précédents travaux de l'équipe démontrent le trafic nucléaire de l'EGFR en réponse à l'EGF dans nos modèles cellulaires.

Dans un second temps, nous utiliserons cette technique pour visualiser le transport nucléaire de l'IGF-1R dans notre modèle cellulaire en réponse au gefitinib et à l'Areg. Cela nous permettra de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R. Au cours de la validation de l'utilisation de l'optogénétique, nous avons eu à faire face à de nombreux problèmes techniques qui ont nécessité de nombreuses mises au point. A l'heure actuelle, nous n'avons pas résolu tous ces problèmes techniques ce qui ne nous a pas permis de répondre à notre second objectif.

2. Matériel & méthodes

1) La station d'Optogénétique BiFocale Rapide

Nous avons utilisé la **station OBFR** (optogénétique bifocale rapide) récemment acquise par la plateforme de microscopie de notre institut. Cette station a été développée dans le but d'observer des changements dynamiques dans des cellules normales, tumorales et traitées ou non avec des drogues (anti-mitotiques, EGFR-TKI...).

La station est notamment composée d'un banc laser et d'un système confocal à "spinning disk" avec un TIRF azimutal permettant une très grande flexibilité dans le contrôle rapide de la puissance et du choix de la longueur d'onde (cf. [Figure 37A](#)).

Le **système confocal** permet de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400nm) appelées "sections optiques" (**z-stack**) grâce au spinning disk. Un **spinning disk** est un disque constitué de petits trous (pinholes) (cf. [Figure 37B](#)) qui permet de diviser l'illumination de l'échantillon en plusieurs centaines de points et ainsi conduire à une excitation à un niveau de lumière relativement bas. Il a pour avantage une grande vitesse d'acquisition et permet de limiter la photo-toxicité des lasers sur les cellules. Le **TIRF** (total internal reflection fluorescence) ou fluorescence par réflexion totale permet une excitation localisée des fluorophores. Contrairement à l'épifluorescence où le faisceau incident arrive perpendiculairement à la lamelle, dans le cas d'une excitation TIRF, le faisceau arrive avec un angle précis (cf. [Figure 37C](#)). Cela permet au rayon incident (excitateur) d'être totalement réfléchi par la lamelle. Seule une onde évanescente permet d'exciter les fluorophores à l'interface lamelle/échantillon (<100nm de hauteur). Cette technique de microscopie permet ainsi l'étude de phénomènes proches de la membrane plasmique comme par exemple l'analyse de la distribution ou de la dynamique de molécules.

La station OBFR, unique en France, permet une observation 3D à haute fréquence temporelle et une modulation de différentes activités biologiques, en temps réel, sur cellule unique et en contrôlant parfaitement l'environnement physico-chimique des cellules (température, pCO₂, humidité...).

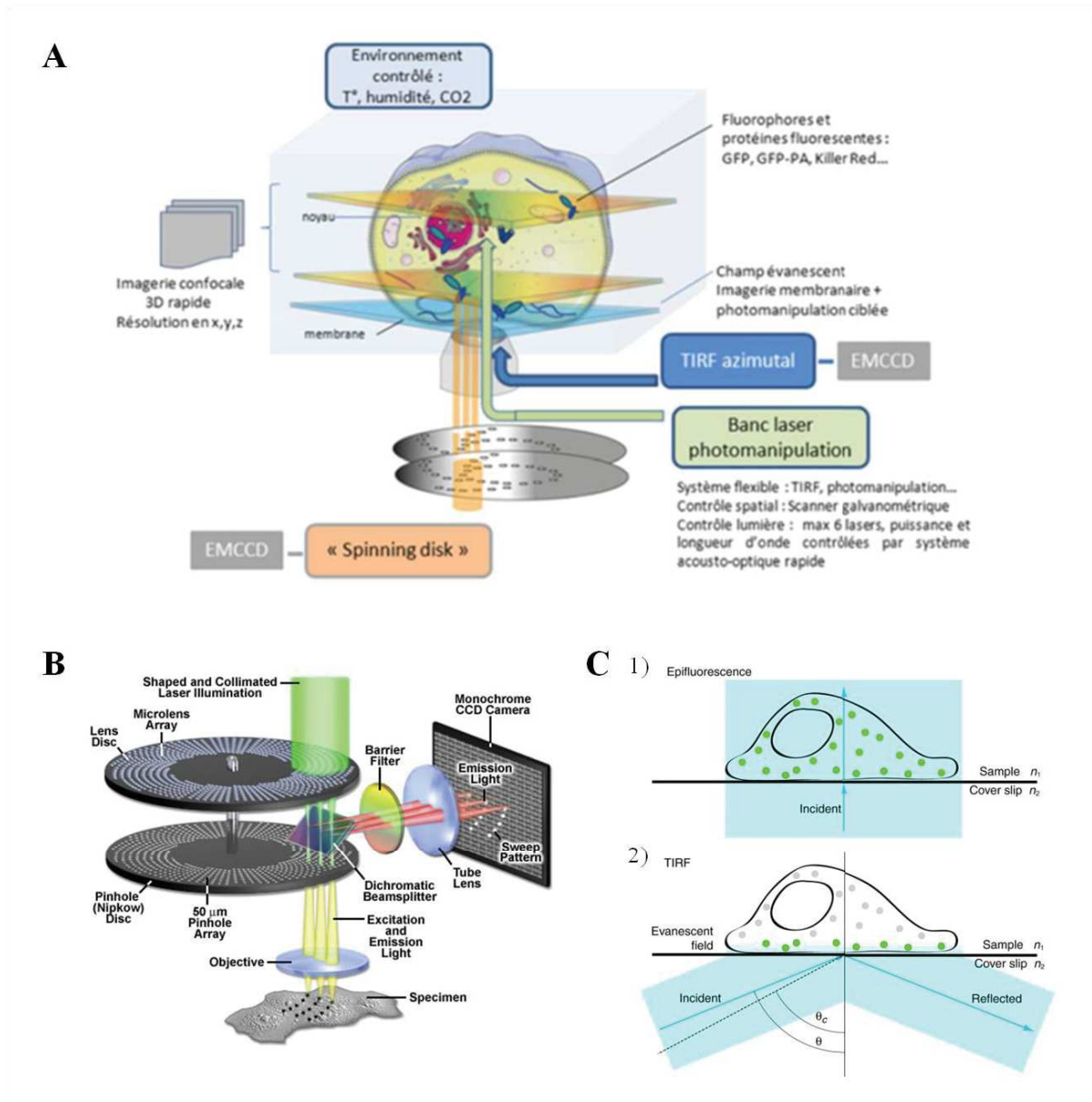


Figure 37 : La station OBFR. A- Schéma de la station d'optogénétique bifocale rapide (OBFR) de l'institut Albert Bonniot. La station est notamment composée d'un banc laser composés de six lasers (405, 445, 473, 488, 561, 640nm) et d'un système confocal "spinning disk" avec un TIRF azimutal B- Schéma d'un spinning disk (Zeiss microscopy). C- Les bases physiques de l'épifluorescence et du TIRF. (1) L'épifluorescence conduit à l'activité des fluorophores de tout l'échantillon. Le rayon incident est perpendiculaire au plan de la lamelle/échantillon (cover slip/sample). (2) Dans le cas du TIRF, le faisceau d'excitation arrive avec un angle critique θ_c . Le rayon est réfléchi par l'interface lamelle/échantillon et un champ évanescent est généré dans l'échantillon. (Mattheyses, 2010)

2) Les vecteurs d'expression

La construction de protéines photosensibles est la première étape de l'optogénétique. Ainsi, nous avons généré des plasmides exprimant un EGFR photoactivables et pour cela, nous avons fusionné l'EGFR soit à un tag PA-GFP (photo-activable-green fluorescent protein), soit à un tag mEOS. Nous avons donc réalisé les constructions suivantes : EGFR-PA-GFP, EGFR-mEOS (cf. [Figure 38](#)).

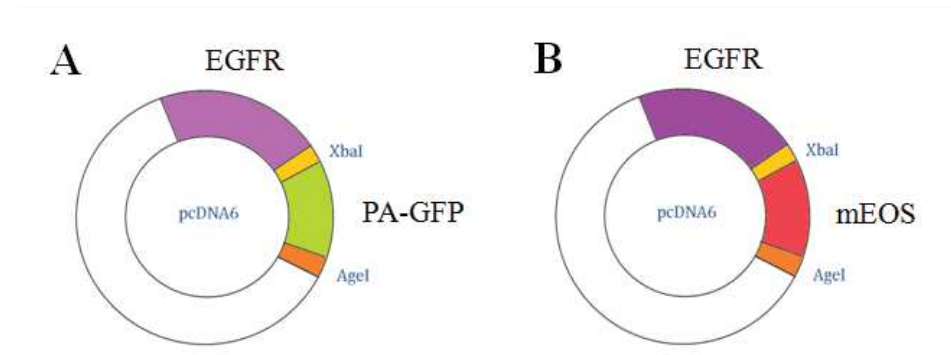


Figure 38 : Les plasmides exprimant la protéine d'intérêt EGFR couplée aux fluorophores PA-GFP et mEOS : A- EGFR-PA-GFP. B-EGFR-mEOS.

La **PA-GFP** n'est pas ou très peu fluorescente avant qu'elle ne soit exposée à des rayonnements violets/ultra-violets intenses (laser 405nm) ce qui la rend difficile à détecter dans sa forme non-activée. Une fois activée la PA-GFP émet dans le vert ; on parle de photo-activation (cf. [Figure 39A](#)). A l'inverse, **mEOS** émet dans le vert lorsqu'elle est sous sa forme inactive. Une fois activée par les rayonnements violets, elle émet dans le rouge ; on parle alors de photo-conversion. (cf. [Figure 39B](#))

L'activation de ces fluorophores peut être contrôlée spatialement grâce au TIRF ou au FRAP (fluorescence recovery after photo-bleaching) de façon très précise ce qui permet d'activer une zone particulière et choisie de la cellule. Par exemple, dans le cas du TIRF, les molécules situées à la membrane plasmique en contact avec la lamelle pourront être activées de façon spécifique.

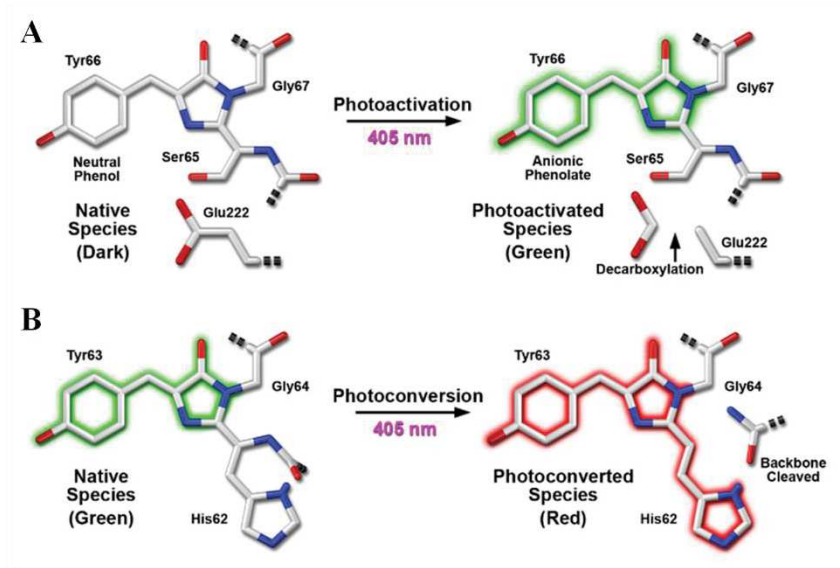


Figure 39 : Photo-activation et photo-conversion de molécules photoactivables. A- La photo-activation de la PA-GFP est certainement due à la décarboxylation de la glutamine Glu222 ce qui permet la conversion d'un état neutre à un état anionique du fluorophore. B- La photo-conversion du vert en rouge de mEOS est due au clivage entre l'amide et le carbone α du résidu histidine His62 suivie par l'oxydation de l'His62. (Shaner, 2007)

Pour réaliser les vecteurs d'expression EGFR taggués PA-GFP et mEOS, nous avons à notre disposition un plasmide pcDNA6-EGFR (8700pb). Les inserts PA-GFP (720pb) et mEOS (681pb) ont été amplifiés par PCR grâce à des amorces contenant les sites de restriction XbaI et AgeI. Après digestion et purification des produits PCR, le vecteur et l'insert sont ligués et transformés pour obtenir nos vecteurs exprimant les protéines de fusion EGFR-PA-GFP et EGFR-mEOS.

3) Les supports cellulaires

Une fois un vecteur d'expression synthétisé et validé, nous avons commencé les mises au point sur le microscope. Pour pouvoir réaliser des images en microscopie confocale, il est nécessaire d'utiliser des lamelles en verre car les supports plastiques causent de l'auto-fluorescence. Nous avons doncensemencé nos cellules H358 sur des labteks en verre. Cependant, nous avons constaté que les cellules H358 transfectées se décollaient de leur support ce qui rendait très compliquée l'acquisition d'images au microscope. Pour pallier à ce problème, nous avons décidé d'utiliser un "coating" à base de fibronectine et de poly-lysine

pour améliorer l'adhérence de nos cellules au support en verre. Cette solution n'a pas permis d'améliorer l'adhérence et l'étalement des cellules H358.

Les cellules H358 ayant des difficultés à s'étaler sur les lamelles en verre et étant trop fragilisées par les transfections transitoires, nous avons donc changé le support. En remplacement des supports en verre, nous avons utilisé des lamelles IbiDi® (μ -slide 4 well, IbiTreat). Ces lamelles en plastique biocompatible possèdent un revêtement IbiTreat qui permet une adhérence optimale des cellules. D'autre part, l'indice de réfraction de ce plastique est quasi-similaire à celui du verre ce qui assure une excellente qualité optique pour l'imagerie de haute résolution comme dans notre cas. Ces lamelles ont permis d'améliorer de manière significative l'adhérence de nos cellules H358.

4) Les clones stables

Nous avons établi des clones stables afin d'éviter de fragiliser l'adhérence de nos cellules sur les supports par des transfections transitoires. Nous voulions que nos clones stables expriment à la fois l'EGFR-PA-GFP et l'H2A-RFP. Le vecteur d'expression H2A-RFP permet l'expression d'une histone H2A. La fluorescence de cette protéine émet dans le rouge (RFP, red fluorescent protein). Elle devait nous permettre (1) de discerner nos cellules au microscope et (2) de marquer le noyau de nos cellules. Pour établir ces clones (doublement stables), nous avons transfecté les cellules H358 avec le premier vecteur d'expression, l'EGFR-PA-GFP. Après sélection avec de la blasticidine, nous avons obtenu plusieurs clones exprimant l'EGFR-PA-GFP (**H358-EGFR-PA-GFP**). Pour la seconde sélection clonale, nous avons procédé de la même façon. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir de clones stables. La transfection du plasmide a fonctionné puisque, juste après la transfection, les cellules présentent un marquage rouge au microscope. Mais, cette fluorescence disparaît avec les passages ce qui suggère que l'ADN n'a pas été intégré au génome des cellules transfectées. Ceci peut être dû au fait que les deux vecteurs d'expression ont le même promoteur (pCMV).

Par la suite, nous avons ensemencé nos cellules H358 exprimant de façon stable l'EGFR-PA-GFP sur des lamelles IbiTreat et pour réussir à marquer le noyau de nos cellules, nous avons utilisé le colorant cellulaire NucRed (NucRed[®] Live 647 ReadyProbes[®] Reagent, Thermofischer). Il permet de réaliser un marquage nucléaire dans des cellules vivantes ou fixées et sa fluorescence émet dans le rouge. De plus, nous utilisons un milieu de culture RPMI sans rouge de phénol pour éviter toute auto-fluorescence due à ce composé.

3. Résultats

1) Construction des vecteurs d'expression et validation de la fonctionnalité des protéines

Nous avons obtenu les vecteurs d'expression l'EGFR-PA-GFP et l'EGFR-mEOS. Afin de valider la fonctionnalité de ces vecteurs d'expression, nous avons transfecté nos cellules H358 avec les vecteurs pcDNA6, EGFR-PA-GFP et EGFR-mEOS. L'étude de l'expression de l'EGFR par western blot nous montre que les cellules transfectées avec l'EGFR-PA-GFP

(sur-)expriment l'EGFR et la GFP contrairement aux cellules transfectées avec l'EGFR-mEOS qui ne surexpriment pas l'EGFR (cf. [Figure 40A](#)). Il semble donc que la modification mEOS empêche l'expression de l'EGFR. Ceci pourrait être dû à une modification de la conformation 3D de la protéine qui rend ainsi le récepteur non fonctionnel. Pour pallier à ce problème, on pourrait réaliser une construction similaire en plaçant cette fois-ci mEOS en N-terminal de l'EGFR.

Ensuite, afin de valider la fonctionnalité de la protéine EGFR synthétisée, nous avons transfecté nos cellules avec l'EGFR-PA-GFP, puis après 24 heures de privation sérique, nous avons traité nos cellules avec de l'EGF pendant 15 minutes. Nous observons qu'en réponse à l'EGF, il y a plus d'EGFR phosphorylé (p-EGFR Y1068) (cf. [Figure 40B](#)). Ainsi, les ligands activent l'EGFR-PA-GFP ce qui indique que la protéine EGFR synthétisée est fonctionnelle.

Enfin, nous avons ensuite voulu vérifier que la modification PA-GFP n'empêchait pas le transport de l'EGFR vers le noyau en réponse à l'EGF dans nos modèles cellulaires. Nous avons transfecté nos cellules H358 avec soit un vecteur d'expression pcDNA6, soit le vecteur exprimant l'EGFR-PA-GFP. Après fractionnement subcellulaire, on observe, dans la fraction nucléaire, que les cellules transfectées par l'EGFR-PA-GFP (sur-)expriment l'EGFR

nucléaire ce qui nous indique que l'EGFR-PA-GFP peut subir une translocation nucléaire (cf. [Figure 40C](#)).

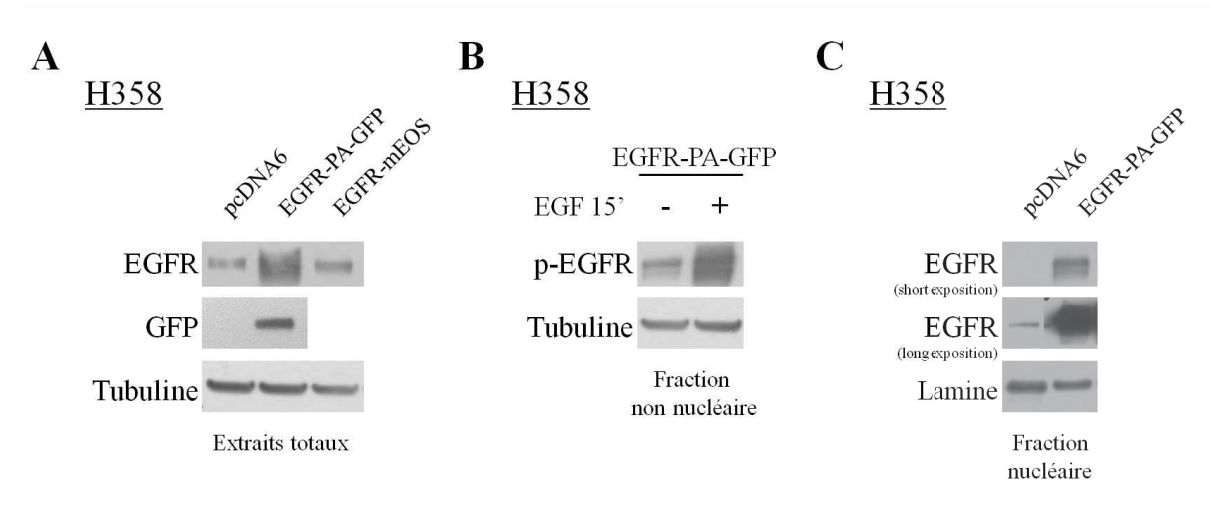


Figure 40 : La modification de l'EGFR n'empêche pas sa phosphorylation et son transport nucléaire. A- Les cellules H358 sont transfectées par différents vecteurs et des extraits totaux sont réalisés. B- Les cellules H358 sont transfectées par le plasmide EGFR-PA-GFP pendant 24 heures, puis après une privation de 24 heures, elles sont traitées à l'EGF pendant 15 minutes. On réalise un fractionnement subcellulaire. C- Les cellules H358 sont transfectées par différents vecteurs et un fractionnement subcellulaire est réalisé. A/B/C- L'expression protéique est étudiée par western blot.

Tous ces résultats nous montrent donc que l'EGFR-PA-GFP s'exprime, est activable par ses ligands et est transporté jusqu'au noyau malgré la modification PA-GFP en C-terminal du récepteur.

2) La PA-GFP est-elle activable par le laser 405nm ?

L'étape suivante a été de vérifier que la PA-GFP est activable par le laser 405nm dans les cellules. Nos résultats montrent qu'avant l'activation du fluorophore, il y a très peu de fluorescence dans le canal vert (EGFR). Cette légère fluorescence peut être expliquée par le fait que la modification de la GFP en PA-GFP ne permet pas une extinction totale de son émission de fluorescence et à une fuite optique due à l'utilisation de plusieurs fluorochromes simultanément. Lorsqu'on irradie nos cellules avec la lumière violette (laser 405nm, 1 seconde), on peut voir l'apparition d'un marquage vert intense. L'intensité de fluorescence de l'EGFR est très marquée au niveau de la membrane plasmique, indiquant que l'EGFR y est majoritairement présent, et plus diffus à l'intérieur des cellules. (cf. [Figure 41](#))

Nous validons donc que la PA-GFP est fonctionnelle c'est-à-dire qu'elle n'est pas ou peu fluorescente avant son activation par un rayonnement violet et qu'après cette activation, elle émet de la fluorescence.

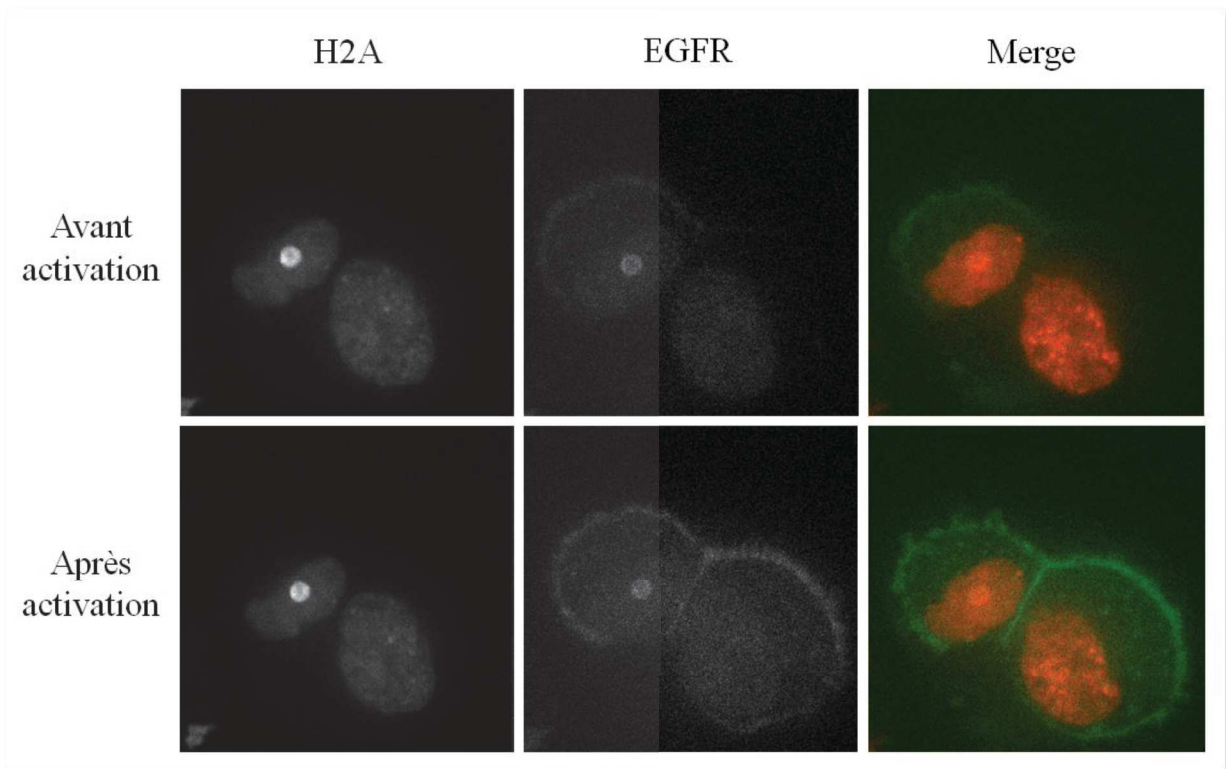


Figure 41 : L'illumination des cellules H358 par le laser 405 nm active l'EGFR-PA-GFP. Les cellules H358 ont été transfectées par les vecteurs H2A-RFP et EGFR-PA-GFP pendant 24 heures sur labtek. Les images ont été acquises sur la station OBFR. Le marquage rouge représente l'histone H2A et le marquage vert représente l'EGFR. L'activation a été réalisée par une excitation de 1 seconde avec le laser 405nm.

3) L'activation de l'EGFR-PA-GFP peut-elle être localisée ?

Ensuite, nous avons vérifié que l'activation de l'EGFR-PA-GFP pouvait être focalisée à une sous partie de la cellule. Pour cela, nous avons transfecté des cellules H358 pendant 24 heures puis, au microscope, nous avons activé une zone précise de notre cellule (sur toute sa hauteur) à l'aide d'un flash lumineux obtenu en exposant très brièvement cette zone avec le laser 405nm. Nos résultats montrent qu'avant activation, il y a très peu de fluorescence dans notre cellule. Après activation, on observe une augmentation très importante de la fluorescence dans la zone activée (cf. [Figure 42A](#)), comme le montre les spectres d'émission (cf. [Figure 42B](#)), alors que le reste de la cellule n'émet aucune fluorescence. Ceci indique donc que seules les molécules EGFR-PA-GFP situées dans la zone choisie et illuminée par le laser 405nm ont été activées ce qui valide que l'activation peut être localisée.

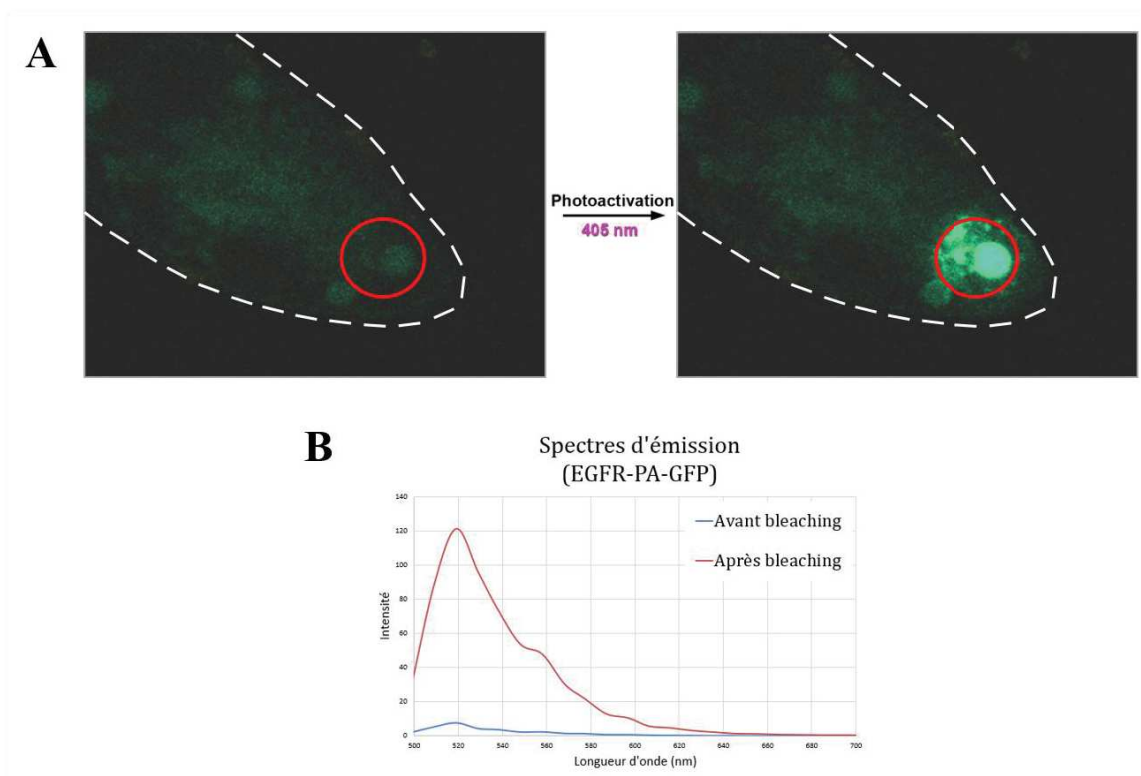


Figure 42 : Le laser 405nm active localement dans le volume de la cellule l'EGFR-PA-GFP. A- Les cellules H358 sont transfectées par l'EGFR-PA-GFP pendant 24 heures. Une partie de la cellule est activée par FRAP à 405nm. Les pointillés blancs délimitent les contours de la cellule et le cercle rouge indique la localisation de l'activation. Le marquage vert représente l'EGFR. B- Un spectre d'émission avant et après activation est réalisé.

Afin d'activer les molécules EGFR-PA-GFP localement à la membrane plasmique, nous avons utilisé le TIRF qui permet de n'exciter que les molécules situées à la jonction entre la lamelle et la membrane plasmique (<100nm de hauteur).

Nos résultats montrent qu'après l'activation par le TIRF :

- Au niveau de la membrane plasmique, après activation par le TIRF 405nm, on observe un haut niveau de fluorescence dans le canal vert (EGFR) et pas du tout de fluorescence dans le canal rouge (H2A) (cf. [Figure 43A](#)). Ceci indique que les molécules EGFR-PA-GFP à la membrane plasmique sont bien activées par le TIRF 405nm. On ne voit pas de fluorescence rouge car notre coupe optique ne traverse pas le noyau.
- Au milieu de la cellule, on observe une fluorescence importante dans le canal rouge ce qui traduit que nous sommes au niveau du noyau. Quant à la fluorescence verte, elle est très faible (cf. [Figure 43B](#)) ce qui peut traduire une diffusion rapide des molécules après leur activation depuis la membrane plasmique vers les plans supérieurs de la cellule.
- En haut de la cellule, donc dans le plan le plus éloigné du plan d'activation, on n'observe qu'une fluorescence dans le canal rouge (cf. [Figure 43C](#)). Aucune molécule d'EGFR-PA-GFP n'est activée.

Ces résultats montrent que l'activation de l'EGFR-PA-GFP par le mode TIRF fonctionne et est localisée à une zone très restreinte.

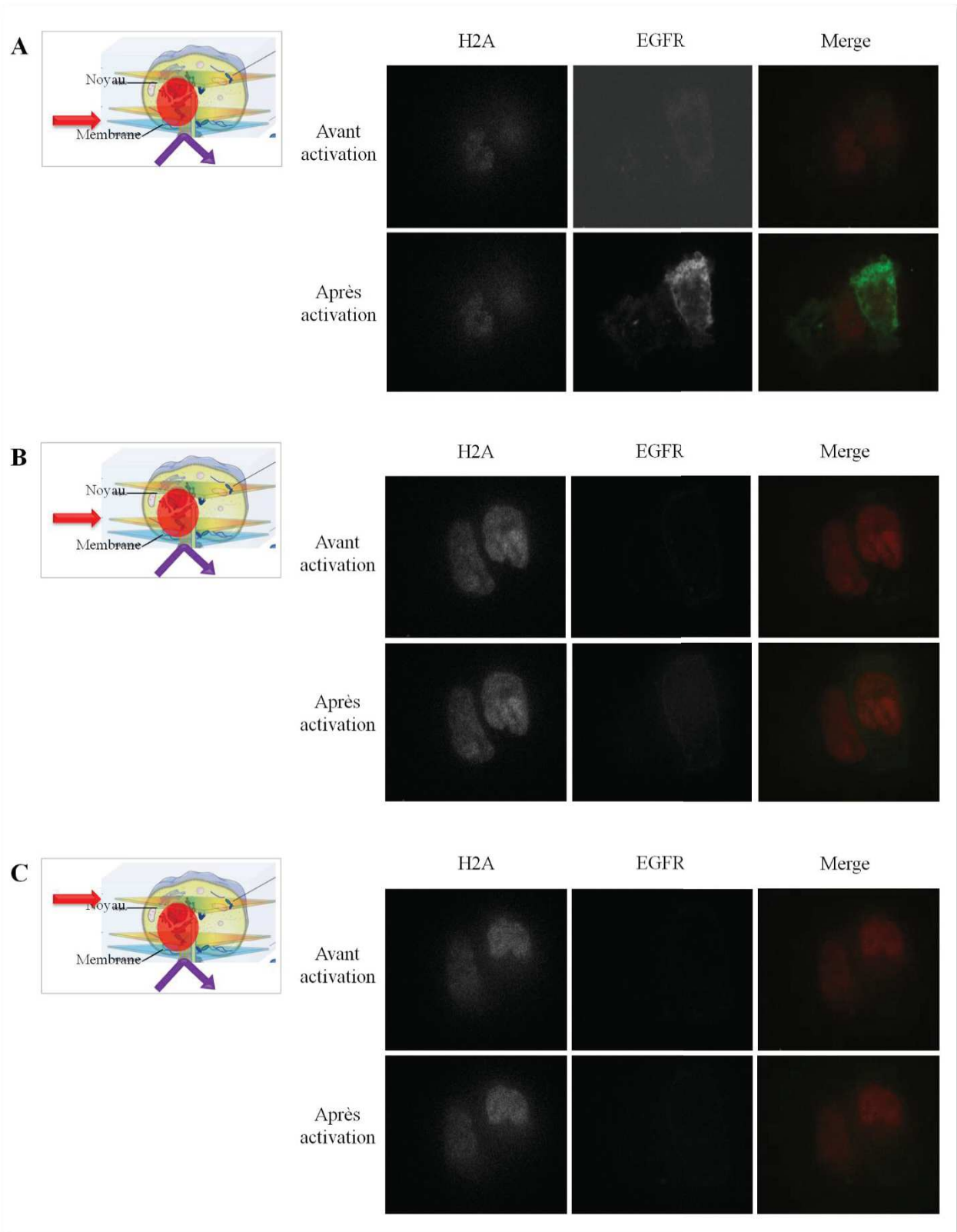


Figure 43 : Le mode TIRF 405nm active localement l'EGFR-PA-GFP. A/B/C- Les cellules H358 sont transfectées par l'EGFR-PA-GFP et l'H2A-RFP pendant 24 heures. Le protocole d'imagerie est le suivant : (1) un z-stack avant activation, (2) activation en mode TIRF à 405nm, (3) un z-stack après activation. Les z-stack permettent de réaliser des coupes optiques fines ainsi il est possible de visualiser coupe par coupe la fluorescence émise. Ces z-stack ont été réalisés sur tout le volume de la cellule. J'ai choisi trois plans (flèche rouge) pour illustrer notre expérience. A- en bas de la cellule, proche de l'interface lamelle/cellule ; B- au milieu de la cellule ; C- en haut de la cellule. Le marquage rouge représente l'histone H2A et le marquage vert représente l'EGFR.

4) Peut-on visualiser une translocation nucléaire de l'EGFR-PA-GFP en réponse à l'EGF ?

Une fois l'activation localisée de l'EGFR-PA-GFP à la membrane plasmique validée, nous avons tenté de visualiser le transport nucléaire de l'EGFR depuis la membrane plasmique vers le noyau en réponse à l'activation par son ligand.

Avant de parvenir à un résultat, nous avons rencontré de nombreuses difficultés. En effet, lorsque nous avons activé avec le laser puis stimulé nos cellules à l'EGF, nous avons observé un déplacement important de nos cellules. La double activation (laser/ligand) a induit le détachement de nos cellules et leur déplacement jusqu'à leur complète sortie du champ optique (cf. [Figure 44](#)). La double stimulation et notamment l'activation par le laser 405nm était donc trop violentes pour notre modèle cellulaire. Pour pallier à ce problème, nous avons considérablement réduit la puissance laser lors de l'activation de la PA-GFP en utilisant un mode dit APD (avalanche photodiode). Ce mode permet des acquisitions beaucoup plus sensibles ce qui permet de réduire par dix la puissance laser. Ceci a permis de réduire ces déplacements de nos cellules et de rendre nos acquisitions analysables.

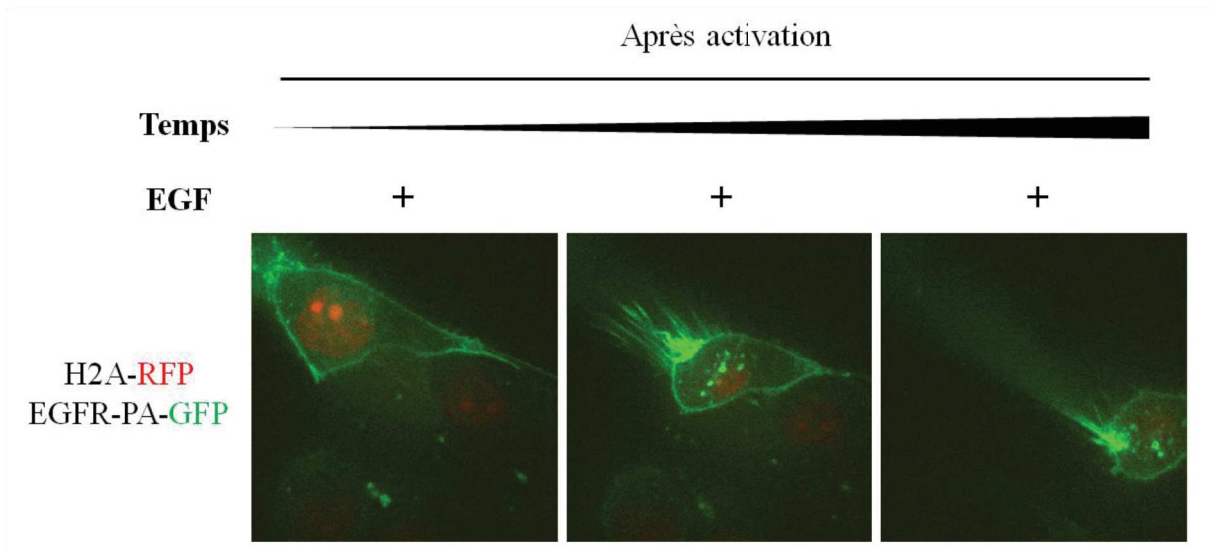


Figure 44 : Déplacement des cellules après activation par le laser et la stimulation par le ligand. Le marquage rouge représente l'histone H2A et le marquage représente l'EGFR-PA-GFP. L'échelle de temps est de moins de 5 minutes.

Nos résultats montrent qu'après l'activation de la PA-GFP par le laser, on observe une apparition de la fluorescence dans le canal vert (EGFR) au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'un marquage cytoplasmique diffus. Après la stimulation par le ligand, on observe de nombreuses taches vertes très fluorescentes dans le cytoplasme et une atténuation du marquage membranaire (cf. [Figure 45](#)). Ces résultats montrent donc qu'en réponse à son ligand, l'EGFR subit une modification de sa distribution subcellulaire et qu'il est notamment internalisé dans des petites vésicules. Malheureusement, nous n'avons pas observé de marquage nucléaire de l'EGFR même après différents temps de stimulation par l'EGF.

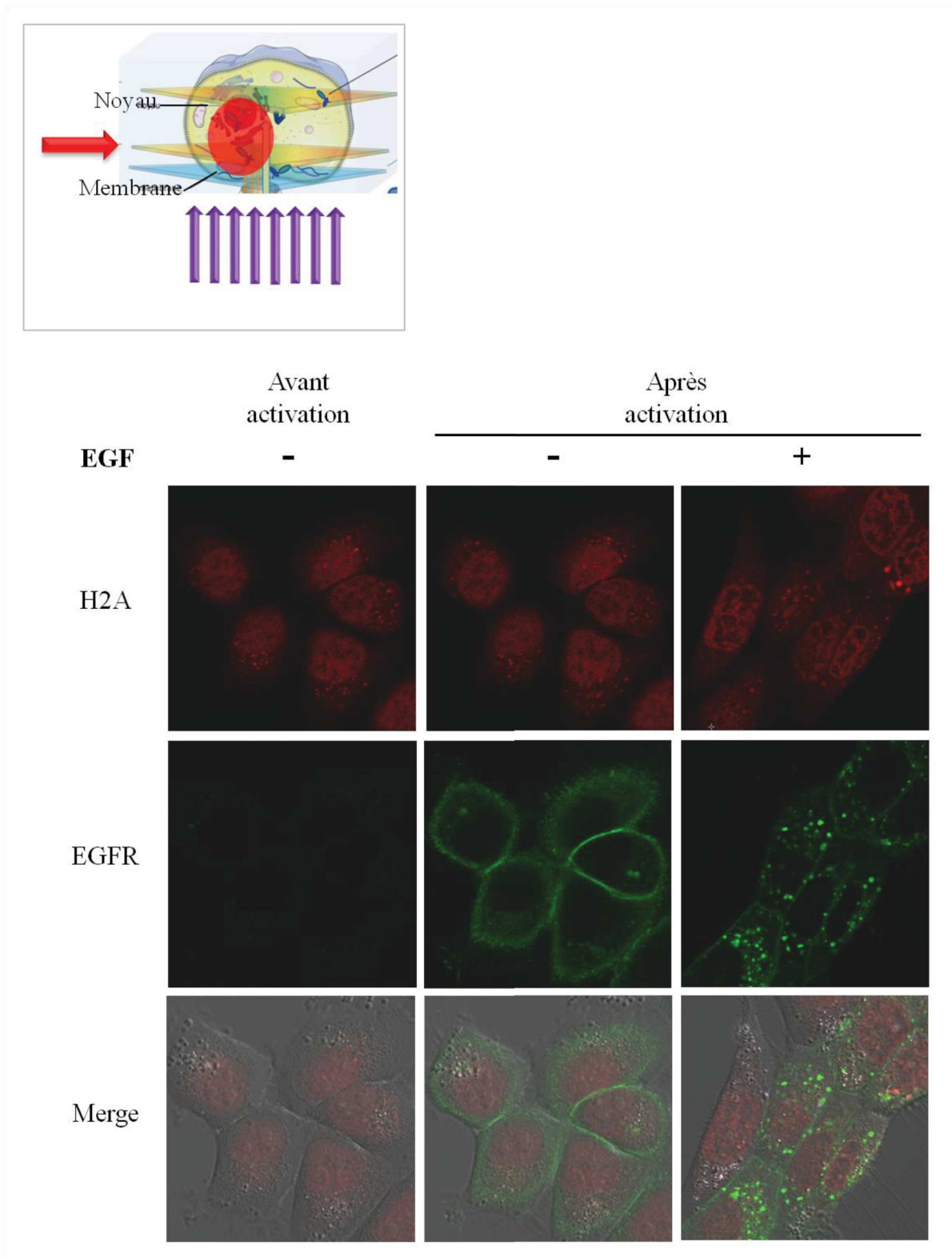


Figure 45 : l'EGF induit une modification de la localisation subcellulaire de l'EGFR-PA-GFP. Les cellules H358 exprimant de façon stable l'EGFR-PA-GFP sont ensemencées sur des lamelles IbiTreat puis 24 heures après, elles sont privées de sérum et traitées à l'EGF. Le marquage fluorescent vert représente l'EGFR. Le marquage du noyau est réalisé grâce au colorant NucRed. Le protocole d'imagerie est le suivant : (1) z-stack avant activation de la PA-GFP, (2) illumination de toute la cellule par le laser 405nm (activation PA-GFP), (3) un z-stack après activation de la PA-GFP, (4) ajout de l'EGF (50ng/mL), (5) z-stack après 30 minutes de stimulation à l'EGF.

4. Discussion et perspectives

Toute l'originalité de l'optogénétique, comparativement à des techniques de microscopies classiques, est de combiner la génétique et l'optique ce qui lui confère de grands atouts (*Pastrana, 2011*). Cette méthode permet tout d'abord de travailler dans des modèles cellulaires vivants ce qui donne la possibilité d'étudier des phénomènes dynamiques. De plus, nous ne travaillons pas avec des anticorps, qui peuvent générer des signaux non spécifiques, mais nous visualisons directement nos protéines cibles. Et enfin, l'intérêt tout particulier de cette technique est de suivre nos molécules très précisément dans la même cellule au cours du temps en en 3 dimensions.

Nos résultats sont encourageants pour la suite de notre travail. En effet, nous avons montré qu'en réponse à l'activation par son ligand l'EGFR subit une modification de sa distribution subcellulaire et qu'il est notamment internalisé dans des vésicules d'endocytose.

Pour continuer ce projet, d'autres mises au point sont nécessaires. En effet, pour le moment, nous ne sommes pas parvenus à montrer que l'EGFR-PA-GFP s'accumule davantage dans le noyau en réponse à l'EGF. Ceci peut être dû au fait que soit le nombre de molécules dans le noyau est inférieur au seuil de détection de l'appareil, soit en réponse à l'EGF, l'EGFR-PA-GFP n'est pas capable de s'accumuler davantage dans le noyau du fait de sa modification. Les premiers résultats de western blot tendent à valider cette seconde hypothèse. Dans ces conditions, il faudrait peut-être envisager de modifier le vecteur d'expression et de mettre la PA-GFP en N-terminal de l'EGFR.

Le mode TIRF présente une difficulté majeure dans notre cas. En effet, le réglage de ce mode requiert de visualiser l'interface lamelle/cellule. Or, nous n'avons pas de repère visuel pour la visualisation de l'interface. Il faut que nous gagnions en précision dans les réglages et pour cela une solution envisageable serait d'utiliser des billes auto-fluorescentes qui par gravité se déposeraient sur la surface de la lamelle et qui nous permettraient de faire nos mises au point sur l'interface lamelle/cellule.

Discussion

Discussion

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans le monde ce qui en fait un réel enjeu de santé publique. Moins d'un patient sur dix atteint de CBNPC est encore en vie cinq ans après le diagnostic de la maladie car entre 60 et 75% des cancers bronchiques sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie (*HAS, 2013*). Ces chiffres peuvent être expliqués par le fait qu'il n'existe pas de marqueur de dépistage précoce du cancer du poumon et que ces cancers sont très souvent asymptomatiques ce qui rend leur diagnostic très tardif. L'émergence des EGFR-TKI (gefitinib, erlotinib, afatinib) a constitué un réel progrès thérapeutique. Cependant, seuls 10 à 15% des patients atteints de CBNPC bénéficieront d'un traitement par EGFR-TKI et malheureusement, ils développeront presque tous après 6 à 12 mois une résistance au traitement (*Sequist, 2011, Hirsch, 2013*).

Certains travaux ont montré que l'expression nucléaire des RTK pouvait jouer un rôle dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses. Il a été mis en évidence que l'EGFR nucléaire est impliqué dans la résistance au gefitinib dans le cancer du sein et au cetuximab dans le cancer du poumon (*Huang, 2011, Li, 2009*). L'expression nucléaire de l'IGF-1R est un marqueur de réponse aux thérapies anti-IGF-1R dans les sarcomes (*Asmane, 2012*). Cependant, ces études restent peu nombreuses et le rôle des RTK nucléaires dans la réponse aux traitements anti-cancéreux est encore largement méconnu.

Dans ce travail, nous montrons pour la première fois le rôle de l'IGF-1R nucléaire dans la progression tumorale des CBNPC en réponse aux EGFR-TKI.

A. L'IGF-1R nucléaire dans les cancers

L'expression nucléaire de l'IGF-1R a été détectée dans les rhabdomyosarcomes alvéolaires (*Aslam, 2013*), les sarcomes (*Asmane, 2012*) et dans les tumeurs rénales où un haut niveau d'IGF-1R nucléaire est associé à un mauvais pronostic (*Aleksic, 2010*). Notre étude montre pour la première fois une expression nucléaire de l'IGF-1R dans une série de tumeurs pulmonaires. En effet, nous avons observé dans plus de 70% des échantillons d'adénocarcinomes pulmonaires un marquage nucléaire de l'IGF-1R.

La détection de l'expression nucléaire de l'IGF-1R est très récente. Jusqu'à présent les études de l'expression de l'IGF-1R dans les tumeurs n'avaient pas montré de marquage nucléaire du récepteur (*Tsuta, 2013, Tran, 2014, Hurbin, 2011*). L'anticorps utilisé (Ventana) ne permettait donc pas la détection de l'IGF-1R nucléaire. Au sein de l'équipe, nous avons eu le même problème pour la détection de l'EGFR nucléaire. Ces problèmes de détection pourraient être dus à des différences de conformation entre les protéines membranaires et nucléaires et donc au masquage de l'épitope détecté par l'anticorps Ventana dans le cas de l'IGF-1R nucléaire. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir auprès des fabricants quels épitopes sont ciblés par les anticorps pour valider notre hypothèse. En nous basant sur les données de la littérature, nous avons utilisé un autre anticorps (IGF-1R β , CST #3027) pour visualiser les marquages membranaires, cytoplasmique et nucléaire de l'IGF-1R.

Toutes les tumeurs ne montrent pas de marquage nucléaire de l'IGF-1R et nous avons observé des marquages très hétérogènes au sein des tumeurs. Cependant, nous n'avons pas observé de différence significative entre les différents sous-types histologiques ce qui peut être expliqué par un faible nombre d'échantillons. Nous sommes en train de compléter cette étude. Nous étudierons les corrélations entre le marquage nucléaire de l'IGF-1R et les paramètres clinico-pathologiques (sous-type histologique, stade...).

B. L'IGF-1R nucléaire en réponse au gefitinib

Le mécanisme moléculaire du transport nucléaire de l'IGF-1R a fait l'objet de peu d'études et n'est pas encore complètement élucidé. Ces études rapportent que l'IGF-1R est endocyté et que la sumoylation, les microtubules et l'importine $\beta 1$ jouent un rôle dans le transport nucléaire du récepteur en réponse à l'activation par son ligand (*Aleksic, 2010, Sehat, 2010, Packham, 2015*).

L'ensemble de nos résultats suggèrent que le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib pourrait faire intervenir les mêmes mécanismes moléculaires de transport nucléaire que ceux identifiés dans la littérature dans d'autres modèles cellulaires en réponse à l'activation par un ligand (*Aleksic, 2010, Sehat, 2010, Packham, 2015*). En effet, le gefitinib induit l'endocytose clathrines-dépendante de l'IGF-1R. Le récepteur est ensuite transporté au réticulum endoplasmique et à la membrane nucléaire puis il est retrouvé dans le nucléoplasme. (cf. [Figure 46](#))

En accord avec les résultats d'*Aleksic et al.* (*Aleksic, 2010*), l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R diminue de 25% l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib. L'activité TK de l'IGF-1R n'est pas suffisante pour son transport nucléaire. Cependant, elle joue certainement un rôle dans ce mécanisme de transport nucléaire qui reste non élucidé pour le moment.

Les importines sont des protéines chaperonnes aussi connues sous le nom de karyophérines. Le rôle majeur des importines est de médier le transport entre le cytoplasme et le noyau de macromolécules qui contiennent des signaux d'import (NLS) ou d'export nucléaire (NES). Le complexe importine $\beta 1$ /importine α s'associe aux séquences NLS de la macromolécule et la transporte à travers le pore nucléaire (*Ström, 2001, Harel, 2004*). En réponse au gefitinib, nous montrons que l'IGF-1R interagit avec l'importine $\beta 1$ ce qui suggère que le transport nucléaire de l'IGF-1R fait intervenir ce mécanisme classique de transport des macromolécules (cf. [Figure 46](#)).

Nos résultats montrent aussi que le gefitinib induit l'interaction entre l'IGF-1R et la sumoylase RanBP2. Des études ont décrit le rôle majeur de la sumoylation de l'IGF-1R dans son transport nucléaire en réponse à l'activation par son ligand (*Sehat, 2010, Packham, 2015*). Bien que des expériences complémentaires soient nécessaires, nos résultats suggèrent le rôle de la sumoylation dans le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib (cf. [Figure 46](#)).

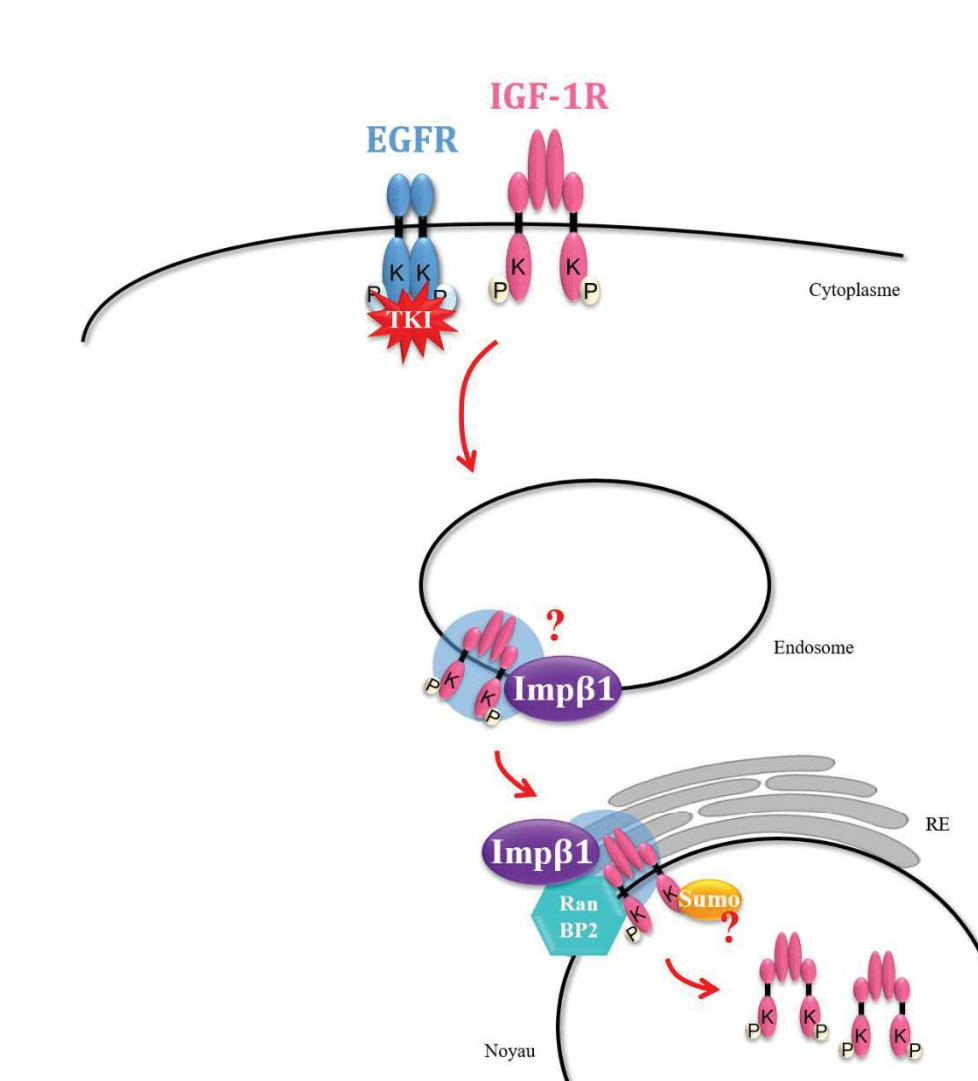


Figure 46 : Les EGFR-TKI induisent le transport nucléaire de l'IGF-1R chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux. Les EGFR-TKI induisent l'endocytose de l'IGF-1R, puis par un transport rétrograde les vésicules d'endocytose sont transportées jusqu'au réticulum endoplasmique (RE). En réponse aux EGFR-TKI, l'IGF-1R interagit avec l'importine β1 (Imp β1) et RanBP2 avant d'être internalisé dans le noyau. La présence du complexe IGF-1R/importine β1 au niveau des endosomes reste à déterminer. L'interaction IGF-1R/RanBP2 suggère un rôle de la sumoylation de l'IGF-1R (Sumo) dans son transport nucléaire. L'IGF-1R est retrouvé dans la fraction soluble du noyau.

C. L'amphiréguline : un acteur majeur du transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib

1. Le rôle de l'Areg dans la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib

Les modèles cellulaires de tumeur pulmonaire qui présentent une accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI ont un haut niveau d'expression d'Areg sécrétée.

Il a été précédemment montré au sein de l'équipe que l'Areg coopère avec l'IGF-1 pour prévenir l'apoptose en condition de privation de sérum en activant une voie dépendante des PKC qui conduit à l'inactivation des protéines pro-apoptotiques Bad et Bax (*Hurbin, 2002, Hurbin, 2005*). De plus, un haut niveau d'Areg sécrétée protège les cellules d'adénocarcinomes mucineux de l'apoptose induite par le gefitinib. L'Areg, l'EGFR et l'IGF-1R coopèrent pour induire une résistance au gefitinib au travers de l'activation d'Akt (*Busser, 2010a, Hurbin, 2011, Jeannot, 2014*).

Nous montrons que l'Areg est nécessaire à la formation du complexe IGF-1R/importine $\beta 1$. De plus, nos données PLA indiquent que l'Areg interagit avec l'IGF-1R et l'importine $\beta 1$. L'IGF-1R n'a pas de séquence NLS et l'Areg possède deux séquences NLS. Il est envisageable que l'Areg permette à l'IGF-1R de se lier de manière indirecte à l'importine $\beta 1$ *via* la formation d'un complexe IGF-1R/Areg/importine $\beta 1$. En stimulant la formation du complexe IGF-1R/Areg/importine $\beta 1$, le gefitinib pourrait donc induire le transport nucléaire de l'IGF-1R. Notre étude est la première à proposer un partenaire potentiel de l'IGF-1R possédant une séquence NLS pour son transport nucléaire (cf. [Figure 47](#)).

Il est connu que l'Areg (pro-Areg, Areg-CTF) peut être internalisée et transportée vers différents compartiments cellulaires (*Isokane, 2008*). La translocation de la pro-Areg à la membrane nucléaire active la migration cellulaire dans des modèles de cancer du sein (*Tanaka, 2012*) et induit la chimiorésistance au cisplatine, au paclitaxel et au 5-fluorouracile dans les cancers gastriques (*Yoshida, 2012*). Dans nos modèles d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux, nous montrons que le gefitinib inhibe la sécrétion de l'Areg et induit sa redistribution subcellulaire dans les cellules. Ainsi, une forme intracellulaire de l'Areg qu'il reste à caractériser (pro-Areg ?, Areg-CTF ?) participe au transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI dans nos modèles.

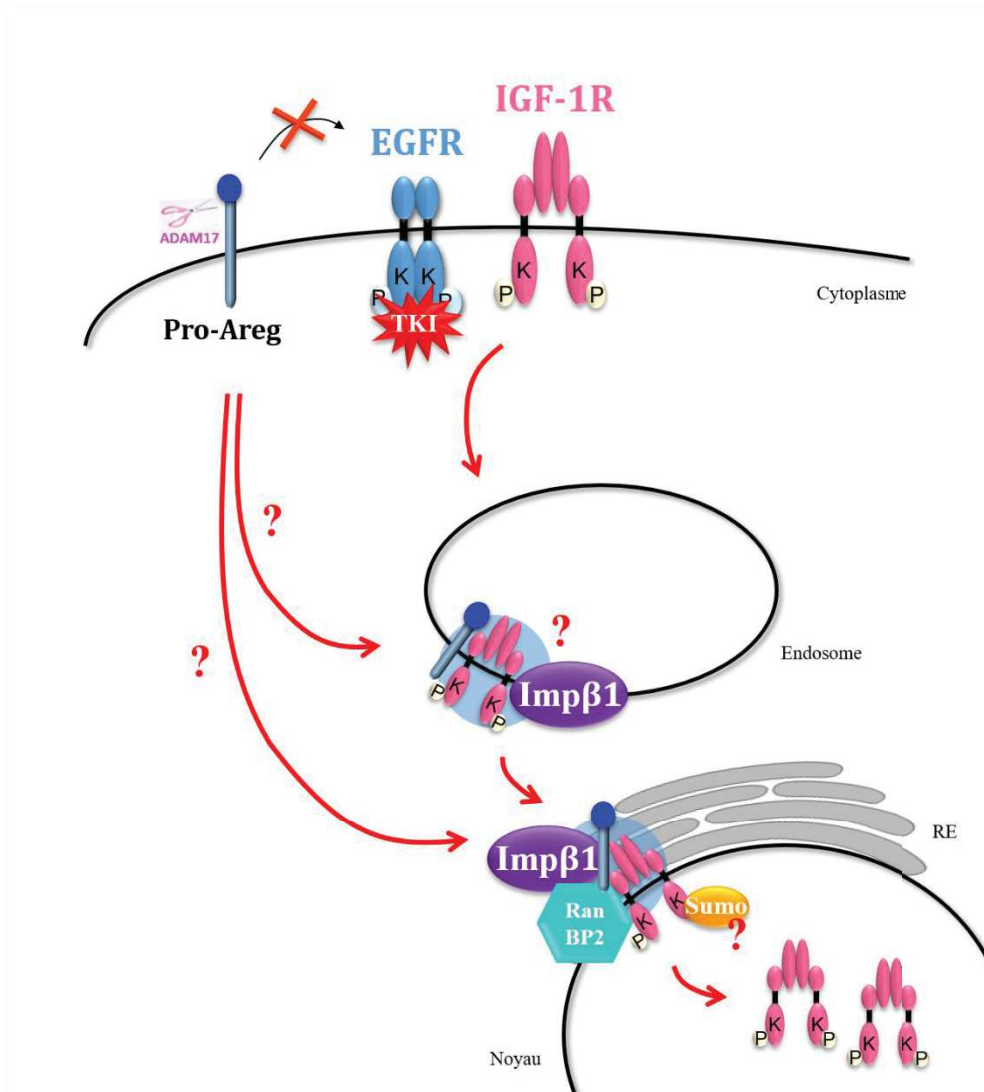


Figure 47: Le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux dépend de l'Areg. Les EGFR-TKI induisent l'endocytose de l'IGF-1R, puis par un transport rétrograde les vésicules d'endocytose sont transportées jusqu'au réticulum endoplasmique (RE).

Les EGFR-TKI inhibent la sécrétion de l'Areg et induisent le trafic intracellulaire de l'Areg par un mécanisme qu'il reste à déterminer. L'Areg interagit avec l'IGF-1R et l'importine $\beta 1$ (Imp $\beta 1$). La présence du complexe IGF-1R/importine $\beta 1$ /Areg (endosome, RE ?) ainsi que la forme d'Areg (pro-Areg, Areg-CTF ?) impliquée dans ce complexe sont à déterminer. L'interaction IGF-1R/RanBP2 suggère un rôle de la sumoylation de l'IGF-1R (Sumo) dans son transport nucléaire. Enfin, l'IGF-1R est retrouvé dans la fraction soluble du noyau.

2. La régulation de la distribution subcellulaire de l'Areg par le gefitinib : quelques pistes...

Nous montrons que le gefitinib inhibe la sécrétion de l'Areg et favorise le trafic intracellulaire de l'Areg. Cependant, le mécanisme par lequel le gefitinib contrôle la localisation subcellulaire de l'Areg reste à déterminer.

Le gefitinib pourrait inhiber la transcription de l'Areg (*Salomon, 1995, Wang, 2008, Willmarth, 2009*). Nous avons étudié le niveau d'ARNm d'Areg dans les cellules H358 par RT-qPCR et nos résultats montrent une diminution de 30% de transcrits d'Areg en réponse au gefitinib. Cependant, le gefitinib inhibe plus de 90% de la sécrétion d'Areg. Cette diminution du nombre de transcrits ne semble donc pas pouvoir expliquer la diminution drastique d'Areg sécrétée.

Nos données en immunofluorescence dans des cellules transfectées Areg-V5 montrent qu'en absence de traitement l'Areg est localisée à la membrane plasmique. A l'inverse, en présence de gefitinib, l'Areg est localisée dans une zone périnucléaire. On peut alors émettre deux hypothèses : (1) Le gefitinib pourrait bloquer le transport de la pro-Areg mature vers la membrane plasmique après sa synthèse protéique ce qui conduirait à une diminution de la quantité d'Areg disponible à la membrane pour le clivage (cf. [Figure 48A](#)); (2) Le gefitinib pourrait induire le transport de l'Areg depuis la membrane plasmique vers la zone périnucléaire(cf. [Figure 48B](#)). Il serait important de valider l'une de ces hypothèses en recherchant notamment si un inhibiteur de l'endocytose bloque la redistribution cellulaire de l'Areg en réponse au gefitinib.

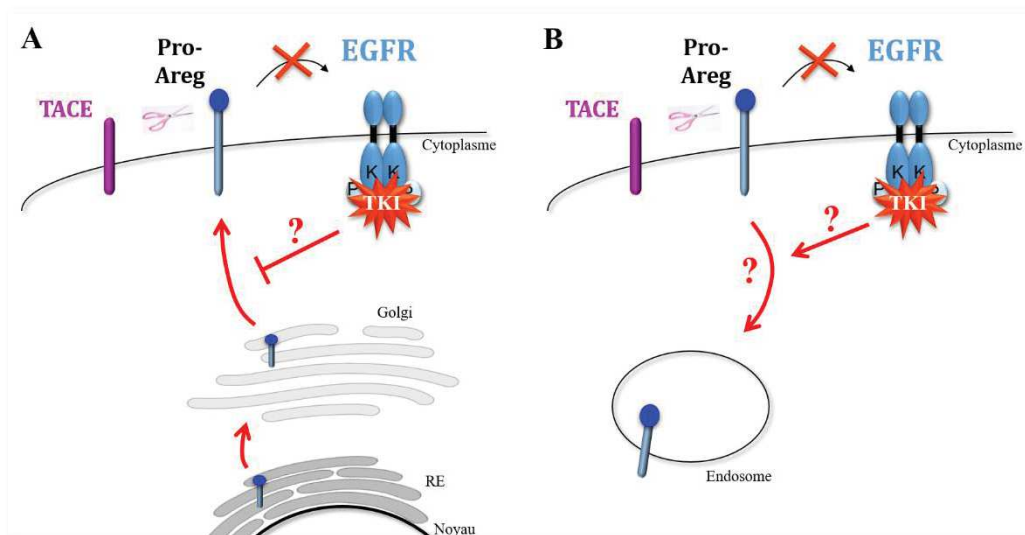


Figure 48 : Les EGFR-TKI pourraient inhiber le transport de la pro-Areg mature vers la membrane plasmique après sa synthèse protéique (A) ou induire son internalisation (B). Pour le moment, nous ne savons pas si l'Areg nécessaire au transport nucléaire de l'IGF-1R provient de la membrane plasmique. Il sera donc intéressant d'étudier cette hypothèse.

D'autre part, il est connu que la mono-ubiquitination de la pro-Areg sur sa lysine Lys240 favorise son endocytose ce qui empêche le clivage protéolytique de la pro-Areg, et donc inhibe la libération d'Areg sécrétée (*Fukuda, 2012*). Les signaux ou enzymes qui conduisent à l'ubiquitination de la pro-Areg n'ont pour l'heure pas été identifiés. Le gefitinib pourrait conduire à une augmentation de l'ubiquitination de la pro-Areg, inhiber son clivage protéolytique et favoriser son trafic intracellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier si le gefitinib contrôle l'ubiquitination de l'Areg. (cf. [Figure 49](#))

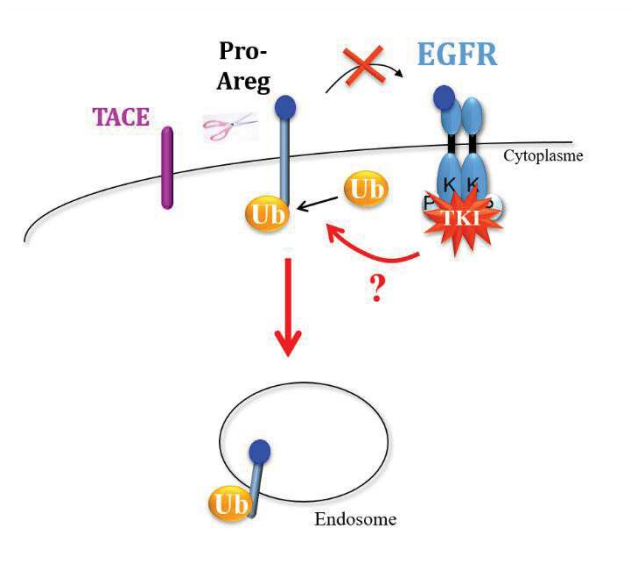


Figure 49 : Les EGFR-TKI pourraient réguler la distribution subcellulaire de la pro-Areg au travers de son ubiquitination. La mono-ubiquitination de la pro-Areg sur sa lysine Lys240 favorise son endocytose ce qui empêche son clivage protéolytique et inhibe sa sécrétion (*Fukuda, 2012*). Le gefitinib pourrait favoriser l'ubiquitination de la pro-Areg et stimuler son trafic intracellulaire.

Il est aussi envisageable que le gefitinib agisse sur l'activité de la métalloprotéase TACE/ADAM17 impliquée dans le clivage de la pro-Areg. L'inhibition de l'EGFR par le gefitinib pourrait diminuer l'activité de TACE et ainsi favoriser l'internalisation de l'Areg. Nos résultats préliminaires indiquent que l'inhibition de TACE par un inhibiteur pharmacologique spécifique (TAPI-1) n'a pas d'impact sur l'expression nucléaire de l'IGF-1R. Cela suggère que l'activité protéolytique de TACE n'est pas suffisante pour l'internalisation de l'Areg et le transport nucléaire de l'IGF-1R.

Le gefitinib pourrait également agir sur l'interaction entre TACE et l'Areg. La formation de ce complexe est régulée par les annexines (*Nakayama, 2012*). Les annexines sont des protéines solubles présentes chez les eucaryotes. A l'heure actuelle, on compte douze annexines (AnxA1 à AnxA13) qui partagent la propriété de se lier aux membranes présentant des phospholipides chargés négativement au travers d'un mécanisme dépendant des ions calcium (*Bouter, 2015*). Les AnxA2, A8 et A9 interagissent avec la pro-Areg et TACE à la surface cellulaire et le clivage protéolytique de la pro-Areg est régulé par ces trois annexines (*Nakayama, 2012*). De plus, l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, de Src et des PKC induit des modifications post-traductionnelles des annexines et régule leur activité (*Gerke, 2002, Gerke, 2005*). Ces données de la littérature nous amènent à émettre l'hypothèse que le gefitinib pourrait, au travers de l'EGFR et de ses voies d'aval, moduler la transcription des annexines ou diminuer les interactions entre les annexines, TACE et la pro-Areg nécessaires au clivage et à la sécrétion d'Areg soluble. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'expression protéique des différentes annexines et les interactions entre annexines, pro-Areg et TACE en absence et en présence de gefitinib. (cf. [Figure 50](#))

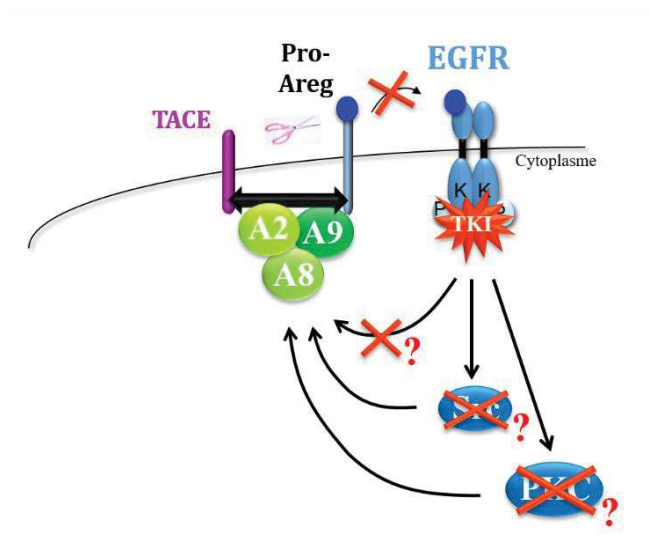


Figure 50 : Les EGFR-TKI pourraient réguler la distribution subcellulaire de la pro-Areg au travers des annexines.

Les EGFR-TKI diminuent la sécrétion de l'Areg et induisent le trafic intracellulaire de la pro-Areg. Les AnxA2, A8 et A9 interagissent avec la pro-Areg et TACE à la surface cellulaire et le clivage protéolytique de la pro-Areg est régulé par ces trois annexines (*Nakayama, 2012*). Les annexines peuvent être régulées par l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, de Src et des PKC (*Gerke, 2005*).

Enfin, il est également connu que la sécrétion de facteurs de croissance peut être régulée indépendamment de l'activité protéolytique de TACE *via* certains composants de voies de signalisation (Dang, 2013). Il a été précédemment montré par l'équipe que le gefitinib active les voies des PI3K et des MAPK dans les cellules d'adénocarcinomes mucineux (Hurbin, 2011, Jeannot, 2014). Nos résultats préliminaires montrent que la voie des PI3K n'est pas impliquée dans l'inhibition de la sécrétion de l'Areg et dans le trafic nucléaire de l'IGF-1R. D'autre part, le laboratoire a montré que la neutralisation de l'Areg inhibe la voie des MAPK activée par le gefitinib (Hurbin, 2011) et le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib (mes résultats). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier le rôle de la voie des MAPK dans le contrôle de la sécrétion de l'Areg en réponse au gefitinib. Enfin, il a été récemment montré que les PKC α peuvent réguler le clivage de la pro-Areg sans affecter l'activité protéolytique de TACE (Dang, 2013). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de cette voie de signalisation dans la localisation subcellulaire de l'Areg.

3. L'Areg sécrétée

L'Areg a un rôle crucial dans le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI. Or, nos modèles cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux se caractérisent par de hauts niveaux d'Areg sécrétée. Ceci nous a conduit à envisager la possibilité que l'Areg sécrétée (sans EGFR-TKI) ait un impact sur l'expression nucléaire de l'IGF-1R. En accord avec cette hypothèse, nous montrons que l'Areg induit l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R mais aussi celle de l'EGFR. Cependant alors que l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R est persistante, celle de l'EGFR est transitoire. De plus, en réponse à l'Areg, ces deux récepteurs s'hétérodimérisent. L'EGFR semble réguler le transport nucléaire de l'IGF-1R sans qu'on ne puisse l'expliquer pour le moment. Ainsi, le mécanisme de transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse à l'Areg est complexe et implique possiblement l'EGFR. Il est envisageable que cette signalisation Areg/EGFR/IGF-1R participe à la progression tumorale des adénocarcinomes pulmonaires mucineux.

D. Quel est le rôle de la signalisation nucléaire Areg/IGF-1R ?

Nous avons utilisé des xénogreffes (H358) établies dans des souris "nude" et traitées avec du gefitinib, des siARN dirigés contre l'Areg ou leur combinaison. Les tumeurs qui n'ont reçu aucun traitement montrent principalement un fort marquage membranaire d'IGF-1R alors que toutes les tumeurs traitées au gefitinib présentent un marquage d'IGF-1R péri-nucléaire et/ou nucléaire. Ceci valide nos résultats *in vitro*. De plus, la neutralisation de l'Areg inhibe l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib et s'accompagne d'une re-sensibilisation au gefitinib, ce qui conduit à une régression des tumeurs. Ces résultats suggèrent que l'IGF-1R nucléaire pourrait jouer un rôle dans la résistance des adénocarcinomes mucineux aux EGFR-TKI *in vivo*.

De manière intéressante, la localisation nucléaire de l'IGF-1R induite par le gefitinib est associée à l'augmentation du marqueur de prolifération, Ki67. La neutralisation de l'Areg prévient également ce marquage. Ces données suggèrent que la signalisation Areg/IGF-1R nucléaire induite en réponse au gefitinib est impliquée dans une voie de prolifération cellulaire.

Il est connu que l'IGF-1R nucléaire est capable de se lier à l'ADN et de contrôler la transcription génique (Sehat, 2010). Il a récemment été montré dans un modèle de cancer du poumon que l'IGF-1R nucléaire se lie aux facteurs de transcription LEF1/TCF et que le complexe IGF-1R/LEF1/TCF active la transcription et l'expression protéique des gènes de la *cyclineD1* et de l'*axin2* (Warsito, 2012). Il serait donc intéressant de rechercher, à l'aide de puces à ADN quels gènes peuvent être activés par l'IGF-1R nucléaire en présence de gefitinib, en particulier les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. (cf. [Figure 51](#))

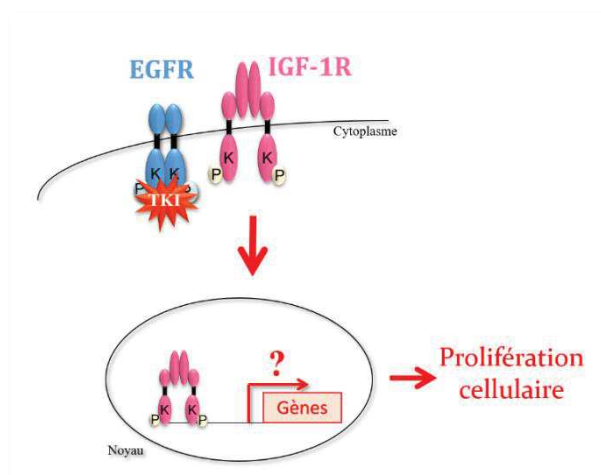


Figure 51 : Identification des cibles de l'IGF-1R nucléaire. Il est connu que l'IGF-1R nucléaire est capable de se lier à l'ADN et de réguler la transcription (Sehat, 2010). Les cibles de l'IGF-1R nucléaire dans les modèles d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux en réponse aux EGFR-TKI sont pour le moment inconnues. Les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire seront tout particulièrement étudiés.

E. Les perspectives cliniques

Un des obstacles majeurs actuel au traitement des cancers du poumon par les EGFR-TKI est le développement de mécanismes de résistance par les tumeurs. Environ 30% des adénocarcinomes pulmonaires présentent une mutation du gène *K-RAS*, mutation qui est à l'origine d'une résistance primaire aux EGFR-TKI de ces tumeurs (Pao, 2005). Aujourd'hui, le traitement de ces patients atteints de CBNPC avec un *K-RAS* muté pose un problème majeur. Dans le cancer du poumon, les mutations de *K-RAS*, principalement associées à la consommation de tabac (Brambilla, 2009), ont majoritairement lieu sur les codons 12 et 13 et conduisent à l'activation constitutive de la protéine et de ses voies d'aval.

Les adénocarcinomes mucineux sont fréquemment muté pour *K-RAS*. C'est le cas de nos modèles cellulaires d'adénocarcinomes mucineux (H358, H441) qui présentent une accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib. Il est donc envisageable que la mutation de *K-RAS* contribue à l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R et favorise la prolifération cellulaire des adénocarcinomes mucineux en réponse aux EGFR-TKI. Bien que les cellules non mucineuses A549 possèdent une mutation de *K-RAS*, elles ne présentent pas d'accumulation nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI. Ainsi, la mutation de *K-RAS* ne semble pas contrôler le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au EGFR-TKI.

Cependant, il est intéressant de souligner que ces trois modèles d'adénocarcinomes ne sont pas tous les trois porteurs de la même mutation de *K-RAS* : H358 (G12C), H441 (G12V), A549 (G12S). Des études *in vitro* suggèrent que les différentes mutations G12 de *K-RAS* peuvent différer dans leur potentiel cancérigène (Roberts, 2010). Les patients atteints de CBNPC dont les tumeurs ont des mutations G12C et G12V ont une survie sans progression bien moins bonne que les patients avec des tumeurs avec la mutation G12S ou un gène sauvage (Ihle, 2011). De plus, les modèles cellulaires avec ces différentes mutations n'activent pas les mêmes voies de signalisation (Ihle, 2011). Une étude de Yoon *et al.* a montré que les lignées H358 et A549 répondent différemment à l'AZD6244, un inhibiteur de MEK. La prolifération cellulaire des cellules H358 est dépendante de l'activation de MEK alors que celle des cellules A549 n'est pas modifiée par l'inhibition de MEK. Ces résultats montrent que la différence de mutation de *K-RAS* de ces deux modèles cellulaires a un impact majeur sur leur résistance aux traitements sans que le mécanisme n'ait été identifié (Yoon, 2010).

A la vue de ces données, on ne peut donc pas exclure le rôle de la mutation de *K-RAS* dans l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R dans nos modèles cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux en réponse aux EGFR-TKI. De plus, il est possible que le type de mutation de *K-RAS* soit capitale pour le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI.

Ainsi, la détermination du type de mutation de *K-RAS* pourrait permettre d'identifier les patients susceptibles de recevoir un traitement inhibant le transport nucléaire de l'IGF-1R.

L'IGF-1R nucléaire semble impliqué dans la prolifération cellulaire des adénocarcinomes pulmonaires mucineux en présence d'EGFR-TKI. On pourrait donc envisager d'inhiber le transport nucléaire de l'IGF-1R pour restaurer la sensibilité aux EGFR-TKI. A l'heure actuelle, les premiers essais cliniques combinant un EGFR-TKI et un anticorps anti-IGF-1R ont montré que 36% des patients porteurs de la mutation de *K-RAS* présentent une amélioration de la survie sans progression contre 0% avec l'EGFR-TKI seul (*Ramalingam, 2011*). Dans nos modèles cellulaires mucineux, nous montrons que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de l'IGF-1R combiné à un EGFR-TKI conduit à une diminution de seulement 25% de la translocation nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib. Il semble donc peu probable que cette combinaison de traitement soit suffisante pour inhiber le transport nucléaire de l'IGF-1R présente chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux en réponse aux EGFR-TKI. Cependant, les traitements anti-IGF-1R actuellement en clinique étant les anticorps anti-IGF-1R, il sera nécessaire de les tester sur nos modèles cellulaires afin de savoir s'ils inhibent davantage le transport nucléaire que les IGF-1R-TKI.

Nos données suggèrent que *K-RAS* et la voie des MAPK pourraient être impliqués dans le transport nucléaire de l'IGF-1R. La combinaison EGFR-TKI/inhibiteur de MEK devra être évaluée dans nos modèles d'adénocarcinomes mucineux résistants aux EGFR-TKI (cf. [Figure 52](#)). Des essais cliniques sont actuellement en cours pour tester cette combinaison de traitement chez des patients atteints de CBNPC avec une mutation de l'*EGFR* ou de *K-RAS*. (NCT01859026 – erlotinib + MEK162 ; NCT01229150 - erlotinib + AZD6244).

L'Areg a un rôle majeur dans le transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI. On peut donc envisager d'inhiber son expression en utilisant des siARN spécifiques en combinaison avec un EGFR-TKI (*Busser, 2010a*). Cependant, cela requiert de mettre au point la formulation (nanoparticule) et réussir à cibler les cellules cancéreuses. Même si ce type de thérapie est beaucoup plus difficile à mettre en place chez le patient, il est envisageable de les utiliser. En effet, un premier essai de phase I a montré que le ciblage à

l'aide de nanoparticules contenant un siARN ciblant le VEGF-A est réalisable. Il est à noter la rémission d'une patiente atteinte d'un cancer de l'endomètre avec de multiples métastases hépatiques dans cet essai. (Tabernero, 2013) (cf. [Figure 52](#))

Le mécanisme de transport nucléaire de l'IGF-1R fait intervenir l'importine $\beta 1$. Il serait donc intéressant d'empêcher la fixation de la protéine cargo avec l'importine $\beta 1$ grâce à des peptides bloquants (Kosugi, 2008) ou de bloquer l'interaction entre l'importine $\beta 1$ et RanGTP pour inhiber la libération de la protéine cargo dans le nucléoplasme. Récemment, Soderholm *et al.* ont montré que l'importazole, une 2,4 diaminoquinazoline, pouvait bloquer spécifiquement l'import nucléaire médié par l'importine $\beta 1$ *in vitro*. En effet, l'importazole se lie à l'importine $\beta 1$ ce qui empêche ainsi son interaction avec RanGTP. La protéine cargo ne peut alors pas être libérée dans le nucléoplasme et reste bloquée à la membrane nucléaire (Soderholm, 2011). Un traitement EGFR-TKI associé à l'importazole devrait être évalué dans nos modèles d'adénocarcinomes pulmonaires mucineux. (cf. [Figure 52](#))

Enfin, une dernière piste serait de combiner un EGFR-TKI avec un anticorps monoclonal (mAb414, RL2) dirigé contre les nucléoporines afin de prévenir l'association entre le pore nucléaire et le complexe IGF-1R/importine $\beta 1$ (Hill, 2013). Ces anticorps ciblent les épitopes des nucléoporines qui se lient aux importines (Gasiorowski, 2003) ce qui empêche les protéines cargos de traverser la membrane nucléaire. (cf. [Figure 52](#))

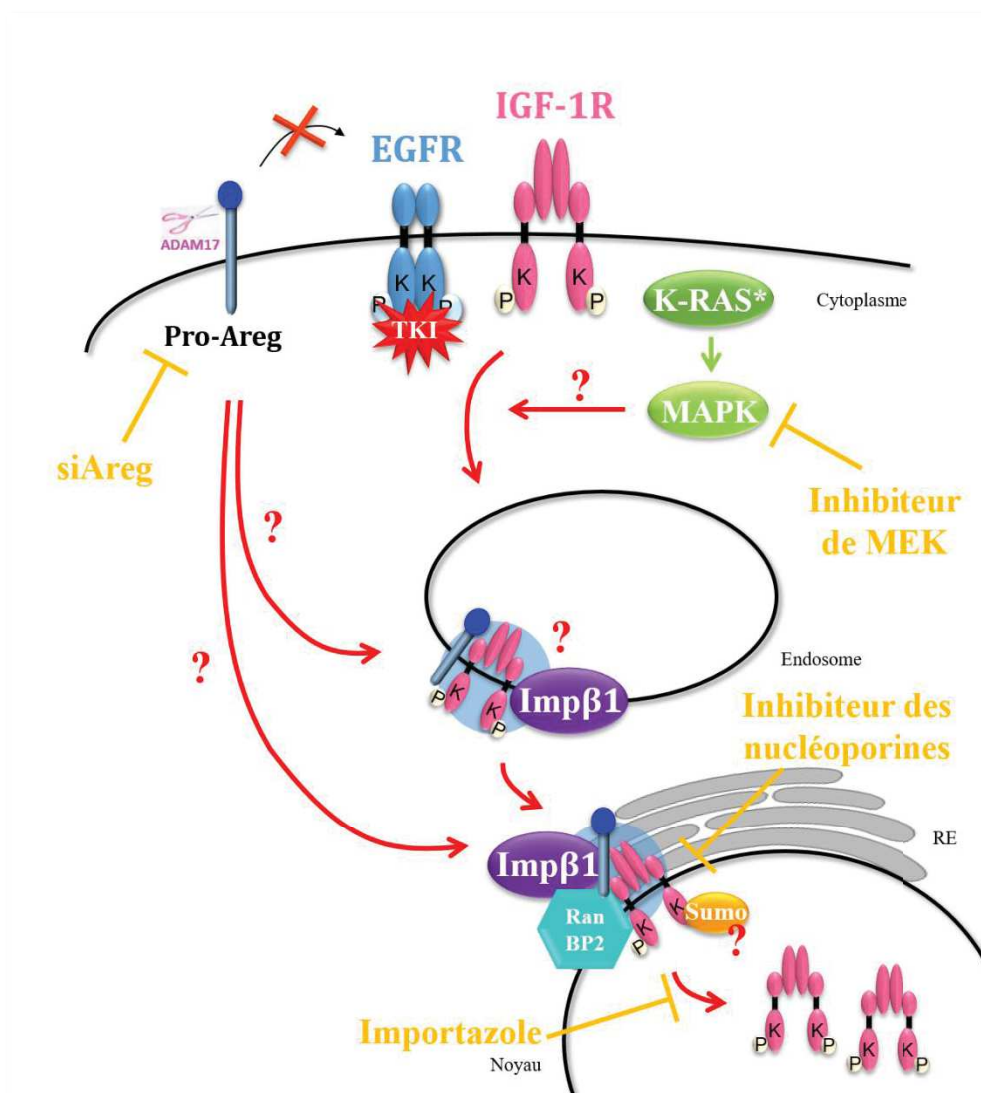


Figure 52 : Des pistes pour l'inhibition du transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse au gefitinib chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux. (1) La neutralisation de l'Areg, acteur majeur du transport nucléaire de l'IGF-1R, à l'aide de siAreg ; (2) L'inhibition de la voie de MAPK à l'aide d'un inhibiteur de MEK ; (3) L'inhibition des nucléoporines prévient l'association entre le pore nucléaire et la protéine cargo (IGF-1R) ce qui empêche le passage de la membrane nucléaire. (Gasiorowski, 2003) ; (4) L'inhibition de l'interaction entre l'importine β1 et RanGTP, grâce à l'importazole, empêche la libération de la protéine cargo dans le nucléoplasme (Soderholm, 2011).

L'IGF-1R nucléaire ainsi que ses fonctions doivent faire l'objet de recherches supplémentaires afin d'en comprendre tout l'enjeu dans la résistance aux thérapies anti-EGFR.

Conclusion

Conclusion

Pour conclure, ce travail nous a permis de montrer la présence d'un transport nucléaire de l'IGF-1R en réponse aux EGFR-TKI chez les adénocarcinomes pulmonaires mucineux. Nous avons également identifié certains partenaires de l'IGF-1R dans ce transport depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau. Notre étude est la première à proposer un partenaire potentiel de l'IGF-1R possédant une séquence NLS pour son transport nucléaire : l'Areg. Enfin, nous mettons en évidence le rôle de la signalisation nucléaire IGF-1R/Areg dans la prolifération cellulaire des adénocarcinomes pulmonaires mucineux.

Cette étude montre donc que le transport nucléaire de l'IGF-1R peut être un acteur majeur dans la réponse des tumeurs aux traitements anti-cancéreux tels que les EGFR-TKI. Dans un contexte où le cancer du poumon est un problème de santé publique majeur et où la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements anti-cancéreux reste le principal défi pour une meilleure prise en charge des patients, l'étude du rôle des RTK nucléaires dans ces mécanismes est nécessaire. Cette nouvelle approche dans la caractérisation des mécanismes de résistance permettra d'identifier de nouvelles cibles et par conséquent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Adams** TE., Epa VC., Garrett TPJ., Ward CW. (2000) *Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor*. Cellular and Molecular Life Sciences, 57, 1050-1093.
- Addison** CL., Ding K., Zhao H., Le Maître A., Goss GD., Seymour L., Tsao MS., Shepherd FA., Bradbury PA. (2010) *Plasma transforming growth factor alpha and amphiregulin protein levels in NCIC Clinical Trials Group BR.21*. Journal of Clinical Oncology, 28(36), 5247-5256.
- Aleksic** T., Chitnis M., Perenstenko O., Gao S., Thomas P., Turner G., Protheroe A., Howarth M., Macauley V. (2010) *Type I receptor translocates to the nucleus of human tumor cells*. Cancer Research, 70(16), 6412-6419.
- Arcaro** A. (2013) *Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer*. Frontiers in Pharmacology, 4(30), 1-8.
- ARISTOT** (Association de Recherche d'Information Scientifique et Thérapeutique en Oncologie Thoracique) (2016) *Cancer bronchique non à petites cellules. Les référentiels en oncologie thoracique Auvergne--Rhône-Alpes 2016, 12^{ème} édition. Mise à jour 2016*.
- Aslam** MI., Hettmer S., Abraham J., Latocha D., Soundararajan A., Huang ET., Goros MW., Michalek JE., Wang S., Mansoor A., Druker BJ., Wagers AJ., Tyner JW., Keller C. (2013) *Dynamic and nuclear expression of PDGFR α and IGF-1R in alveolar Rhabdomyosarcoma*. Molecular Cancer Research, 11, 1303-1313.
- Asmane** I., Watkin E., Alberti L., Duc A., Marec-Berard P., Ray-Coquard I., Cassier P., Decouvelaere A-V., Ranchère D., Kurtz J-E., Bergerat J-P., Blay J-Y. (2012) *Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) exclusive nuclear staining: a predictive biomarker for IGF-1R monoclonal antibody (Ab) therapy in sarcomas*. European Journal of Cancer, 48(16), 3027-3035.

B

- Baillo** A., Giroux C., Ethier SP. (2011) *Knock-down of amphiregulin inhibits cellular invasion in inflammatory breast cancer*. *Journal of Cell Physiology*, 226(10), 2691-2701.
- Baldys** A., Gööz M., Morinelli T., Lee M., Raymond J. Jr, Luttrell L., Raymond J. Sr. (2009). *Essential role of c-Cbl in amphiregulin-induced recycling and signaling of the endogenous epidermal growth factor receptor*. *Biochemistry*, 48(7), 1462-1473.
- Barlesi** F., Mazieres J., Merlio JP., Debieuvre D., Mosser J., Lena H., Ouafik L., Besse B., Rouquette I., Westeel V., Escande F., Monnet I., et al. (2016) *Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT)*. *The Lancet*, 2016.
- Barnard** J., Graves-Deal R., Pitterlkow M., Dubois R., Cook P., Ramsay G., Bishop P., Damstrup L., Coffey R. (1994) *Auto- and cross-induction within the mammalian Epidermal Growth Factor-related peptide family*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22817-22822.
- Baserga** R. (2005) *The insulin-like growth factor-1 receptor as a target for cancer therapy*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 9(4), 753-768.
- Berasain** C., Garcia-Trevijano E., Castillo J., Erroba E., Santamaria M., Lee D., Prieto J., Avila M. (2005) *Novel role of amphiregulin in protection from liver injury*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 19012-19020.
- Berasain** C. and Avila M. (2014) *Amphiregulin*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28, 31-41.
- Billings** SD., Southall MD., Li T., Cook PW., Baldrige L., Moores WB., Spandau DF., Foley JG., Travers JB. (2003) *Amphiregulin overexpression results in rapidly growing keratinocytic tumors: an in vivo xenograft model of keratoacanthoma*. *The American Journal of Pathology*, 163, 2451-2458.
- Bitler** B., Goverdhan A., Schroeder J. (2010) *MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor*. *Journal of Cell Science*, 123, 1716-1723.
- Blivet-Van Eggelpoël** MJ., Chettouh H., Fartoux L., Aoudjehane L., Barbu V., Rey C., Priam S., Housset C., Rosmorduc O., Desbois-Mouthon C. (2012) *Epidermal growth factor*

- receptor and HER-3 restrict cell response to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells.* Journal of Hepatology, 57(1), 108-115.
- Boerner J., Demory M., Silva C., Parsons S. (2004)** *Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II.* Molecular and Cellular Biology, 24(16), 7059-7071.
- Bostwick DG., Qian J., Maihle NJ. (2004)** *Amphiregulin expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 93 cases.* Prostate, 58, 164-168.
- Bouter A., Carmeille R., Gounou C., Bouvet F., Degrelle SA., Evain-Brion D., Brisson AR. (2015)** *Review : Annexin-A5 and cell membrane repair.* Placenta, 36 (Suppl 1), S43-49.
- Brahmer J., et al. (2015)** *Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous cell non-small-cell lung cancer.* The New England Journal of Medicine, 373, 123-135.
- Brahmkhatri V., Prasanna C., Atreya H. (2014)** *Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies.* BioMed Research International, 2015, 538019.
- Brambilla E. and Gazdar A. (2009).** *Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies.* European Respiratory Journal, 33, 1485–1497.
- Brand TM., Iida M., Li C., Wheeler DL. (2011).** *The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and Its Role in Cancer.* Discovery Medicine, 12, 419-432.
- Brosseau S., Viala M., Varga A., Planchard D., Besse B., Soria JC. (2015)** *3rd generation's TKI in lung cancer non-small cell EGFR-mutated having acquired a secondary T790M resistance.* Bulletin du Cancer, 102(9), 749-757.
- Brown C., Meise K., Plowman G., Coffey R., Dempsey P. (1998)** *Cell surface Ectodomain cleavage of human amphiregulin precursor is sensitive to a métalloprotéase inhibitor. Release of a predominant N-glycosylated 43-kDa soluble form.* The Journal of Biological Chemistry, 273(27), 17258-17268.
- Buck E. and Mulvihill M. (2011)** *Small molecule inhibitors of the IGF-1R/IR axis for the treatment of cancer.* Expert Opinion on Investigational Drugs, 20(4), 605-621.
- Burgess A. (2008)** *EGFR family: structure physiology signaling and therapeutic targets.* Growth Factors, 26(5), 263-274.

- Busser B.**, Sancey L., Josserand V., Niang C., Favrot M-C., Coll J-L., Hurbin A. (2010a) *Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small cell lung cancers*. *Molecular Therapy*, 18, 528-535.
- Busser B.**, Sancey L., Josserand V., Niang C., Khochbin S., Favrot M-C., Coll J-L., Hurbin A. (2010b) *Amphiregulin promotes resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer cells by regulating Ku70 acetylation*. *Molecular Therapy*, 18, 536–543.
- Busser B.**, Sancey L., Brambilla E., Coll J-L., Hurbin A. (2011) *The multiple roles of amphiregulin in human cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1816, 119-131.

C

- Carpenter R.** and Lo H-W. (2012) *Dacomitinib, an emerging HER-targeted therapy for non-small cell lung cancer*. *Journal of Thoracic Disease*, 4(6), 639-642.
- Castillo J.**, Erroba E., Perugorria MJ., Santamaría M., Lee DC., Prieto J., Avila MA., Berasain C. (2006) *Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Research*, 66(12), 6129-6138.
- Cataldo V.**, Gibbons L., Pérez-Soler R., Quintas-Cardama A. (2011) *Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib*. *The New England Journal of Medicine*, 364, 947-955.
- Chang CJ.**, Yin PH., Yang DM., Wang CH., Hung WY., Chi CW., Wei YH., Lee HC. (2009) *Mitochondrial dysfunction-induced amphiregulin upregulation mediates chemoresistance and cell migration in HepG2 cells*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 1755-1765.
- Chang MH.**, Ahn HK., Lee J., Jung CK., Choi YL., Park YH., Ahn JS., Park K., Ahn MJ. (2011) *Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors*. *Cancer*, 117(1), 143-151.
- Che TF.**, Lin CW., Wu YY., Chen YJ., Han CL., Chang YL., Wu CT., Hsiao TH., Hong TM., Yang PC. (2015) *Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC*. *Oncotarget*, 6(35), 37349-37366.
- Choi H.** and Mazzone P. (2014). *Radon and lung cancer: Assessing and mitigating the risk*. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 81, 567-575.

- Chow J.**, Condorelli G., Smith R. (1998) *Insulin-like growth factor internalization regulates signaling via the Shc/mitogen-activated protein kinase pathway but not the insulin receptor substrate-1*. The Journal of Biological Chemistry, 273(8), 4672-4680.
- Ciardiello F.**, Kim N., Saeki T., Dono R., Persico MG., Plowman GD., Garrigues J., Radke S., Todaro GJ., Salomon DS. (1991) *Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors*. PNAS USA., 88, 7792-7796.
- Ciardiello F.** and Tortora G. (2008) *EGFR antagonists in cancer treatment*. The New England Journal of Medicine, 358, 1160-1174.
- Cohen S.**, Ushiro H., Stoscheck C., Chinkers M. (1982) *A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles*. The Journal of Biological Chemistry, 257(3), 1523-1531.
- Cohen V.**, Agulnik J.S., Ang C., Kasymjanova G., Batist G., Small D., Brandao G., Chong G., and Miller W.H. (2010). *Epidermal growth factor receptor mutations detected by denaturing high-performance liquid chromatography in non-small cell lung cancer*. Cancer, 116, 4309-4317.
- Cook PW.**, Pittelkow MR., Keeble WW., Graves-Deal R., Coffey RJ. Jr., Shipley GD. (1992) *Amphiregulin messenger RNA is elevated in psoriatic epidermis and gastrointestinal carcinomas*. Cancer Research, 52, 3224-3227.
- Cortot A.**, Younes M., Martel-Planche G., Guibert B., Isaac S., Souquet P-J., Commo F., Girard P., Fouret P., Brambilla E., Soria JC. (2014a). *Mutation of TP53 and Alteration of p14Arf Expression in EGFR- and KRAS-Mutated Lung Adenocarcinomas*. Clinical Lung Cancer, 15, 124-130.
- Cortot A.** and Jänne P. (2014b) *Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas*. European Respiratory Review, 23, 356-366.
- Cortot A.**, Repellin CE., Shimamura T., Capelletti M., Zejnullahu K., Ercan D., Christensen JG., Wong KK., Gray NS., Jänne P. (2013) *Resistance to irreversible EGF receptor tyrosine kinase inhibitors through a multistep mechanism involving the IGF1R pathway*. Cancer Research, 73(2), 834-843.
- Crawford J.**, Swanson P., Schwarzenberger P., Sandler A., Prager D., Zhang K., Freeman DJ., Johnson CW., Krishnan K., Johnson D. (2013) *A phase 2 randomized trial of paclitaxel and carboplatin with or without panitumumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer*. Journal of Thoracic Oncology, 8(12), 1510-1518.

Cross D., Ashton S., Ghiorghiu S., Eberlein C., Nebhan C. (2014) *AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer*. *Cancer Research*, 4, 1046-1061.

D

Da Cunha Santos G., Shepherd F., Tsao MS. (2011) *EGFR mutations and lung cancer*. *Annual Review of Pathology Mechanisms Disease*, 6, 49-69.

Dahabreh IJ., Linardou H., Kosmidis P., Bafaloukos D., Murray S. (2011) *EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer*. *Annals of Oncology*, 22(3), 545-552.

Dang M., Armbruster N., Miller M., Cermenó E., Hartmann M., Bell G., Root D., Lauffenburger D., Lodish H., Herrlich A. (2013) *Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways*. *PNAS*, 110(24), 9776-9781.

D'Antonio A., Losito S., Pignata S., Grassi M., Perrone F., De Luca A., Tambaro R., Bianco C., Gullick WJ., Johnson GR., Iaffaioli VR., Salomon DS., Normanno N. (2002) *Transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 are frequently expressed in advanced human ovarian carcinomas*. *International Journal of Oncology*, 21, 941-948.

Daydé D., Guérard M., Perron P., Barial C., Eymin B., Gazzeri S. (2015) *Nuclear trafficking of EGFR by Vps34 represses ARF expression to promote lung tumor cell survival*. *Oncogene*, 2015 dec 21.

De Angelis Campos AC., Rodrigues MA., De Andrade C., De Goes AM., Nathanson MH., Gomes DA. (2011). *Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412, 341–346.

Dela Cruz CS., Tanoue LT., Matthay RA. (2011) *Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention*. *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), 605-44.

Demory M., Boerner J., Davidson R., Faust W., Miyake T., Lee I., Hüttmann M., Douglas R., Haddad G., Parsons S. (2009) *Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36592-36604.

- Denduluri S.**, Idowu O., Wang Z., Liao Z., Yan Z., Mohammed M., Ya J., Wei Q., Wang J., Zhao L., Luu H. (2015) *Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance*. *Genes & Diseases*, 2(1), 13-25.
- Deng H.**, Lin Y., Badin M., Vasilcanu D., Strömberg T., Jernberg-Wiklund H., Sehat B., Larsson O. (2011) *Over-accumulation of nuclear IGF-1 receptor in tumor cells requires elevated expression of the receptor and the SUMO-conjugating enzyme Ubc9*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404, 667-671.
- Desbois-Mouthon C.**, Cacheux W., Blivet-Van Eggelpoël M., Barbu V., Fartoux L., Poupon R., Housset C., Rosmorduc O. (2006) *Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib*. *International Journal of Cancer*, 119(11), 2557-2566.
- Desbois-Mouthon C.**, Baron A., Blivet-Van Eggelpoël M., Fartoux L., Venot C., Bladt F., Housset C., Rosmorduc O. (2009) *Insulin-like factor-1 receptor inhibition induces a resistance mechanism via the epidermal Growth Factor receptor/HER3/AKT signaling pathway : rational basis for cotargeting insulin-like growth factor-1 receptor and epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma*. *Clinical Cancer Research*, 15(17), 5445-5456.
- Doebele R.**, Piling A., Aisner D., Kutateladze T., Le A., Weickhardt AJ., Kondo KL., Linderman DJ., Heasley LE., Franklin WA., Varella-Garcia M., Camidge DR. (2012) *Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer*. *Clinical Cancer Research*, 18(5), 1472-1482.
- Doll R.** and Hill A. (1950) *A study of the aetiology of carcinoma of the lung*. *British Medical Journal*, 2, 740-748.
- Dreyer C.**, Raymond E., Faivre S. (2009) *PI3K/AKT/mTOR signaling pathway*. *Cancéro Digest*, 1(3), 187-189.
- Du Y.**, Shen J., Hs, JL., Han Z., Hsu M-C., Yang C-C., Kuo H-P., Wang Y-N., Yamaguchi H., Miller SA., Hung M-C. (2014). *Syntaxin 6-mediated Golgi translocation plays an important role in nuclear functions of EGFR through microtubule-dependent trafficking*. *Oncogene*, 33, 756-770.
- Dziadziuszko R.**, Merrick DT., Witta SE., Mendoza AD., Szostakiewicz B., Szymanowska A., Rzyman W., Dziadziuszko K., Jassem J., Bunn PA. Jr., Varella-Garcia M., Hirsch FR. (2010) *Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) gene copy number is associated with survival in operable non-small-cell lung cancer: a comparison*

between *IGF1R* fluorescent in situ hybridization, protein expression, and mRNA expression. *Journal of clinical oncology*, 28(13), 2174-2180.

E

- Ebert M.**, Yokoyama M., Kobrin MS., Friess H., Lopez ME., Buchler MW., Johnson GR., Korc M. (1994) *Induction and expression of amphiregulin in human pancreatic cancer*. *Cancer Research*, 54, 3959-3962.
- Eckstein N.**, Servan K., Girard L., Cai D., Von Jonquieres G., Jaehde U., Kassack M., Gazdar A., Minna J., Royer H-D. (2008) *Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 739-750.
- El-Zammar OA.**, Zhang S., Katzenstein AL. (2009) *Comparison of FISH, PCR, and immunohistochemistry in assessing EGFR status in lung adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic features*. *Diagnostic Molecular Pathology*, 18(3), 133-137.
- Engelman J.**, Zejnullahu K., Mitsudomi T. Song Y., Hyland C., Park JO., Lindeman N., Gale CM., Zhao X., Christensen J., Kosaka T., Holmes AJ., Rogers AM., Cappuzzo F., Mok T., Lee C., Johnson BE., Cantley LC., Jänne PA. (2007) *MET amplification leads to Gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. *Sciences*, 316, 1039-1043.
- ESMO/FAC** European Society for Medical Oncology/Fonds AntiCancer (2014) *Cancer du poumon non à petites cellules*. ESMO/FAC Patient Guide Series.

F

- Fiala O.**, Pesek M., Finek J., Minarik M., Benesova L., Sorejs O., Svaton M., Bortlicek Z., Kucera R., Topolcan O. (2016) *Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification in Patients with Advanced-stage NSCLC*. *Anticancer Research*, 36(1), 455-460.
- Fontanini G.**, De Laurentiis M., Vignati S., Chine S., Lucchi M., Silvestri V., Mussi A., De Placido S., Tortora G., Bianco AR., Gullick W., Angeletti CA., Bevilacqua G., Ciardiello F. (1998) *Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small*

cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. Clinical Cancer Research, 4(1), 241-249.

- Frasca F.**, Pandini G., Sciacca L., Pezzino V., Squatrito S., Belfiore A., Vigneri R. (2008) *The role of insulin receptors and IGF-1 receptors in cancer and other diseases.* Archives of Physiology and Biochemistry, 114(1), 23-37.
- Fukuda S.**, Nishida-Fukuda H., Nakayama H., Inoue H., Higashiyama S. (2012) *Monoubiquitinylation of pro-amphiregulin regulates its endocytosis and ectodomain shedding.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 420(2), 315-320.
- Funatomi H.**, Itakura J., Ishiwata T., Pastan I., Thompson SA., Johnson GR., Korc M. (1997) *Amphiregulin antisense oligonucleotide inhibits the growth of T3M4 human pancreatic cancer cells and sensitizes the cells to EGF receptor-targeted therapy.* International Journal of Cancer, 72(3), 512-517.

G

- Gasiorowski JZ.** and Dean DA. (2003) *Mechanisms of nuclear transport and interventions.* Advanced Drug Delivery Reviews, 55(6), 703-716.
- Gerke V.** and Moss SE. (2002) *Annexins : from structure to function.* Physiological Reviews, 82(2), 331-371.
- Gerke V.**, Creutz CE., Moss SE. (2005) *Annexins : linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics.* Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 6(6), 449-461.
- Girnita L.**, Girnita A., Larsson O. (2003) *Mdm2-dependent ubiquitinylation and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor.* PNAS USA, 100(14), 8247-8252.
- Girnita L.**, Shenoy S., Sehat B., Vasilcanu R., Girnita A., Lefkowitz R., Larsson O. (2005a) *β -arrestin is crucial for ubiquitinylation and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase.* The Journal of Biological Chemistry, 280(26), 24412-24419.
- Girnita L.**, Shenoy S., Sehat B., Vasilcanu R., Vasilcanu D., Girnita A., Lefkowitz R., Larsson O. (2005b) *β -arrestin and Mdm2 mediate IGF-1 Receptor-stimulated ERK activation and cell cycle progression.* The Journal of Biological Chemistry, 282(15), 11329-11338.
- Goldstraw P.**, Chansky K., Crowley J., Rami-Porta R., Asamura H., Eberhardt W., Nicholson A., Groome P., Mitchell A., Bolejack V. (2015) *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming*

(Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1), 39-51.

Gong Y., Yao E., Shen R., Goel A., Arcila M., Teruya-Feldstein J., Zakowski M., Frankel S., Peifer M., Thomas R., Ladanyi M., Pao W. (2009) *High expression levels of total IGF-1R and sensitivity of NSCLC cells in vitro to an anti-IGF-1R antibody (R1507)*. *PLoS ONE*, 4(10), e7273, 1-11.

Goto Y., Sekine I., Tanioka M., Shibata T., Tanai C., Asahina H., Nokihara H., Yamamoto N., Kunitoh H., Ohe Y., Kikkawa H., Ohki E., Tamura T. (2012) *Figitumumab combined with carboplatin and paclitaxel in treatment-naive japanesepatients with advanced non-small cell lun cancer*. *Investigational New Drugs*, 30, 1548-1556.

Gualberto A. (2010) *Figitumumab (CP-751,871) for cancer therapy*. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(4), 575-585.

H

Haisa M. (2013) *The type I insulin-like growth factor receptor signaling system and targeted tyrosine kinase inhibition in cancer*. *Journal of International Medical Research*, 41(2), 253-264.

Han S., Bai E., Jin G., He C., Guo X., Wang L., Li M., Ying X., Zhu Q. (2014) *Expression and clinical significance of YAP, TAZ, and Areg in hepatocellular carcinoma*. *Journal of Immunology Research*, 2014, 261365-261375.

Han W. and Lo H-W. (2012). *Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations*. *Cancer Letters*, 318, 124-134.

Hanada N., Lo H-W., Day C-P., Pan Y., Nakajima Y., Hung M-C. (2006). *Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor*. *Molecular Carcinogenesis*. 45, 10-17.

Hanahan D. and Weinberg R. (2000) *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 100, 57-70.

Hanahan D. and Weinberg R. (2011) *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 100, 57-70.

Hansel DE., Rahman A., Hidalgo M., Thuluvath PJ., Lillemoe KD., Shulick R., Ku JL., Park JG., Miyazaki K., Ashfaq R., Wistuba II., Varma R., Hawthorne L., Geradts J., Argani P., Maitra A. (2003) *Identification of novel cellular targets in biliary tract cancers using global gene expression technology*. *The American Journal of Pathology*, 163, 217-229.

- Harel A., Forbes DJ. (2004)** *Importin beta : conducting a much larger cellular symphony.* Molecular Cell. 16(3), 319-330.
- HAS (2009)** Commission de la transparence, Avis du 13 mai 2009. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-09/erbitux_-_ct-6366.pdf
- HAS (2013)** *Cancers broncho-pulmonaires, guide de parcours de soin.* http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-10/guide_k_bronchopulmonaires_finalweb_091013.pdf
- HAS (2014)** *AMM afatinib, commission de transparence.* http://www.boehringer-ingenelheim.fr/content/dam/internet/opu/fr_FR/documents/produits/AT/CT-13272_GIOTRIF_PIC_INS_Avis2_CT13272.pdf
- Herbst RS., Heymach JV., Lippman SM. (2008)** *Lung cancer.* The New England Journal of Medicine, 359,1367-80.
- Higashiyama S., Nanba D., Nakayama H., Inoue H., Fukuda S. (2011)** *Ectodomain shedding and remnant peptide signalling of EGFRs and their ligands.* The Journal of Biochemistry, 150(1), 15-22.
- Hill R., Cautain B., De Pedro N., Link W. (2013)** *Targeting nucleocytoplasmic transport in cancer therapy.* Oncotarget, 5(1), 11-28.
- Hirsch FR., Varella-Garcia M., Bunn PA., Di Maria MV., Veve R., Bremmes RM., Barón AE., Zeng C., Franklin WA. (2003)** *Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis.* Journal of Clinical Oncology, 21, 3798-3807.
- Hirsch FR., Varella-Garcia M., Cappuzzo F., McCoy J., Bemis L., Xavier AC., Dziadziuszko R., Gumerlock P., Chansky K., West H., Gazdar AF., Crino L., Gandara DR., Franklin WA., Bunn PA. Jr. (2007).** *Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib.* Annals of Oncology, 18, 752-760.
- Hirsch FR., Varella-Garcia M., Dziadziuszko R., Xiao Y., Gajapathy S., Skokan M., Lin M., O'Neill V., Bunn P. (2008)** *Fluorescence in situ Hybridization subgroup analysis of TRIBUTE, a phase III trial of erlotinib plus carboplatin and paclitaxel in non-small-cell lung cancer.* Cancer therapy: Clinical, 14, 6317-6323.
- Hirsch FR., Jänne PA., Eberhardt WE., Cappuzzo F., Thatcher N., Pirker R., Choy H., Kim ES., Paz-Ares L., Gandara DR., Wu YL., Ahn MJ., Mitsudomi T., Shepherd FA., Mok TS. (2013)** *Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer : status 2012.* Journal of Thoracic Oncology, 8(3), 373-384.

- Hirsh V. (2015)** *Next-Generation Covalent Irreversible Kinase Inhibitors in NSCLC: Focus on Afatinib*. *BioDrugs*, 29, 167-183.
- Hrustanovic G., Lee B., Bivona T. (2013)** *Mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies*. *Cancer Biology & Therapy*, 14(4), 304-314.
- Huang L. and Fu L. (2015)** *Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 390-401.
- Huang W-C., Chen Y-J., Li L-Y., Wei Y-L., Hsu S-C., Tsai S-L., Chiu P-C., Huang W-P., Wang Y-N., Chen C-H. (2011)**. *Nuclear translocation of Epidermal Growth Factor Receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in Gefitinib-resistant cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 20558-20568.
- Hubert P. (2006)** *Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs*. *Bulletin du Cancer*, hors série, 17-24.
- Hung L-Y., Tseng JT., Lee Y-C., Xia W., Wang Y-N., Wu M-L., Chuang Y-H., Lai C-H., Chang W-C. (2008)**. *Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression*. *Nucleic Acids Research*, 36, 4337-4351.
- Hurbin A., Dubrez L., Coll J-L., Favrot M-C. (2002)** *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*, 277, 49127-49133.
- Hurbin A., Coll J-L., Dubrez-Daloz L., Mari B., Auberger P., Brambilla C., Favrot M-C. (2005)** *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 Biochemistry*, 280(20), 19757-19767.
- Hurbin A., Wislez M., Busser B., Antoine M., Tenaud C., Rabbe N., Dufort S., De Fraipont F., Moro-Sibilot D., Cadranel J., Coll J-L., Brambilla E. (2011)** *Insulin-like Growth Factor-1 Receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma*. *The Journal of Pathology*, 225, 83-95.

I

- Iams W. and Lovly M. (2015)** *Molecular pathways : clinical applications and future directions of insulin-like growth factor-1 receptor pathway blockade*. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4270-4277.

- Ichikawa W.**, Terashima M., Ochiai A., Kitada K., Kurahashi I., Sakuramoto S., Katai H., Sano T., Imamura H., Sasako M. (2016) *Impact of Insulin-like Growth Factor-1 receptor and Amphiregulin expression on survival in patients with stage II/III gastric cancer enrolled in the adjuvant chemotherapy trial of S-1 for Gastric Cancer*. Gastric Cancer.
- Ihle N.**, Byers L., Kim E., Saintigny P., Lee J., Blumenschein G., Tsao A., Liu S., Larsen J., Wang J., Diao L., Coombes K., Chen L., Zhang S., Abdelmelek M., Tang X., Papadimitrakopoulou V., Minna J., Lippman S., Hong W., Herbst R., Wistuba I., Heymach J., Powis G. (2012) *Effect of K-RAS oncogene substitutions on protein behavior : implications for signaling and clinical outcome*. Journal of the National Cancer Institute, 104(3), 228-239.
- Iida M.**, Brand TM., Campbell DA., Li C., Wheeler DL. (2013) *Yes and Lyn play a role in nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor*. Oncogene, 32(6), 759-767.
- INCa (2010)** *Cancer du poumon, prise en charge thérapeutique du cancer du poumon non à petites cellules*. Synthèse des recommandations.
- Ishikawa N.**, Daigo Y., Takano A., Taniwaki M., Kato T., Hayama S., Murakami H., Takeshima Y., Inai K., Nishimura H., Tsuchiya E., Kohno N., Nakamura Y. (2005) *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 Research, 65(20), 9176-9184.
- Isokane M.**, Hieda M., Hirakawa S., Shudou M., Nakashiro K., Hashimoto K., Hamakawa H., Higashiyama S. (2008) *Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription*. Journal of Cell Science, 121, 3608-3618.

J

- Jackman D.**, Pao W., Riely G., Engelman J., Kris M., Jänne P., Lynch T., Johnson E., Miller V. (2009) *Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer*. Journal of Clinical Oncology, 28(2), 357-360.

- Jaganathan S.**, Yue P., Paladino D.C., Bogdanovic J., Huo Q., Turkson J. (2011). *A functional nuclear Epidermal Growth Factor Receptor, Src and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells*. PLoS ONE, 6, e19605.
- Jänne PA.** and Johnson B (2006) *Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors*. Clinical Cancer Research, 12, 4416-4420.
- Jänne PA.**, Yang JC., Kim DW., Planchard D., Ohe Y., Ramalingam SS., Ahn MJ., Kim SW., Su WC., Horn L., Haggstrom D., Felip E., Kim JH., Frewer P., Cantarini M., Brown KH., Dickinson PA., Ghiorghiu S., Ranson M. (2015) *AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small cell lung cancer*. The New England Journal of Medicine, 372(18), 1689-1699.
- Jeannot V.**, Busser B., Brambilla E., Wislez M., Robin B., Cadranel J., Coll J-L., Hurbin A. (2014) *The PI3K/AKT pathway promotes gefitinib resistance in mutant KRAS lung adenocarcinoma by a deacetylase-dependent mechanism*. International Journal of Cancer, 134, 2560-2571.
- Jin G.**, Kim MJ., Jeon H-S., Choi JE., Kim DS., Lee EB., Cha SI., Yoon GS., Kim CH., Jung TH, Park J. (2010). *PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers*. Lung Cancer, 69, 279–283.
- Jin M.**, Buck E., Mulvihill M. (2013) *Modulation of insulin-like growth factor-1 receptor and its signaling network for the treatment of cancer : current status and future perspectives*. Oncology Reviews, 7(e3), 12-23.
- John T.**, Lu G., Tsao M-S. (2009) *Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors*. Oncogene, 28, S14-S23.
- Johnson GR.**, Saeki T., Gordon AW., Shoyab M., Salomon DS., Stromberg K. (1992) *Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon*. The Journal of Cell Biology, 118(3), 741-751.
- Jones S.** and Rappoport J. (2014) *Interdependent epidermal growth factor receptor signaling and trafficking*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 51, 23-28.

Jorissen R., Walker F., Pouliot N., Garrett T., Ward C., Burgess A. (2003) *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling*. Experimental Cell Research, 284, 31-53.

K

Kakiuchi S., Daigo Y., Ishikawa N., Furukawa C., Tsunoda T., Yano S., Nakagawa K., Tsuruo T., Kohno N., Fukuoka M., Sone S., Nakamura Y. (2004) *Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839)*. Human Molecular Genetics, 13(24), 3029-3043.

Kim J-S., Kim E., Liu D., Lee J., Behrens C., Lippman S., Hong WK., Wistuba I., Lee E., Lee H-Y. (2015) *Activation of insulin-like growth factor 1 receptor in patients with non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 6(18), 16746-16756.

Kim YH., Sumiyoshi S., Hashimoto S., Masago K., Togashi Y., Sakamori Y., Okuda C., Mio T., Mishima M. (2012a) *Expressions of insulin-like growth factor receptor-1 and insulin-like growth factor binding protein 3 in advanced non small-cell lung cancer*. Clinical Lung Cancer, 13(5), 385-90.

Kim YW., Prudkin L., Feng L., Kim ES., Hennessy B., Lee JS., Lee JJ., Glisson B., Lippman SM., Wistuba II., Hong WK., Lee HY. (2012b) *Epidermal growth factor receptor and K-Ras mutations and resistance of lung cancer to insulin-like growth factor 1 receptor tyrosine kinase inhibitors*. Cancer, 118(16), 3993-4003.

Kosugi S., Hasebe M., Entani T., Takayama S., Tomita M., Yanagawa H. (2008) *Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling*. Chemistry & Biology, 15(9), 940-949.

Kuo HY., Chen YC., Chang HY., Jeng JC., Lin EH., Pan CM., Chang YW., Wang ML., Chou YT., Shih HM., Wu CW. (2013) *The PML isoform IV is a negative regulator of nuclear EGFR's transcriptional activity in lung cancer*. Carcinogenesis, 34(8), 1708-1716.

L

Lams W. and Lovly C. (2015) *Molecular pathways: clinical applications and future direction of insulin-like growth factor-1 receptor pathway blockade*. Clinical Cancer Research, 21(19), 4270-4277.

- Langer C.**, Besses B., Gualberto A., Brambilla E., Soria J.C. (2010) *The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer*. Journal of Clinical Oncology, 28(36), 5311-5320.
- Langer C.**, Novello S., Park K., Krzakowski M., Karp DD., Mok T., Benner RJ., Scranton JR., Olszanski AJ., Jassem J. (2014) *Randomized, phase III trial of first-line figitumumab in combination with paclitaxel and carboplatin versus paclitaxel and carboplatin alone in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. Journal of Clinical Oncology, 32(19), 2059-2066.
- Lantuéjoul S.**, Salameire D., Brambilla E. (2011) *Evolution des la classification histologique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules*. La letter du Cancérologue, XX(6), 376-381.
- Le Faou AL.** and Scemama O. (2005). *Epidemiology of tobacco smoking*. Revue des Maladies Respiratoires, 22, 8S27-32.
- Lee Y.**, Wang Y., James M., Jeong JH., You M. (2015) *Inhibition of IGF1R signaling abrogates resistance to afatinib (BIBW2992) in EGFR T790M mutant lung cancer cells*. Molecular Carcinogenesis, 2015.
- Lemjabbar-Alaoui H.**, Sukhvinder S., Mengistab A., Gallup M., Basbaum C. (2011) *TACE/ADAM17 phosphorylation by PKC-epsilon mediates premalignant changes in tobacco smoke-exposed lung cells*. PLoS ONE, 6(3), e17489.
- Li C.**, Iida M., Dunn EF., Ghia AJ., Wheeler DL. (2009) *Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab*. Oncogene, 28, 3801-3813.
- Li S.**, Schmitz K., Jeffrey P., Wiltzius J., Kussie P., Ferguson K. (2005) *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab*. Cancer Cell, 7, 301-311.
- Li W.**, Deng J., Tang JX. (2014) *Combined effects methylation of FHIT, RASSF1A and RARβ genes on non-small cell lung cancer in the Chinese population*. Asian Pacific Journal of cancer Prevention, 15(13), 5233-5237.
- Liang Z.**, Zhang J., Zeng X., Gao J., Wu S., Liu T. (2010) *Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas*. BMC Cancer, 10(376).
- Liccardi G.**, Hartley J., Hochhauser D. (2011) *EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment*. Cancer Research, 71(3), 1103-1114.

- Lin L.** and Bivona T.G. (2012). *Mechanisms of resistance to Epidermal Growth Factor Receptor inhibitors and novel therapeutic strategies to overcome resistance in NSCLC patients*. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012, e817297.
- Lin S-Y.**, Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong KY., Bourguignon L., Hung M-C. (2001). *Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor*. *Nature Cell Biology*, 3, 802-808.
- Lo H-W.**, Hsu S-C., Ali-Seyed M., Gunduz M., Xia W., Wei Y., Bartholomeusz G., Shih J-Y., Hung M-C. (2005). *Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway*. *Cancer Cell*, 7, 575-589.
- Lo H-W.**, Ali-Seyed M., Bartholomeusz G., Hsu S-C., Hung M-C. (2006) *Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin β 1 and CRM1*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 1570-1583.
- Lo H-W.**, Cao X., Zhu H., Ali-Osman F. (2010). *Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes*. *Molecular Cancer Research*, 8, 232-245.
- Longva K.**, Blystad F., Stang E., Larsen A., Johannessen L., Madshus I. (2002) *Ubiquitinylation and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to the inner membranes of multivesicular bodies*. *Journal of Cellular Biology*, 156, 843-854.
- Lopaczynski W.** (1999) *Differential regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I*. *Acta Biochimica Polonica*, 46(1), 51-60.
- Lopes G.**, De Queiros Vattimo F., De Castro Junior G. (2015) *Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer*. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 41(4), 365-375.
- Losanno T.**, Rossi A., Maione P., Napolitano A., Gridelli C. (2016) *Anti-EGFR and antiangiogenic monoclonal antibodies in metastatic non-small-cell lung cancer*. *Expert Opinion on Biological Therapy*.
- Lu Y.**, Zhao Y., Mascarenhas D., Pollak M. (2001) *Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)*. *Journal of National Cancer Institute*, 93(24), 1852-1857.
- Ludovini V.**, Bellezza G., Pistola L., Bianconi F., DiCarlo L., Sidoni A., Semeraro A., DelSordo R., Tofanetti FR., Mameli MG., Daddi G., Cavaliere A., Tonato A., Crino L. (2009) *High coexpression of both insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with shorter disease-free*

survival in resected non-small-cell lung cancer patients. *Annals of Oncology*, 20, 842-849.

- Ludovini V.**, Flacco A., Bianconi F., Ragusa M., Vannucci J., Bellezza G., Chiari R., Minotti V., Pistola L., Tofanetti FR., Siggillino A., Baldelli E., Sidoni A., Daddi N., Puma F., Varella-Garcia M., Crino L. (2013) *Concomitant high gene copy number and protein overexpression of IGF1R and EGFR negatively affect disease-free survival of surgically resected non-small-cell-lung cancer patients*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71, 671-680.
- Luo S.** and Lam D. (2013) *Oncogenic driver mutations in lung cancer*. *Translational Respiratory Medicine*, 1, 6-14.

M

- MacDonald-Obermann JL.** and Pike LJ. (2014) *Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimère and hétérodimère formation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(38), 26178-26188.
- Madshus IH.** and Spang E. (2009) *Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking*. *Journal of Cell Sciences*, 122, 3433-3439.
- Mano H.** (2008) *Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer*. *Cancer Science*, 99(12), 2349-2355.
- Masters G.**, Temin S., Azzoli C., Giaccone G., Baker S., Brahmer J., Ellis P., Gajra A., Rackear N., Schiller J., Smith T., Strawn J., Trent D., Johnson D. (2015) *Systemic therapy for stage IV NSCLC: American Society of Clinical Oncology clinical guideline update*. *Journal of Clinical Oncology*, 33(30), 3488-3515.
- Mattheyses A.**, Sanford S., Rappoport J. (2010) *Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist*. *Journal of Cell Science*, 123, 3621-3628.
- Mills I.** (2012) *Nuclear translocation and functions of growth factor receptors*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23, 165-171.
- Mogi A.** and Kuwano H. (2011) *TP53 mutations in non small cell lung cancer*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, ID 583929.

- Mok T.**, Wu Y., Thongprasert S., Yang C., Chu D., Saijo N., Sunpaweravong P., Han B., Margono B., Ichinose Y., Nishiwaki Y., Ohe Y., Yang J., Chewaskulyong B., Jiang H., Duffield E., Watkins C., Armour A., Fukuoka M. (2009) *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. The New England Journal of Medicine, 361(10), 947-957.
- Monami G.**, Emiliozzi V., Morrione A. (2008) *Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitinylation of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization*. Journal of Cellular Physiology, 216(2), 426-437.
- Morcavallo A.**, Stefanello M., Iozzo R., Belfiore A., Morrione A. (2014) *Ligand-mediated endocytosis and trafficking of the insulin-like growth factor receptor I and insulin receptor function*. Frontiers in Endocrinology, 5(220), 1-7.
- Morgillo F.**, Woo J.K., Kim E., Hong W.K., Lee H-Y. (2006) *Heterodimerization of Insulin-like Growth Factor Receptor/Epidermal Growth Factor Receptor and induction of Survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib*. Cancer Research, 66, 10100-10111.
- Morgillo F.**, Kim W-Y., Kim E., Ciardiello F., Hong WK., Lee H-Y. (2007) *Implication of the Insulin-like Growth Factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with Gefitinib*. Clinical Cancer Research, 13, 2795-2803.
- Mullooly M.**, McGowan P., Crown J., Duffy MJ. (2016) *The ADAMs family of proteases as targets for the treatment of cancer*. Cancer Biology & Therapy, Apr 26:0.
- Mulvihill M.**, Cooke A., Rosenfeld-Franklin M., Buck E., Foreman K., Landfair D., O'Connor M., Pirritt C., Sun Y., Yao Y., Arnold L., Gibson N., Ji Q-S. (2009) *Discovery of OSI-906 : a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor*. Future Medicinal Chemistry, 1(6), 1153-1171.

N

- Nakayama H.**, Fukuda S., Inoue H., Nishida-Fukuda H., Shirakata Y., Hashimoto K., Higashiyama S. (2012) *Cell surface annexins regulate ADAM-mediated ectodomain shedding of proamphiregulin*. Molecular Biology of the Cell, 23(10), 1964-1975.
- Ng KP.**, Hillmer AM., Chuah CT., Juan WC., Ko TK., Teo AS., Ariyaratne PN., Takahashi N. (2012) *A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer*. Nature Medicine, 18(4), 521-528.

Normanno N., Kim N., Wen D., Smith K., Harris AL., Plowman G., Colletta G., Ciardiello F., Salomon DS. (1995) *Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas*. Breast Cancer Research and Treatment, 35, 293-297.

O

O-Charoenrat P., Rhys-Evans P., Eccles S. (2000) *Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells*. International Journal of Cancer, 88, 759–765.

Olivier M., Petitjean A., Marcel V., Pétré A., Mounawar M., Plymoth A., Fromentel C., Hainaut P. (2009) *Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective*. Cancer Gene Therapy, 16, 1-12.

OMS, Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (2013) *Dernières statistiques mondiales sur le cancer*. Communiqué de presse N°223.

Ou S-H. (2012) *Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): A better mousetrap? A review of the clinical evidence*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 83, 407-421.

Oxnard G. (2016) *The cellular origins of drug resistance in cancer*. Nature Medicine, 22(3), 232-234.

P

Packham S., Warsito D., Lin Y., Karlsson R., Sehat B., Larsson O. (2015) *Nuclear translocation of IGF-1R via p150Glued and an importin- β /RanBP2-dependent pathway in cancer cells*. Oncogene, 34, 2227-2238.

Panani AD., Roussos C. (2006) *Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer*. Cancer Letters, 239(1), 1-9.

Pao W., Wang TY., Riely GJ., Miller VA., Pan Q., Ladanyi M., Zakowski MF., Heelan RT., Kris MG., Varmus HE. (2005) *KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib*. PLoS Medicine, 2(1), e17, 57-61.

Pao W. and Chmielecki J. (2010). *Rational, biologically based treatment of EGFR- mutant non-small-cell lung cancer*. Nature Reviews Cancer, 10, 760-774.

- Pao W.** and Hutchinson KE. (2012). *Chipping away at the lung cancer genome*. Nature Medicine, 18, 349-351.
- Park JH.**, Choi YJ., Kim SY., Lee JE., Sung KJ., Park S., Kim WS., Song JS., Choi CM., Sung YH., Rho JK., Lee JC. (2016) *Activation of the IGF1R pathway potentially mediates acquired resistance to mutant-selective 3rd-generation EGF receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2016.
- Pastrana E.** (2011) *Optogenetics : controlling cell function with light*. Nature Methods, 8(1), 24-25.
- Peled N.**, Wynes M., Ikeda N., Ohira T., Yoshida K., Qian J., Ilouze M., Brenner R., Kato Y., Mascaux C., Hirsch F. (2013) *Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a biomarker for resistance to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer*. Cellular Oncology, 36, 277-288.
- Peschard P.** and Park M. (2003) *Escape from Cbl-mediated downregulation: A recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases*. Cancer Cell, 3, 519-523.
- Peto R.** (1986). *Influence of dose and duration of smoking on lung cancer rates*. IARC Scientific Publications, 23-33.
- Pirker R.**, Pereira J.R., Von Pawel J., Krzakowski M., Ramlau R., Park K., De Marinis F., Eberhardt W.E., Paz-Ares L., Störkel S., Schumacher K-M., Von Heydebreck A, Celik I., O'Byrne K. (2012). *EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study*. The Lancet Oncology, 13, 33-42.

Q

- Quoix E.** and Lemarié E. (2011) *Epidemiological novelties in lung cancer*. Revue des Maladies Respiratoires, 28, 1048-1058.

R

- Ramalingam S.**, Spigel D., Chen D., Steins M., Engelman J., Schneider C-P., Novello S., Eberhardt W., Crino L., Habben K., Liu L., Jänne P., Brownstein C., Reck M. (2011) *Randomized phase II study of Erlotinib in combination with placebo or R1507, a*

- monoclonal antibody to insulin-like growth factor-1 receptor, for advanced-stage non small-cell lung cancer*. Journal of Clinical Oncology, 29(34), 4574-4580.
- Rami-Porta R., Asamura H., Goldstraw P. (2015)** *Predicting the prognosis of lung cancer: the evolution of tumor, node and metastasis in the molecular age – challenge and opportunities*. Translational Lung Cancer Research, 4(4), 415-423.
- Remon J., Morán T., Majem M., Reguart N., Dalmau E., Márquez-Medina D., Lianes P. (2014)** *Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a new era begins*. Cancer Treatment Reviews, 40, 93-101.
- Riedemann J. and Macauley VM. (2006)** *IGF1R signaling and its inhibition*. Endocrine-Related Cancer, 13, S33-S43.
- Roberts P., Stinchcombe T., Der C., Socinski M. (2010)** *Personalized medicine in non-small-cell lung cancer : is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy ?* Journal of Clinical Oncology, 28(31), 4769-4777.
- Robertson D., Zhu M., Wu Y-C. (2012)** *Cellular distribution of the IGF-1R in corneal epithelial cells*. Experimental Eye Research, 94(1), 179-186.
- Romanelli R., LeBeau A., Fumer C., Lazzarino D., Hochberg A., Wood T. (2007)** *Insulin-like growth factor type-I receptor internalization and recycling mediate the sustained phosphorylation of Akt*. The Journal of Biological Chemistry, 282(31), 22513-22524.
- Rosell R., Moran T., Queralt C., Porta R., Cardenal F., Camps C., Majem M., Lopez-Vivanco G., Isla D., Provencio M., Insa A., Massuti B., Gonzalez-Larriba JL., Paz-Ares L., Bover I., Garcia-Campelo R., Moreno MA., Catot S., Rolfo C., Reguart N., Palmero R., Sánchez JM., Bastus R., Mayo C., Bertran-Alamillo J., Molina MA., Sanchez JJ., Taron M. (2009)** *Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. The New England Journal of Medicine, 361(10), 958-967.
- Roskoski R. (2014)** *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. Pharmacological Research, 79, 34-74.

S

- Sachdev D. and Yee D. (2007)** *Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy*. Molecular Cancer Therapeutics, 6(1), 1-12.

- Saeki M.**, Egusa H., Kamano Y., Kakihara Y., Houry WA., Yatani H., Noguchi S., Kamisaki Y. (2013) *Exosome-bound WD repeat protein Monad inhibits breast cancer cell invasion by degrading amphiregulin*. PLoS One, 8(7), e67326.
- Salomon D.**, Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. (1995) *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 19(3), 183-232.
- Sarfstein R.**, Pasmanik-Chor M., Yeheskel A., Edry L., Shomron N., Warman N., Wertheimer E., Maor S., Shochat L., Werner H. (2012) *Insulin-like growth factor-1 translocates to nucleus and autoregulates IGF-1R gene expression in breast cancer cells*. The Journal of Biological Chemistry, 287(4), 2766-2776.
- Sarfstein R.** and Werner H. (2013) *Minireview: Nuclear insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: a novel paradigm in signal transduction*. Endocrinology, 154(5), 1672-1679.
- Scagliotti GV.** and Novello S. (2012) *The role of the insulin-like growth factor signaling pathway in non-small cell lung cancer and other solid tumors*. Cancer Treatment Reviews, 38, 292-302.
- Scagliotti GV.**, Bondarenko I., Blackhall F., Barlesi F., Hsia TC., Jassem J., Milanowski J., Popat S., Sanchez-Torres JM., Novello S., Benner RJ., Green S., Molpus K., Soria JC., Shepherd FA. (2015) *Randomized, phase III trial of figitumumab in combination with erlotinib versus erlotinib alone in patients with nonadenocarcinoma nonsmall-cell lung cancer*. Annals of Oncology, 26(3), 497-504.
- Schanzer J.**, Wartha K., Croasdale R., Moser S., Künkele K-P., Ries C., Scheuer W., DuerrH., Pompiati S., Pollman J., Stracke J., Lau W., Ries S., Brinkmann U., Klein C., Umana P. (2014) *A novel glycoengineered bispecific antibody format for targeted inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) and insulin-like growth factor receptor type I (IGF-1R) demonstrating unique molecular properties*. The Journal of Biological Chemistry, 289(27), 18693-18706.
- Scoazec J.Y.**, Sabourin J.C. (2010) *2010: The seventh edition of the TNM classification*. Annales de pathologies, 30, 2-6.
- Sebastian S.**, Settleman J., Reshkin S.J., Azzariti A., Bellizzi A., Paradiso A. (2006). *The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover*. Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer, 1766, 120-139.

- Sehat B.**, Andresson S., Girnita L., Larsson O. (2008) *Identification of c-Cbl as a new ligase for insulin-like growth factor-1 receptor with distinct roles from Mdm2 in receptor ubiquitination and endocytosis*. *Cancer Research*, 68, 5669-5677.
- Sehat B.**, Tofigh A., Lin Y., Trocmé E., Liljedahl U., Lagergren J., Larsson O. (2010) *SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor*. *Science Signaling*, 2(108), 1-11.
- Seligmann JF.**, Elliott F., Richman SD., Jacobs B., Hemmings G., Brown S., Barrett JH., Tejpar S., Quirke P., Seymour MT. (2016) *Combined Epregrin and Amfipregulin expression levels as a predictive biomarker for panitumumab Therapy Benefit or lack of benefit in patients with RAS wild-type advanced colorectal cancer*. *JAMA Oncology*.
- Sequist LV.**, Waltman BA., Dias-Santagata D., Digumarthy S., Turke AB., Fidias P., Bergethon K., Shaw AT., Gettinger S., Cosper AK., Akhavanfard S., Heist RS., Temel J., Christensen JG., Wain JC., Lynch TJ., Vernovsky K., Mark EJ., Lanuti M., Iafrate AJ., Mino-Kenudson M., Engelman JA. (2011) *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. *Science Translational Medicine*, 3(75), 1-12.
- Sequist LV.**, Yang J., Yamamoto N., O'Byrne K., Hirsh V., Mok T., Geater S., Orlov S., Tsai C-M., Boyer M., Su W-C., Bannouna J., Kato T., Gorbunova V., Lee KH., Shah R., Massey D., Zazulina V., Shahidi M., Schuler M. (2013) *Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic Lung Adenocarcinoma with EGFR mutations*. *Journal of Clinical Oncology*, 31(27), 3327-3334.
- Sequist LV.**, Soria JC., Goldman JW., Wakelee HA., Gadgeel SM., Varga A., Papadimitrakopoulou V., Solomon BJ., Oxnard GR. (2015) *Rociletinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer*. *The New England Journal of Medicine*, 372(18), 1700-1709.
- Sergina N.** and Moasser M. (2008) *The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic target*. *Trends in Molecular Medicine*, 13(12), 527-534.
- Shaner N.**, Patterson G., Davidson M. (2007) *Advances in fluorescent protein technology*. *Journal of Cell Science*, 120(24), 4247-4260.
- Sharma SV.**, Bell DW., Settleman J., Haber DA. (2007). *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 7, 169-181.

- Shi F.**, Telesco S., Liu Y., Radhakrishnan R., Lemmon M. (2010) *ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation*. PNAS, 107(17), 7692-7697.
- Shoyab M.**, McDonald V., Bradley G., Todaro G. (1988) *Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7*. PNAS USA, 85, 6528-6532.
- Shoyab M.**, Plowman G., McDonald V., Bradley G., Todaro G. (1989) *Structure and function of human amphiregulin: a member of the Epidermal Growth Factor family*. Science, 243, 1074-1076.
- Sigismund S.**, Woelk T., Puri C., Maspero E., Tacchetti C., Transidico P., Di Fiore PP., Polo S. (2005) *Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos*. PNAS USA, 102, 2760-2765.
- Sigismund S.**, Argenzio E., Tosoni D., Cavallaro E., Polo S., Di Fiore P. (2008). *Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation*. Developmental Cell, 15, 209–219.
- Singh P.**, Alex JM., Bast F. (2014) *Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) signaling systems : nivel strategies for cancer*. Medical Oncology, 31(805), 1-14.
- Soderholm J.**, Bird S., Kalab P., Sampathkumar Y., Hasegawa K., Uehara-Bingen M., Weis K., Heald R. (2011) *Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin-β*. ACS Chemical Biology, 6, 700-708.
- Soria J-C.**, Mok T., Cappuzzo F., Jänne P. (2012) *EGFR-mutated oncogene-addicted non-small-cell lung cancer: current trends and future prospects*. Cancer Treatment Reviews, 38, 416-430.
- Sorkin A.** and Goh L.K. (2009). *Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs*. Experimental Cell Research, 315, 683-696.
- Sos ML.** and Thomas RK. (2012). *Genetic insight and therapeutic targets in squamous- cell lung cancer*. Oncogene, 31, 4811–4814.
- Stella G.**, Luisetti M., Inghilleri S., Cemmi F., Scabini R., Zorzetto M., Pozzi E. (2012) *Targeting EGFR in non-small-cell lung cancer: lessons, experiences, strategies*. Respiratory Medicine, 106, 173-183.
- Sternlicht MD.**, Sunnarborg SW., Kouros-Mehr H., Yu Y., Lee DC., Werb Z. (2005) *Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via*

ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. Development, 132(17), 3923-3933.

Stoll S., Stuart P., Lambert S., Gandarillas A., Rittié L., Johnston A., Elder J. (2016) *Membrane-tethered intracellular domain of Amphiregulin promotes keratinocyte proliferation.* Journal of Investigative Dermatology, 136, 444-452.

Stoll S. and Elder J. (1999) *Differential regulation of EGF-like growth factor genes in human keratinocytes.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 265(1), 214-221.

Ström A-C. and Weis K. (2001) *Importin- β -like nuclear transport receptors.* Genome Biology, 2(6), 1-9.

Suda K., Mizuuchi H., Sato K., Takemoto T., Iwasaki T., Mitsudomi T. (2014) *The insulin-like growth factor 1 receptor causes acquired resistance to erlotinib in lung cancer cells with the wild-type epidermal growth factor receptor.* International Journal of Cancer, 135(4), 1002-1006.

T

Tabernero J., Shapiro G., LoRusso P., Cervantes A., Schwartz G., Weiss G., Paz-Ares L., Cho D., Infante J., Alsina M., Gounder M., Falzone R., Harrop J., White AS., Toudjarska I., Bumcrot D., Meyers R., Hinkle G., Svrzikapa N., Hutabarat R., Clausen V., Cehelsky J., Nochur S., Gamba-Vitalo C., Vaishnav A., Sah D., Gollob J., Burris H. (2013) *First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement.* Cancer Discovery, 3, 406-417.

Tanaka H., Nishioka Y., Yokoyama Y., Higashiyama S., Matsuura N., Matsuura S., Hieda M. (2012) *Nuclear envelope-localized EGF family protein amphiregulin activates breast cancer cell migration in an EGF-like domain independent manner.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 420, 721-726.

Tandon R., Senthil V., Nithya D., Pamidiboina V., Kumar A., Malik S., Chaira T., Diwan M., Gupta P., Venkataramanan R., Malik R., Das B., Dastidar SG., Cliffe I., Ray A., Bhatnagar PK. (2013) *RBx10080307, a dual EGFR/IGF-1R inhibitor for anticancer therapy.* European Journal of Pharmacology, 711, 19-26.

- Tognon C.** and Sorensen P. (2012) *Targeting the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) signaling pathway for cancer therapy*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 16(1), 33-48.
- Tomas A., Futter C., Eden E.** (2014) *EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer*. Trends in Cell Biology, 24(1), 26-34.
- Torre L., Bray F., Siegel R., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A.** (2015). *Global cancer statistics, 2012*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65, 87-108.
- Tran TN., Selinger CI., Yu B., Ng CC., Kohonen-Corish MR., McCaughan B., Kennedy C., O'Toole SA., Cooper WA.** (2014) *Alterations of insulin-like growth factor-1 receptor gene copy number and protein expression are common in non-small cell lung cancer*. Journal of Clinical Pathology, 67(11), 985-991.
- Travis W., Brambilla E., Muller-Hermelink K., Harris C.** (2004) WHO classification 2004. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Chapitre 1: Tumours of the lung.
- Travis W.** (2011). *Classification of lung cancer*. Seminars in Roentgenology, 46(3), 178-86.
- Travis W., Brambilla E., Nicholson A., Yatabe Y., Austin J., Beasley MB., Chirieac LR., Dacic S., Duhig E., Flieder DB., Geisinger K., Hirsch FR., Ishikawa Y., Kerr KM., Noguchi M., Pelosi G., Powell C., Tsao MS., Wistuba I.** (2015) *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. Journal of Thoracic Oncology, 10(9), 1243-1260.
- Traynor A., Weigel T., Oettel K., Yang D., Zhang C., Kim K., Salgia R., Iida M., Brand T., Campbell T., Hernan H., Wheeler D.** (2013) *Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small-cell lung cancer*. Lung Cancer, 81, 138-141.
- Tsuta K., Mimae T., Nitta H., Yoshida A., Maeshima AM., Asamura H., Grogan TM., Furuta K., Tsuda H.** (2013) *Insulin-like growth factor-1 receptor protein expression and gene copy number alterations in non-small cell lung carcinomas*. Human Pathology, 44(6), 975-982.

U

- Ullrich A., Gray A., Tam AW., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le Bon T., Kathuria S., Chen E.** (1986) *Insulin-like growth factor I receptor primary*

structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. The EMBO Journal, 5(10), 2503-2512.

Underner M., Urban T., Perriot J., Chazeron I., Meurice J.C. (2014) *Cannabis smoking and lung cancer.* Revue des Maladies Respiratoires, 31 (6), 488-498.

V

Van der Wekken AJ., Saber A., Hiltermann T., Kok K., Van den Berg A. (2016) *Resistance mechanisms after tyrosine kinase inhibitors afatinib and crizotinib in non-small cell lung cancer, a review of the literature.* Critical Reviews in Oncology.

Van Meerbeeck JP., Fennell DA., De Ruyscher DK. (2011) *Small-cell lung cancer.* The Lancet, 378(9804), 1741-1755.

Vardatsikos G., Sahu A., Srivastava A. (2009) *The insulin-like growth factor family: molecular mechanism, redox regulation, and clinical implications.* Antioxydants & Redox Signaling, 11(5), 1165-1190.

Vecchione A., Marchese A., Henry P., Rotin D., Morrione A. (2003) *The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitinylation and stability of the insulin-like growth factor I receptor.* Molecular and Cellular Biology, 23(9), 3363-3372.

Vollebergh MA., Kappers I., Klomp HM., Buning-Kager JC., Korse CM., Hauptmann M., De Visser KE., Van den Heuvel MM., Linn SC. (2010) *Ligands of epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor family as serum biomarkers for response to epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer.* Journal of Thoracic Oncology, 5(12), 1939-1948.

W

Wang GZ., Cheng X., Li XC., Liu YQ., Wang XQ., Shi X., Wang ZY., Guo YQ., Wen ZS., Huang YC., Zhou GB. (2015) *Tobacco smoke induces production of chemokine CCL20 to promote lung cancer.* Cancer Letters, 363, 60-70.

Wang Q., Ru Y., Zhong D., Zhang J., Yao L., Li X. (2014) *Engineered ubiquitin ligase PTB-U-box targets insulin/insulin-like growth factor receptor for degradation and coordinately inhibits cancer malignancy.* Oncotarget, 5(13), 4945-4958.

- Wang X.**, Masri S., Phung S., Chen S. (2008) *The Role of Amphiregulin in Exemestane-Resistant Breast Cancer Cells : Evidence of an Autocrine Loop*. Cancer Research, 68(7), 2259-2265.
- Wang Y-N.**, Wang H., Yamaguchi H., Lee H-J., Lee H-H., Hung, M-C. (2010a). *COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 399, 498-504.
- Wang Y-N.**, Yamaguchi H., Hsu J-M., Hung M-C. (2010b). *Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins*. Oncogene, 29, 3997–4006.
- Wang Y-N.**, Yamaguchi H., Huo L., Du Y., Lee H-J., Lee H-H., Wang H., Hsu J-M., Hung M-C. (2010c). *The translocon Sec61 β localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF Receptor to the nucleus*. The Journal of Biological Chemistry, 285, 38720-38729.
- Wang Y-N.** and Hung M-C. (2012) *Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family*. Cell & Biosciences, 2(13), 1-10.
- Warsito D.**, Sjöström S., Andersson S., Larsson O., Sehat B. (2012) *Nuclear IGF-1R is a transcriptional co-activator of LEF1/TCF*. EMBO reports, 13(3), 244-250.
- Weinstein I.B.** and Joe A. (2008) *Oncogene addiction*. Cancer Research, 68, 1194-1210.
- Wilkinson K.** and Henley J. (2012) *Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation*. Biochemical Journal, 428(2), 133-145.
- Willmarth NE.** and Ethier SP. (2006) *Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells*. The Journal of Biological Chemistry, 281(49), 37728-37737.
- Willmarth NE.**, Baillo A., Dziubinski ML., Wilson K., Riese DJ., Ethier SP. (2009) *Altered EGFR localization and degradation in human breast cancer cells with an amphiregulin/EGFR autocrine loop*. Cell Signaling, 21(2), 212-219.
- Wu J-Y.**, Yu C-J., Chang Y-C., Yang C-H., Shih J-Y., Yang, P-C. (2011). *Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on “uncommon” epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer*. Clinical Cancer Research, 17, 3812-3821.

Y

- Yamada M.**, Ichikawa Y., Yamagishi S., Momiyama N., Ota M., Fujii S., Tanaka K., Togo S., Ohki S., Shimada H. (2008) *Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer*. *Clinical Cancer Research*, 14(8), 2351-2356.
- Yeo CD.**, Park KH., Park CK., Lee SH., Kim SJ., Yoon HK., Lee YS., Lee UJ., Lee KY., Kim T-J. (2015) *Expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) predicts poor responses to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer patients harboring activating EGFR mutations*. *Lung Cancer*, 87, 311-317.
- Yokota J.**, Shiraishi K., Kohno T. (2010) *Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions*. *Advances in Cancer Research*, 109, 51-72.
- Yonesaka K.**, Zejnullahu K., Lindeman N., Homes AJ., Jackman DM., Zhao F., Rogers AM., Johnson BE., Jänne PA. (2008) *Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers*. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6963-6973.
- Yonesaka K.**, Takegawa N., Satoh T., Ueda H., Yoshida T., Takeda M., Shimizu T., Chiba Y., Okamoto I., Nishio K., Tamura T., Nakagawa K. (2015) *Combined analysis of plasma Amphiregulin and Heregulin predicts response to cetuximab in metastatic colorectal cancer*. *PLoS One*, 10(11), e0143132.
- Yoon Y-K.**, Kim H-P., Han S-W., Oh DY., Im S-A., Bang Y-J., Kim T-Y. (2010) *KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to Akt or STAT3 activation: implication for combinatorial approach*. *Molecular Carcinogenesis*, 49, 353-362.
- Yoshida M.**, Shimura T., Fukuda S., Mizoshita T., Tanida S., Kataoka H., Kamiya T., Nakazawa T., Higashiyama S., Joh T. (2012) *Nuclear translocation of pro-amphiregulin induces chemoresistance in gastric cancer*. *Cancer Science*, 103(4), 708-715.
- Yu H.**, Spitz M., Mistry J., Gu J., Hong W., Wu X. (1999) *Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case control analysis*. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(2), 151-156.
- Yu H.**, Riely G., Lovly C. (2014) *Therapeutic strategies utilized in the setting of acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. *Clinical Cancer Research*, 20(23), 5898-5907.

Z

Zhang F., Yu Y., Xing L., Chen M. (2015) *Cetuximab combined with chemotherapy is beneficial for patients with advanced non-small cell lung cancer after EGFR-tyrosine kinase inhibitors failure*. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 8(9), 16140-16148.

Zhou C., Wu Y., Chen G., et al. (2011) *Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study*. The Lancet Oncology, 12,735-742.

Zeiss microscopy Online Campus, Education in Microscopy and digital imaging, <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>.

Signalisation nucléaire de l'IGF-1R et résistance aux thérapies anti-EGFR dans les cancers du poumon

Responsable de 1,6 million de décès par an dans le monde, le cancer du poumon constitue aujourd'hui la première cause de mortalité par cancer. Les cancers bronchiques non-à-petites cellules représentent 85% des cancers du poumon et ont un pronostic vital très mauvais. Les EGFR-TKI (inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, gefitinib) constituent un réel progrès thérapeutique pour le traitement des cancers du poumon. Cependant, ces traitements ne sont efficaces que dans un petit sous-groupe de patients. Un des enjeux actuels est donc d'identifier les mécanismes de résistance primaire mis en jeu par les tumeurs.

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) activent des voies de signalisation intracellulaires depuis la membrane plasmique. Ces dernières années, une translocation nucléaire des RTK a également été mise en évidence. Ces travaux récents suggèrent que la signalisation nucléaire des RTK pourrait contribuer à la résistance des tumeurs en réponse aux thérapies anti-cancéreuses.

Dans l'équipe, il a été montré que l'activation de l'IGF-1R est associée à la progression tumorale des adénocarcinomes pulmonaires et que le gefitinib induit une accumulation nucléaire de l'IGF-1R dans un modèle d'adénocarcinome mucineux. Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'IGF-1R nucléaire pourrait jouer un rôle dans la résistance aux EGFR-TKI des adénocarcinomes pulmonaires mucineux.

Nos résultats indiquent que plus de 70% des adénocarcinomes pulmonaires présentent un marquage nucléaire de l'IGF-1R. A l'aide de différents modèles cellulaires résistants aux EGFR-TKI, nous montrons que le gefitinib induit l'accumulation nucléaire de l'IGF-1R dans les adénocarcinomes pulmonaires mucineux. Cette translocation nucléaire implique l'endocytose clathrines-dépendante de l'IGF-1R et la formation d'un complexe entre l'IGF-1R, l'importine β 1 et l'amphiréguline. La neutralisation de l'amphiréguline prévient le transport nucléaire de l'IGF-1R et resensibilise les cellules à l'apoptose induite par le gefitinib *in vitro* et *in vivo*. L'ensemble de ces résultats identifie le trafic intracellulaire de l'IGF-1R comme un nouveau composant de la réponse aux EGFR-TKI et suggèrent que la signalisation nucléaire IGF-1R/Areg contribue à la progression des adénocarcinomes mucineux sous EGFR-TKI.

Nuclear IGF-1R signaling and resistance to anti-EGFR targeted therapies in lung cancer

Responsible of 1.6 million deaths each year worldwide, lung cancer is today the leading cause of cancer mortality in the world. Non-small-cell lung cancers account for about 85% of lung cancer and have a very bad prognosis (5-year survival rate inferior to 10%). EGFR-TKI (EGFR tyrosine kinase inhibitors, gefitinib) are a real medical advance for lung cancers treatment. However, these treatments are efficient in a small subgroup of patients. So, one of the current issues is to identify primary resistance mechanisms involved in tumors.

Tyrosine kinase receptors (RTK) activate intracellular signaling pathways from the plasma membrane. These last years, a nuclear translocation of the RTK was shown. Recent works suggest that RTK nuclear signaling could contribute to tumors resistance in response to anti-cancerous therapies.

In our team, it was shown that activation of IGF-1R signaling is associated with lung adenocarcinoma progression and that gefitinib induces IGF-1R nuclear accumulation in a mucinous adenocarcinoma cell line. On the basis of these results, we hypothesize that nuclear IGF-1R could play a role in the resistance of mucinous lung adenocarcinoma to EGFR-TKI.

Our results indicate that more than 70% lung adenocarcinoma tumors present a positive IGF-1R nuclear staining. Thanks to EGFR-TKI-resistant cell lines, we show that gefitinib induces the nuclear accumulation of IGF-1R in mucinous adenocarcinoma. This nuclear translocation involves clathrin-mediated endocytosis and a complex between IGF-1R, importin β 1 and amphiregulin. Amphiregulin silencing prevents IGF-1R nuclear translocation in response to gefitinib and restores gefitinib-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. Our whole results identify that IGF-1R intracellular trafficking is a new component of response to EGFR-TKI and strongly suggest that a nuclear IGF-1R/amphiregulin signaling contributes to mucinous lung adenocarcinoma progression in response to EGFR-TKI.

Mots-clés : IGF-1R nucléaire, amphiréguline, cancer du poumon, résistance, EGFR-TKI

Key words : Nuclear IGF-1R, amphiregulin, lung cancer, resistance, EGFR-TKI

Centre de Recherche Institute for Advanced Biosciences (IAB),

UGA-Inserm U1209-CNRS UMR 5309

Equipe EYMIN "Epissage alternatif des ARNs, signalisation cellulaire et réponse aux thérapies"

Equipe COLL "Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer"

