



Mise en évidence d'interactions létales par criblage phénotypique dans le contexte de la résistance aux thérapies du cancer colorectal

Eve Combès

► To cite this version:

Eve Combès. Mise en évidence d'interactions létales par criblage phénotypique dans le contexte de la résistance aux thérapies du cancer colorectal. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT134 . tel-02059885

HAL Id: tel-02059885

<https://theses.hal.science/tel-02059885>

Submitted on 7 Mar 2019

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 L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2 n°168

Unité de recherche IRCM U1194

**Mise en évidence d'interactions létales par criblage
phénotypique dans le contexte de la résistance aux
thérapies du cancer colorectal**

Présentée par Eve COMBÈS

Le 27/11/2017

Sous la direction du Dr Céline Gongora

Devant le jury composé de

Mr Philippe Pasero, DR1, Institut de Génétique Humaine

Mme Marie-Jeanne Pillaire, CR1, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Mr Jacques Robert, PUPH, Institut Bergonié

Mr Hervé Watier, PUPH, Université François Rabelais

Mme Céline Gongora, DR2, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier

Président du jury

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Remerciements

Par ces quelques pages, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée à progresser, qui ont partagé les accomplissements et les déceptions de ces trois années de dur labeur que ce soit au quotidien, le temps d'une discussion ou d'une simple anecdote échangée au détour d'un couloir.

Pour commencer, je tiens à remercier les membres de mon jury, en débutant par le Dr Marie-Jeanne Pillaire ainsi que le Pr Jacques Robert qui ont accepté d'évaluer ce manuscrit. Merci pour vos conseils et votre expertise qui m'ont permis d'améliorer mon travail. Je remercie également le Pr Hervé Watier, représentant du LabexMabimprove qui a financé cette thèse, pour sa présence en tant qu'examineur ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à ce projet durant les très appréciées retraites du Labex. Enfin, un grand merci au Dr Philippe Pasero d'avoir accepté d'être le président de ce jury. Merci d'avoir participé avec enthousiasme à ce projet ainsi qu'à mes comités de thèse et de m'avoir fait une petite place dans votre labo le temps de d'apprendre l'art de l'étalement des fibres d'ADN.

Je souhaite également remercier les autres membres de mon comité de thèse Emmanuelle Liaudet-Coopman et Arnaud Coquelle. Votre bienveillance et vos conseils m'ont été d'une grande aide durant cette thèse.

Céline, je te suis reconnaissante pour tellement de choses, à commencer par le fait d'avoir choisi une petite étudiante en master 2 de biologie (espèce en voie de disparition désormais) pour effectuer un stage sous ta direction. Merci, de m'avoir soutenue dans mes nombreuses errances administratives et aidée à obtenir une bourse pour effectuer cette thèse. Je te remercie de m'avoir accordé ta confiance durant ces trois années. Tu as été une excellente directrice de thèse, tu m'as guidée sur le plan scientifique sans me priver de mon autonomie. Tu t'es rendue disponible malgré ton emploi du temps surchargé durant cette fin de thèse mouvementée. Ton équipe à de beau jour devant elle, avec une chef aussi passionnée que toi.

Je souhaite également te remercier, Nadia, pour l'implication et l'enthousiasme que tu apportes à chaque projet auquel tu participes et pour ta gentillesse à toute épreuve. Il va sans dire qu'une part importante de la réussite de ce projet te revient. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, notamment durant les longues semaines de mises au point pour les manips de Facs ou de Celigo.

Diégo, ça y est, « le boulet » va bientôt partir, tu n'auras plus l'opportunité de dormir dans un aéroport à cause d'une correspondance ratée, ou encore de courir après une valise à moitié arrachée par un tapis roulant. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton humour et ton amour des

mathématiques qui permet à l'équipe de se pavaner partout dans le monde grâce à tes matrices de synergie. Merci également pour ton implication et ta confiance dans ce projet qui va, je l'espère, se conclure par une belle avancée thérapeutique pour les patients.

Philippe et Maguy, merci pour vos prises de becs, vos débats enflammés, votre franchise, vos caractères bien trempés, votre immense bienveillance envers les étudiants qui apportent beaucoup de vie dans l'équipe. J'ai beaucoup aimé discuter avec vous, recevoir vos remarques qu'elles aient été positives ou négatives, elles m'ont toujours fait progresser et réfléchir.

Je remercie évidemment absolument **tous** les membres de l'équipe actuelle et passée, pour ces trois années que nous avons partagées !

Pour n'en citer que quelques-uns ... Augusto, je suis heureuse que tu continues ce projet, j'espère que les belles découvertes vont se poursuivre et je te remercie d'exercer toute l'équipe à parler anglais. Leïla, tu es une des personnes les plus gentilles que j'ai pu rencontrer, toujours adorable et souriante, tu fais partie avec Manda des bonnes âmes du labo qui n'hésitent pas à prendre 2 minutes pour refaire une solution ou ranger un coin de paillasse ; pour cela merci !! J'espère que les petits nouveaux vont suivre votre exemple. Je vous souhaite à tous, thésard(e)s de l'équipe (Leïla, Manda, Sara, Hadjer, Romain, Alice) de faire de belles thèses ! Alice, ton arrivée dans le bureau nous a amené un vent de fraîcheur et de gaîté en cette fin de thèse difficile, je t'en remercie et te souhaite une belle réussite.

Salima j'ai adoré travailler et discuter avec toi, merci pour ton sourire et ta bonne humeur communicative! Marie-Alice profite bien de tes vacances, Lucile profite de tes petites choupettes, j'espère que l'équipe pourra à nouveau vous accueillir très bientôt, Litaty toujours si discrète et posée, à toutes merci pour votre gentillesse et votre simplicité. Je suis vraiment heureuse de vous connaître.

Je pense également à deux ex-membres de l'équipe pour qui j'ai une affection particulière : Laetitia et Hanane. Laetitia je tenais à te remercier pour le temps que tu m'as accordé durant mon stage de master 2, pour la confiance que tu as placée en moi et pour tout ce que tu m'as appris. J'ai pris conscience de ma passion pour la recherche à ton contact. J'espère vraiment que l'on aura l'occasion de se revoir au détour d'un post-doc ou d'une visite dans le sud de la France. Hanane, comme une grande sœur aimante et tortionnaire tu as guidé, intimidé et fais rire les jeunes thésards. Redoutant la honte de se faire traiter de cacahuète ou de mérou, tout le monde filait droit au labo!! Tu n'as jamais rechigné (enfin si beaucoup), tu as toujours rechigné à nous sortir de la panade mais tu l'as toujours fait, et pour cela je te remercie ! Tu as été un vrai repère pour les étudiants de cette équipe, deux d'entre eux t'en seront toujours reconnaissants.

Je remercie également toute l'équipe de Pierre Martineau dans laquelle j'ai fait mes débuts. Pierre, merci d'avoir mangé les chocolats fourrés à l'alcool dont personne ne voulait, d'être passé nous dire au revoir au bureau à 19h, 20h (même si c'était sans doute pour voir qui était encore là ou voir si il y avait encore des chocolats). Merci pour cette proximité et bienveillance que vous avez à l'égard des étudiants. Piona, merci pour tes anecdotes sur le conseil général et pour ta façon d'être qui est unique ! Laurence, Vincent j'ai apprécié écouter vos anecdotes autour de nos nombreux repas à la cantine. Laurence, je te souhaite une belle HDR et une belle carrière au sein de l'équipe PM. Vincent, représentant fashion du couloir, voisin de paillasse de mes débuts, merci pour tous les commérages (et l'expérience scientifique un peu quand même) partagés. Merci Nicole et Christian, binôme attachant et si discret. J'ai également une pensée pour les derniers stagiaires PM, les deux pioupious de Vincent aux horaires et histoires improbables, on en a tellement ri dans le bureau ! Je souhaite une belle réussite aux deux nouveaux pioupious de l'équipe Célestine et Tristan, profitez bien de ces années de thèses qui passent à une vitesse folle sous le soleil de Montpellier !

J'en viens aux Martinettes : Déboubiche, Sheila, Galmiche, Milou, Julie... Merci pour tous ces fous rires partagés, j'ai tellement aimé nos enquêtes (le mystère du lavabo, les tordus de l'historique Gmail, les « love affair » ...), dire et entendre les répliques de Dikkenek, les phrases à double sens ... Nous avons fait et dit tellement de choses absurdes, il m'est impossible d'en parler ici sans perdre toute crédibilité mais je n'ai (malheureusement) rien oublié de nos déboires ! Déboubiche tu m'as fait entrer et prendre un abonnement dans une salle de sport : Bravo!! Nous avons partagé nos peines autour d'un thé, partagé nos joies autour d'une bière, d'un mojito ou d'un fichier excel. Ma niçoise fan de toutouyou, tu vas me manquer !

SOOooo long, you don't have to GOoooOOO!

Un grand merci aux membres des services communs et du secrétariat que j'ai eu la chance de côtoyer particulièrement Jean-Yves, Françoise, Nadia, Chloé, Marion, Philippe et Céline. Merci à Adeline, Marion, Madeline et Myriam qui pour moi font et feront toujours parties de la grande famille PM-CG. Merci à toi Berfin, tu es une personne adorable et courageuse, tu mérites le meilleur pour ta vie personnelle et professionnelle, j'espère que nous garderons contact. Je pense également à beaucoup de thésards de l'institut Charline, Riad, Romain, Alexandre, Maëva, Emile, Pascale, Tom, Nour avec qui j'ai partagé de nombreux weekends au labo, des anticorps, les JET, pour certains les Labex. Je remercie également le petit monde de l'animalerie spécialement Laetitia T avec qui j'ai aussi partagé les conseils de centre, Hanane M, Hélène D, Charles Vincent et son équipe. Je tiens à remercier particulièrement Halex, Flavie, Thierry C et Anaïs B, Béatrice O, Naoïl qui m'ont aidée durant mon projet par leur conseils avisés, leur expérience scientifique et avec qui j'ai grandement apprécié travailler et discuter.

Bien sûr beaucoup de gens hors de l'institut ont également été essentiels pour moi durant cette thèse. Je veux bien évidemment parler de ma famille et de mes amies. Je n'ai pas eu beaucoup de temps à vous accorder durant ces trois années, j'espère pouvoir à nouveau prendre le temps et passer d'agréables moments avec vous tous.

Marine, Aurélie, Camille, Jade, Pauline, Mélody la petite troupe du collège ; Julia, Aurore et Cécile, les truites du lycée, nos soirées m'ont fait tant de bien. Il s'est passé tellement de chose durant ces trois ans! Merci pour ces quelques après-midi, soirées à nous raconter nos vies et nous souvenir de notre lointaine jeunesse. J'espère que nous réussirons encore à nous revoir dans les années à venir malgré la distance.

Les personnes qui comptent le plus sont toujours les plus difficiles à remercier... Mes grands-parents, oncles et tantes, cousins, cousines je vous remercie tous de m'avoir donné des dizaines d'occasions de quitter mon quotidien pour venir manger un bon repas ou un bon gâteau avec vous! Merci à ceux qui sont venus me soutenir lors du jour J, surtout à Fanfan la rebelle! J'ai tellement de chance de vous avoir!

Noémie, Nathan même si je ne suis pas souvent là, si vous avez besoin de votre grande sœur, je répondrais toujours présente!

Papa, Maman, merci de m'avoir laissé faire mes choix, mes erreurs, de m'avoir soutenue sans savoir dans quoi je m'embarquais avec cette thèse. Même si je n'ai pas appelé souvent, que je n'entendais presque jamais mon téléphone, vous avez toujours été dans mes pensées... Votre fierté lors de ma soutenance a été la meilleure des récompenses!

Matthieu, de collègue de bureau à compagnon, il m'est impossible de décrire ce que je ressens pour toi, tant ces deux années à tes côtés m'ont apporté de bonheur. Tu as été présent, à chaque instant. Tu as toujours trouvé comment me remonter le moral, me donner du courage. Nous avons partagé cette dure épreuve de la fin de thèse ensemble, et je pense que sans ton soutien je n'aurais jamais pu y mettre autant d'énergie. MERCI

Je tire ma révérence sur cette belle citation :

"La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l'atteindre coûte que coûte." Marie-Curie

**Mise en évidence d'interactions létales par
criblage phénotypique dans le contexte de la
résistance aux thérapies du cancer colorectal**

Sommaire

Table des illustrations	3
Liste des abréviations	5
Contexte bibliographique.....	9
1 Le cancer colorectal.....	11
1-1 Anatomie	11
1-2 Cancérogénèse	13
1 -2 -1 Les formes familiales	13
1-2-2 La forme sporadique	14
a- La voie canonique: l'instabilité chromosomique.....	14
b- L'instabilité des microsatellites.....	17
1-3 Classifications et épidémiologie du cancer colorectal	19
1-3-1 Degrés de classification des CCR	19
a- La détermination du stade	19
b- Des différentes classifications moléculaires au consensus.....	21
1-3-2 Données épidémiologiques, Diagnostic et prévention.....	23
1-4 Traitements du cancer colorectal	25
1-4-1 Médicaments cytotoxiques utilisés dans le traitement du CCR métastatique	29
a- 5-fluorouracile/leucovorine	29
b- Irinotecan	31
c- Oxaliplatine.....	33
1-4-2 Les thérapies anti-EGFR utilisées dans le traitement du CCR métastatique.	37
a- La voie EGFR	40
b- Le cétuximab	41
c- Le panitumumab.....	42
2- Comment améliorer les thérapies existantes ? Le problème de la résistance aux traitements.....	43
2-1 Mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses utilisées dans le CCR	43
2-1-2 Altération de la cible ou des voies de signalisation visées par les traitements	47
2-1-3 Activation/blocage d'autres voies de signalisation.....	49
2-2 Létalité synthétique et cancer.....	51
2-2-1 Principe	51

2-2-2 Les différentes approches.....	53
2-2-3 Les types de criblages	53
a- Banque de composés chimiques.....	53
b - Criblage du génome par ARN interférence	54
c – Criblage du génome par l’outil Crispr-Cas9	57
Résultats	59
1- Projet	61
2- Mise en place technique du criblage phénotypique et validation des cibles	65
2-1 Choix des lignées résistantes	67
2-1-1 Criblages consacrés aux médicaments cytotoxiques.....	67
2-1-2 Criblage consacré aux thérapies anti-EGFR	67
2-2 Principales étapes et mise au point du criblage phénotypique	69
2-3 Résultats des trois criblages phénotypiques.....	71
2-4 Présentation des cibles	73
2-5 Validation des cibles potentielles par ARN interférence et utilisation d’inhibiteur spécifique..	77
2-5-1 Criblage consacré à l’oxaliplatine.....	77
2-5-2-Criblage consacré à l’irinotécan (SN-38).....	81
2-5-3 Criblage consacré aux thérapies anti-EGFR	85
2-6 Matériel et Méthodes	91
3- Inhibition de la protéine ATR et résistance à l’oxaliplatine.....	97
3-1 Introduction	97
3-1-1 ATR, senseur de dommages à l’ADN.....	97
3-1-2 Modulation du cycle cellulaire à la suite de dommages à l’ADN : Voies de signalisation ATM et ATR dépendantes.	101
3-2 Article	103
3-3 Commentaires de l’article	137
3-4- Matériel et méthodes supplémentaires	141
4-Discussion.....	145
Conclusion générale et perspectives.....	153
ANNEXES	159
Références bibliographiques	185
Résumé	206

Table des illustrations

Figure 1 : Localisation et segmentation du côlon ¹	11
Figure 2: Carcinogénèse colique induite par instabilité chromosomique ¹²	15
Figure 3 : Modèle classique d'activation de p53 ²⁰	17
Figure 4 : Les stades du cancer colorectal ²⁶	19
Figure 5: Avancées et progrès des traitements du CCR métastatique ⁴²	27
Figure 6: Possibilités de traitement pour les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique intégrant les caractéristiques moléculaires et le site anatomique dans le processus décisionnel ⁴³ ...	27
Figure 7: Le 5-fluorouracile et ses analogues utilisés dans le traitement du CCR ⁵⁰	30
Figure 8: Formule chimique de l'irinotécan et de son métabolite actif le SN-38	31
Figure 9: Mécanisme d'action de l'irinotécan ⁵⁵	32
Figure 10: Formule chimique du cisplatine et de l'oxaliplatine	34
Figure 11: Les différents types d'adduits produits par l'oxaliplatine ⁶³	34
Figure 12: Mécanisme d'induction de l'ICD ⁶⁹	36
Figure 13: Structure schématique d'un anticorps (IgG) ⁷⁷	38
Figure 14: Les degrés d'humanisation des anticorps monoclonaux ⁷⁷	39
Figure 15: Structure de l'EGFR ⁷⁹	40
Figure 16: Schéma des principales voies de signalisation activables à la suite de la dimérisation de l'EGFR et sites d'action de ses principaux inhibiteurs ⁸⁰	41
Figure 17: Protéines activables par l'EGFR dont les mutations sont associées à la résistance aux anti-EGFR	48
Figure 18 : Les principaux types de criblages de létalité synthétique ¹⁴³	56
Figure 19: Illustration de l'extinction d'un gène par la technique Crispr-Cas9 ¹⁵⁸	58
Figure 20 : Caractérisation du niveau de résistance des lignées cellulaires utilisées pour les trois criblages phénotypiques.	68
Figure 21: Etapes du criblage phénotypique.....	69
Figure 22: Confirmation des cibles ATR et ROR2 par ARN interférence.	77
Figure 23: Deux anticorps anti-ROR2 ont un effet synergique avec l'oxaliplatine.....	79
Figure 24: L'inhibition de RAC1 par shRNA sensibilise la lignée G7 au SN-38.....	81
Figure 25: L'inhibition pharmacologique de RAC1 associée au SN-38 présente un effet synergique dans les lignées G7 (A) et HCT116 (B) en culture 2D et en 3D..	82
Figure 26: L'association du KU55933 et du SN-38 est synergique dans les lignées G7 et HCT116.....	83

Figure 27: La répression stable d'YSK4 ne sensibilise pas significativement les cellules HCT116 à l'erlotinib ou au panitumumab..	85
Figure 28: La répression stable de DDR2 ne sensibilise pas significativement les cellules HCT116 au cétuximab..	86
Figure 29: Le dasatinib sensibilise les cellules HCT116 au panitumumab et au cétuximab.....	87
Figure 30 : L'inhibition pharmacologique d'ATR par le VE-822 sensibilise la lignée HCT116 au panitumumab mais pas au cétuximab.	88
Figure 31: Principe utilisé pour l'obtention des matrices de synergie	94
Figure 32: Dommages et complexes protéiques associés à cinq voies de réparation de l'ADN ²¹⁶	98
Figure 33: Régulation du cycle cellulaire par les voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1 ²¹²	101
Figure 34: Le VE-822 et l'oxaliplatine ralentissent significativement la progression des fourches répliquatives dans la lignée HCT116-R1.	140
Figure 35: Etapes de l'étalement des fibres ADN sur lame	141
Figure 36: Exemple de mesure de progression de la fourche.....	142
Figure 37: Matrices de viabilité et de synergie obtenues à la suite du traitement des lignées cellulaire G7 (A) et HCT116 (B) par le VE-822 associé au SN-38.....	147
Figure 38 : Matrices de viabilité et de synergie obtenues à la suite du traitement des lignées cellulaire G7 (A) et HCT116 (B) par le VE-822 associé au SN-38, en culture trois dimension.....	148
Figure 39: Modèle d'action de l'oxaliplatine et de la combinaison du VE-822 et de l'oxaliplatine dans la lignée HCT116-R1 ²⁵⁴	151
Tableau 1 : Classification TNM ²⁷	20
Tableau 2 : Caractéristiques des classifications moléculaires du CCR	21
Tableau 3 : Différences biologiques significatives dans les sous-types moléculaires ²⁹	23
Tableau 4: Résultats des deux criblages phénotypiques dédiés aux médicaments cytotoxiques (SN-38 et Oxaliplatine).	72
Tableau 5: Résultats du criblage phénotypique dédié aux thérapies anti-EGFR.	72
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus à la suite des trois criblages phénotypiques	156

Liste des abréviations

5-FU: 5-fluorouracile

ABC transporteur: *ATP-binding cassette* transporteur

ADCC: *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* ou cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

AMM: autorisation de mise sur le marché

APC: *adenomatous polyposis coli*

ATM: *ataxia-telangiectasia mutated*

ATR : *ataxia-telangiectasia mutated and rad3 related*.

ATRIP: *ATR interacting protein*

BER: *base excision repair* ou réparation par excision de base

CCR: cancer colorectal

CDR: *complementary determining regions*

CIN: *chromosomal instability* ou instabilité chromosomique

CIMP: *CpG island methylator phenotype* ou phénotype méthylateur des îlots CPG

Chk1/Chk2: *checkpoint kinase 1* et *checkpoint kinase 2*

CPT: camptothécine

CPT-11: irinotécan

Crispr-Cas9: *clustered regularly interspaced short palindrome repeats* and *CRISPR associated protein 9*

DACH: diaminocyclohexane

DCC: *deleted in colorectal cancer*

DDR2: *discoidin domain receptor 2*

DPD: dihydropyrimidine deshydrogénase

DSB: *double strand breaks* ou cassures double brin

DTMP: désoxythymidine monophosphate

DNTP: désoxyribonucléotides triphosphate

EGF: *epidermal growth factor* ou facteur de croissance épidermique

EGFR: *epidermal growth factor receptor* ou récepteur du facteur de croissance épidermique

ERCC1: *excision repair cross complementation group 1*

ESMO: *European Society for Medical Oncology* ou Société Européenne d'Oncologie Médicale

FA: *Fanconi anemia* ou anémie de Fanconi

FDA: *food and drug administration*

F-dUMP: fluorodéoxyuridine monophosphate

F-dUTP: fluorodéoxyuridine triphosphate

FOLFIRI: 5-FU + leucovorine + irinotécan

FOLFOX: 5-FU + leucovorine + oxaliplatine

FOLFOXIRI ou FOLFIRINOX: 5-FU + leucovorine + oxaliplatine + irinotécan

F-UTP: fluorouridine triphosphate

gARN: *guiding RNA* ou ARN guide

GST: glutathion s-transférase

HER: *human epidermal growth factor receptor*

HNPCC: *hereditary non-polyposis colorectal cancer* ou cancer colorectal héréditaire sans polypose

HR : recombinaison homologue

HRAS: *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*

ICD: *immunogenic cell death* ou mort cellulaire immunogène

IgG: immunoglobuline G

KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

L-OHP: oxaliplatine

Mab: *monoclonal antibody* ou anticorps monoclonal

MDM-2: *mouse double minute 2 homolog*

MDR : *multidrug resistance*

MMR: *mismatch repair* ou réparation de mésappariement

MRP2: *multidrug resistance-associated protein 2* (aussi appelé ABCC2)

MSI: *microsatellites instability* ou instabilité microsatellitaire

MSI-H et MSI-L: *high and low MSI* ou instabilité microsatellitaire forte ou légère

MSS: microsatellites stables

NER: *nucleotide excision repair* ou réparation par excision de nucléotides

NHEJ: *non homologous end-joining* ou jonction d'extrémité non homologue

NRAS: *Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog*

PAF: polypose adénomateuse familiale

PCR: *polymerase chain reaction* ou amplification en chaîne par polymérase

PDX: *patient derived xenograft*

PFS: *progression free survival* ou survie sans progression

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

RAC1: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

ROR2: *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2*

RPA: *replication protein A* ou protéine de réplication A

SiRNA: *Short interfering RNA* ou petits ARN interférents

ShRNA: *Short hairpin RNA* ou petit ARN en épingle à cheveux

SNP: *single nucleotide polymorphism* ou polymorphisme nucléotidique

ssDNA: *single stranded DNA* ou ADN simple brin

TAS-102: trifluridine + tipiracil

TGF- α : *transforming growth factor alpha*

TNM: *tumor, node, metastasis* ou tumeur, ganglion lymphatique, métastase

TNNI3K: *cardiac troponin I-interacting kinase*

TS: thymidilate synthase

TP: thymidine phosphorylase

Topo I: topoisomérase I

UFT: tégafur uracile

VEGF: *vascular endothelial growth factor* ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VHL: *Von Hippel Lindau*

XRCC1: *X-ray cross complementing group 1*

YSK4: Yeast Sps1/Ste20-Related Kinase 4 ou **MAP3K19** *mitogen activated protein kinase kinase kinase 19*

Contexte bibliographique

1 Le cancer colorectal

1-1 Anatomie

Le gros intestin (côlon et rectum) constitue la dernière partie du système digestif. Après absorption des éléments nutritifs par l'intestin grêle, l'eau contenue dans les déchets issus de l'alimentation y est absorbée jusqu'à obtention des selles qui passeront par le rectum avant d'être évacuées par l'anus.

Le côlon, situé dans l'abdomen, se divise en quatre segments : le côlon droit relié à l'intestin grêle par le caecum, le colon transverse, le colon gauche et le colon sigmoïde qui relie le colon gauche au rectum (Figure 1). La paroi des différents segments du côlon est constituée de quatre couches qui se superposent : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la couche séreuse (de la plus interne vers la couche externe) ¹.

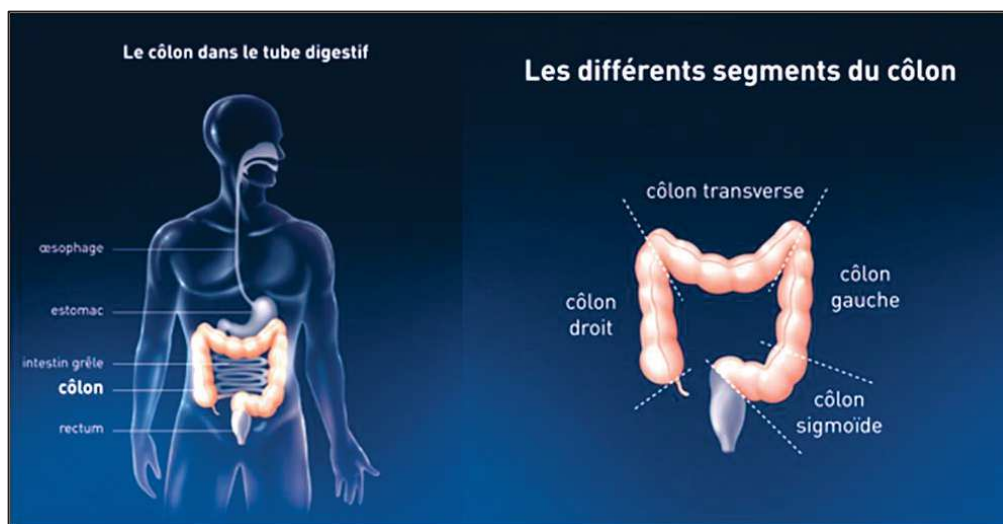


Figure 1 : Localisation et segmentation du côlon ¹

1-2 Cancérogénèse

Le polype adénomateux est une excroissance de cellules sur la muqueuse colique : c'est une tumeur bénigne. Tous les polypes ne deviennent pas cancéreux cependant, après une évolution lente, certaines cellules peuvent accumuler des mutations les rendant malignes. Plus de 80 % des cancers colorectaux sont issus de polypes adénomateux. Lorsque les cellules tumorales prolifèrent, elles envahissent progressivement les différentes couches de la paroi du côlon. Certaines cellules cancéreuses peuvent également acquérir la capacité de coloniser d'autres organes formant des métastases.

On appelle cancer colorectal toute tumeur se développant dans le gros intestin ; les tumeurs du côlon et du rectum possédant les mêmes caractéristiques.²

1 -2 -1 Les formes familiales

Il est désormais admis que près d'un tiers des cancers colorectaux (CCR) peuvent être considérés comme familiaux. Parmi eux, plus de 20 % ne sont pas reliés à un syndrome clairement défini ³. En effet, les descendants des personnes atteintes par ces cancers présentent un risque plus important de développer un cancer colorectal que la population générale. La part restante (environ 5 %) de ces cancers familiaux est associée à des mutations très pénétrantes et à un tableau clinique bien défini.

Les formes familiales de cancer colorectal les plus couramment rencontrées et les mieux décrites sont le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) ou syndrome de Lynch et la polypose adénomateuse familiale (PAF). Celles-ci prédisposent majoritairement au cancer colorectal mais également à d'autres types de cancers de part la présence de mutations dans l'ensemble des cellules de l'organisme ⁴⁻⁵.

Le syndrome de Lynch représente 2 à 4 % des CCR. Les personnes atteintes par ce syndrome ont un risque très élevé (entre 50 et 80 %) de développer un CCR au cours de leur vie ^{6,7}. Les tumeurs surviennent précocement comparées aux CCR sporadiques et histologiquement celles-ci sont peu différenciées et mucineuses. Les mutations transmises dans ce syndrome concernent les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN

(MMR) et sont à l'origine de tumeurs comportant une forte instabilité des microsatellites (H-MSI) ⁸.

La polypose adénomateuse familiale est la seconde forme familiale la plus rencontrée de CCR et résulte d'une mutation autosomique dominante du gène APC (*adenomatous polyposis coli*). Ce syndrome se caractérise par l'envahissement du côlon par des centaines voire des milliers de polypes. Ces polypes se développent dès l'adolescence entraînant chez les individus non traités un CCR diagnostiqué en moyenne à 39 ans ⁹. Les patients à risques sont donc suivis dès la préadolescence (10-12 ans) par des coloscopies régulières. Si l'aspect, la taille ou le nombre de polypes deviennent inquiétants, ces patients subissent différents types de colectomies préventives ¹⁰.

1-2-2 La forme sporadique

Les CCR sporadiques représentent 75 à 80 % des CCR totaux. Cependant, comme dit précédemment, environ 20 % des cancers sporadiques peuvent être considérés comme « familiaux » bien qu'ils ne soient pas apparentés à un syndrome familial identifié³.

La carcinogénèse sporadique est divisée en deux classes, la première induite par une instabilité chromosomique (CIN) et la seconde caractérisée par une instabilité des microsatellites (MSI).

α- La voie canonique: l'instabilité chromosomique

La voie canonique, aussi appelée CIN ou microsatellites stables (MSS) représente environ 85 % des cancers sporadiques.

Pour décrire cette voie, le modèle de Fearon et Vogelstein ¹¹ est une référence. Il associe les événements génétiques à l'évolution morphologique de la tumeur (figure 2). Les caractéristiques de ce modèle sont principalement des mutations de gènes suppresseurs de tumeur tels que : APC, p53 et DCC ainsi que de l'oncogène KRAS. La voie CIN comporte également une fréquence élevée de perte d'hétérozygotie impliquant les bras chromosomiques 5q, 8p, 17p et 18q ¹².

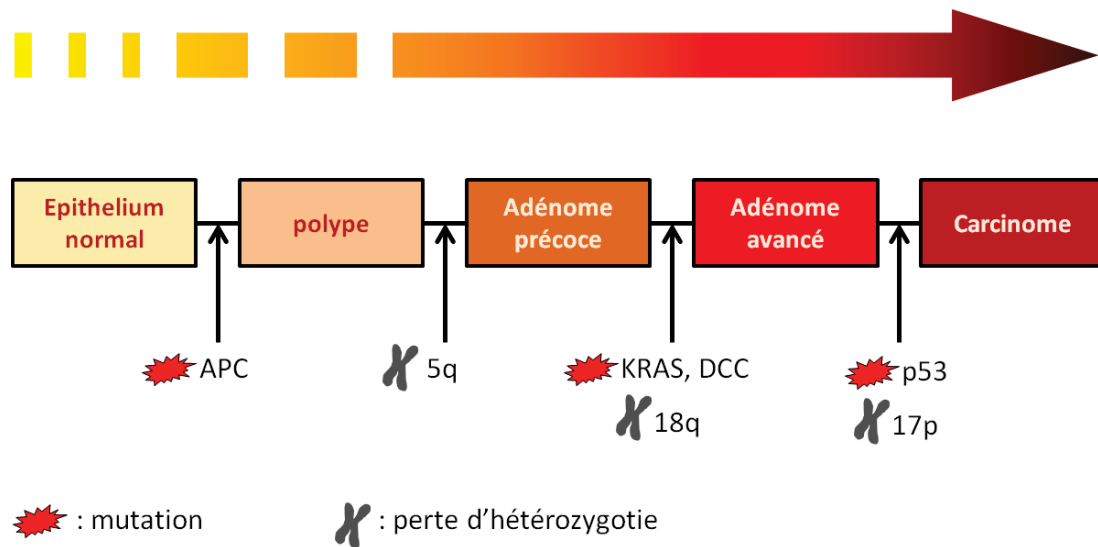


Figure 2: Carcinogénèse colique induite par instabilité chromosomique (figure adaptée de Moran et al.¹²)

Le gène APC est muté dans la majorité des CCR sporadiques dès les stades précoces. La transmission héréditaire de sa mutation est à l'origine de la PAF (Cf : 1-2-1 Forme familiale). La protéine APC joue un rôle dans la voie Wnt qui contrôle de nombreux gènes tels que des régulateurs du cycle cellulaire (Cycline D, c-Myc) et certains gènes liés à la progression tumorale (MMP-7, MMP-26). La mutation d'APC conduit à une activation constitutive de la voie Wnt. La protéine APC est également impliquée dans différents processus de régulation du cytosquelette. Son absence peut altérer la migration cellulaire et l'alignement des chromosomes durant la mitose¹³. Ainsi, La mutation du gène APC initie le premier stade de la carcinogénèse colique.

Les gènes KRAS et DCC (*deleted in colorectal cancer*) sont les cibles de mutations durant la progression de l'adénome colique. Ils sont respectivement mutés dans 35 à 42 % et 70 % des CCR^{14,15}. KRAS est un proto-oncogène, effecteur de la voie du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), impliqué dans la prolifération cellulaire et la survie. Son rôle sera plus amplement étudié dans la partie consacrée aux traitements anti-EGFR (partie 1-4-2). Dans 40 % des cas, la mutation de KRAS se situe sur les codons 12 ou 13 et conduit à une activation constitutive de la voie EGFR¹⁶. Les cellules coliques prolifèrent alors plus rapidement que les cellules coliques dites « normales ».

La mutation du gène suppresseur de tumeur p53 lève le dernier frein à la carcinogénèse. Il est muté dans près de 50 % des cancers humains (toutes tumeurs confondues) et transforme l'adénome avancé non-invasif en cancer invasif.

Dans la carcinogénèse colorectale, son taux de mutation augmente au fil de la progression tumorale et atteint 75 % dans les CCR invasifs. La protéine p53 est considérée comme la « gardienne du génome ». Son activité est cruciale pour le maintien de l'intégrité du génome du fait de son contrôle sur le cycle cellulaire. P53 est majoritairement régulée par MDM-2, l' E3 ubiquitine ligase qui à l'état cellulaire basal induit une dégradation continue de p53 ¹⁷.

À la suite de divers stress (UV, stress osmotique, oxydatif, chimique) qui conduisent à des dommages à l'ADN, la protéine p53 est stabilisée et s'accumule dans la cellule. Elle subit alors des modifications post traductionnelles lui conférant la capacité de ralentir ou stopper le cycle cellulaire pour permettre l'intervention des systèmes de réparation de l'ADN. Dans le cas où les dommages à l'ADN seraient trop importants pour être réparés, p53 induit l'apoptose ou « mort programmée » de la cellule ^{18,19}. En effet, en condition physiologique, ce sont les modifications post-traductionnelles subies par p53 qui déterminent sa stabilité ainsi que son activation. Dans le modèle d'activation classique, à la suite d'un stress, il est admis que les phosphorylations N-terminales situées sur la serine 15 et 20 induisent rapidement une stabilisation de p53 en inhibant son interaction avec MDM-2 et donc sa dégradation. Ce sont principalement les kinases chargées de la détection des dommages à l'ADN qui sont à l'origine de ces phosphorylations, à la suite desquelles p53 se lie à l'ADN et active la transcription de ses gènes cibles, ceux-ci détermineront le devenir de la cellule (figure 3). La régulation de p53 est complexe : son activation dépend essentiellement des phosphorylations, acétylations et autres modifications post-traductionnelles de cette protéine. Cependant, en cancérologie, elle dépend également de la régulation de ses facteurs de répression tel que MDM-2 ²⁰.

Il est donc évident que les mutations de p53 provoquent une dérégulation importante du cycle cellulaire et de l'apoptose dans les cellules cancéreuses.

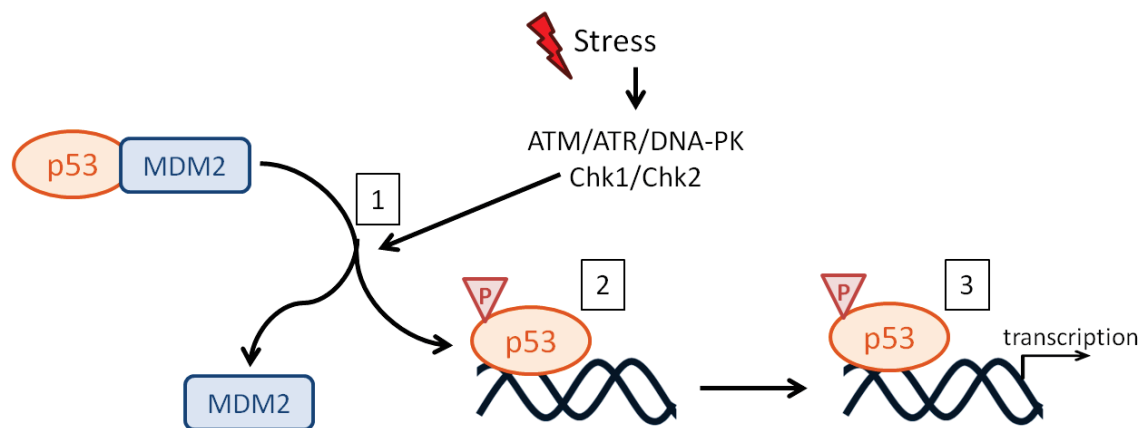


Figure 3 : Modèle classique d'activation de p53. 1-stabilisation de p53, 2-liaison à l'ADN, 3-transcription des gènes cibles²⁰.

Enfin, il est important de préciser que dans ce modèle de carcinogénèse, toutes les mutations et pertes chromosomiques évoquées peuvent ne pas coexister. En effet, outre le niveau d'expression des protéines (APC, KRAS, P53 ...), ce sont leurs rôles dans la cellule qui sont ciblés par ces mutations pour permettre aux cellules cancéreuses de croître au profit du tissu sain. Ainsi, une tumeur ne présentant pas de mutation du gène APC aura souvent une mutation au niveau du gène de la β -caténine (protéine clef de la voie Wnt) engendrant un effet similaire¹².

b- L'instabilité des microsatellites

Peu après la publication du modèle de Fearon et Vogelstein en 1992¹¹, l'équipe du Pr. Perucho a utilisé la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) dans le but d'amplifier des extraits d'ADN provenant de tumeurs colorectales et de tissus sains de mêmes patients pour comparer leurs différences chromosomiques. C'est ainsi que dans plus de 10 % des tumeurs, des milliers de courtes délétions dans des séquences répétées de l'ADN ont été observées.

La présence de ces dernières était négativement corrélée avec les mutations des gènes KRAS et p53, mettant en évidence une voie alternative à l'instabilité chromosomique dans la cancérogénèse colorectale. Les auteurs avaient dès lors évoqué un lien possible avec le syndrome de Lynch (cf: 1-2-1 Forme familiale). En effet, ces tumeurs possèdent des caractéristiques communes telles que le développement dans le colon proximal et des

cellules peu différenciées ²¹. Dans le même temps, Thibodeau et al. observent également une instabilité des microsatellites dans 28 % des 90 CCR étudiés, non corrélée à des pertes d'hétérozygotie ²².

Les cas de cancérogénèse qui se développent par instabilité des microsatellites (MSI) représentent environ 15 % des CCR sporadiques. Á l'instar du syndrome de Lynch, des défauts dans le système de réparation des mésappariements (MMR) de l'ADN sont à l'origine de ces tumeurs. Le phénotype méthylateur des îlots CPG (CIMP) est à l'origine des tumeurs sporadiques de types MSI. Dans la majorité des cas, c'est le gène MLH-1, principal acteur du MMR chez l'homme, qui est inactivé par méthylation de son promoteur ²³.

Il existe deux classes de cancers MSI : la classe *MSI-High* (MSI-H) présentant un fort degré d'instabilité des microsatellites et la classe *MSI-Low* (MSI-L) considérée comme étant à l'interface entre MSI-H et MSS. Désormais les classifications font davantage référence à MSI-H versus non MSI-H. L'utilisation d'un panel de marqueurs des microsatellites selon les lignes directrices de Bethesda²⁴ permet de déterminer qu'une tumeur présentant plus d'un microsatellite et/ou plus de 30 % du panel utilisé muté appartient à la classe MSI-H, présentant des caractéristiques cliniques similaires au syndrome de Lynch. Les tumeurs pour lesquelles un microsatellite ou moins de 30 % du panel est muté font parties des MSI-L qui présentent des caractéristiques cliniques communes aux tumeurs MSS. Enfin, outre l'apport dans la compréhension des caractéristiques génétiques et moléculaires caractérisant les CCR, ces sous-groupes permettent de mettre en évidence que les tumeurs MSI-H sont de meilleur pronostic ²⁵.

1-3 Classifications et épidémiologie du cancer colorectal

1-3-1 Degrés de classification des CCR

a- La détermination du stade

Lors du diagnostic, le stade du cancer est déterminé. Celui-ci reflètera l'étendue de la maladie dans l'organisme et sera important dans le choix de la stratégie thérapeutique à adopter. La classification TNM (*tumor/ node/ metastasis*) ou (tumeur/ ganglion lymphatique/ métastase) est largement utilisée pour déterminer le stade d'un CCR. Les trois critères principaux utilisés pour définir le stade de la maladie sont :

- La taille et la profondeur de la tumeur
- Le degré d'atteinte des ganglions lymphatiques
- L'absence ou la présence de métastases

Les trois premiers stades représentent les différents niveaux d'envahissement du tissu du côlon ou du rectum sans atteinte de ganglions lymphatiques ni d'autres tissus à distance. Au stade III un ou plusieurs ganglions lymphatiques sont envahis et au stade IV un ou plusieurs foyers tumoraux sont observés à distance de la tumeur primaire (Figure 4) ²⁶.

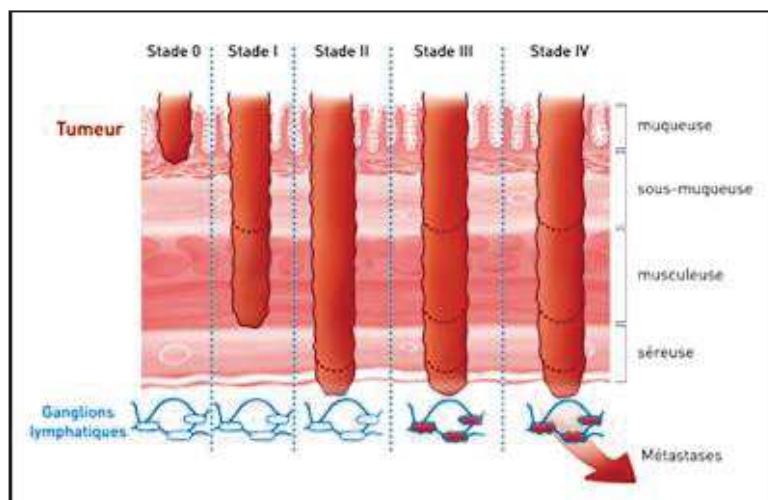


Figure 4 : Les stades du cancer colorectal ²⁶

Des sous-classes peuvent compléter cette classification en fonction de l'étendu ou du nombre de lésions. Ainsi selon la classification ESMO (société européenne d'oncologie médicale), le stade II comporte deux sous-groupes distinguant les tumeurs ayant ou non envahi le péritoine. Le stade III contient, quant à lui, trois sous-groupes selon l'envahissement local de la tumeur et le nombre de ganglions lymphatiques atteint par les cellules cancéreuses (tableau 1).

À la suite d'une biopsie ou d'une résection tumorale, les examens d'anatomopathologie peuvent s'avérer d'une aide précieuse pour préciser le stade de la maladie mais également le type de lésion cancéreuse dont souffre le patient. Ces données permettent de « grader » les lésions cancéreuses en fonction du degré de différences entre tissu sain et tissu tumoral : plus les deux tissus sont différents morphologiquement et plus le grade (de 1 à 4) est élevé ²⁷.

Tableau 1 : Classification TNM ²⁷

Stade	Définition	Catégorie
Stade 0	Carcinome in situ : tumeur maligne confinée à la muqueuse qui n'a pas envahi la sous-muqueuse	Cancer colo-rectal localisé
Stade I	La tumeur envahit la sous-muqueuse ou la tunique musculieuse	
Stade IIA	La tumeur traverse la tunique musculieuse et envahit la sous-séreuse ou les tissus environnants de l'espace intrapéritonéal	
Stade IIB	La tumeur pénètre dans le péritoine viscéral et/ou envahit directement des organes ou des structures situés dans l'espace intrapéritonéal	
Stade III	La tumeur a produit des métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux. Le stade III est divisé en trois stades différents en fonction de l'envahissement de la tumeur locale et du nombre de ganglions lymphatiques portant des métastases • Stade IIIA : la tumeur envahit la muqueuse, la sous-muqueuse ou la tunique musculieuse et s'est propagée à 1–3 ganglions lymphatiques régionaux. • Stade IIIB : La tumeur envahit la sous-séreuse, le péritoine viscéral ou les organes voisins, et s'est propagée à 1–3 ganglions lymphatiques régionaux. • Stade IIIC : Indépendamment du degré d'envahissement local, la tumeur s'est propagée à 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus.	
Stade IV	Indépendamment du degré d'envahissement local et/ou de la propagation à des ganglions lymphatiques régionaux, la tumeur s'est propagée à des organes distants.	Cancer colorectal avancé

b- Des différentes classifications moléculaires au consensus

La corrélation entre le statut MSI-H des tumeurs et leur meilleur pronostic a été un premier pas dans la classification moléculaire des CCR. Le développement des puces ADN à la fin des années 90 a permis d'engendrer un grand nombre de données de transcriptome. La première comparaison entre le transcriptome de tissus sains et de tissus tumoraux fût appliquée au cancer du sein²⁸. C'est donc grâce à des approches transcriptomiques que plusieurs classifications moléculaires du CCR ont été publiées entre 2012 et 2014. Chacune de ces classifications diffère dans leur cohorte de patients, leur type d'échantillons, ainsi que les puces ADN utilisées (tableau 2) et a donné lieu à des classifications différentes comprenant de trois à six sous-types de CCR.

Tableau 2 : Caractéristiques des classifications moléculaires du CCR

Auteurs	Groupe dans l'étude consensus²⁹	Nombres et types d'échantillons	Sous-types obtenus
Budinska et al.³⁰	A	1113 échantillons (congelés + inclusion en paraffine) CCR stade II et III	Surface des cryptes Intérieur des cryptes CIMP Mésenchymateux Mixte
Marisa et al.³¹	B	443 échantillons (congelés) CCR stade I à IV	C1- CIN faiblement immun C2- Défaut du MMR C3- Muté KRAS C4- Cellules souches cancéreuses C5- CIN (voie WNT suractivée) C6- CIN normal
Roepman et al.³²	C	188 échantillons (congelés) CCR stade I à IV	Type A Types B Type C
De Sousa e Melo et al.³³	D	90 échantillons (congelés) CCR stade II	CCS1 CCS2 CCS3
Sadanandam et al.³⁴	E	445 échantillons (congelés) CCR stade I à IV	Inflammatoire Entérocyte Amplification transitoire Type globule Type cellule souche
Schlicker et al.³⁵	F	62 échantillons (congelés) CCR stade II à IV	1.1 1.2 1.3 2.1 2.2

Afin d'éviter une cacophonie entre les différents modèles, les principaux auteurs de ces classifications se sont réunis en 2015 pour mettre au point un système de classification consensuel permettant de donner une base unique à l'étude de l'hétérogénéité tumorale dans le CCR.

Dans l'étude de Guinney et al. les six approches moléculaires (classées de A à F dans le tableau 2) ont été effectuées sur l'ensemble des échantillons (n =4 151 patients), chaque échantillon a donc reçu six classements. L'étude de l'interconnexion entre ces classements a permis de faire émerger 4 sous-types de CCR (CMS1, CMS2, CMS3 et CMS4). L'approche basée sur les interconnexions, a directement corrélié 78 % des échantillons à un sous-type, par le recours à une analyse plus avancée 7 % supplémentaires ont pu être assignés un sous-type. Ainsi, 15 % des échantillons ne peuvent être attribués à un seul sous-type, la moitié se situant entre deux sous-types et l'autre moitié demeurent non classable ²⁹.

Ce classement moléculaire permet ainsi de mettre en évidence des caractéristiques biologiques (tableau 3) et cliniques distinctes pour chaque sous-type. Pour ce qui est de la survie globale et de la survie sans progression, c'est le groupe CMS4 qui est de plus mauvais pronostic. Les patients CMS2 présentent la survie sans progression la plus favorable et le groupe CMS1 présente une faible survie après rechute²⁹. Cliniquement, le modèle proposé est donc pertinent pour mettre en évidence des classes de patients à risques et guider de nouveaux essais cliniques corrélés aux caractéristiques moléculaires des tumeurs ³⁶. De plus, cette étude consensuelle a permis de mettre en place un ensemble de programmes mis à disposition de la communauté scientifique pour analyser et classer de nouvelles cohortes de patients.

Cependant, l'utilisation de cette technique en routine clinique pour définir la prise en charge des patients reste pour l'instant trop coûteuse à mettre en place. Toutefois, les caractéristiques phénotypiques mises en évidence dans chaque sous-groupe pourraient être des indicateurs intéressants et simples à étudier par immunohistochimie, constituant ainsi un pas de plus vers la médecine de précision ³⁷.

Tableau 3 : Différences biologiques significatives dans les sous-types moléculaires. Tableau traduit et adapté de Guinney et al.²⁹

CMS1 MSI immun	CMS2 Voie canonique	CMS3 Métabolique	CMS4 Mésenchymateux
14 %	37 %	13 %	23 %
MSI, CIMP élevé, hypermutation	CIN importante	Certains MSI, CIMP faible, CIN faible	CIN importante
BRAF muté		KRAS muté	
Infiltration et activation immune	Wnt et Myc activée	Dérégulation métabolique	Infiltration stromale Activation TGFβ, angiogénèse

1-3-2 Données épidémiologiques, diagnostic et prévention

En France, le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer du point de vue de l'incidence chez l'homme (après le cancer de la prostate et le cancer du poumon). Chez la femme, il se classe en deuxième position après le cancer du sein. Chaque année, 43 000 nouveaux cas de CCR sont recensés tout sexe confondu. Ce cancer représente la deuxième cause de décès par cancer en France chez l'homme après le cancer du poumon et la troisième cause de mortalité chez la femme après le cancer du sein et du poumon avec 17833 décès estimés en 2015. Le CCR touche de façon majoritaire les personnes de plus de 65 ans.

Récemment les tendances de la survie globale ont augmenté. En effet, pour les cancers colorectaux diagnostiqués entre 2005 et 2010, la survie globale à 5 ans atteint désormais 63 % en France métropolitaine.

Au diagnostic la moitié des cancers colorectaux est déjà au stade régional ou avancé (III ou IV). C'est pourquoi depuis 2008, un programme national de dépistage du cancer colorectal a été mis en place. Celui-ci concerne les personnes de 50 et 74 ans avec un risque

moyen de CCR : il permet la détection de sang occulte dans les selles. En 2015 ce test a été perfectionné ; il est désormais plus simple d'utilisation et présente une sensibilité supérieure. Ainsi, ce programme permet une détection précoce des lésions cancéreuses, 25 % sont détectées au stade précancéreux et plus de 60 % sont détectées avant le stade régional (III), donnant de meilleures chances de survie aux patients diagnostiqués ³⁸.

1-4 Traitements du cancer colorectal

Le CCR peut être traité selon différentes modalités (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapies, thérapies ciblées). Les traitements du CCR dépendent du stade de la maladie, de sa localisation (zone du côlon, ou du rectum), de l'étendue de la lésion et de l'état général du patient.

Du stade 0 à I, la chirurgie est le traitement préférentiel car la tumeur est localisée et superficielle. En général, une colectomie visant à retirer la partie lésée du colon est proposée. Pour le rectum, seule la tumeur est retirée si elle est de petite taille ; dans les autres cas la partie du rectum touchée est retirée avec son tissu de soutien (mesorectum).

Pour Les stades suivants (II et III), la tumeur est profondément ancrée dans les tissus et peut avoir envahi les ganglions et organes voisins. La résection chirurgicale des tissus touchés et des ganglions qui en dépendent est effectuée. Si la tumeur se situe dans le côlon une chimiothérapie adjuvante (post chirurgie) est recommandée afin de réduire le risque de récurrence pour les tumeurs agressives de stades II et pour les stades III. Lorsque le rectum est touché, la radiothérapie peut remplacer ou compléter la chimiothérapie avant la chirurgie (traitement néoadjuvant) pour faire décroître la tumeur et faciliter son ablation ou après celle-ci pour limiter les risques de récurrence (traitement adjuvant).

La chirurgie peut également être employée pour traiter les cancers colorectaux de stade IV. En amont, des agents cytotoxiques peuvent être utilisés afin de réduire la taille des métastases et de faciliter l'exérèse. Lorsqu'il n'est pas possible d'opérer, la chimiothérapie constitue le traitement principal pour ralentir la progression ou faire régresser les tumeurs. Elle peut être complétée par d'autres traitements : les thérapies dites « ciblées ». Pour les cancers du rectum la radiothérapie peut être utilisée afin de diminuer les symptômes liés au cancer^{39,40}.

Le traitement du cancer colorectal métastatique est généralement composé de médicaments cytotoxiques aussi appelés agents antinéoplasiques (5-fluorouracile, oxaliplatine, irinotécan, capécitabine) et de thérapies ciblées, principalement anti-EGFR, et anti-VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). L'association de ces traitements compose les différents protocoles de chimiothérapies et de thérapies ciblées qui

sont proposés au patient en fonction de son état général et des caractéristiques de son cancer. Différents protocoles peuvent être prescrits à un patient, si sa tumeur devient résistante aux traitements ou si le protocole est mal toléré, chaque protocole correspondant à une « ligne de traitement ».

Les médicaments cytotoxiques peuvent être combinés entre eux, ainsi, 5-fluorouracile (5-FU), leucovorine et oxaliplatine forment le protocole FOLFOX, 5-fluorouracile (5-FU), leucovorine et irinotécan composent le protocole FOLFIRI, enfin l'association 5-fluorouracile (5-FU), leucovorine, Irinotécan et oxaliplatine est utilisée sous le nom de FOLFOXIRI ou FOLFIRINOX. Les premiers agents antinéoplasiques ont été approuvés dans le traitement du cancer colorectal depuis le début des années 90 et leur combinaison a permis d'augmenter significativement la survie des patients. Lors d'un changement de protocole de traitement, l'alternance des agents cytotoxiques est recommandée (ex : si le FOLFIRI était en première ligne, on recommandera le FOLFOX en second protocole et vice versa)⁴¹.

Les premières thérapies ciblées ont été mises sur le marché dans les années 2000 et ont permis, en combinaison avec les chimiothérapies conventionnelles, d'améliorer la survie et/ ou d'augmenter le taux de réponse des patients. Elles sont désormais proposées dès la première ligne de traitement et leur choix dépend des caractéristiques de la tumeur.

Actuellement, les mutations des gènes KRAS et BRAF sont les seuls biomarqueurs utilisés dans le CCR, leur présence contre-indique l'utilisation des thérapies anti-EGFR (cétuximab, panitumumab). Dans ce cas, les thérapies anti-angiogéniques sont utilisées (bévacizumab, ramucirumab, aflibercept ou régorafénib). Enfin, le composé cytotoxique TAS-102 (trifluridine-tipiracil), récemment approuvé peut être utilisé en troisième ligne de traitement^{42,43} (figure 5 et 6).

Cette thèse étant axée sur les résistances aux agents antinéoplasiques et thérapies anti-EGFR utilisés dans le traitement du CCR, seuls les médicaments composant ces groupes seront décrits dans la suite de ce manuscrit.

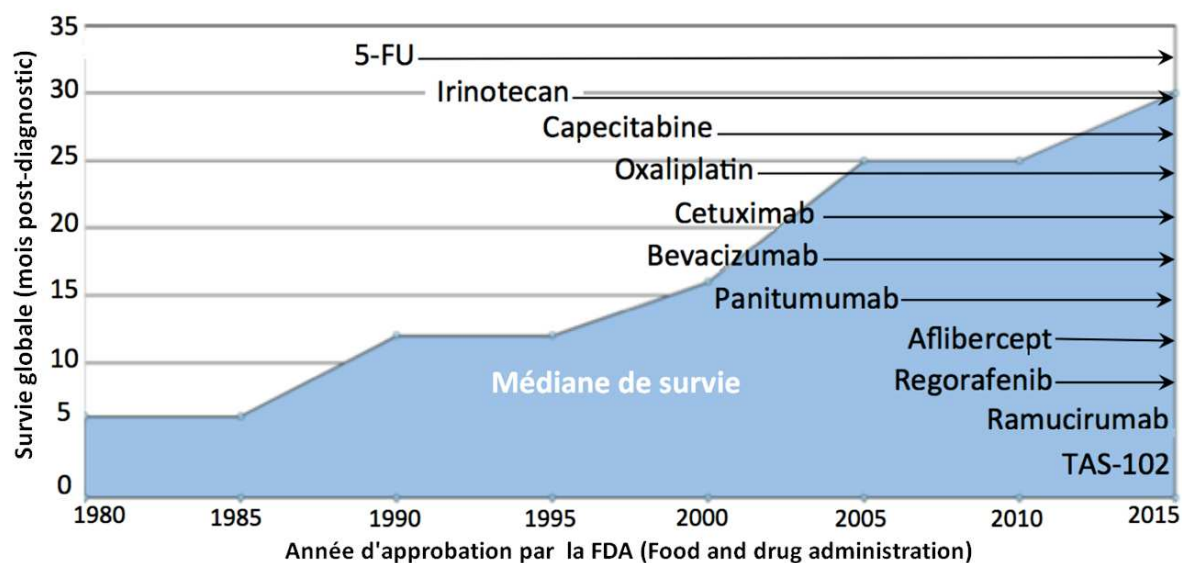


Figure 5: Avancées et progrès des traitements du CCR métastatique ⁴²

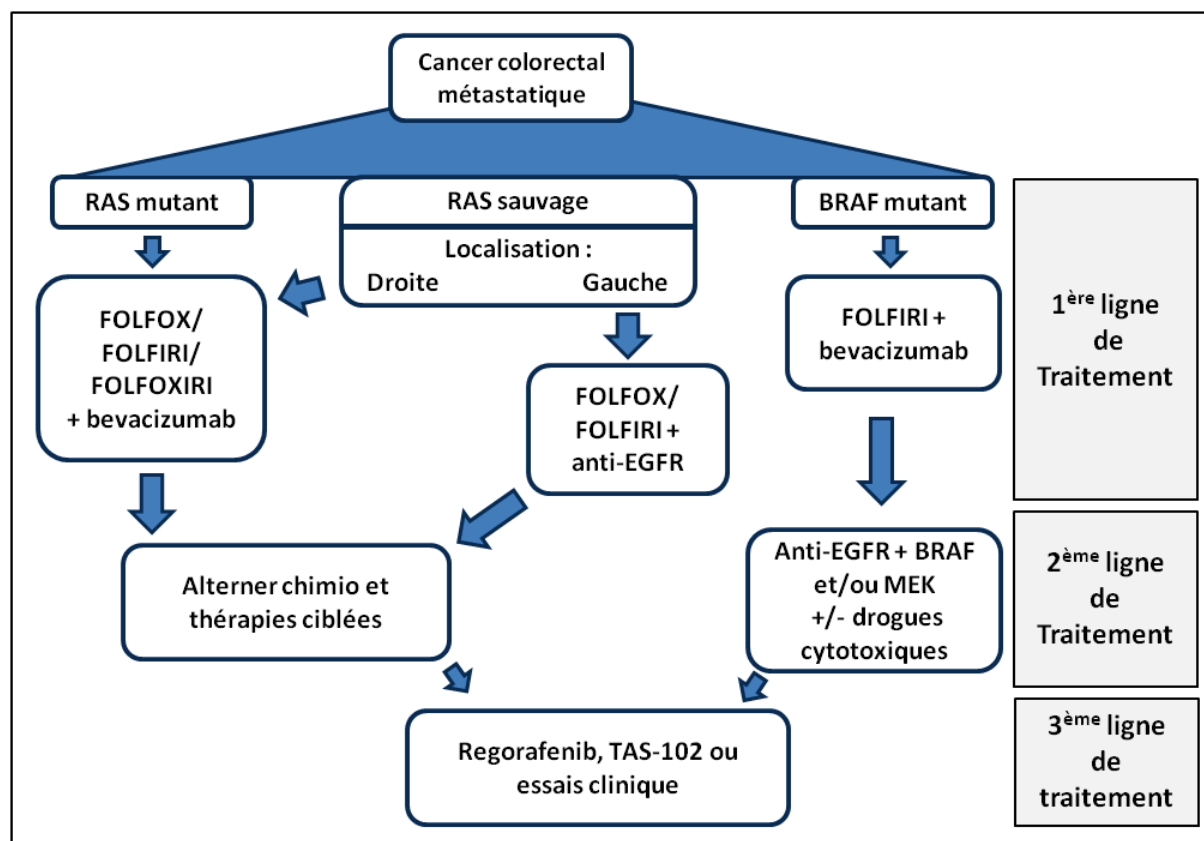


Figure 6: Possibilités de traitement pour les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique intégrant les caractéristiques moléculaires et le site anatomique dans le processus décisionnel ⁴³.

1-4-1 Médicaments cytotoxiques utilisés dans le traitement du CCR métastatique

Contrairement à la chirurgie et à la radiothérapie qui sont des traitements dits « locaux ». Les antinéoplasiques ou médicaments cytotoxiques qui composent les protocoles à base de chimiothérapies sont des traitements systémiques car il cible toutes les cellules en prolifération de l'organisme. Les cellules tumorales ayant une prolifération rapide et anarchique sont donc préférentiellement touchées par ces traitements. À l'état physiologique, certaines cellules ont une vitesse de prolifération élevée (ex : racines capillaires, cellules intestinales, cellules de la peau). Les antinéoplasiques, en endommageant ces cellules saines, peuvent causer divers effets secondaires, tels que : perte de cheveux, diarrhée et rash cutané. Dans certains cas, les effets secondaires sont trop sévères et nécessitent l'arrêt du traitement. Cependant, les médicaments cytotoxiques ont permis d'augmenter la survie voire de guérir un grand nombre de patients jusqu'alors condamnés. Certains médicaments, comme le 5-FU ou le méthotrexate constituent aujourd'hui encore des standards dans le traitement des cancers.

Généralement administré par perfusion lente dans une veine, le médicament cytotoxique peut également être délivré par voie orale ou dans la zone touchée par les lésions cancéreuses. C'est le cas au niveau du foie, siège de 40 à 60 % des métastases issues du CCR, on parle alors de chimioembolisation artérielle ou de chimiothérapie intra-artérielle

44 .

a- 5-fluorouracile/leucovorine

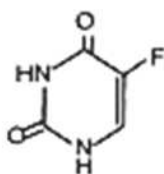
Le 5-FU, synthétisé par Heidelberger dans les années 1950, est un analogue de l'uracile possédant un atome de fluor en position C5. Il fait partie de la classe des anti-métabolites (figure 7). Dès 1957, son effet anti-tumoral est mis en évidence et la molécule fait rapidement l'objet d'essais cliniques ^{45,46}. Les anti-métabolites ciblent les processus de synthèse biologique essentiels en les inhibant et en s'incorporant dans des macromolécules (ADN, ARN). Le 5-FU possède ces deux actions du fait de son analogie avec l'uracile. Il est capable d'altérer la synthèse de l'ARN, de l'ADN et cette molécule inhibe également une

enzyme : la thymidylate synthase (TS). L'effet de cet agent antinéoplasique s'effectue grâce à ces métabolites actifs : le fluorodéoxyuridine monophosphate (FdUMP), le fluorodéoxyuridine triphosphate (FdUTP) et le fluorouridine triphosphate (FUTP). Le FdUMP bloque l'activité de la TS, cette enzyme transforme le déoxyuridine monophosphate en déoxythymidine monophosphate (dTMP) nécessaire à la synthèse de l'ADN. Ainsi, les réserves de déoxyribonucléotide (dNTP) sont déstabilisées par manque de dTMP provoquant des dommages à l'ADN non réparés. Le F-UTP s'intègre dans l'ARN causant de graves dysfonctions dans la synthèse des protéines. Le 5-FU seul peut augmenter la médiane de survie des patients atteints de CCR métastatique de plus de 7 mois. Cependant, dans l'organisme, 80 % de la molécule est directement inactivée par les systèmes de détoxification de l'organisme ⁴⁷.

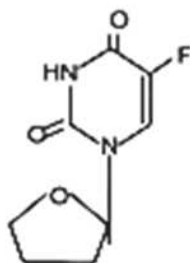
À la fin des années 80, de nouvelles recherches ont permis d'améliorer l'effet du 5-FU en le couplant à de l'acide folinique (leucovorine) qui potentialise le blocage de la TS. Dans cet essai, les patients atteints de CCR métastatique traités par 5FU + Leucovorine ont une médiane de survie de 12 mois. Outre l'amélioration de survie, cette combinaison augmente le taux de réponse et la qualité de vie des patients ⁴⁸. C'est pourquoi le 5-FU est systématiquement associé à la leucovorine dans le traitement du CCR.

Il existe désormais des analogues du 5-FU, tels que la capécitabine ou le tégaflur uracile (UFT) utilisés dans le traitement du cancer colorectal (figure 7). Ces prodrogues permettent de limiter la métabolisation du 5-FU et sont prises par voie orale ⁴⁹.

5-Fluorouracile



Tégaflur



Capécitabine

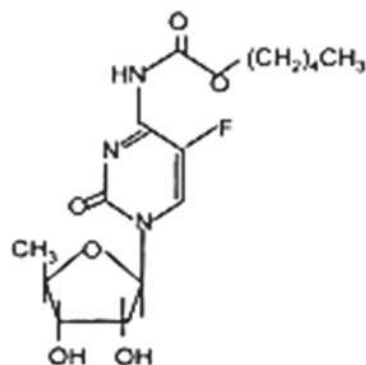


Figure 7: Le 5-fluorouracile et ses analogues utilisés dans le traitement du CCR ⁵⁰

b- Irinotecan

L'irinotécan, dérivé de la camptothécine, fait partie de la classe des inhibiteurs de topoisomérase. La camptothécine (CPT) est une molécule aux propriétés anticancéreuses mises en évidence dans les années 60. Elle est issue du *camptotheca acuminata*, arbre utilisé en médecine chinoise. Dans les années 1970, la trop grande toxicité de la CPT lors d'essais clinique a momentanément stoppé les recherches sur cette molécule.

Plus tard, des études montreront que l'action anti-tumorale de la CPT passe par l'inhibition de la topoisomérase I. Une fois le mécanisme d'action de la CPT mis en évidence, des analogues de la molécule ont été synthétisés afin d'abolir les effets toxiques de la CPT tout en conservant une activité anti-tumorale ⁵¹. L'irinotécan (CPT-11) fait partie des analogues de la CPT et est considéré comme une prodrogue dont l'effet anti-tumoral s'effectue par le biais de son métabolite actif : le SN-38 (figure 8) ⁵². En France, il obtient une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1995. Son indication principale concerne les cancers colorectaux avancés en combinaison avec 5-FU/leucovorine ou en monothérapie. Aujourd'hui, ce médicament cytotoxique peut également être utilisé dans le traitement des cancers ovariens et pancréatiques.

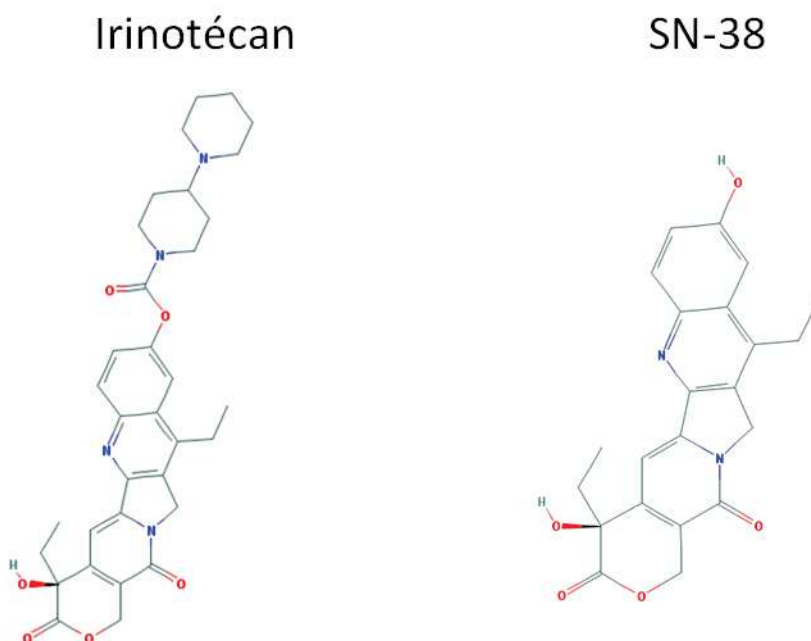


Figure 8: Formule chimique de l'irinotécan et de son métabolite actif le SN-38 (PubChem)

L'irinotécan est métabolisé par la carboxylestérase en son métabolite actif le SN-38 qui produit l'effet cytotoxique en ciblant la topoisomérase I (Topo I), une enzyme impliquée dans la relaxation de la double hélice d'ADN⁵³.

Lors de la réplication, l'ADN est désenroulé à partir d'une origine de réplication. Lorsque la fourche de réplication progresse, l'ADN en aval est surenroulé et la topoisomérase I permet de relaxer ce type de tension. Pour cela, la topoisomérase I se lie à l'ADN, en sectionne un brin permettant à l'ADN de se relaxer d'un tour, puis répare le brin sectionné permettant à la réplication de se poursuivre⁵⁴.

Le SN-38 est capable de bloquer la topoisomérase I liée à l'ADN lorsque celle-ci a sectionné un brin de la double hélice⁵¹. Ce blocage engendre des dommages simple brin et provoque également des cassures double brin de l'ADN lorsque l'appareil réplcatif progresse et entre en collision avec la topoisomérase I bloquée sur l'ADN (figure 9). Le SN-38 induit ainsi un arrêt de prolifération ainsi que l'apoptose des cellules tumorales^{52,53}.

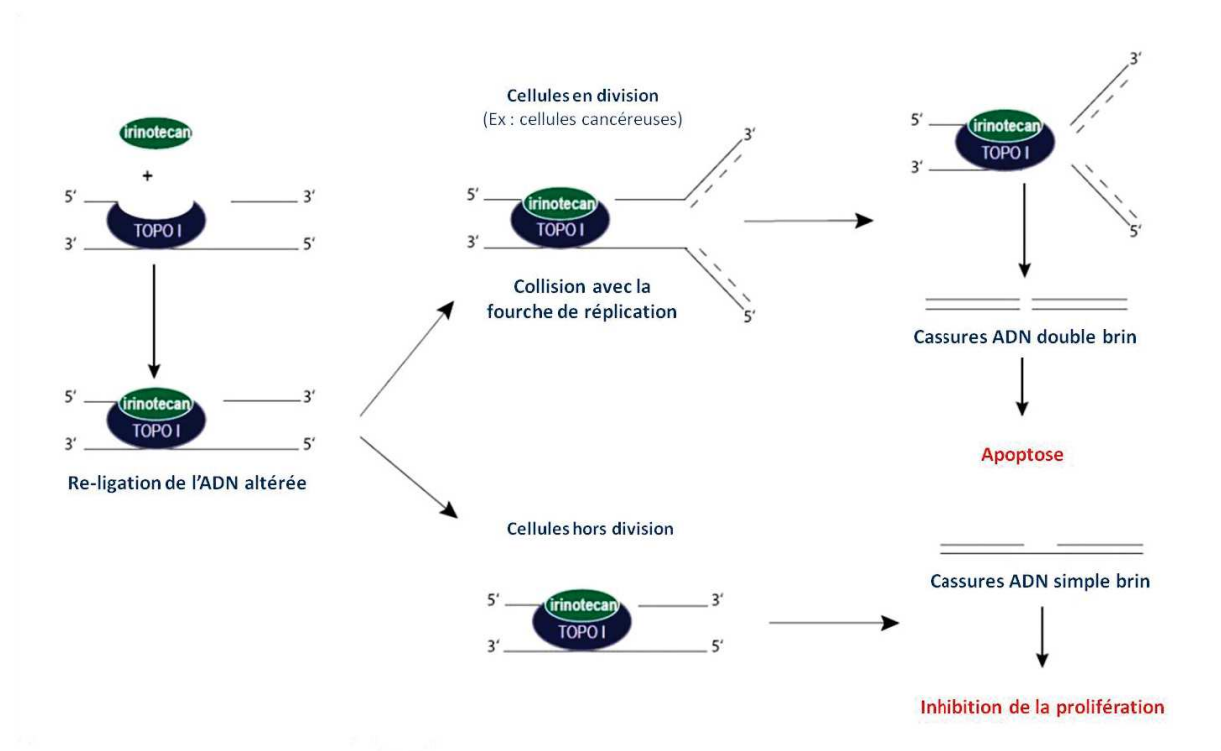


Figure 9: Mécanisme d'action de l'irinotécan (adapté de⁵⁵)

D'abord utilisé en seconde ligne de traitement pour les patients dont la tumeur ne répondait plus au standard 5-FU/leucovorine, l'irinotécan a ensuite été utilisé en clinique comme première ligne de traitement combiné au 5-FU/Leucovorine (protocole FOLFIRI). En première ligne, cette combinaison a permis d'augmenter le taux de réponse et la survie médiane des patients atteints de CCR métastatique⁵⁶. Cependant, l'irinotécan peut entraîner des toxicités importantes pouvant dans de rares cas conduire au décès si le patient possède un déficit de l'enzyme UGT1A, responsable de l'inactivation du SN-38⁵⁷. Il est donc recommandé de tester la présence de certains polymorphismes génétiques sur cette enzyme avant de débiter un traitement composé d'irinotécan ou en cas d'effets secondaires sévères⁵⁸.

c- Oxaliplatine

L'oxaliplatine (L-OHP) est un agent alkylant antinéoplasique. Ce sel de platine de troisième génération est constitué d'un atome de platine, d'un groupe oxalate et d'une molécule de 1-2 diaminocyclohexane (DACH). Le potentiel des sels de platine comme agent anticancéreux a été mis en évidence par Rosenberg et al. dès 1969⁵⁹. Le cisplatine fût le premier dérivé de platine à être approuvé par la FDA (*food and drug administration*) en 1978⁶⁰. Cependant, l'apparition de résistances et de toxicités à la suite de ce traitement ont entraîné le développement de nouveaux dérivés à base de platine (figure10).

Les sels de platine ciblent principalement l'ADN, ils se lient aux bases de l'ADN en formant des adduits de platine. Ces derniers causent des dommages capables de provoquer l'apoptose des cellules cancéreuses⁶¹. L'oxaliplatine a montré son efficacité sur des lignées cellulaires résistantes au cisplatine et n'est pas efficace dans les mêmes tissus que ses précurseurs⁶². De plus, en clinique il est le seul sel de platine indiqué dans le traitement des CCR métastatiques. En France il fût mis sur le marché en 1996.

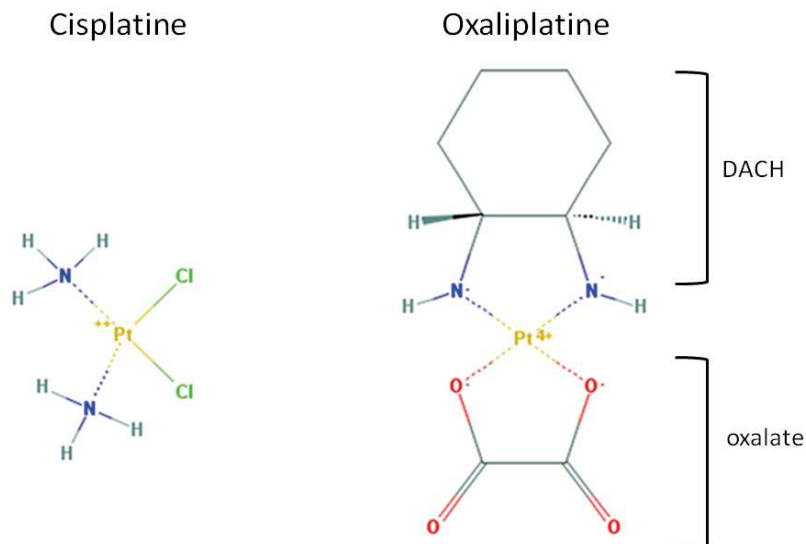


Figure 10: Formule chimique du cisplatine et de l'oxaliplatine (PubChem)

Certains aspects du mécanisme d'action de l'oxaliplatine sont aujourd'hui encore non élucidés. En effet, l'oxaliplatine semble avoir un mécanisme d'action différent des autres sels de platine utilisés en cancérologie (carboplatine, cisplatine). D'un point de vue général l'activité cytotoxique de l'oxaliplatine provient des adduits qu'il forme en se liant sur l'ADN tout comme ses précurseurs⁶³. C'est le DACH-platine dépourvu de sa partie oxalate qui va se lier à l'ADN en formant des ponts intra-brins et en une faible proportion des ponts inter-brins que ne forme pas le cisplatine (figure 11). *In vitro*, à cytotoxicité égale, l'oxaliplatine crée moins d'adduits sur l'ADN que le cisplatine⁶⁴, suggérant que ce médicament pourrait cibler d'autres molécules que l'ADN.

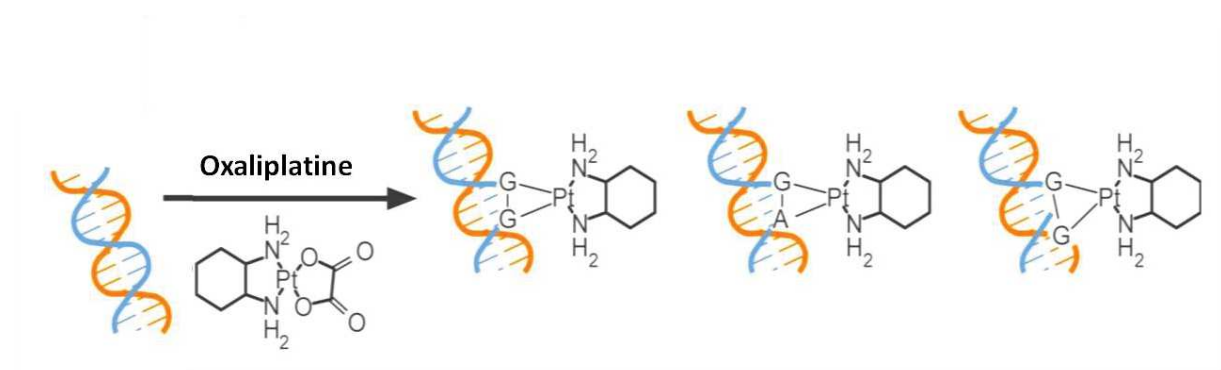


Figure 11: Les différents types d'adduits produits par l'oxaliplatine (adapté de⁶³)

Malgré le plus faible nombre d'adduits, ceux-ci perturbent de façon plus importante la structure de l'ADN par le biais de la partie DACH⁶⁵. Les dommages à l'ADN de l'oxaliplatine semblent également être pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN de façon différente que ceux induits par le cisplatine. En effet, les adduits produits par l'oxaliplatine paraissent moins dépendant du système MMR (Réparation des mésappariements de l'ADN). Ceux-ci seraient moins bien reconnus et moins sensibles à l'absence de MLH1 protéine essentielle de ce système de réparation⁶⁶. Ces adduits seraient donc essentiellement reconnus par les protéines du système de réparation par excision des nucléotides (NER). Le stress engendré par les adduits provoquerait ainsi l'activation d'une apoptose dépendante de p53 dans les cellules dont l'ADN est trop endommagé pour être réparé^{67,68}.

De plus, l'action de l'oxaliplatine peut également stimuler le système immunitaire provoquant une mort cellulaire dépendante de l'immunité : la mort cellulaire immunogène ou *immunogenic cell death* (ICD). Trois phénomènes permettent de mettre en évidence qu'une substance peut induire l'ICD : une translocation de la calréticuline (CRT) du réticulum endoplasmique au feuillet externe de la membrane plasmique, la sécrétion d'ATP dans le milieu extra cellulaire et le relargage de la protéine HMGB1 (figure 12)⁶⁹. Ces signaux permettent l'activation du système immunitaire, qui peut être peu actif dans les tissus péri-tumoraux. Le système immunitaire peut ainsi cibler les cellules cancéreuses, et prendre part à l'effet cytotoxique de l'oxaliplatine *in vivo*⁷⁰.

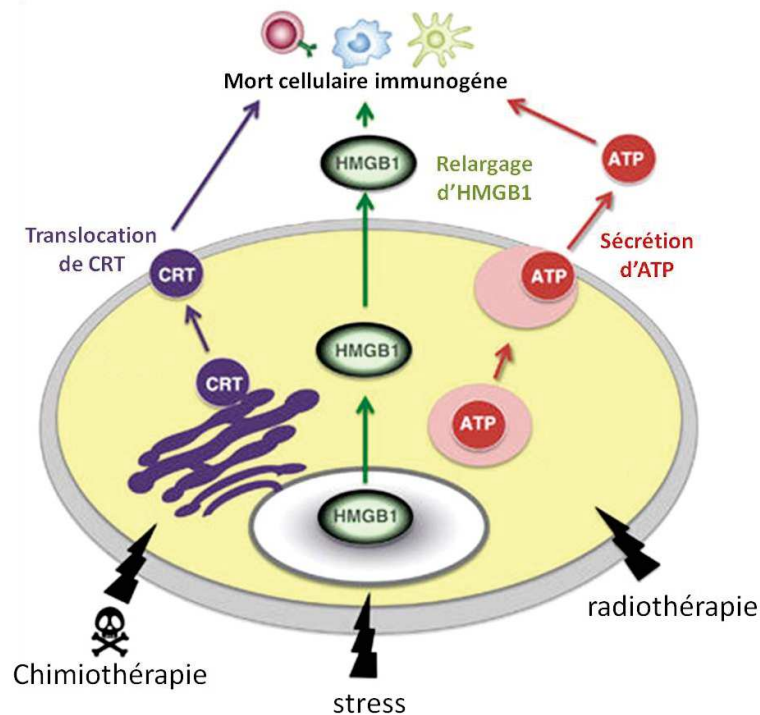


Figure 12: Mécanisme d'induction de l'ICD ⁶⁹

D'un point de vue clinique l'oxaliplatine présente un effet modéré lorsqu'il est utilisé seul. Cependant, il est très synergique en association avec la combinaison 5-FU/leucovorine. Chez des patients souffrant de CCR métastatique traités par l'oxaliplatine associé à 5FU/leucovorine, un taux de réponse supérieur à 50 % et une survie globale pouvant atteindre 19 mois a été observée ⁶⁹. L'oxaliplatine est donc utilisé en association avec la combinaison 5-FU/leucovorine (FOLFOX) dans le traitement adjuvant du cancer colorectal de stade III et dans le traitement du CCR métastatique (en première ou seconde ligne) ⁴¹. L'oxaliplatine est également associé dans cette pathologie avec la combinaison 5-FU/leucovorine et l'irinotécan (FOLFIRINOX ou FOLFOXIRI) ⁷².

Toutefois, le traitement par l'oxaliplatine n'est pas dépourvu d'effets secondaires. Outre les toxicités couramment observées avec d'autres antinéoplasiques (troubles gastro-intestinaux et hématotoxicité), l'oxaliplatine peut être neurotoxique, causant une neuropathie sensorielle aiguë et/ou une neuropathie sensorielle cumulative. Cette dernière apparaît au fil du temps, le plus souvent la neurotoxicité est réversible mais nécessite l'arrêt de cette thérapie durant plusieurs mois ⁷³. L'apparition de neurotoxicité sera donc particulièrement surveillée durant un traitement à base d'oxaliplatine.

1-4-2 Les thérapies anti-EGFR utilisées dans le traitement du CCR métastatique.

Les thérapies ciblées sont des médicaments spécifiquement dirigés contre une protéine ou un mécanisme impliqué dans le développement de la lésion cancéreuse. Dans le CCR métastatique, ces thérapies ciblent la prolifération, la survie cellulaire (par le biais de l'EGFR) ou la néoangiogénèse bloquant ainsi l'apport en oxygène et nutriments des cellules cancéreuses. Bien qu'ils soient dirigés contre des protéines et mécanismes spécifiques de la tumeur, ces traitements peuvent eux aussi provoquer des effets secondaires. Les plus courants sont une hausse de la tension artérielle, des rashs cutanés et une protéinurie.

Chez les patients dont la tumeur est « RAS non mutée », l'EGFR constitue une cible thérapeutique de choix car il est surexprimé dans de nombreux cancers, dont le cancer colorectal. De plus, sa présence au niveau tumoral est associée à une plus grande agressivité de la maladie⁷⁴. Dans le cancer colorectal cette protéine est ciblée par deux anticorps thérapeutiques (le cétuximab et le panitumumab). Dans les cancers bronchiques non à petites cellules, et le cancer du pancréas des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR sont également utilisés (l'erlotinib et le géfitinib).

Les inhibiteurs de tyrosine kinase sont de petites molécules chimiques qui bloquent l'activité kinase de la protéine cible, pour l'EGFR c'est la partie intracellulaire du récepteur qui est visée, ce qui empêche l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur même si celui-ci est constitutivement activé⁷⁵.

Les immunoglobulines de type G (IgG) constituent le principal type d'anticorps circulant chez l'Homme. Elles sont sécrétées par les plasmocytes qui sont issus des lymphocytes B plasmatiques en réponse à une stimulation par un agent étranger à l'organisme appelé antigène. Les IgG sont composées de quatre chaînes peptidiques : deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L). Deux sites de fixation à l'antigène, les « *complementary determining regions* » (CDR), se trouvent aux extrémités de la partie Fab. Les IgG sont divisées en quatre sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4), chacune possédant leur particularité dans le type d'antigènes reconnus, les protéines effectrices recrutées (par leur partie Fc) ou encore leur abondance plasmatique⁷⁶ (figure 13).

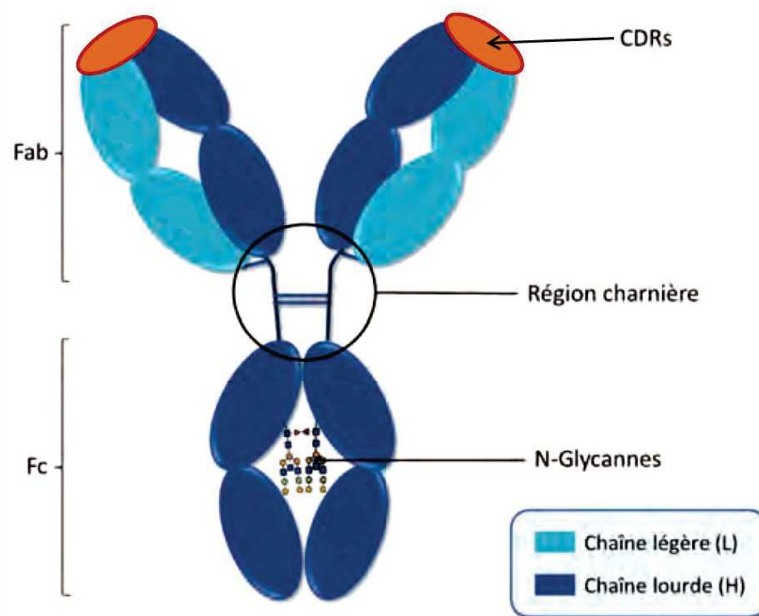


Figure 13: Structure schématique d'un anticorps (IgG). Adapté de Broutin et Watier ⁷⁷

Ainsi, les anticorps thérapeutiques possèdent les qualités inhérentes aux anticorps produits par le système immunitaire qui sont : une reconnaissance et une fixation spécifique à un antigène et la capacité de recruter des effecteurs du système immunitaire pour neutraliser la source de l'antigène.

La technique des hybridomes, mise en place par Köhler et Milstein, résultant de la fusion de lymphocytes B (cellules productrices d'anticorps spécifiques) et de cellules de myélome (immortelles) révolutionne la production d'anticorps en permettant l'obtention d'anticorps monoclonaux. Les productions sont ainsi de composition constante dans le temps.

D'abord entièrement murins, les anticorps thérapeutiques ont été progressivement humanisés permettant une augmentation de leur demi-vie et limitant leur immunogénicité ⁷⁷ (figure 14).

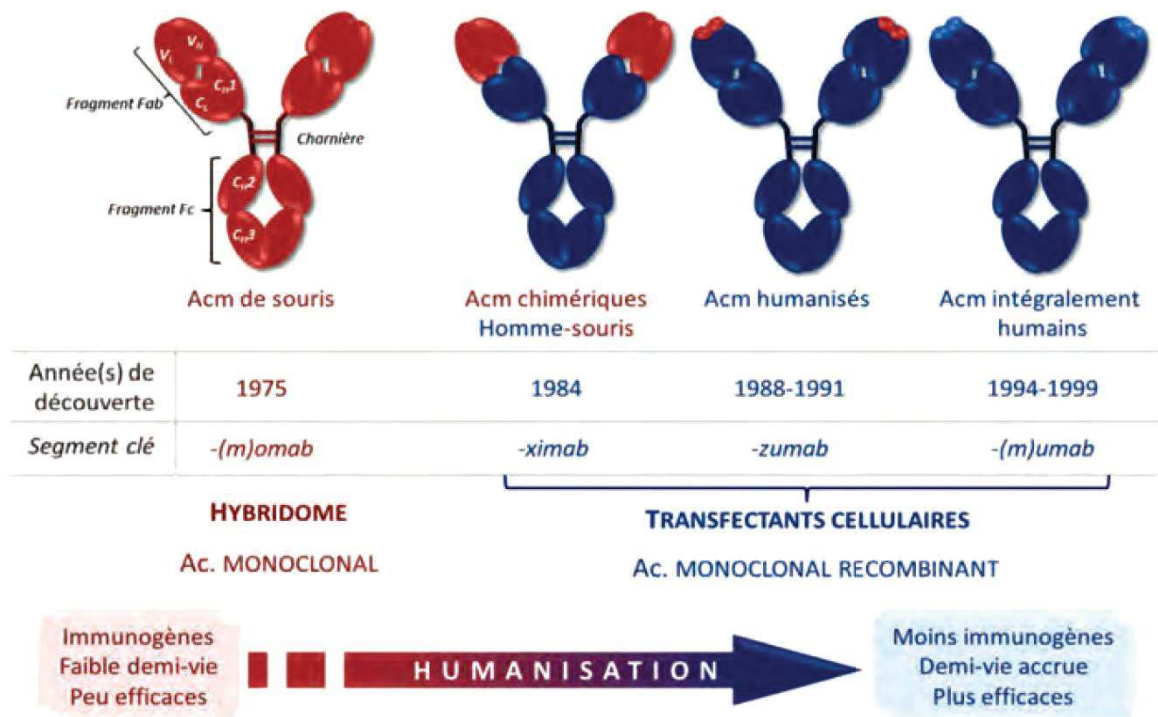


Figure 14: Les degrés d'humanisation des anticorps monoclonaux d'après Broutin et Watier ⁷⁷

α - La voie EGFR

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), également appelé ERBB1 ou HER1 appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase HER. Il peut former des dimères avec un autre EGFR (homodimères) ou avec l'un des trois autres membres de la famille HER (hétérodimères), HER2, HER3 ou HER4. L'EGFR est constitué d'un large domaine extracellulaire avec à son extrémité N-terminale, un domaine de liaison à ses différents ligands. Ce récepteur est également constitué d'un domaine transmembranaire, suivi d'un domaine juxta membranaire comportant le domaine tyrosine kinase. Enfin à l'extrémité C-terminale se situe les sites d'autophosphorylation qui permettront la fixation des différentes protéines effectrices⁷⁸ (figure 15).

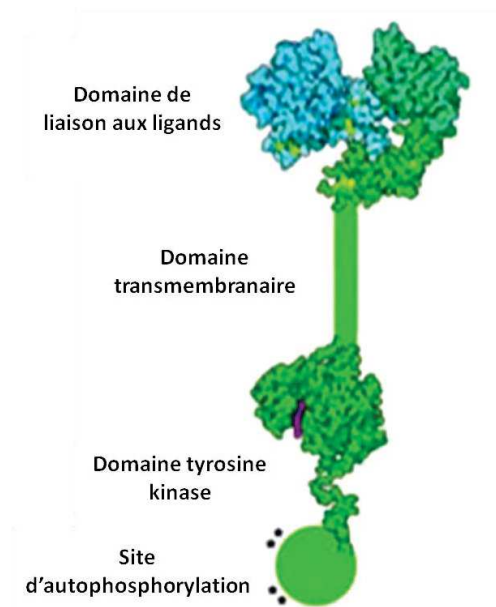


Figure 15: Structure de l'EGFR⁷⁹

De nombreux ligands peuvent interagir avec l'EGFR parmi eux l'EGF (facteur de croissance épidermique), l'amphiréguline, le TGF- α et l'épiréguline. Lorsqu'un ligand se fixe sur l'EGFR, le récepteur se dimérise provoquant son autophosphorylation. En fonction du ligand et des récepteur HER en jeu dans la dimérisation, cette phosphorylation peut activer la voie de signalisation intracellulaire RAS / RAF / MEK ainsi que la voie PI3K / AKT. Ces voies induisent la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la migration, la survie cellulaire et l'angiogenèse⁷⁹ (figure 16).

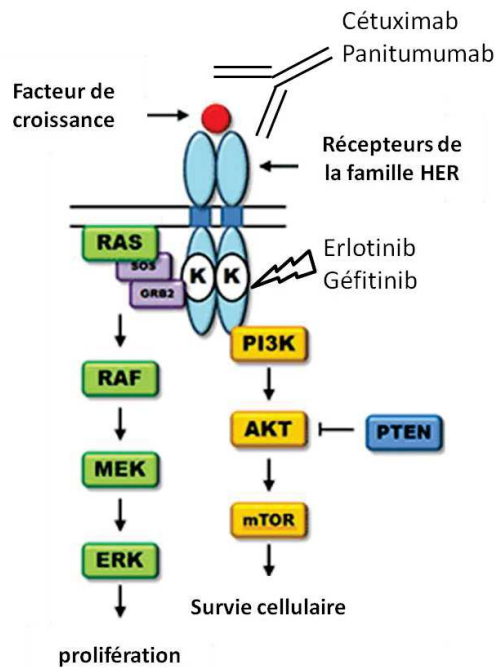


Figure 16: Schéma des principales voies de signalisation activables à la suite de la dimérisation de l'EGFR et sites d'action de ses principaux inhibiteurs (adapté de Lovly et al.⁸⁰)

b- Le cétuximab

Le cétuximab est issu de l'anticorps monoclonal 225 (mab 225) étudié par Masui et al. dès 1984. Cet anticorps inhibe la fixation de l'EGF sur son récepteur bloquant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses A431 (issues de carcinomes épidermiques)⁸¹. L'effet du mab 225 est essentiellement cytostatique notamment par l'induction d'une augmentation de la protéine p27⁸².

Pour son développement en clinique, une version chimérique (homme-souris) de l'anticorps monoclonal 225 a été produite : le cétuximab (IMC-C225). *In vivo*, l'effet de l'anticorps chimérique se révélera bien supérieur à celui de son prédécesseur murin dans le modèle de souris nude xéno greffé par la lignée cellulaire A431. En effet, dans cette étude, le cétuximab provoque une inhibition de la prolifération des tumeurs et il est également capable d'induire la régression complète de certaines tumeurs établies⁸³.

De type IgG1, le mab 225 et le cétuximab sont capables de recruter les cellules du système immunitaire grâce à leur partie Fc pour cibler les cellules cancéreuses ce qui

contribue à leur effet anti-tumoral ^{84,85}. Ce phénomène s'appelle l'ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) ou cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. Plus récemment, l'implication de l'immunité adaptative dans l'effet du cétuximab a également été mise en évidence ⁸⁶.

Dans le CCR métastatique, le cétuximab obtient une AMM en montrant son efficacité en monothérapie et en association avec l'irinotécan sur des tumeurs devenues réfractaires à ce médicament cytotoxique⁸⁷. Différents essais cliniques montrent que le cétuximab potentialise l'effet des agents antinéoplasiques avec lesquels il est fréquemment associé (protocoles FOLFOX et FOLFIRI). De plus, chez des patients dont le cancer est devenu réfractaire à l'oxaliplatine ou à l'irinotécan, il peut également être utilisé en monothérapie et prolonger ainsi la survie des patients ⁷⁸.

c- Le panitumumab

Le panitumumab, anciennement appelé ABX-EGF est le premier anticorps monoclonal humain hautement spécifique du récepteur de l'EGF. Il se lie, tout comme le cétuximab, à la partie extracellulaire de l'EGFR. Cependant, ces deux anticorps reconnaissent des épitopes différents de cette protéine ⁸⁸. Dans des modèles de souris xénogreffées avec des cellules A431, le panitumumab peut prévenir l'établissement de tumeurs, mais aussi éradiquer ou inhiber la croissance de tumeurs établies ⁸⁹. Son effet antitumoral sur de nombreuses lignées cancéreuses est principalement lié à sa capacité à réguler négativement l'EGFR et à induire son internalisation. Etant de type IgG2, le panitumumab ne peut pas recruter de façon suffisamment efficace les protéines immunitaires effectrices et induire l'ADCC ⁹⁰.

Dans le CCR, le panitumumab a d'abord été approuvé dans les tumeurs réfractaires au protocole thérapeutique FOLFOX et FOLFIRI avec un taux de progression diminué de presque 50 % et une survie sans progression (PFS) passant de 8,5 semaines dans le bras contrôle à 13,8 semaines lorsque le panitumumab est utilisé ⁷⁸. Il est maintenant prescrit en deuxième ligne de traitement en combinaison avec les régimes de chimiothérapies FOLFOX ou FOLFIRI ou en monothérapie après l'échec de ces protocoles thérapeutiques.

2- Comment améliorer les thérapies existantes ?

Le problème de la résistance aux traitements.

2-1 Mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses utilisées dans le CCR

Aujourd'hui, les stratégies thérapeutiques ont évolué grâce à la combinaison de chimiothérapies conventionnelles à base de 5-FU, d'oxaliplatine et/ou d'irinotécan et de thérapies ciblées dirigées contre le récepteur de l'EGF (cétuximab et panitumumab) ou le VEGF (bévacizumab, aflibercept, régorafinib). Cependant, malgré un taux de survie amélioré et la mise sur le marché d'un grand nombre de molécules depuis la découverte des premiers antinéoplasiques, les patients diagnostiqués pour un CCR au stade avancé ont une médiane de survie d'environ 30 mois ⁴².

Chez de nombreux patients, les cellules cancéreuses sont ou deviennent résistantes aux traitements utilisés. En effet, la maladie, au fil des combinaisons de thérapies, reste sous-contrôle pour des temps de plus en plus court. À terme, pour 90 % des patients atteints de CCR métastatique, les lésions cancéreuses vont progresser sous traitement ⁹¹.

Il existe deux types de résistances aux traitements : le premier est la résistance innée ou intrinsèque ; le second est la résistance acquise ou secondaire. La résistance innée représente les tumeurs insensibles au traitement dès la première administration. Par exemple, dans l'étude qui a permis la mise sur le marché du cetuximab plus de 80 % des patients n'ont pas répondu au traitement par cet anticorps ⁸⁷. Quant à la résistance acquise, elle s'établit au cours du temps : la lésion dans un premier temps sensible à un protocole thérapeutique va recommencer à croître après plusieurs cycles de traitement. C'est en général à ce moment là qu'une autre association thérapeutique est proposée au patient si son état général le permet. Cependant, les possibilités ne sont pas infinies et au fil des protocoles thérapeutiques la tumeur résiste de plus en plus rapidement jusqu'à épuiser l'arsenal thérapeutique disponible.

Dans ce contexte d'échec thérapeutique, médecine et recherche tentent de combattre ces phénomènes de résistance. Pour lutter contre la résistance innée, l'effort se porte sur la recherche de biomarqueurs parallèlement à la compréhension des caractéristiques moléculaires des cancers. L'objectif est d'appliquer, dès la première ligne, le bon traitement au bon patient ⁹². Cette orientation personnalisée pourrait permettre une régression voire une rémission rapide et éviter l'émergence d'une résistance acquise aux traitements chez de nombreux patients. De plus, une bonne orientation permet également de préserver la qualité de vie du patient qui n'est pas exposé inutilement à certaines molécules qui présentent des effets secondaires pouvant affecter son état général. Pour la résistance acquise qui est le principal obstacle à la survie des patients atteints de CCR métastatique, les priorités sont : la compréhension des mécanismes de résistance et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ce manuscrit, seuls les mécanismes de résistance majeurs, impliquant les thérapies telles que le 5-FU, l'irinotécan, l'oxaliplatine et les anti-EGFR, dans le CCR seront décrits. *In vitro* et en clinique, les principaux mécanismes de résistance à ces thérapies sont les modifications visant à accélérer leur métabolisme, ou encore à empêcher leur accumulation dans la cellule cancéreuse. L'action sur la cible peut également être modifiée par le biais de mutations ou la modification de protéines en aval de la voie visée. Enfin, d'autres voies impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN ou la survie cellulaire peuvent avantager les cellules cancéreuses ⁹¹.

2-1-1 Transport et métabolisme du médicament

La pharmacocinétique, c'est à dire le devenir du médicament dans l'organisme, est directement corrélée à l'efficacité et à la toxicité inhérente à un traitement. L'état basal des paramètres pharmacocinétiques ou leur modification sont fréquemment impliqués dans la résistance aux traitements anticancéreux. Dans les cellules cancéreuses devenues résistantes, la modification de déterminants du métabolisme et du transport permet de diminuer la concentration intracellulaire de l'agent cytotoxique. Le plus souvent c'est par une surexpression de transporteurs d'efflux ou une métabolisation augmentée de la molécule anticancéreuse que les cellules cancéreuses résistent aux traitements⁹³.

La littérature regorge d'exemples mettant en cause la sous-expression de transporteurs d'influx, la surexpression de transporteurs d'efflux ou encore de protéines impliquées dans le catabolisme des molécules thérapeutiques actives, dans la résistance aux médicaments cytotoxiques, et ce, dans de nombreux cancers. Ici, sont relatés les exemples les plus représentatifs de résistance aux médicaments cytotoxiques utilisés pour traiter le CCR métastatique mettant en cause des déterminants du métabolisme et du transport.

Les *ATP binding cassette* (ABC) transporteurs composent une large famille de protéines d'efflux. Ils sont souvent impliqués dans le transport des médicaments et mis en cause dans la résistance acquise aux antinéoplasiques⁹³. Dans le cancer colorectal, les ABC transporteurs impliqués dans le phénomène de « *multidrug resistance* » (MDR) sont exprimés dans les cellules tumorales, suggérant une importante résistance innée des CCR aux thérapies prises en charge par ces protéines⁹⁴. Ainsi, dans des lignées résistantes à l'irinotécan, une surexpression d'ABCG2, protéine d'efflux de la famille des ABC transporteurs, prenant en charge son métabolite actif: le SN-38 a été mise en évidence^{95,96}. En clinique, dans deux études sur des patients atteints de CCR, l'expression ou la présence de certains polymorphismes d'ABCG2 corrèle également avec l'efficacité de l'irinotécan^{97,98}.

Un autre ABC transporteur, la protéine ABCC2 ou MRP2 (Multidrug resistance-associated protein 2) est impliquée dans la résistance au cisplatine, sel de platine dont l'oxaliplatine est un dérivé⁹⁹. Mais, bien qu'elle soit surexprimée dans un modèle *in vitro* de résistance à l'oxaliplatine¹⁰⁰, l'expression de la protéine MRP2 ne semble pas corrélée à la

résistance à l'oxaliplatine en clinique ¹⁰¹. Dans des lignées cellulaires de cancers ovariens et œsophagiens rendues résistantes aux sels de platine, l'effet de l'oxaliplatine peut également être affecté par une augmentation de l'expression d'un autre type de transporteur d'efflux, le transporteur de cuivre ATP7A ^{102,103} qui, avec le transporteur ATP7B, est impliqué dans la translocation de cette molécule ¹⁰⁴. Dans le CCR, c'est la surexpression d'ATP7B qui serait liée à une baisse de la survie des patients traités par des protocoles à base d'oxaliplatine ¹⁰⁵. Ce médicament cytotoxique peut également être affecté par les transporteurs d'influx permettant son accumulation dans les cellules cancéreuses⁶⁷. Ainsi, une forte expression des transporteurs OAT2 et OCT2 est prédictive d'une bonne réponse aux protocole FOLFOX¹⁰⁶.

Les ABC transporteurs sont également impliqués dans la résistance au 5-FU. On retrouve notamment *in vitro*, l'implication d'ABCB1 dans un modèle de résistance à ce traitement¹⁰⁷. Dans les tissus devenus réfractaires au 5-FU, c'est la protéine ABCB5 qui est surexprimée ¹⁰⁸. Ceci mettant en évidence l'importance du niveau d'expression de nombreux transporteurs d'efflux dans les phénomènes de résistance aux médicaments cytotoxiques délivrés dans le traitement du CCR.

Enfin, Les protéines du métabolisme impliquées dans l'inactivation des médicaments cytotoxiques peuvent aussi être à l'origine de résistance à ces traitements. En effet, La dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) protéine responsable du catabolisme du 5-FU ⁴⁷ peut, lorsqu'elle est surexprimée *in vitro*, conférer une résistance au 5-FU ¹⁰⁹. L'influence de l'expression de l'enzyme DPD sur la résistance au 5-FU a ainsi été confirmée par une étude sur des échantillons cliniques de CCR ¹¹⁰. Les glutathione s-transférase (GST) participent à la conjugaison du cisplatine facilitant son élimination. Le lien entre la surexpression de GSTP1, sous classe de la famille des GST, et la résistance au cisplatine est bien établi, de même que la forte expression de GSTP1 dans le cancer colorectal. Cependant, la corrélation entre la surexpression de GSTP1 et la résistance à l'oxaliplatine n'a pas été démontrée de façon concluante ^{111,112}, témoignant une fois encore, de la singularité de l'oxaliplatine vis à vis des autres sels de platine sur le marché.

2-1-2 Altération de la cible ou des voies de signalisation visées par les traitements

La modulation de l'expression de la cible, sa mutation ainsi que la modification de protéines en aval de celle-ci peuvent être à l'origine de résistance aux traitements. Dans le CCR, ces mécanismes de résistance touchent principalement les thérapies anti-EGFR (cétuximab et panitumumab) mais peuvent également affecter l'effet de certains médicaments cytotoxiques (5-FU, irinotécan).

Dans le CCR, des études ont mis en évidence que le niveau d'expression de la thymidylate synthase (TS), cible principale du 5-FU, et de la thymidine phosphorylase (TP) qui permet la conversion du 5-FU en son principal métabolite actif étaient corrélés avec l'effet du 5-FU ^{47,110,113}. Ainsi, une expression tumorale et para-tumorale importante de TS et de TP est de plus mauvais pronostic et suggère une réponse diminuée au 5-FU.

L'efficacité de l'irinotécan dont le métabolite actif, le SN-38, cible la topoisomérase I, peut être diminuée par une augmentation de l'expression de la topoisomérase I consécutive à une augmentation du nombre de copie du gène TOPI ^{114,115}. Il existe également de nombreuses mutations qui peuvent empêcher l'action du SN-38 sur la topoisomérase I *in vitro* dans des modèles de résistance. Cependant, en clinique les mutations de topoisomérase I reportées sont très rares ¹¹⁶⁻¹¹⁸. Il semblerait donc qu'en clinique, le niveau d'expression de la topoisomérase I soit un bon marqueur prédictif de la réponse à l'irinotécan dans le CCR ¹¹⁹.

Plus récemment, les résistances innées et acquises aux thérapies ciblées notamment aux thérapies anti-EGFR ont été largement étudiées. Très fréquemment, les mécanismes impliqués dans la résistance à ces traitements sont des mutations au niveau des voies de signalisation en aval de l'EGFR induisant leur activation constitutive ¹²⁰ (figure 17). Dès 2006, les mutations de KRAS rendant la protéine constitutivement active sont décrites dans le cas de résistances primaires au kétuximab ¹²¹. Plus tard, l'émergence de mutations de KRAS seront reliées à la résistance acquise aux anti-EGFR ¹²². Désormais, le lien est établi entre les mutations de tous les gènes de la famille RAS (HRAS, KRAS et NRAS) et la résistance aux thérapies anti-EGFR ¹²³. C'est pourquoi, en France, la haute autorité de santé restreint l'usage du kétuximab et du panitumumab aux patients dont la tumeur est RAS « sauvage »

c'est à dire non mutée. Les mutations de PTEN sont également nombreuses, elles conduisent à son inactivation, levant ainsi l'inhibition de PTEN sur la protéine AKT et aboutissant à l'activation de la voie PI3K. Les autres mutations des voies en aval de l'EGFR, sur les protéines RAF et PI3K sont, elles, activatrices¹²⁰. Enfin, suite au traitement par le cétuximab, le récepteur EGFR peut également être muté résultant en une résistance spécifique à cet anticorps¹²⁴.

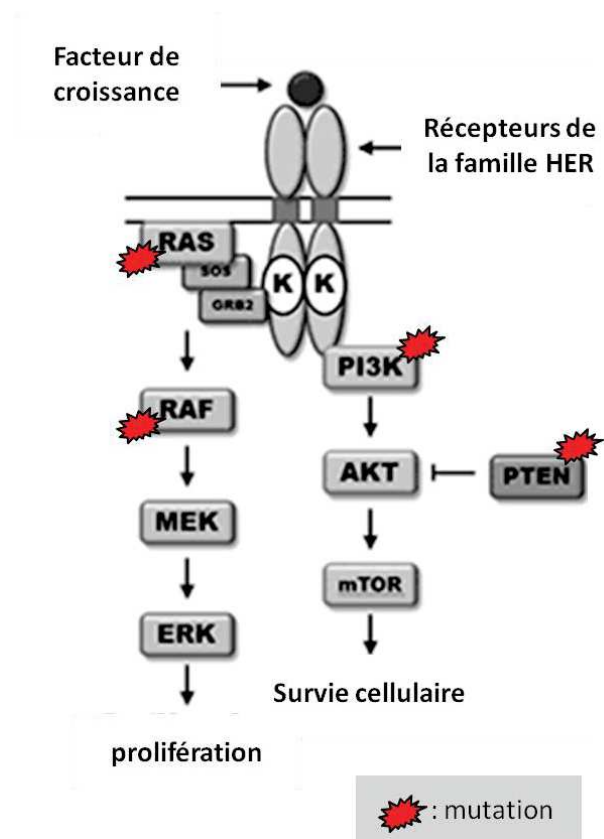


Figure 17: Protéines activables par l'EGFR dont les mutations sont associées à la résistance aux anti-EGFR (adapté de Lovly et al.⁸⁰ et bardelli et al.¹²⁰)

2-1-3 Activation/blocage d'autres voies de signalisation

Outre la modulation de facteurs pharmacocinétiques, l'altération de la cible et des voies de signalisation liées à celle-ci, l'efficacité des thérapies anticancéreuses peut être diminuée par la modulation d'autres voies de signalisation. L'activation de voies de réparation de l'ADN, de voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire ou les défauts dans l'initiation de l'apoptose peuvent être impliqués dans la résistance aux médicaments cytotoxiques. Ces mécanismes de résistance ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, essentiellement *in vitro*. Parfois en clinique, il est difficile de corrélérer ces modifications à la réponse ou la survie des patients dans de larges cohortes tant elles sont spécifiques du modèle cellulaire utilisé ¹²⁵.

Contrairement au cisplatine, l'oxaliplatine n'est pas sensible à l'absence de MLH1, protéine du système MMR ⁶⁷. Cependant, d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, plus spécifiquement dans les systèmes du NER (réparation par excision de nucléotides) et du BER (réparation par excision de bases) sont associées à la résistance à l'oxaliplatine. Le rôle des protéines *Excision Repair Cross Complementing group 1* (ERCC 1) et *X-Ray Cross Complementing group 1* (XRCC1) a plus particulièrement été mis en évidence dans ce mécanisme. Dans le CCR métastatique, Shirota et al. ont montré qu'un fort niveau d'expression intratumoral d'ERCC 1 divisait par cinq la survie médiane des patients traités par un protocole à base d'oxaliplatine ¹²⁶, faisant d'ERCC1 un biomarqueur clinique potentiel pour orienter le traitement des patients en première ligne ¹²⁷. De plus, dans des cellules résistantes à l'oxaliplatine l'inhibition d'ERCC1 peut restaurer la sensibilité à ce médicament cytotoxique ¹²⁸. Cette protéine dont l'expression est augmentée chez les patients suite au traitement par l'oxaliplatine, pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle ¹²⁹. Les polymorphismes nucléotidiques (SNP) des gènes impliqués dans les systèmes du NER et du BER peuvent également être prédictifs de la réponse aux protocoles thérapeutiques à base d'oxaliplatine ^{112,130}. C'est dans ce contexte que le rôle de la protéine XRCC1 (BER) dans la résistance à l'oxaliplatine a été étudié ^{131,132}. Ainsi, avant la mise en place d'un traitement par ce sel de platine, la présence de certains SNP et le niveau d'expression des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN peuvent permettre d'anticiper la réponse à ce médicament cytotoxique.

La protéine p53 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'induction de la mort cellulaire à la suite de divers stress touchant l'ADN. P53 est également une protéine fréquemment mutée dans le cancer colorectal ^{11,19,133}. Dès 1993, l'étude de Lowe et al. avait mis en évidence l'impact de la perte de fonctionnalité de la protéine p53 sur l'effet de divers agents cytotoxiques constatant une diminution de l'effet du 5-FU ¹³⁴. Par la suite, cette même corrélation a été confirmée *in vitro*, après traitement par l'oxaliplatine et par le 5-FU mais pas avec l'irinotécan, en comparant un modèle de cellules colorectales p53 sauvages et p53 mutées ^{135,136}. En clinique, les patients traités pour un CCR par des traitements à base de 5-FU ont une espérance de vie plus courte lorsque, dans leur tumeur, le gène p53 est muté ¹³⁷.

Enfin, au laboratoire, dans des modèles de lignées de cancer colorectal résistantes à l'oxaliplatine des défauts de l'apoptose ont été mis en évidence ¹³⁸. Dans un modèle de résistance au métabolite actif de l'irinotécan (SN-38) une activation constitutive de la MAPK p38 a été observée. Montrant la capacité des cellules cancéreuses à activer des voies privilégiant leur survie. Cette étude met également en évidence le potentiel thérapeutique de l'inhibition de p38 dans le contexte de la résistance à l'irinotécan ainsi que son rôle de biomarqueur pour déterminer les patients « répondeurs » à ce traitement ¹³⁹.

2-2 Létalité synthétique et cancer

2-2-1 Principe

Le concept de létalité synthétique a pour la première fois été évoqué en 1922 par Calvin Bridge et illustre le fait que deux événements génétiques qui n'affectent pas la viabilité seuls, puissent aboutir à la mort de l'organisme ou de la cellule lorsque qu'ils se produisent simultanément¹⁴⁰. D'abord étudié chez la drosophile et la levure, l'intérêt de ces interactions létales est exploité depuis la fin des années 90 pour découvrir de nouvelles thérapies anticancéreuses¹⁴¹. La plupart des thérapies ciblées sur le marché sont basées sur l'addiction des cellules cancéreuses à une voie oncogénique. C'est pourquoi, la stratégie thérapeutique employée vise à inhiber une protéine appartenant à la voie suractivée. Cependant, toutes les voies oncogéniques ne peuvent pas être directement ciblées et toutes les cellules cancéreuses ne possèdent pas ce type d'addiction. La létalité synthétique permet alors de mettre en évidence des addictions non-oncogéniques (NOA) spécifiques des cellules cancéreuses ou de trouver des cibles thérapeutiques indirectes pour des altérations génétiques sans cibles exploitables¹⁴². L'objectif est donc de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques, pour contrer la résistance innée ou acquise aux thérapies actuelles.

Quel que soit l'approche ou le type de criblage choisis, le choix du ou des modèles cellulaires à étudier s'avère crucial pour obtenir des résultats robustes et pertinents. La létalité synthétique peut être utilisée pour l'étude du gain ou de la perte de fonction d'un gène connu (ex : KRAS)¹⁴³, mais également de la comparaison entre une lignée répondeuse et une lignée réfractaire à un traitement. Ceci, afin de mettre en évidence une létalité conditionnelle entre un élément du crible utilisé et le statut génétique ou le traitement étudié dans le modèle cellulaire choisi.

2-2-2 Les différentes approches

Deux façons de mettre en évidence de nouvelles interactions létales coexistent. La première est une approche fondée sur des hypothèses ou « ciblée ». Elle se base sur les connaissances déjà acquises de la communauté scientifique et oriente donc la recherche de nouvelles cibles sur une ou plusieurs voies de signalisation connues. Cette première approche a mis en évidence l'intérêt des inhibiteurs de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) dans les cancers ovariens *breast cancer early onset 1* (BRCA1) mutés et a permis leur utilisation en clinique ¹⁴⁴. Elle peut également permettre d'effectuer des criblages restreints autour de molécules interagissant directement avec un gène ou une protéine d'intérêt ¹⁴⁵. La seconde est une approche dites « non-biaisée » ou sans a priori consistant à évaluer l'ensemble des gènes (génomique), d'un groupe de gène (ex : kinome) ou d'une banque de molécule entre autres exemples. Cette seconde approche basée sur l'utilisation de criblage à grande échelle permet de trouver des cibles dites « non intuitives » ¹⁴³.

2-2-3 Les types de criblages

Dans la découverte d'interactions létales plusieurs types de criblage à grande échelle peuvent être utilisés. Certains criblages sont basés sur l'utilisation de banques de composés chimiques, d'autres sont des criblages phénotypiques par inhibition de gènes utilisant des ARN interférents (siRNA, shRNA). Plus récemment, l'outil Crispr-Cas9 a permis de révolutionner les criblages de létalité synthétique ¹⁴³.

a- Banque de composés chimiques

Différentes banques de composés peuvent être utilisées : certaines contiennent des composés dont la cible est connue ; d'autres des composés non annotés dont on ne connaît pas la cible ou le mécanisme d'action. Les banques les plus souvent utilisées sont les banques de composés chimiques non annotés mais parfois des banques de composés naturels peuvent aussi être choisies pour découvrir d'éventuelles activités anticancéreuses

¹⁴³.

Ce type de criblage a notamment été utilisé dans des cellules de cancer rénal et a permis de découvrir une létalité conditionnelle entre l'inactivation du suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau (VHL), et le composé chimique STF-62247. L'effet de cette molécule, induisant l'autophagie des cellules cancéreuses rénales, a également pu être confirmé *in vivo*¹⁴⁶. Plus tard, cette molécule a démontré son efficacité lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec la radiothérapie¹⁴⁷. Depuis, les études sur cette molécule prometteuse se poursuivent car son mécanisme d'action précis reste encore indéterminé. Dans la résistance secondaire au traitement, un criblage étudiant la suractivation de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (voie de l'anémie de Fanconi (FA)) a été effectué afin de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses ovariennes au cisplatine. Le potentiel thérapeutique de quatre molécules a ainsi été mis en évidence¹⁴⁸.

Cependant, l'utilisation de banques de composés chimiques non annotés dans la découverte d'interactions létales présente deux défis. D'une part, découvrir un composé capable d'avoir une activité anti cancéreuse dans les conditions choisies, d'autre part, découvrir la cible ou le mécanisme d'action de ce composé. Mais ce type d'approche présente un avantage certain, celui d'avoir un composé à disposition pour effectuer les tests précliniques *in vitro* et *in vivo* (Figure 18).

b - Criblage du génome par ARN interférence

On distingue les criblages par petit ARN interférent (siRNA) et les criblages par les ARN en épingle à cheveux (shRNA). Les siRNA et shRNA permettent des criblages à grande échelle. Chaque ARN interférent constituant une banque d'ARN interférents possède une séquence spécifique du transcrit d'un gène. Pour plus d'efficacité et de spécificité plusieurs ARN interférents peuvent être dirigés contre une même cible.

Les siRNA sont transfectés séparément, par cible, dans les puits où les cellules ont étéensemencées. Dans ce cas, c'est la viabilité cellulaire de chaque puits qui sera étudiée et comparée entre les différentes conditions de traitement et/ou les différentes lignées cellulaires choisies. La contrainte principale de ce type de crible est donc le nombre de puits qui pourrait limiter le nombre de siRNA ou de lignées testées. Par la suite, cet obstacle a pu être maîtrisé grâce aux shRNA, ceux-ci sont utilisés sous forme de plasmides et transduit

dans les cellules choisies grâce à des vecteurs viraux. Chaque plasmide contient la séquence d'un shRNA, un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques ainsi qu'une séquence « code barre » essentielle lors de l'étape de séquençage. De cette façon, l'ensemble d'une banque de shRNA peut être transduite dans une même culture cellulaire. Après l'étape de transduction, les cellules ayant intégré les shRNA sont donc sélectionnées car le gène de résistance aux antibiotiques s'est aussi inséré dans leur génome. Enfin, à l'issue du criblage, c'est un séquençage de l'ADN cellulaire qui permettra d'identifier (via les « codes barres ») les shRNA à l'origine d'une interaction létale ¹⁴³ (figure 18). Pour ce faire, la présence de chaque shRNA dans les différentes conditions sera quantifiée. En comparant ces conditions, un enrichissement ou une déplétion pourra être observé pour certains shRNA qui représenteront respectivement des protéines dont l'absence est favorable ou létale dans le contexte étudié.

L'utilisation d'une même culture cellulaire pour toute une banque de shRNA autorise donc l'étude comparative d'un large nombre de conditions et/ou de lignées. C'est de cette façon que cette approche a permis d'étudier un grand nombre de lignées cancéreuses KRAS mutées et d'identifier une protéine essentielle dans ce contexte génétique : la sérine thréonine kinase TBK1 ¹⁴⁹. Cette protéine est impliquée dans l'activation de la protéine NF- κ B, très étudiée en cancérologie car elle peut jouer un rôle dans l'initiation, le développement, la formation de métastase ainsi que l'acquisition de résistance aux thérapies anticancéreuses ¹⁵⁰. Depuis, un autre criblage par shRNA effectué dans les cancer du sein HER2 positifs a également identifié TBK1 comme une cible thérapeutique prometteuse ¹⁵¹.

Dans le cancer colorectal, Prahallad et al. ont mis en évidence une interaction létale entre l'inhibition de BRAF auparavant très peu, voire non efficace, dans des lignées colorectales BRAF mutées et l'inhibition de l'EGFR ¹⁵². La robustesse des résultats ainsi que la disponibilité d'inhibiteurs déjà sur le marché pour ces deux protéines ont permis le développement rapide d'un essai clinique pilote, combinant l'anti-BRAF, vémurafénib et l'anticorps monoclonal anti-EGFR, panitumumab. À l'issue de cet essai, comptant quinze patients atteints de cancer colorectal métastatique BRAF muté, un effet clinique encourageant a pu être observé sans qu'aucune toxicité sévère ne soit recensée, permettant ainsi la poursuite des études cliniques ¹⁵³.

Ces procédés de criblage par ARN interférence ont ainsi permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, dans les années à venir, un nombre conséquent de nouvelles molécules thérapeutiques découvertes grâce à ce type de criblage pourraient voir le jour.

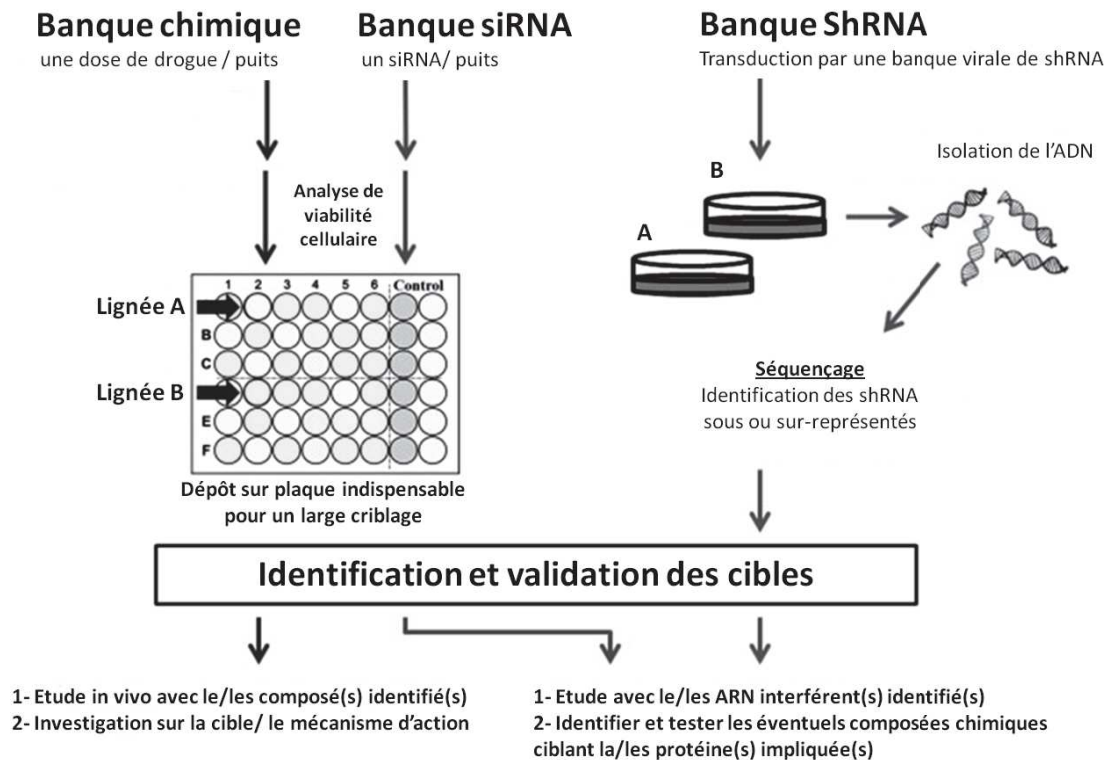


Figure 18 : Les principaux types de criblages de létalité synthétique¹⁴³. Les lignées A et B peuvent avoir un statut génétique différent, recevoir un traitement ou répondre à un médicament de façon différente. Dans le premier cas, une létalité conditionnelle entre le gène différentiellement exprimé et un élément du crible est recherchée, dans le second cas une létalité conditionnelle entre un médicament et un élément du crible est recherchée.

c – Criblage du génome par l'outil Crispr-Cas9

Récemment, l'outil Clustered regularly interspaced short palindrome repeats associé à la nucléase Cas9 (Crispr-Cas9) également surnommé ciseaux génétiques découvert par le Dr J.Doudna et le Dr E.Charpentier ¹⁵⁴ a révolutionné le domaine de l'ingénierie génétique.

L'utilisation de cette technique dans les criblages de létalité synthétique, consiste à induire une cassure double brin par l'action de la nucléase Cas9 dans une zone du génome spécifiquement reconnue par un ARN guide (gARN) sur lequel la protéine Cas9 se lie. La cassure est ensuite prise en charge par le système de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) qui cause de courte délétion ou insertion de bases, créant un décalage du cadre de lecture. Ce décalage crée un codon stop prématuré et donc une absence de traduction du gène en protéine fonctionnelle (Figure 19). L'étude du génome par perte de fonction nécessite pour cette approche la conception d'une collection d'ARN guide ciblant l'ensemble des gènes à étudier et présentant un domaine de reconnaissance à Cas9. Á l'instar des shRNA, les gRNA ont pu être intégrés au sein de vecteurs viraux avec le gène permettant la production de la protéine Cas9 autorisant des criblages haut débit ¹⁵⁵.

Cette nouvelle approche permet une inhibition protéique plus efficace et plus spécifique que le criblage par shRNA. Ainsi, un des premiers criblages effectués a permis d'attester de la grande efficacité de cette technique par confirmation de cibles découvertes par ARN interférence, et dans ce même contexte, par la découverte de nouvelles protéines d'intérêts ¹⁵⁶. Plus récemment, une autre étude a mis en évidence l'efficacité de ce nouvel outil comparé à la technique d'ARN interférence. En effet, l'utilisation de l'outil Crispr-Cas9 a, dans cette étude, permis de réduire considérablement les effets non spécifiques ainsi que le bruit de fond ¹⁵⁷.

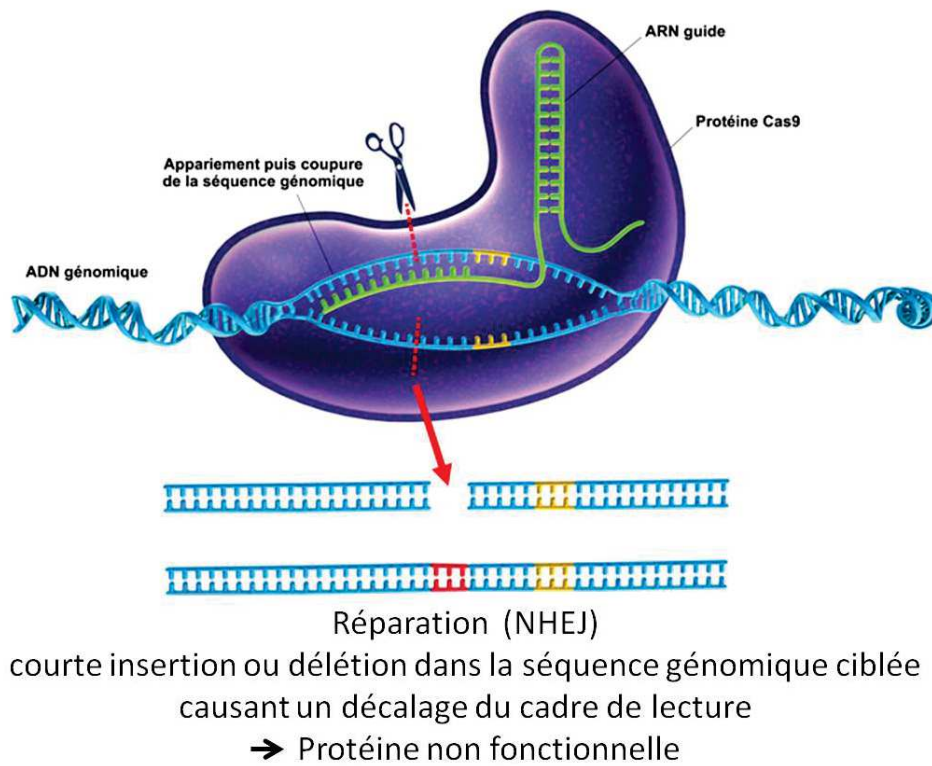


Figure 19: Illustration de l'extinction d'un gène par la technique Crispr-Cas9. Adapté de¹⁵⁸

Résultats

1- Projet

Aujourd'hui, les traitements du cancer colorectal métastatique ont évolué grâce à la combinaison de chimiothérapies conventionnelles à base de 5-FU, d'oxaliplatine et/ou d'irinotécan et de thérapies ciblées dirigées contre le récepteur de l'EGF ou le VEGF. Malgré un taux de survie amélioré par la combinaison de ces médicaments, de nombreux phénomènes de résistance aux traitements sont observés.

Le but de notre équipe est donc de découvrir de nouveaux biomarqueurs de résistance, ainsi que d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dont l'inhibition pourraient contrer durablement les phénomènes de chimiorésistance. À cette fin, notre équipe a généré des lignées résistantes aux différents médicaments cytotoxiques utilisés dans le cancer colorectal (irinotécan et oxaliplatine).

Dans l'étude de la résistance à l'irinotécan, notre équipe a démontré que les lignées clonales les plus résistantes à cette thérapie surexprimaient la protéine d'efflux ABCG2⁹⁵. Certains de ces modèles de résistance présentent également des mutations de la topoisomérase I capable d'altérer l'interaction entre le SN-38 et la topo I et donc l'efficacité de l'irinotécan¹¹⁷. Enfin, l'étude du transcriptome de la lignée HCT116-SN6 a mis en évidence une activation constitutive de la protéine p38, ainsi que le potentiel thérapeutique de son inhibition combiné à l'irinotécan^{139,159}.

À partir des modèles de résistance à l'oxaliplatine (HCT116-R1 et HCT116-R2), des défauts de la voie mitochondriale de l'apoptose, responsable de la résistance à ce sel de platine, ont été observés. Dans le modèle HCT116-R2, qui présente la plus forte résistance à ce médicament, c'est l'absence de la protéine pro-apoptotique BAX qui en est à l'origine¹³⁸. Les lignées résistantes générées par notre équipe ont ainsi permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes de résistance aux agents cytotoxiques utilisés dans le traitement du CCR.

L'objectif de mon projet de thèse a été de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que de nouveaux biomarqueurs au moyen de criblages phénotypiques afin de contrer les phénomènes de résistance aux thérapies du CCR (oxaliplatine, irinotécan et thérapies anti-EGFR).

Pour cela, une technique de criblage phénotypique par ARN interférence (collaboration avec le Dr R.Beijersbergen (NKI, Pays Bas)) a été appliquée sur deux lignées clonales résistantes, l'une à l'oxaliplatine et l'autre au SN-38 (métabolite actif de l'irinotécan), dont le mécanisme de résistance n'était pas défini. Cette même technique a été utilisée sur une lignée présentant une résistance innée aux thérapies anti-EGFR afin d'étudier trois thérapies ciblant l'EGFR : le cétuximab, Le panitumumab et l'erlotinib. Pour réaliser ces criblages phénotypiques nous avons choisi une banque composée de shRNA ciblant le kinome humain.

À l'issue des différents criblages phénotypiques, notre attention s'est portée sur l'analyse des shRNA déplétés, qui représentent les protéines dont l'inhibition pourra restaurer la sensibilité au(x) traitement(s) utilisé(s).

Les cibles identifiées lors des trois criblages ont ensuite été confirmées au moyen d'une inhibition spécifique par shRNA et, lorsque cela était possible, par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique. La cible la plus prometteuse, obtenue au cours du criblage consacré à l'oxaliplatine a fait l'objet d'un travail plus abouti. En effet, l'inhibition de cette kinase combinée à l'oxaliplatine ainsi que le mécanisme d'action de cette combinaison de traitement a été étudiée *in vitro* et *in vivo* dans deux modèles précliniques, donnant lieu à un article en préparation.

Mise en place technique du criblage phénotypique et validation des cibles

2- Mise en place technique du criblage phénotypique et validation des cibles

Pour ce projet, nous avons effectué trois criblages phénotypiques. Les deux premiers criblages étudiant deux médicaments cytotoxiques (l'oxaliplatine et l'irinotécan) et le troisième dédié aux thérapies anti-EGFR (cétuximab, panitumumab, erlotinib). Par la suite, les résultats de ces trois criblages ont été analysés et validés.

Ces trois criblages ont chacun été effectués sur une lignée cellulaire présentant une résistance acquise ou innée à chacune des thérapies étudiées. Les lignées arborant une résistance acquise à l'oxaliplatine et à l'irinotécan sont issues de la même lignée parentale d'adénocarcinome colique, HCT116.

L'utilisation des banques de criblage phénotypique produites par l'équipe du Dr R.Beijersbergen (NKI, Pays Bas) a déjà permis de mettre en évidence des cibles thérapeutiques prometteuses et de nouvelles stratégies de traitement ^{152,160}. Ainsi, la banque de shRNA ciblant le kinome humain (500 kinases) utilisée pour les trois criblages, contient 1798 shRNA, soit en moyenne 4 shRNA ciblant une même kinase.

Notre objectif était de mettre en évidence une ou plusieurs kinases dont l'inhibition pourrait restaurer la sensibilité à une thérapie du CCR dans les lignées cellulaires choisies. De plus, Les cibles potentielles validées grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de protéine kinase pourraient rapidement déboucher sur des essais cliniques. En effet, un grand nombre de ces molécules pharmacologiques est disponible sur le marché voire possède déjà une AMM ^{161,162}.

2-1 Choix des lignées résistantes

2-1-1 Criblages consacrés aux médicaments cytotoxiques

Pour ces criblages, les lignées choisies ont été générées au laboratoire, par exposition à des concentrations croissantes d'agents cytotoxiques (oxaliplatine ou SN-38) puis clonées afin d'obtenir des lignées dont la concentration inhibitrice médiane (IC50) est au moins 10 fois supérieure à celle de la lignée native, HCT116 (Figure 20 A et B)^{117,138}. La première lignée utilisée, HCT116-R1, est résistante à l'oxaliplatine. Une précédente étude effectuée par notre équipe a démontré que la voie mitochondriale de l'apoptose était altérée dans ce modèle¹³⁸. Cette lignée présente également une légère résistance croisée à l'irinotécan (IC50 de la lignée native : 7,7 nM ; IC50 de la lignée HCT116-R1 : 32,3 nM)¹³⁸. La seconde lignée clonale utilisée, appelée G7, est résistante au SN-38. Elle ne présente pas de surexpression de la pompe d'efflux ABCG2. Ce modèle de résistance comporte deux mutations hétérozygotes du gène TOP I, qui n'affecte pas significativement la quantité de protéine topo I présente dans la cellule. Cependant, ces mutations réduisent l'effet cytotoxique de l'irinotécan en diminuant l'affinité de la topo I pour le SN-38¹¹⁷.

2-1-2 Criblage consacré aux thérapies anti-EGFR

Pour ce criblage nous avons utilisé la lignée HCT116 qui présente une résistance innée au cétuximab et au panitumumab, elle est également réfractaire au traitement par l'erlotinib (figure 20 C). En effet, cette lignée présente une mutation du gène KRAS (G13D) et de PIK3CA (codant pour la sous-unité catalytique de la protéine PI3K) induisant une activation constitutive des voies en aval de l'EGFR¹⁶³. Le cétuximab et le panitumumab sont deux anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR qui diffèrent au niveau de leur épitope, de leur mécanisme d'action et de leur humanisation (cf : introduction). L'erlotinib est une molécule chimique qui possède une structure et un mécanisme d'action différent : il cible la partie intracellulaire de l'EGFR au niveau de la poche liant l'ATP et inhibe ainsi l'activation de son domaine tyrosine kinase⁷⁵. Lors de ce criblage, nous avons choisi de comparer les résultats obtenus après traitement des cellules par ces trois thérapies anti-EGFR.

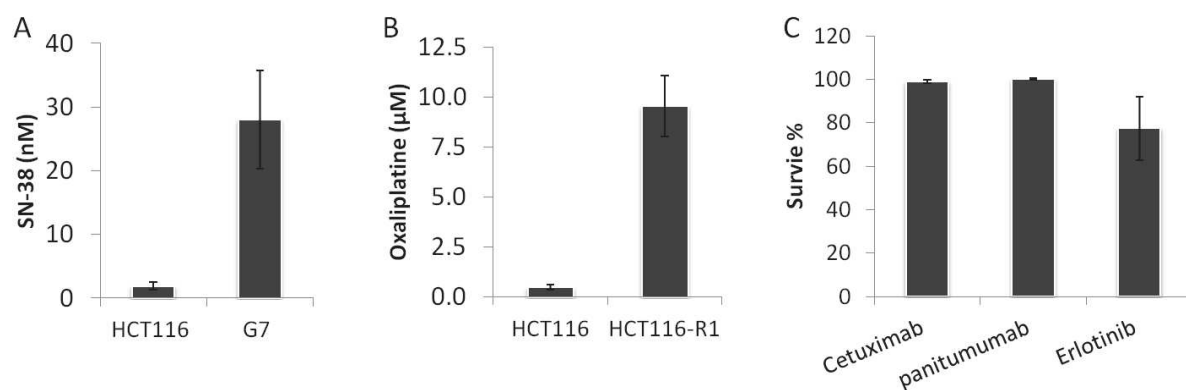


Figure 20 : Caractérisation du niveau de résistance des lignées cellulaires utilisées pour les trois criblages phénotypiques. A- IC₅₀ obtenu après 96h de traitement des lignées HCT116 et G7 par le SN-38. B- IC₅₀ obtenu après 96h de traitement des lignées HCT116 et HCT116-R1 par l'oxaliplatine. C- Pourcentage de survie de la lignée HCT116 après 7jours de traitement par une concentration de 200μg/ml de cétuximab, de panitumumab et 10μg/ml d'erlotinib.

2-2 Principales étapes et mise au point du criblage phénotypique

Le criblage phénotypique est constitué de quatre étapes principales précédant l'identification et l'étude des cibles potentielles. Pour chacun des criblages phénotypiques, ces étapes ont nécessité une mise au point technique pour adapter l'expérience aux traitements et aux cellules utilisées afin d'obtenir des résultats robustes (figure 21).

Dans cette partie seront donc présentées et expliquées les étapes du criblage ayant fait l'objet de mises au point. Le déroulement complet du criblage sera, quant à lui, présenté dans la partie matériel et méthodes.

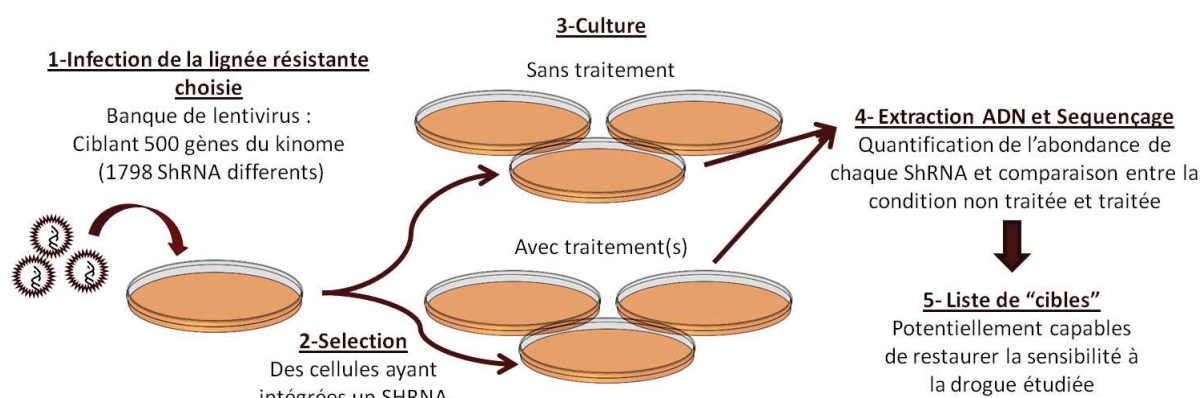


Figure 21: Etapes du criblage phénotypique

Etape 1: La première étape consiste à infecter la lignée résistante choisie, par les lentivirus contenant la collection de shRNA ciblant le kinome humain. Cette mise au point consiste à caractériser l'infektivité de cette banque. Pour cela nous avons déterminé le titre viral de la banque de lentivirus utilisée, c'est à dire le nombre de particule virale par millilitre de solution. Le but est de s'assurer que chaque cellule ne soit infectée que par un seul lentivirus, donc n'intègre qu'un seul shRNA. C'est pourquoi, nous avons choisi une *multiplicity of infection* (MOI) inférieure à 1, la MOI représente le rapport entre le nombre de particules virales et le nombre de cellules à infecter. Dans notre cas, nous souhaitons mettre en présence une particule virale pour trois cellules, soit une MOI de 0,3.

Les rétrovirus et dans une moindre mesure les lentivirus peuvent s'insérer de façon aléatoire dans le génome de la cellule hôte¹⁶⁴. Lorsque l'insertion survient dans les régions codantes de l'ADN elle peut causer la mort de la cellule hôte si l'expression d'un gène essentiel est

perturbée. Dans de rare cas, l'insertion peut aussi avoir lieu dans des régions non codantes de l'ADN hôte et conduire à l'absence d'expression de l'ARN interférent dans la cellule concernée. Pour palier à ces phénomènes et promouvoir une large diversité dans le site d'insertion des shRNA, nous avons opté pour une infection d'au moins 1 000 cellules pour chacun des shRNA de la banque dans l'expérience dédiée aux thérapies ciblées. Pour les criblages consacrés aux médicaments cytotoxiques, la diversité d'insertion choisie était de 10 000.

Etape 2 : Durant 7 jours, les cellules infectées sont sélectionnées par la puromycine. Puis, les cellules ayant intégrées un shRNA sont réensemencées pour que chaque shRNA soit présent à au moins 1 000 exemplaires, et ce pour chaque condition de traitement. Pour les criblages dédiés aux médicaments cytotoxiques, la représentation de chaque shRNA était de 1 500 exemplaires. Pour garantir une prolifération exponentielle des cellules durant l'étape de culture, celles-ci ne doivent pas être confluentes avant la fin de l'expérience. C'est pourquoi un large nombre de boîte de pétri est nécessaire à cette étape.

Etape 3 : Les cellules infectées sont alors traitées ou non durant 7 jours. Lors des criblages consacrés aux médicaments cytotoxiques, la quantité de traitement utilisée correspond à une concentration létale pour la lignée sensible (HCT116) mais, qui n'affecte pas la viabilité des lignées clonales résistantes. Dans le troisième criblage consacré aux thérapies anti-EGFR, la lignée HCT116 est totalement réfractaire au traitement par le cétuximab ou le panitumumab, la concentration utilisée a donc été choisie de façon arbitraire : 50 µg/mL. Cette concentration est suffisante pour observer un effet significatif de ces anticorps dans des lignées KRAS non mutées ainsi que la lignée KRAS mutée partiellement répondeuse, DLD-1. L'erlotinib est utilisé à la concentration de 2,5 µg/mL, dernière concentration à ne pas affecter la viabilité des cellules HCT116.

Etape 4 : Une fois l'ADN des différentes conditions extrait et séquencé, une analyse par déplétion (*drop out*) a été effectuée pour les trois criblages, c'est-à-dire que seul les shRNA déplétés dans la condition traitée par rapport à la condition non traitée ont été pris en compte.

2-3 Résultats des trois criblages phénotypiques

Pour chaque criblage entre deux et quatre cibles potentielles ont été obtenues (tableaux 4 et 5). Pour les criblages phénotypiques consacrés aux médicaments cytotoxiques, la sélection des cibles a été réalisée selon trois critères : (i) une différence d'expression d'au moins 2 fois entre le triplicat expérimental traité et non traité ; (ii) la significativité des résultats obtenus pour chaque shRNA (seuil de significativité de 0,1) ; (iii) la majorité des shRNA dirigés contre une même cible devait répondre aux deux premiers critères.

C'est ainsi que les protéines ATM et RAC1 ont été mises en évidence après l'analyse des résultats du criblage phénotypique effectué pour étudier la résistance à l'irinotécan (SN-38). Dans l'étude de la résistance à l'oxaliplatine, ce sont deux protéines cibles qui ont été identifiées : ATR et ROR2 (tableau 4).

Dans l'étude de la résistance aux thérapies anti-EGFR, les résultats du criblage ont été décevants puisqu'aucune cible n'a été identifiée selon les critères définis ci-dessus. Nous avons donc décidé d'abaisser les critères de sélection. Ainsi, Les shRNA « considérés » présentent une différence d'expression supérieure à 1,5 fois entre la condition non traitée et traitée. Le seuil de significativité a été abaissé à 0,55 soit jusqu'à 55 % de probabilité qu'il n'y ait pas d'effet du ShRNA choisi. De plus, au moins la moitié des shRNA dirigés contre une cible devaient répondre aux deux critères précédents pour en faire une cible potentielle. Enfin, les cibles potentielles communes à plusieurs thérapies anti-EGFR ont été choisies.

Selon ces critères nous avons identifié la protéine YSK4 (commune aux trois thérapies dirigées contre l'EGFR) et les protéines TNNT3, ATR et DDR2 (communes aux deux anticorps monoclonaux cétuximab et panitumumab) (tableau 5).

Tableau 4: Résultats des deux criblages phénotypiques dédiés aux médicaments cytotoxiques (SN-38 et Oxaliplatine). Pour chaque criblage, les cibles sont accompagnées du nombre de ShRNA dirigé contre la protéine cible considérée, de la différence d'expression entre le triplicat non traité et traité et de la significativité des résultats obtenus pour les shRNA retenus.

Traitements utilisés	ShRNA significatifs/ nombre de ShRNA dirigés contre la cible	Gène	Différentiel quantitatif (min- max) entre la condition non traitée et traitée	Significativité (min-max)
SN-38	2/4	ATM	1.4- 3.36	0.08- 1.51 ^{e-10}
	3/4	RAC1	12.5- 100	0.028- 0.23 ^{e-3}
Oxaliplatine	3/4	ATR	1.7- 2.8	0.34 ^{e-3} - 1.45 ^{e-12}
	2/2	ROR2	1.7-2.1	1.62 ^{e-4} - 3.5 ^{e-8}

Tableau 5: Résultats du criblage phénotypique dédié aux thérapies anti-EGFR. Pour chaque traitement du criblage (cétuximab, panitumumab, erlotinib), les cibles sont accompagnées du nombre de ShRNA dirigé contre la protéine cible considérée, de la différence d'expression entre le triplicat non traité et traité et de la significativité des résultats obtenus pour les shRNA retenus.

Traitements utilisés	Nombre de ShRNA considérés (p-value <0.55)/ nombre de ShRNA dirigés contre la cible	Gène	Différentiel quantitatif (min- max) entre la condition non traitée et traitée	Significativité (min-max)
Cétuximab	3/4	ATR	1.94- 5.3	0.487- 0.28
	3/4	DDR2	1.6- 2.17	0.49- 0.297
	4/5	TNNI3K	2- 2.6	0.403- 0.183
	2/2	YSK4	2.2-2.5	0.377- 0.239
Panitumumab	2/4	ATR	1.8- 2	0.522-0.457
	2/4	DDR2	1.6- 1.8	0.48-0.47
	3/5	TNNI3K	2.2- 2.44	0.48- 0.28
	2/2	YSK4	2- 3.2	0.4- 0.16
Erlotinib	1/2	YSK4	1.7	0.52

2-4 Présentation des cibles

Les sept protéines identifiées lors des trois criblages et dont l'inhibition a été capable d'induire une interaction létale avec l'une des thérapies utilisées, présentent des fonctions cellulaires très variables. ATR et ATM sont des protéines majeures de la réparation de l'ADN. Leur inhibition est déjà testée dans de nombreuses études précliniques et cliniques en oncologie ¹⁶⁵. Les protéines DDR2 et RAC1 sont impliquées dans le développement du cancer. Enfin, trois protéines dont le rôle en oncologie est inconnu (YSK4, TNNI3K) ou encore incertain (ROR2) ont également été mises en évidence. Dans cette partie, les rôles physiologiques et les implications dans le cancer colorectal de ces protéines seront développés.

ATM ou *Ataxia Telangiectasia Mutated* est une protéine impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN, elle est activée à la suite de cassures double brin de l'ADN (DSB). Son activation initie une cascade de signalisation et permet le recrutement de protéines spécifiques de la réparation de l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire mais également de l'apoptose ¹⁶⁶. La mutation germinale de cette protéine est à l'origine d'une pathologie, l'ataxie télangiectasie. Une des particularités de cette maladie est la grande sensibilité aux rayons ionisants des malades. c'est la raison pour laquelle l'inhibition d'ATM a été étudiée en combinaison avec la radiothérapie ^{165,167}. ATM est une protéine qui peut être mutée ou dont l'expression peut être dérégulée dans les cellules cancéreuses ¹⁶⁸. En effet, La mutation d'ATM constitue un facteur de risque pour le développement du cancer du sein ¹⁶⁹. De plus, dans le cancer colorectal métastatique, la perte de son expression est de mauvais pronostic dans les cancers colorectaux de type CIN ¹⁷⁰. Cependant, certains variants génétiques d'ATM sont de bon pronostic dans le traitement par le TAS-102 (3^{ème} ligne de traitement du CCR) ¹⁷¹. L'inhibition d'ATM *in vitro* et *in vivo* dans des lignées de cancer colorectal sensibilise les cellules cancéreuses aux radiations ainsi qu'au traitement par des inhibiteurs de topoisomérase I et II ¹⁷². Récemment, un nouvel inhibiteur spécifique d'ATM (AZD0156) efficace dans des modèles de leucémie myéloïde ¹⁷³ et présentant une bonne biodisponibilité par voie orale a été découvert ¹⁷⁴, donnant lieu à un premier essai clinique (Clinical trial.gov).

ATR ou *Ataxia Telangiectasia and Rad3 related kinase* est, tout comme ATM, une protéine essentielle pour la détection et la réparation des dommages à l'ADN. La protéine ATR est sollicitée par la présence d'ADN simple brin persistant généré par des dommages à l'ADN ou un stress réplcatif. Lorsqu'elle est activée, cette kinase peut réguler de nombreux processus tels que l'arrêt du cycle cellulaire, la stabilité des fourches de réplication et la réparation de l'ADN ¹⁷⁵. Dès le début des années 2010, l'inhibition d'ATR en oncologie a été testée et a montrée des effets prometteurs dans des tumeurs ATM et p53 déficientes ¹⁷⁶. L'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la protéine ATR, le VE-822 ou VX-970, a permis d'augmenter la sensibilité aux radiations dans des modèles précliniques de tumeurs pancréatiques ¹⁷⁷. L'inhibition d'ATR peut également sensibiliser différents types de cellules cancéreuses à des inhibiteurs de la topoisomérase I, ou à certains sels de platine (cisplatine, carboplatine) ¹⁷⁸. C'est pourquoi, deux inhibiteurs spécifiques d'ATR (VX-970 et AZD6738) font actuellement l'objet d'essais clinique seuls ou en combinaison avec plusieurs médicaments cytotoxiques (cisplatine, carboplatine, irinotécan et gemcitabine) ¹⁷⁹. Une description plus détaillée de la protéine ATR, de son implication dans la réparation des dommages à l'ADN et dans le cancer colorectal introduira la seconde partie des résultats.

DDR2 ou *discoidin domain receptor 2* est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. Cette protéine de liaison aux collagènes extracellulaires est, avec DDR1, impliquée dans la prolifération, l'adhésion, la motilité cellulaire et l'apoptose ¹⁸⁰. Dans diverses pathologies (fibrose, athérosclérose et cancer) la protéine DDR2 peut être dérégulée. Dans plusieurs cancers, DDR2 est une cible thérapeutique potentielle notamment dans les cancers de la tête et du cou et les cancers du poumon ^{181,182}. Ses inhibiteurs les plus sélectifs sont les multi-inhibiteurs de tyrosine kinase dasatinib et nilotinib ¹⁸³. Ils sont utilisés dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques pour cibler la protéine de fusion BCR-ABL spécifique de ce cancer. L'expression de la protéine DDR2 est associée à des cancers plus agressifs ¹⁸⁴ ainsi qu'à des tumeurs colorectales de plus mauvais pronostic ¹⁸⁵. Au niveau hépatique, deux études sont contradictoires, la première dans le CCR métastatique attribue à l'absence de DDR2 une prédisposition aux métastases hépatiques ¹⁸⁶. La seconde met en évidence une diminution de la croissance des tumeurs hépatiques lorsque la protéine DDR2 est inhibée par ARN interférence ¹⁸⁷.

RAC1 ou *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* est une protéine clef de la transduction intracellulaire, exprimée de façon ubiquitaire et faisant partie de la famille des Rho GTPase. Elle intervient notamment dans les voies de signalisation impliquées dans l'organisation du cytosquelette, le trafic intracellulaire, la régulation du cycle cellulaire, la migration cellulaire et la réponse immunitaire innée ¹⁸⁸. La protéine RAC1 est présente sous deux formes, l'une activée liée au GTP l'autre inactive liée au GDP. Lorsque l'équilibre entre ces deux états de la molécule est rompu, souvent à l'avantage de la forme activée, ou lorsqu'elle est surexprimée, RAC1 est impliquée dans de nombreuses pathologies dont le cancer. En effet, RAC1 peut promouvoir la transformation, la survie, l'invasion et le développement métastatique des cellules cancéreuses ^{189,190}. Des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de cette protéine ont été développés dont le nsc23766, qui inhibe le passage de la forme inactive à la forme active de RAC1 ¹⁹¹. Dans le cancer colorectal, le niveau d'expression de RAC1 et sa suractivation par le biais du variant d'épissage RAC1b joue un rôle dans la progression et la survie des cellules cancéreuses ¹⁹²⁻¹⁹⁴. Enfin, l'inhibition par ARN interférence de RAC1 limite la migration et le potentiel invasif de la lignée colorectale HCT116 ¹⁹⁵.

ROR2 ou *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2* est un récepteur membranaire qui peut lier des ligands de la voie Wnt. Cette protéine est impliquée dans le développement embryonnaire de différents tissus et est normalement réprimée dans les tissus adultes. Cependant, dans de nombreux cancers dont le cancer colorectal ¹⁹⁶, l'expression du récepteur ROR2 peut être associée à une plus forte croissance et invasion des cellules tumorales. La protéine ROR2 peut donc constituer une cible thérapeutique potentielle en cancérologie. Cependant, à ce jour aucun inhibiteur spécifique de cette protéine n'est disponible ¹⁹⁷. Le rôle de ROR2 dans le cancer colorectal nécessite des clarifications car il existe des études contradictoires concernant le caractère pro ou anti-tumoral de cette protéine ^{196,198,199}. Plus récemment, une publication démontre l'absence de spécificité de certains anticorps commerciaux dit « anti-ROR2 » ²⁰⁰. Le rôle de ROR2 dans la cancérogénèse et dans le développement de métastases est donc à ce jour mal défini.

TNNI3K ou *Cardiac Troponin I-interacting kinase* est une kinase spécifique du tissu cardiaque ²⁰¹. Cette protéine est essentiellement décrite et étudiée pour son implication dans plusieurs cardiomyopathies ²⁰². De récentes études ont également montré l'implication de TNNI3K dans l'hypertrophie et la régénération du muscle cardiaque ^{203,204}. C'est pourquoi, son inhibition thérapeutique est envisagée ²⁰⁵. Enfin, selon la seule étude concernant TNNI3K en cancérologie, une forte expression de TNNI3K est associée à une plus faible survie dans une cohorte de 226 patients atteints de CCR ²⁰⁶. Les fonctions et les implications de TNNI3K en oncologie sont à ce jour non connues.

YSK4 ou la *mitogen activated protein kinase kinase kinase 19* (MAP3K19) est, une protéine très peu présente dans la littérature scientifique. Cette protéine est fortement exprimée dans le testicule, le poumon et l'endomètre ²⁰⁷. En 2016, Boehme et al. ont observé une surexpression de cette protéine dans diverses pathologies respiratoires et proposé son inhibition comme piste thérapeutique ^{208,209}. Très récemment, une troisième étude a suggéré son implication dans une pathologie oculaire : le kératocone ²¹⁰. Cependant, il n'existe à ce jour aucune mention de cette protéine dans le domaine de la cancérologie.

2-5 Validation des cibles potentielles par ARN interférence et utilisation d'inhibiteur spécifique.

2-5-1 Criblage consacré à l'oxaliplatine

Ce premier criblage a mis en évidence deux cibles potentielles : ATR et ROR2 (cf : Tableau 4). Dans le but de confirmer nos résultats, nous avons utilisé des shRNA spécifiques des transcrits à l'origine de ces deux protéines afin d'étudier l'effet de leur répression sur la réponse cellulaire à l'oxaliplatine dans la lignée HCT116-R1.

Les résultats des tests de viabilité cellulaire démontrent que la répression stable de ROR2 sensibilise les cellules HCT116-R1 à l'oxaliplatine, l'IC₅₀ étant diminuée de façon significative. De plus, nous observons que la répression stable d'ATR permet de restaurer la sensibilité à l'oxaliplatine de la lignée HCT116-R1 qui retrouve une IC₅₀ équivalente à la lignée sensible HCT116 (IC₅₀ proche de 1 μ M) (Figure 22A). Ces résultats confirment donc l'effet de « létalité synthétique » observé dans notre crible pour les protéines ATR et ROR2. La poursuite de l'étude du rôle d'ATR dans la résistance acquise à l'oxaliplatine constitue l'objet de la seconde partie des résultats et d'un article en préparation.

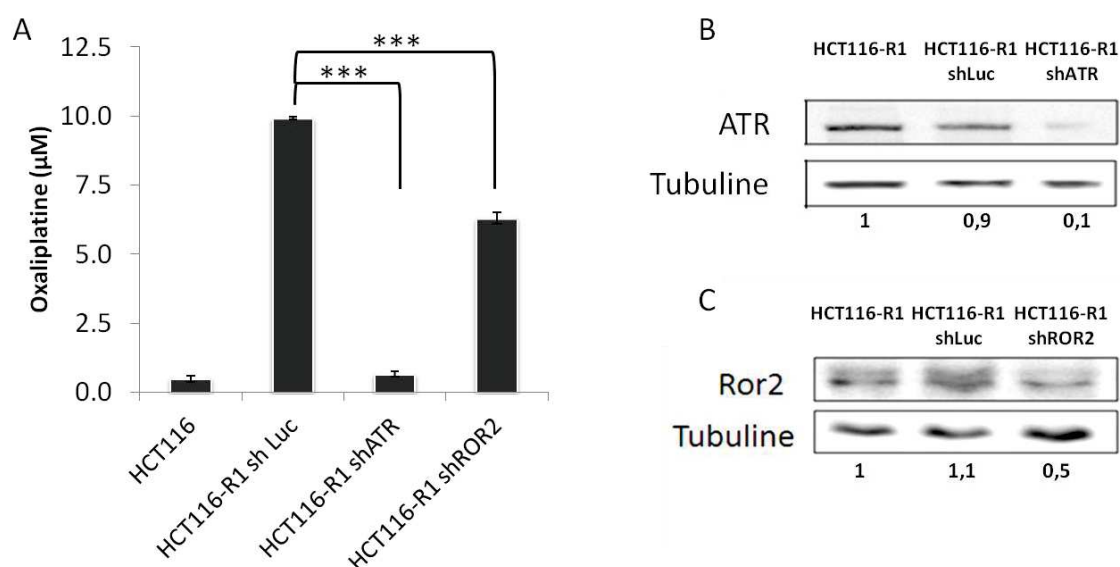
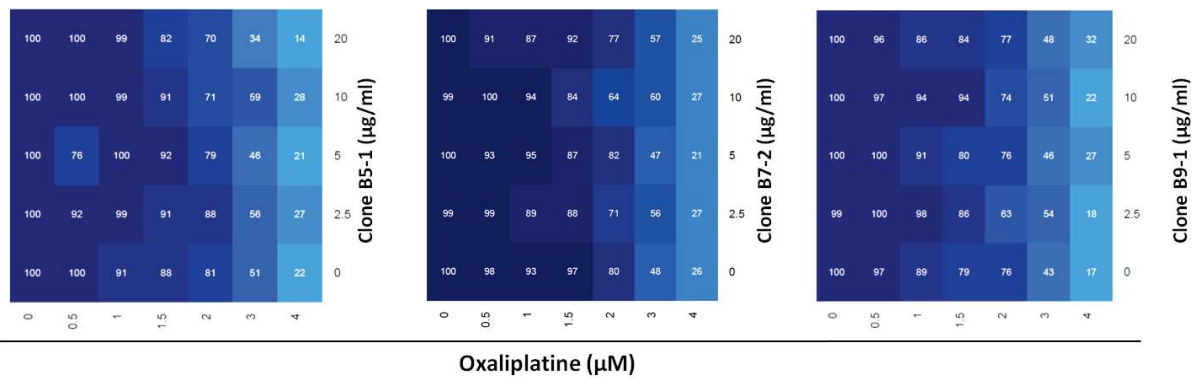


Figure 22: Confirmation des cibles ATR et ROR2 par ARN interférence. A- les IC₅₀ ont été obtenues après 96h de traitement par l'oxaliplatine dans les lignées cellulaires HCT116 et HCT116-R1 (shLuc, shATR et shROR2). B et C- Quantification de l'expression des protéines ATR et ROR2 par Western-Blot dans les lignées HCT116-R1, HCT116-R1 shLuc, HCT116-R1 shATR et HCT116-R1 shROR2.

ROR2 ne disposant d'aucun inhibiteur ou anticorps thérapeutique spécifique disponible, nous avons en collaboration avec le Dr Thierry Chardes, par le biais d'un financement LabexMabimprove, confié à GenAc (plateforme de production d'anticorps basée à l'IRCM) la sélection et la production d'anticorps spécifiques de ROR2. Onze anticorps candidats au format IgG1 spécifiques de ROR2 ont été obtenus. Trois de ces anticorps candidats (B5-1, B7-2, B9-1) ont été testés dans la lignée HCT116-R1 en combinaison avec l'oxaliplatine. Les résultats de ces combinaisons ont été analysés par la méthode des matrices de synergie développée au sein de notre équipe (cf : matériel et méthodes). La matrice de synergie obtenue à partir des données de viabilité cellulaire nous permet de mettre en évidence, pour chacune des combinaisons testées, la part de l'effet dû à la synergie (en rouge) entre les deux molécules utilisées.

Ainsi, la combinaison des anticorps B5-1 et B7-2 avec l'oxaliplatine est synergique. Sur cette première expérience, le clone B5-1 semble avoir un effet dose-dépendant lorsqu'il est combiné avec l'oxaliplatine à des concentrations comprises entre 1,5 et 3 μM , sans avoir d'effet sur la viabilité lorsqu'il est utilisé seul. Le clone B7-2 n'affecte pas non plus la viabilité cellulaire seul et en combinaison avec l'oxaliplatine la synergie atteint son maximum à des concentrations intermédiaires d'oxaliplatine (de 1,5 μM à 2 μM) et d'anti-ROR2 (de 5 $\mu\text{g/mL}$ à 10 $\mu\text{g/mL}$). En revanche, l'association entre le clone B9-1 et l'oxaliplatine semble être antagoniste dans la lignée HCT116-R1 (figure 23). Ces résultats préliminaires devront cependant être confirmés.

Matrices de viabilité



Matrices de synergie

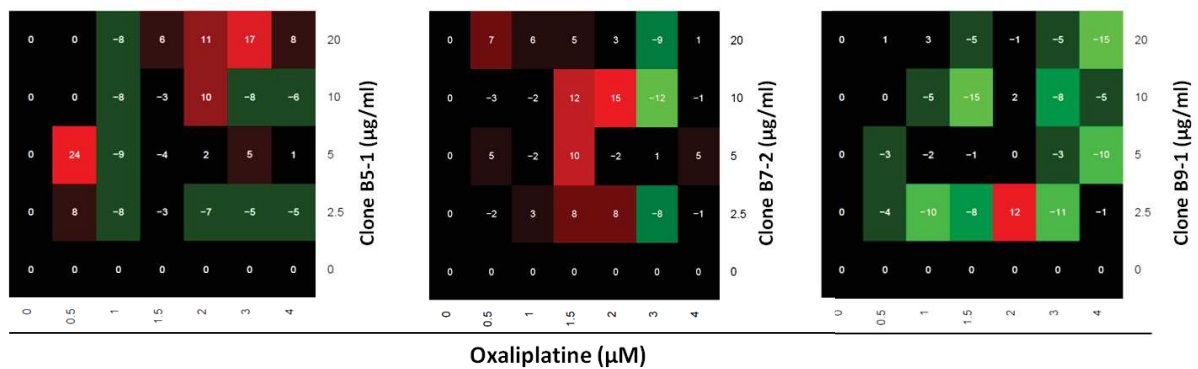


Figure 23: Deux anticorps anti-ROR2 ont un effet synergique avec l'oxaliplatine. Matrices de viabilité et de synergie résultant des tests de viabilité cellulaire combinant trois anticorps candidats anti-ROR2 (clones B5-1, B7-2 et B9-1) avec l'oxaliplatine dans la lignée HCT116-R traitée durant 7 jours. Chaque couple de matrice (viabilité + synergie) représente une expérience.

Dans l'étude de la résistance à l'oxaliplatine, les cibles potentielles obtenues ont toutes deux été confirmées par ARN interférence. L'inhibition pharmacologique d'ATR, par le VE-822 permet également de sensibiliser les cellules HCT116-R1 à l'oxaliplatine (cf : article). De plus, des résultats préliminaires encourageants ont été obtenus en utilisant les anticorps candidats B5-1 et B7-2 inhibant la protéine ROR2 en combinaison avec l'oxaliplatine.

2-5-2-Criblage consacré à l'irinotécan (SN-38)

Ce criblage a mis en évidence deux cibles potentielles ATM et RAC1 (cf : Tableau 4). Dans le but de confirmer nos résultats, nous avons utilisé un shRNA spécifique du transcrit à l'origine de la protéine RAC1 et étudié l'effet de sa répression sur la réponse cellulaire au SN-38 dans la lignée G7, résistante à cet agent cytotoxique. Un inhibiteur spécifique de la protéine RAC1, le NSC26733 a ensuite été utilisé en combinaison avec le SN-38 dans cette même lignée.

Les résultats des tests de viabilité cellulaire démontrent que la répression stable de RAC1 sensibilise significativement la lignée G7 au SN-38 (figure 24 A).

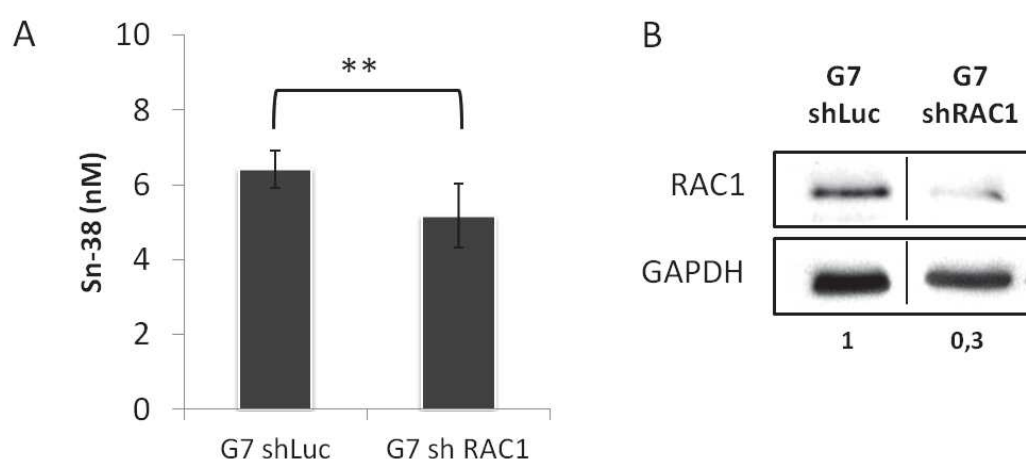


Figure 24: L'inhibition de RAC1 par shRNA sensibilise la lignée G7 au SN-38. A- Les IC50 ont été obtenues après 96h de traitement par le SN-38 des lignées G7 shLuc et G7 shRAC1. B- Quantification de l'expression de la protéine RAC1 par Western-Blot dans ces mêmes lignées. Figure réalisée à partir des résultats de C.Thinat (stage de Master 2 encadré par C-Gongora)

L'inhibiteur spécifique de RAC1, le nsc23766 en association avec le SN-38 montre une légère synergie en culture plane (2D) et une synergie plus importante en culture en trois dimensions (3D) dans la lignée G7 ainsi que dans la lignée sensible HCT116 (figure 25). La culture 3D nous permet d'étudier des conditions proches de celles observées *in vivo* dans des modèles de xénogreffes (gradient d'oxygène, de nutriment, zone hypoxique...) ²¹¹. Ici, nous observons que ces conditions de culture cellulaire augmentent la synergie entre l'inhibiteur de RAC1 et le SN-38 plus particulièrement dans la lignée résistante où la zone de

synergie est plus étendue que dans la lignée sensible. De plus, à concentration égale, l'inhibiteur de RAC1 seul diminue plus fortement la viabilité de la lignée G7 que de la lignée HCT116 (IC₅₀ de 28 μ M pour la lignée G7 et de 17 μ M pour la lignée HCT116 en culture 2D).

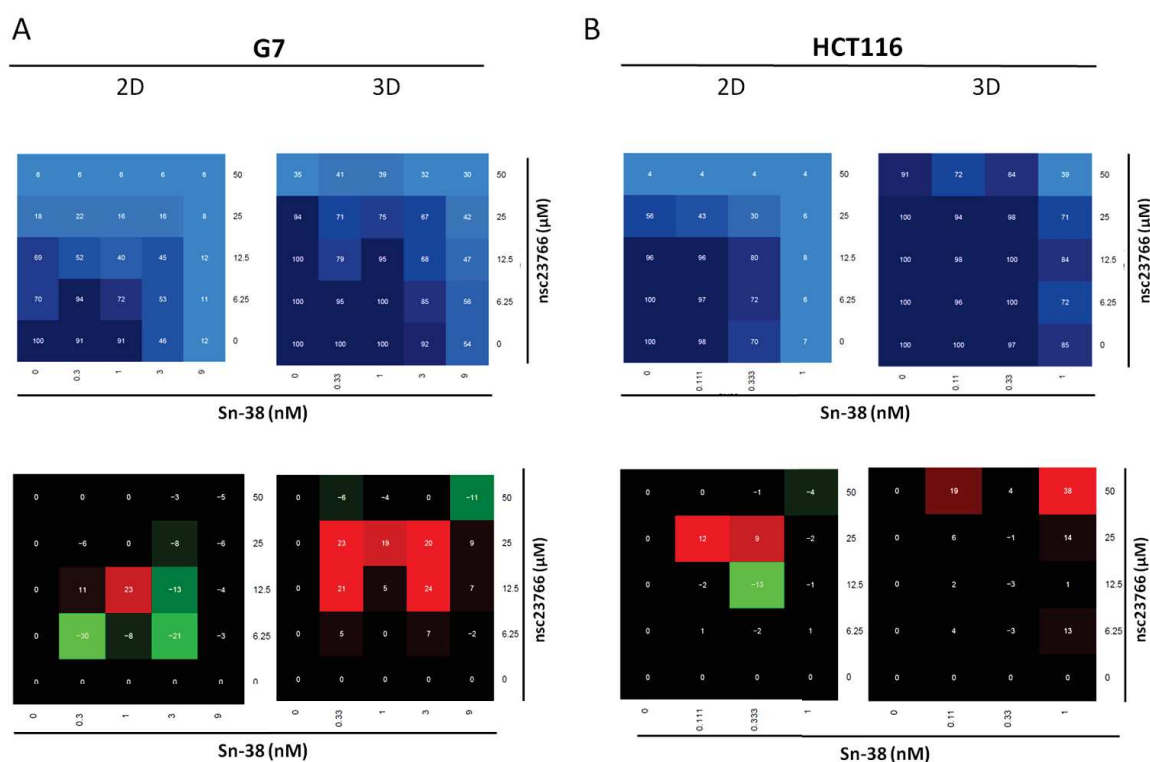


Figure 25: L'inhibition pharmacologique de RAC1 associée au SN-38 présente un effet synergique dans les lignées G7 (A) et HCT116 (B) en culture 2D et en 3D. En 2D, les résultats ont été obtenus après 7 jours de traitement. En culture 3D, les résultats ont été obtenus après 10 jours de traitement (cf : matériel et méthodes) (expérience représentative).

L'inhibition d'ATM a été effectuée en utilisant le KU55933, le premier inhibiteur spécifique de cette protéine¹⁶⁶. Les résultats montrent qu'à des concentrations faibles de KU55933 (très spécifique d'ATM¹⁷²) une synergie modérée (valeurs inférieures à 15) est obtenue en combinaison avec le SN-38 dans la lignée G7 (figure 26 A) et une synergie plus importante est observée dans la lignée HCT116 (figure 26 B). Lorsque l'inhibiteur d'ATM est utilisé à des concentrations plus fortes une synergie importante (valeurs supérieures à 25) est obtenue dans les deux lignées cellulaires (figure 26).

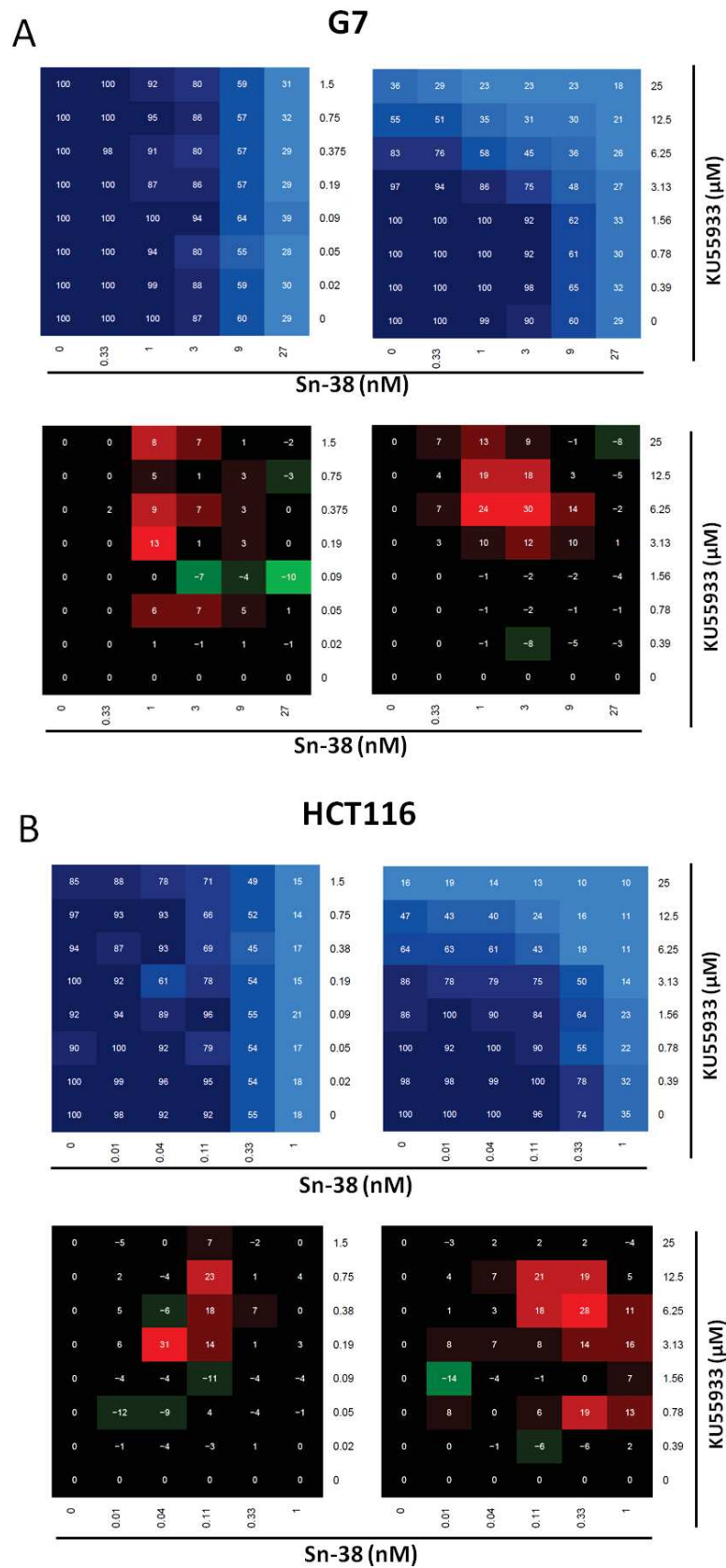


Figure 26: L'association du KU55933 et du SN-38 est synergique dans les lignées G7 et HCT116. Le SN-38 a été combiné à des concentrations faibles de KU55933 (de 0 à 1,5 μM) et à une gamme de concentrations plus large (de 0 à 25 μM) de ce même inhibiteur ; ces conditions ont été appliquées à la lignée G7 (A) et HCT116 (B). Les résultats ont été obtenus après 96h de traitement (expérience représentative).

Nos résultats confirment la « létalité synthétique » entre l'inhibition des protéines RAC1, ATM et le SN-38 dans la lignée clonale résistante à l'irinotécan. En effet, l'inhibition de RAC1 combinée avec le SN-38 est très synergique (indice de synergie supérieur à 20) en culture 3D dans la lignée G7. La synergie entre le KU55933 et le SN-38 est importante à des concentrations élevées de cet inhibiteur (de 3 à 12,5 μM), à faibles concentrations (0 à 1,5 μM) la synergie obtenue est modérée dans les cellules G7. Des études complémentaires devront être réalisées pour déterminer si d'autres kinases sont inhibées par le KU55933 dans nos conditions expérimentales.

2-5-3 Criblage consacré aux thérapies anti-EGFR

Lors de ce dernier criblage quatre cibles potentielles ont été identifiées, YSK4, commune aux trois thérapies anti-EGFR utilisées, ainsi que, DDR2, TNNT3K et ATR, communes aux deux anticorps monoclonaux utilisés (cf : Tableau 5). C'est pourquoi l'inhibition de la protéine YSK4 a été étudiée en association avec les traitements par le cétuximab, le panitumumab et l'erlotinib. L'inhibition de DDR2, TNNT3K et ATR a été étudiée en combinaison avec le cétuximab et le panitumumab. Nous avons utilisé les shRNA spécifiques du transcrit des gènes YSK4, DDR2 et TNNT3K pour étudier l'effet de leur répression sur la réponse cellulaire aux différentes thérapies anti-EGFR. La répression stable de TNNT3K n'a pas fonctionné, les expériences concernant cette cible n'ont donc pas été prises en compte et ne seront pas présentées dans ce manuscrit.

Les résultats des tests de viabilité cellulaire ne confirment pas l'implication de la protéine YSK4 dans la résistance aux thérapies anti-EGFR. Nous observons cependant que la répression stable d'YSK4 a tendance à sensibiliser la lignée HCT116 au panitumumab et à l'erlotinib, bien que les résultats ne soient pas significatifs (figure 27 A et B). En revanche, aucun effet significatif ou tendance n'est observé lorsque la lignée HCT116 shYSK4 est traitée par le cétuximab.

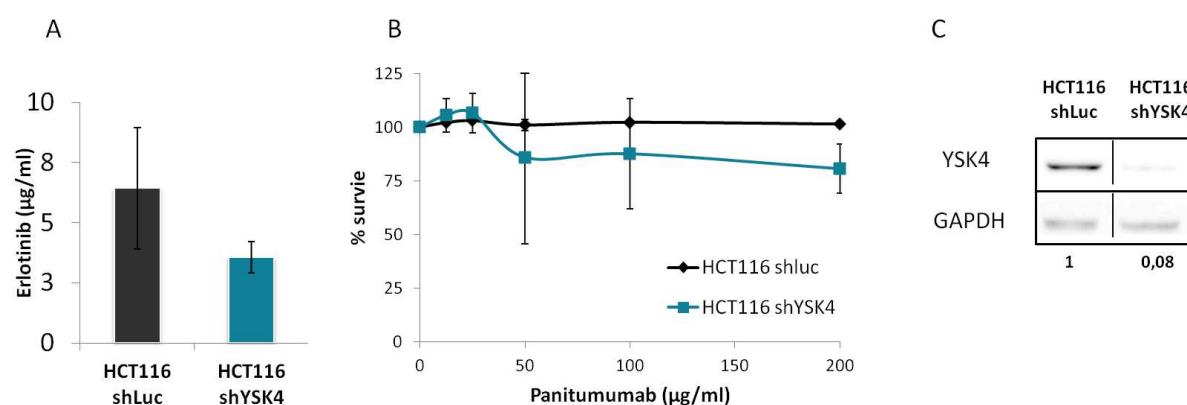


Figure 27: La répression stable d'YSK4 ne sensibilise pas significativement les cellules HCT116 à l'erlotinib ou au panitumumab. A- IC50 obtenus après traitement par l'erlotinib des lignées HCT116 shLuc et HCT116 shYSK4. B- Courbes de viabilité cellulaire obtenues après traitement par le panitumumab des lignées HCT116 shLuc et HCT116 shYSK4 C- Quantification de l'expression de la protéine YSK4 par Western-Blot. Ces résultats (A et B) ont été obtenus après 7 jours de traitements.

D'après les résultats des tests de viabilité cellulaire, la répression stable de DDR2 n'a pas d'effet significatif en combinaison avec les deux anticorps monoclonaux utilisés. Cependant, l'inhibition de DDR2 par shRNA tend à sensibiliser la lignée HCT116 au cétuximab (figure 28 A). En revanche, aucun effet significatif ou tendance n'est observé lorsque la lignée HCT116 shDDR2 est exposée au panitumumab.

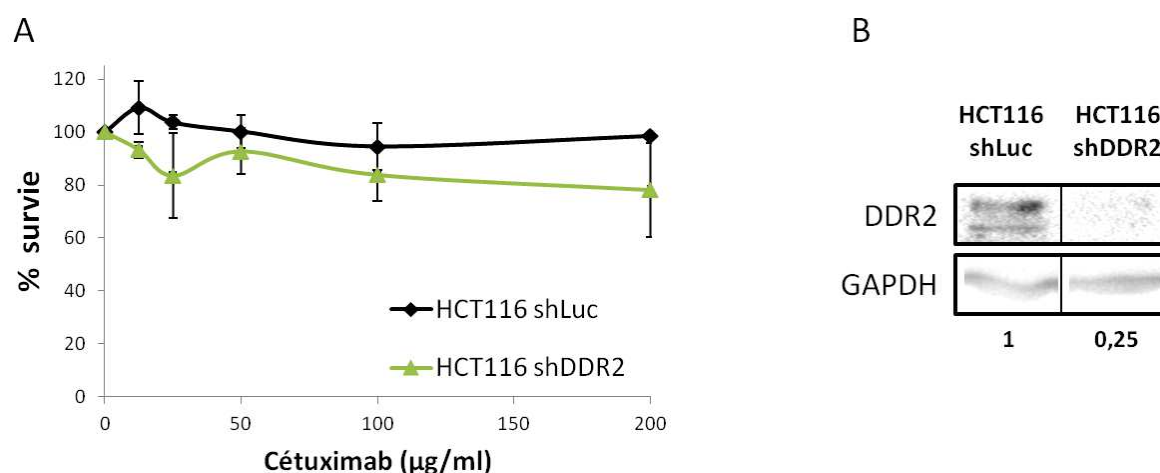


Figure 28: La répression stable de DDR2 ne sensibilise pas significativement les cellules HCT116 au cétuximab. A- Courbes de viabilité cellulaire obtenues après 7 jours de traitement des lignées HCT116 shLuc et HCT116 shDDR2 par le cétuximab. B- Quantification de l'expression de la protéine DDR2 par Western-Blot dans ces deux lignées.

Dans un second temps, le dasatinib, inhibiteur pharmacologique de DDR2 a été utilisé. La combinaison entre le dasatinib et le cétuximab est synergique confirmant la tendance observée lors de la répression stable de DDR2. Une synergie modérée (valeurs inférieure à 20) est observée pour des concentrations de dasatinib comprises entre 100 et 200 nM, associées à des concentrations de cétuximab comprises entre 50 et 200 $\mu\text{g/mL}$ (figure 29 A). De plus, sur une zone restreinte, on observe que le panitumumab présente également une synergie avec le dasatinib. La synergie observée est forte (valeurs supérieures à 20) pour une concentration de dasatinib de 100 nM associée à des concentrations de panitumumab comprises entre 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$ (figure 29 B).

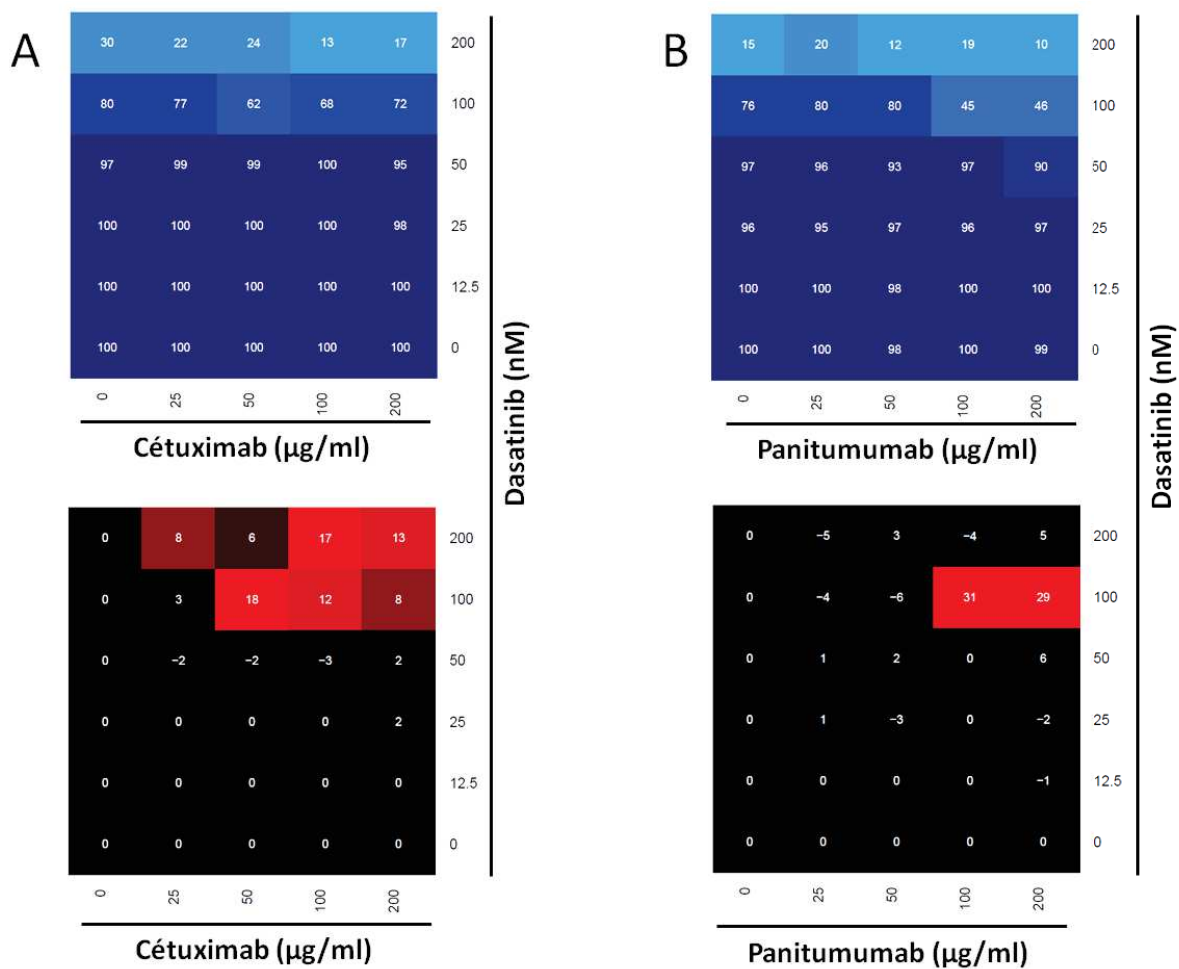


Figure 29: Le dasatinib sensibilise les cellules HCT116 au panitumumab et au cétuximab. A- Résultats d'un test de viabilité combinant le cétuximab est le dasatinib dans la lignée HCT116. B- Résultats d'un test de viabilité combinant le panitumumab est le dasatinib dans la lignée HCT116. Ces résultats ont été obtenus après 7 jours de traitement (expérience représentative).

L'inhibition de la protéine ATR a ensuite été effectuée par le VE-822. La combinaison du VE-822 avec le cétuximab est majoritairement additive (valeurs proches de zéro) mais pour une concentration de VE-822 de 0,06 μ M nous observons une zone d'antagonisme fort (valeurs inférieures à -20) (figure 30 A). En revanche, en combinaison avec le panitumumab une synergie modérée est présente pour cette même concentration de VE-822 (figure 30 B). L'inhibition pharmacologique d'ATR peut donc sensibiliser la lignée HCT116 au panitumumab mais pas au cétuximab.

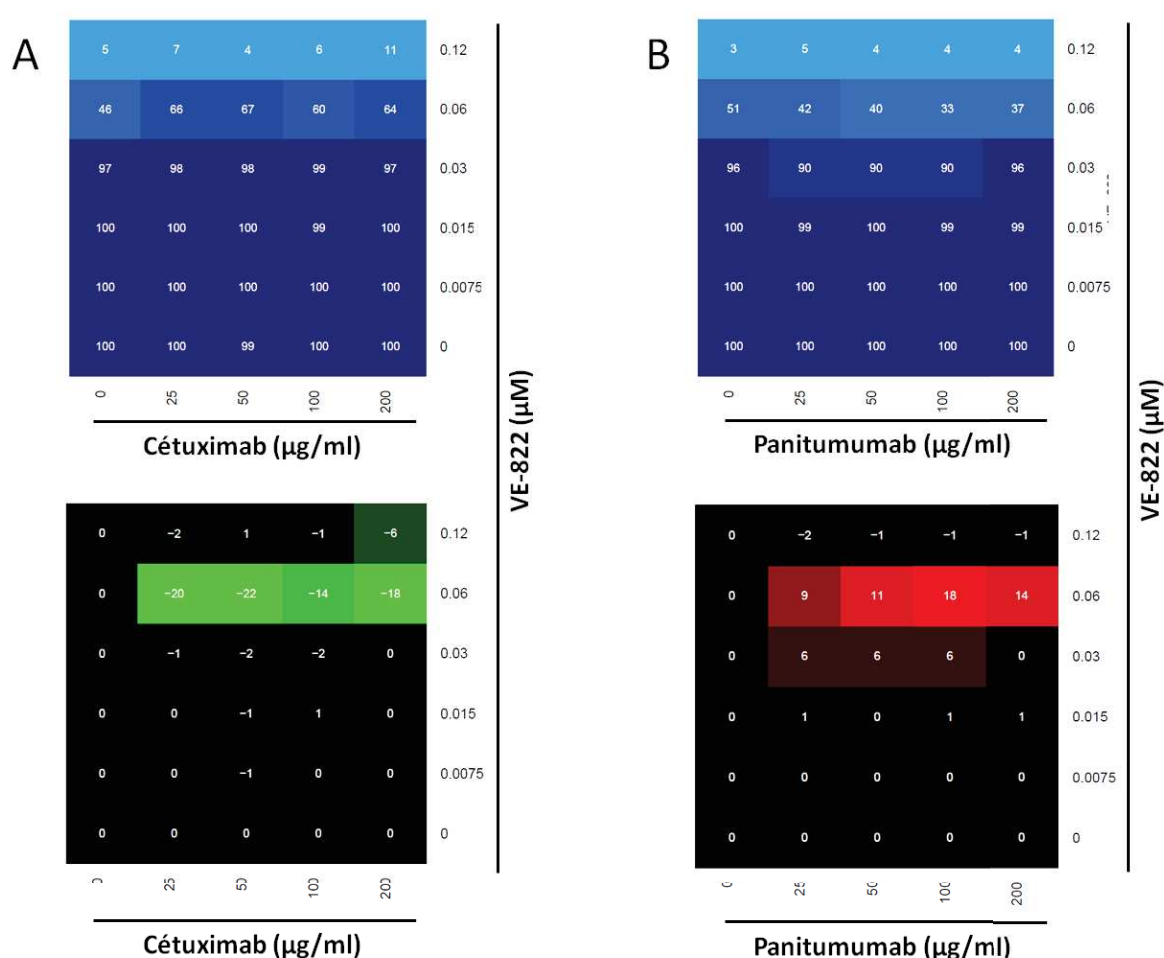


Figure 30 : L'inhibition pharmacologique d'ATR par le VE-822 sensibilise la lignée HCT116 au panitumumab mais pas au cétuximab. A- Matrices de viabilité et de synergie résultant de la combinaison entre le cétuximab et le VE-822 dans la lignée HCT116. B- Matrices de viabilité et de synergie résultant de la combinaison entre le panitumumab et le VE-822 dans la lignée HCT116. Ces résultats ont été obtenus après 7 jours de traitement (expérience représentative).

Parmi les cibles potentielles générées par ce dernier criblage phénotypique une seule n'a pu être évaluée, en effet la répression stable de TNNT3 n'a pas fonctionné et aucun inhibiteur pharmacologique ne cible cette protéine. De plus, pour deux protéines cibles (YAP et DDR2) l'inhibition par ARN interférence n'a pas montrée d'effet significatif en réponse aux traitements par les thérapies anti-EGFR. Cependant, la combinaison entre le dasatinib, molécule capable d'inhiber DDR2 et le cétuximab, ou le panitumumab est synergique. Quant à la protéine ATR, son inhibition par le VE-822 sensibilise les cellules HCT116 au panitumumab, alors que, nous observons un antagonisme avec le cétuximab. Pour conclure sur ce criblage, l'implication de la protéine ATR dans la résistance au panitumumab a été confirmée dans la lignée HCT116. Le traitement par le dasatinib combinée aux deux anticorps monoclonaux anti-EGFR est également synergique dans la lignée HCT116. Les études concernant ces deux protéines seront donc poursuivies. Pour les protéines YAP et TNNT3, nous pourrions conclure nos études sur ces cibles si des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de ces deux protéines sont commercialisés.

2-6 Matériel et Méthodes

Réactifs et anticorps :

Le cétuximab (5 mg/mL), le panitumumab (20 mg/mL), et l'erlotinib (5 mg/mL) proviennent de l'ICM. Le ncs23766 et le KU55933 ont été fournis par Sigma-Aldrich, le Dr Arnaud Coquelle nous a fourni le VE-822. La benzonase provient de Merk-Millipore. Les anticorps : anti-YSK4 (PA5-29285) et anti-RAC1 (PA1-091X) ont été achetés chez Thermofisher Scientific, les anti-ROR2 (#14700) et anti-DDR2 (#12133) proviennent de Cell Signaling Technology et l'anti-TNNI3K (Ab 136954) est fourni par Abcam.

Culture cellulaire :

Les lignées cellulaires humaines de cancer colorectal HCT116 (ATCC, USA) et les lignées clonales résistantes HCT116-R1 et G7 sont cultivées dans du RPMI-1640 complété avec 10 % de sérum de veau fœtal. Celles-ci ont été maintenues dans un environnement humide à 37 °C avec 5 % de CO₂. Les lignées clonales résistantes à l'oxaliplatine (HCT116-R1) et au SN-38 (G7) ont été obtenues par une exposition continue à ces médicaments cytotoxiques suivie d'un clonage comme décrit précédemment^{138,159}.

Les cellules HCT116, HCT116-R1 et G7 exprimant un ShRNA ciblant les ARNm d'une des protéines cibles ont été obtenues par transduction lentivirale. Nous avons utilisé des vecteurs PLKO contenant les shRNA issus de la banque fournie par le NKI pour les expériences de criblage phénotypique. La sélection est réalisée par un antibiotique, la puromycine (1 µg/mL).

Criblage de létalité synthétique :

i) Production des particules virales : Chacun des 1798 shRNA dirigés contre le kinome humain (518 kinases) a été inséré dans des plasmides PLKO-1 (un ShRNA/plasmide). Les plasmides de la banque shRNA sont ensuite transfectés dans des HEK293T avec les plasmides permettant la production de lentivirus (gag-pol-env) (effectué à l'IGF – plateforme de vectorologie de Montpellier).

ii) Dosage des virus et transduction lentivirale : Les virions contenant la banque de shRNA sont alors dosés et utilisés pour infecter les lignées choisies à 0,3 MOI au cours des différents criblages phénotypiques (HCT116-R1, G7 et HCT116).

iii) Sélection et réensemencement : Après une sélection par la puromycine (1 µg/mL) durant une semaine, les cellules infectées sont réensemencées à 3 millions de cellules par condition et par triplicat dans les criblages consacrés aux agents cytotoxiques (0,3 M de cellules/boîtes soit 30 boîtes/condition/triplicat = 180 boîtes de pétri au total) et à 2 millions de cellules par condition et par triplicat durant le criblage consacré aux thérapies anti-EGFR (0,1 M de cellules/boîtes soit 20 boîtes/condition/triplicat = 240 boîtes de pétri au total).

iv) Culture : 24h plus tard les cellules sont traitées ou non (oxaliplatine à 3 µM, SN-38 à 27 nM, cétuximab, panitumumab à 50 µg/mL et erlotinib à 2,5 µg/mL) durant 7 jours.

v) Extraction ADN : Les cellules sont alors grattées dans du PBS, regroupées par condition de traitement et par triplicat et leur ADN est extrait (kit genomic DNA purification, Macherey-Nagel).

vi) Séquencage et analyse : les séquences de shRNA contenues dans les échantillons d'ADN sont alors amplifiées par PCR, et séquencées afin d'obtenir l'abondance de chaque shRNA par condition et par triplicat (réalisé par nos collaborateurs de l'équipe du Dr R. Beijersbergen, NKI). Pour l'analyse, réalisée en collaboration avec le Dr Pierre Martineau, la sélection des cibles a été réalisée selon trois critères : (i) la différence d'expression entre le triplicat expérimental traité et non traité ; (ii) la significativité des résultats obtenus pour chaque shRNA ; (iii) la proportion de shRNA dirigés contre une même cible répondant aux deux premiers critères.

.

Test de viabilité cellulaire 2D :

Les cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits à fond plat, entre 150 et 1 000 cellules par puits selon la lignée cellulaire. 24 h plus tard les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes d'agents cytotoxiques (SN-38 ou oxaliplatine) ou de thérapies ciblées (cétuximab, panitumumab ou erlotinib) seules ou combinées à des concentrations croissantes d'inhibiteurs pharmacologiques (VE-822, NSC 23766, dasatinib, KU55933) ou

d'anticorps candidats anti-ROR2 durant 96h ou 7 jours à 37 °C. Les cellules sont ensuite fixées au trichloroacetate 10 % (TCA) puis colorées par la Sulforhodamine B 4 % (SRB). Les cellules sont lysées au Tris base. L'absorbance à 560 nm est ensuite mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA. Le pourcentage de cellules vivantes est calculé par rapport aux puits contrôles ne recevant pas de traitement. Enfin, une IC50 est déterminée graphiquement par report de la courbe sur l'axe des ordonnées. Les tests de viabilité cellulaire présentés dans ce manuscrit ont été effectués au moins trois fois.

Test de viabilité cellulaire en culture 3D :

Pour la génération des sphères, en fonction de la lignée cellulaire choisie, entre 50 et 300 cellules en suspension sont déposées dans chaque puit d'une plaque 96 puits à fond rond *ultra-low attachment*. Après 4 jours, des sphères se sont formées, elles sont alors incubées en présence de concentrations croissantes de médicaments cytotoxiques (SN38 ou Oxaliplatine) combinées à des concentrations croissantes d'inhibiteurs pharmacologiques (VE-822, NSC 23766). Six jours plus tard le traitement est renouvelé. Après 14 jours de culture, chaque sphère est lysée et mise en présence de cell titer-Glo, détectant l'ATP présent dans le milieu, rendant ainsi compte de la viabilité cellulaire par luminescence. La luminescence est ensuite mesurée à l'aide d'un luminomètre de plaque. Les tests de viabilité cellulaire en trois dimensions présentés dans ce manuscrit ont été effectués au moins deux fois.

Matrice de synergie (cf : matériel et méthodes de l'article):

A l'issue d'un test de viabilité cellulaire en culture plane ou en 3D combinant deux molécules, la viabilité cellulaire est obtenue pour l'ensemble des points de la plaque (test SRB ou cell titer-Glo). Grâce à un script sous « R » se basant sur l'effet de chaque molécule seule (équation de Bliss et de Lehàr), une matrice de synergie est générée. Le nombre associé à chaque combinaison lorsqu'il est positif, indique la part de l'effet observé due à la synergie ; lorsque celui-ci est négatif, il indique un antagonisme entre les deux molécules. À partir de ces nombres, chaque combinaison est associée à une couleur indiquant le type d'effet observé. La synergie est associée à la couleur rouge, l'additivité au noir et l'antagonisme au vert (figure 31).

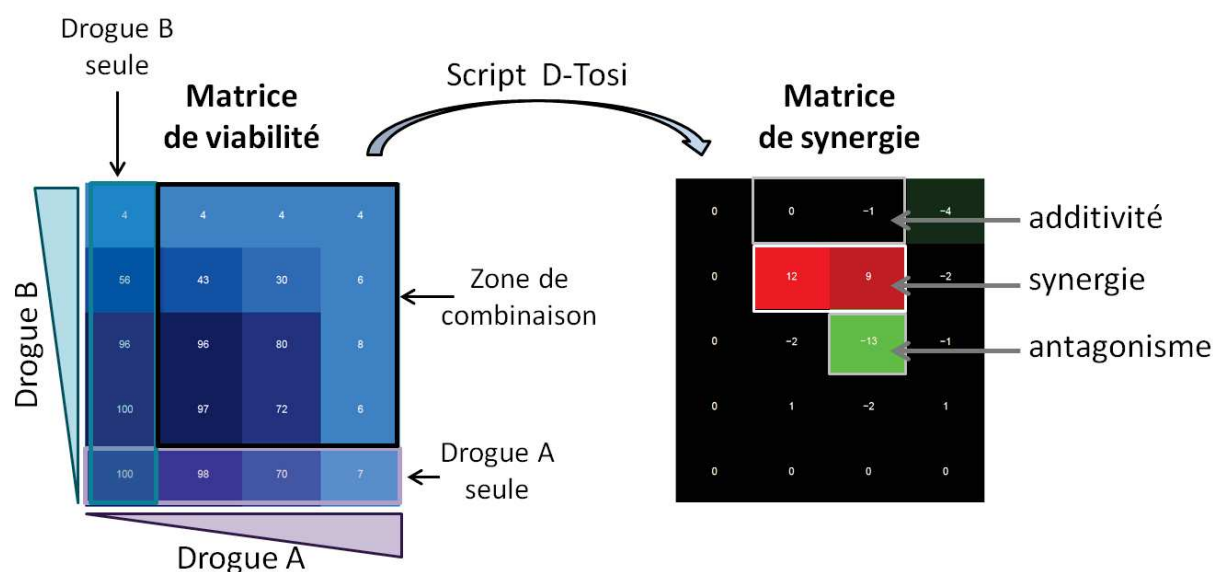


Figure 31: Principe utilisé pour l'obtention des matrices de synergie

Western blot:

Les cellules, une fois traitées, sont rincées (PBS 1X) et directement lysées dans du Tp Laemmli (4 % SDS, 20 % glycerol, 1 % 2-β mercaptoethanol, 0,004 % bromophenol blue, 0,125 M Tris HCL). Les acides nucléiques (ADN, ARN) présents dans les extraits sont digérés par l'ajout de benzonase (0,2 µL pour 100 µL de laemmli). Après dénaturation 5 min à 95 °C, les extraits protéiques (10 000 cellules/µl) sont déposés et séparés sur gels polyacrylamides SDS-PAGE à 10, 12 % ou sur gradient 4-20 %. Ils sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose avec un tampon de transfert contenant 20 % d'éthanol pendant 1 heure en transfert semi-sec (gel 10 et 12 %) ou pendant 2 heures en transfert liquide (gel gradient). Puis, la membrane est bloquée dans une solution de lait 5 % PBS-Tween 0,1 % pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Elle est ensuite incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Après 3 lavages dans du PBS-Tween 0,1 %, la membrane est incubée 1 heure en présence de l'anticorps secondaire anti-espèce de l'anticorps primaire couplé à l'HRP (Horse Radish Peroxidase) dilué au 1/5 000 dans du lait 5 % PBS-Tween 0,1 % sous agitation. Après lavages, les protéines d'intérêt sont révélées par chimio-luminescence (Kit ECL revelblot plus, et ECL revelblot intense) et visualisées grâce à une G-Box (Syngene).

Inhibition de la protéine ATR et résistance à l'oxaliplatine

3- Inhibition de la protéine ATR et résistance à l'oxaliplatine

3-1 Introduction

Les résultats du premier criblage phénotypique ont mis en évidence la protéine ATR comme potentiellement impliquée dans la résistance à l'oxaliplatine. Dans le modèle cellulaire de résistance acquise à ce médicament cytotoxique (HCT116-R1), l'inhibition par ShRNA de la protéine ATR a permis de restaurer la sensibilité à l'oxaliplatine (cf : Figure 22 du manuscrit et Figure 2 de l'article). ATR est une protéine impliquée dans de multiples processus cellulaires (réparation des dommages à l'ADN, régulation du cycle cellulaire, gestion du stress réplcatif). Les principales implications de cette protéine seront développées dans cette partie.

3-1-1 ATR, senseur de dommages à l'ADN

ATR fait partie avec ATM et DNA-PK de la famille des *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases* (PIKK). Ce sont des protéines majeures de la réparation de l'ADN, celles-ci permettent la détection des dommages à l'ADN et par ce biais le recrutement de protéines de réparation de l'ADN^{212,213}.

Dans les cellules humaines, Il existe six voies principales de réparation de l'ADN : le MMR (réparation de mésappariement), le BER (réparation par excision de base), le NER (réparation par excision de nucléotide), la recombinaison homologue (HR) ainsi que la réparation par recombinaison non homologue (NHEJ). Ces voies de réparation sont induites par différents types de dommages et font appel à des complexes protéiques spécifiques (figure 32). La réparation directe de la lésion constitue la sixième voie de réparation de l'ADN. Elle permet une réparation rapide de dommages à l'ADN très spécifiques (dimères de thymine, alkylation...) en faisant appel à un nombre réduit de protéines (Photolyase, Alkyltransférase ...) ²¹⁴.

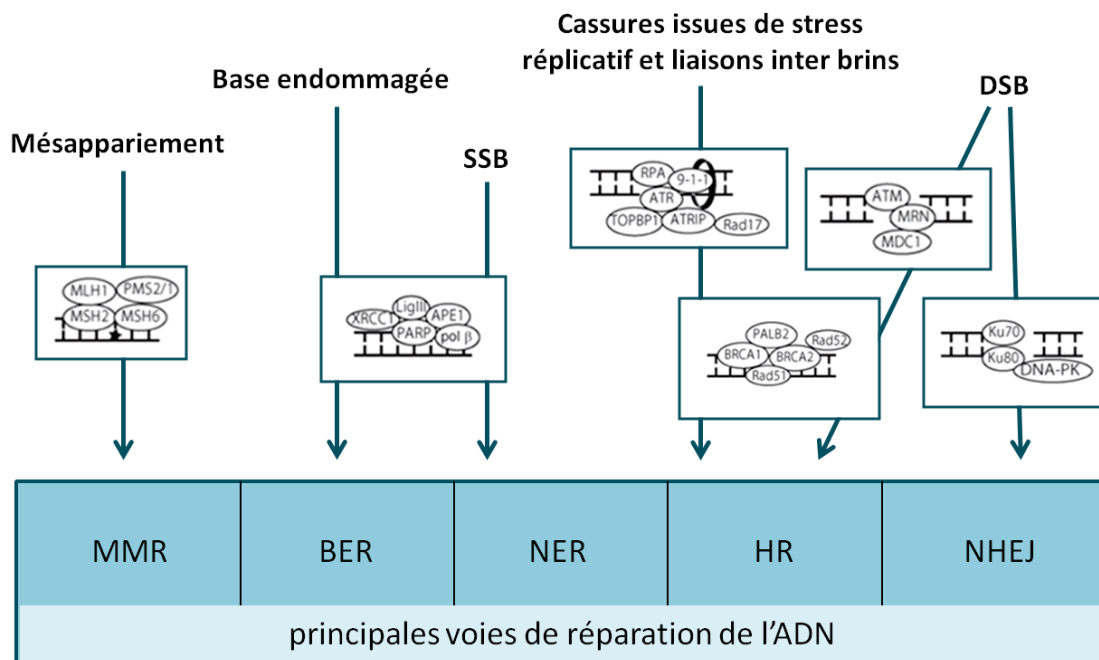


Figure 32: Dommages et complexes protéiques associés à cinq voies de réparation de l'ADN. SSB = cassures simple brin, DSB= cassures double brin. (adapté de Yoshimoto et al.²¹⁶)

Le MMR est sollicité par la présence de mésappariement entre deux bases de l'ADN et permet essentiellement de réparer les erreurs de réplication. Le BER intervient lorsqu'une base est endommagée, souvent à la suite de l'action d'espèces réactives de l'oxygène produites par des radiations ionisantes ou certains agents thérapeutiques. Le NER prend en charge de plus larges dommages tels que les distorsions de la double hélice d'ADN et les cassures simple brin de l'ADN, ce type de dommage peut se produire par exposition aux ultra-violet (UV), aux espèces réactives de l'oxygène, aux radiations ionisantes ainsi qu'à certains antinéoplasiques^{215,216}. Les sels de platine induisent des dommages qui peuvent être pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN du MMR et du NER. L'oxaliplatine produit des adduits essentiellement reconnus par le NER⁶⁷, ce qui explique que le niveau d'expression de la protéine ERCC1, impliquée dans le NER, est un indicateur de la réponse à ce sel de platine¹²⁶. Cependant, il a également été montré que la protéine XRCC1 (BER) pouvait jouer un rôle dans la résistance à l'oxaliplatine¹³². Les voies de réparation NHEJ et HR peuvent toutes deux être sollicitées à la suite de cassures double brin de l'ADN (DSB). La voie NHEJ permet une réparation rapide de la cassure sans ralentissement du cycle cellulaire par le biais de la protéine DNA-PK²¹². La recombinaison homologue s'effectue via les protéines ATM, BRCA et RAD51 qui peuvent réparer les dommages, ainsi

que réguler le cycle cellulaire par l'activation de « checkpoint ». La voie HR peut également réparer les cassures de l'ADN induites par un stress réplcatif (ex : collision ou arrêt de la fourche réplcative) ou des liaisons inter-brins par une voie ATR dépendante^{215,216}.

À l'état physiologique, dans le noyau de la cellule, ATR forme un complexe stable avec sa protéine partenaire ATRIP (*ATR interacting protein*). Le complexe ATR-ATRIP est recruté sur l'ADN uniquement lorsque celui-ci est recouvert par les protéines RPA qui reconnaissent spécifiquement l'ADN simple brin (ssDNA). Le ssDNA est généré au cours de la réplication et consécutivement au stress réplcatif ou à des dommages à l'ADN, cependant le complexe ATR-ATRIP n'est pas recruté durant la réplication. La fixation des protéines RPA au ssDNA s'effectuerait de façon transitoire et sur de courts segments de l'ADN lors de la réplication, alors que, après des dommages ou un blocage des fourches de réplication les protéines RPA formeraient une couverture plus large et persistante du ssDNA. C'est pourquoi, dans leur étude, Zou et Elledge émettent l'hypothèse que le recrutement d'ATR-ATRIP au niveau du ssDNA recouvert par les protéines RPA, intervient en fonction de la quantité, de la durée et de la stabilité de la fixation de la protéine RPA à l'ADN²¹⁷. La reconnaissance du RPA lié à de l'ADN simple brin par le complexe ATR-ATRIP peut aussi, dans une moindre mesure, intervenir dans d'autres voies de réparation de l'ADN que la voie HR, telles que les voies du NER et du BER^{218,219}. Afin d'assurer l'intégrité du génome, certaines voies de réparation de l'ADN sont donc interconnectées ou peuvent coopérer en fonction du nombre et de la complexité des lésions présentes sur l'ADN. C'est pourquoi, ATR peut également intervenir secondairement à l'action de la protéine ATM au niveau de cassures double brin réséquées^{213,219}.

3-1-2 Modulation du cycle cellulaire à la suite de dommages à l'ADN :

Voies de signalisation ATM et ATR dépendantes.

Les protéines ATR et ATM peuvent, outre leur intervention dans le recrutement de protéines de réparation de l'ADN, provoquer l'arrêt du cycle cellulaire afin de faciliter l'intervention des systèmes de réparation.

L'arrêt du cycle cellulaire s'effectue par l'activation de points de contrôle ou « *checkpoint* ». Il existe un point de contrôle à la transition G1/S, dans la phase S et lors de la transition G2/M. Chez l'homme, les kinases Chk1 et Chk2 (*checkpoint kinase 1 et 2*) sont activées par les protéines ATR et ATM respectivement et sont impliquées dans la régulation et l'arrêt du cycle cellulaire. Après l'activation de la voie ATR-Chk1 ou de la voie ATM-Chk2, les protéines effectrices Cdc25 sont rapidement phosphorylées provoquant leur export du noyau et inhibant ainsi leur activité promotrice du cycle cellulaire²²⁰. L'arrêt du cycle cellulaire est maintenu par stabilisation de la protéine p53 par le biais de sa phosphorylation au niveau de la serine 15 et 20 par la voie ATM-Chk2 ou ATR-Chk1. P53 peut ainsi activer ses gènes cibles dont p21 qui agit au niveau de la transition G1/S et maintient l'arrêt du cycle en inhibant principalement le complexe Cdk2-CyclineE (figure33)^{212,220}.

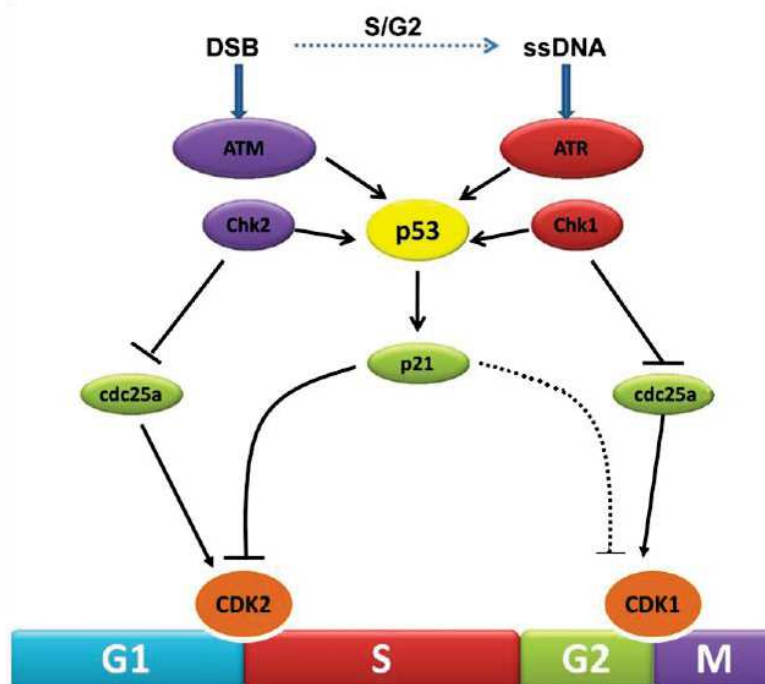


Figure 33: Régulation du cycle cellulaire par les voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1²¹²

Au delà de la régulation du cycle cellulaire, la voie ATR-Chk1 régule la stabilité des fourches de réplication et avec la voie ATM-Chk2 limite l'initiation de nouvelles fourches de réplication en cas de dommages à l'ADN ^{175,221}. Les voies ATR-Chk1 et ATM-Chk2 jouent également un rôle dans l'apoptose consécutive à la présence de cassures double brin, leur rôle a notamment été mis en évidence dans l'induction de l'apoptose dépendante de p53 ^{222,223}. Plus précisément, la protéine ATM est capable d'induire la phosphorylation de p53 au niveau de la ser46, induisant ainsi l'apoptose via les protéines pro apoptotiques PUMA et BAX ^{224,225}. Cependant, après un stress réplicatif, l'activation de la voie ATR-Chk1 aurait un rôle anti-apoptotique ²²⁶. En effet, en 2015, l'étude de Hilton et al. met en évidence l'existence d'une forme cytoplasmique de la protéine ATR non liée à la protéine ATRIP qui, au niveau mitochondrial, bloque le recrutement de BAX limitant ainsi l'apoptose ²²⁷. L'activation de la voie ATM-Chk2 favoriserait donc l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, alors que la voie ATR-Chk1 induirait un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'un blocage de l'apoptose au niveau mitochondrial en cas de stress réplicatif.

3-2 Article

Malgré les progrès réalisés dans la prise en charge du cancer colorectal, la résistance acquise aux traitements est une cause fréquente d'échec thérapeutique. Dans ce contexte, notre travail vise à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à l'oxaliplatine. Pour cela, nous avons utilisé une technique de criblage phénotypique sur la lignée clonale résistante à l'oxaliplatine HCT116-R1. Le but de ce criblage est d'identifier les kinases dont l'inhibition provoque une interaction létale avec l'oxaliplatine. Ce criblage a permis d'identifier ATR, protéine clef de la réparation de l'ADN, comme impliquée dans la résistance à ce traitement ; implication que nous avons validé en inhibant ATR par ARN interférence dans les cellules HCT116-R1, augmentant ainsi leur sensibilité à l'oxaliplatine. Par la suite, nous avons étudié *in vitro* l'effet de l'inhibition spécifique de la protéine ATR par le VE-822 combiné à l'oxaliplatine dans des lignées cellulaires résistantes à l'oxaliplatine (HCT116-R1, HCT116-R2, SW48-R), ainsi que différentes lignées cellulaires de cancer colorectal (HCT116, SW48, SW480, SW620, HT-29) en deux et trois dimensions. Le modèle cellulaire HCT116-R1 a plus particulièrement été étudié afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la synergie entre le VE-822 et l'oxaliplatine. Nous avons notamment exploré *in vitro* l'effet de cette combinaison de traitements sur l'apoptose, la prolifération, les voies de signalisation ATM-Chk2 et ATR-Chk1 ainsi que sur l'induction de dommages à l'ADN (ssDNA et DSB). *In vivo*, l'effet de la combinaison a été évalué par xénogreffe de cellules HCT116-R1 dans le modèle de souris nude. Dans une seconde partie, l'impact du double traitement sur la mort immunogène a été étudié *in vitro* par quantification de la translocation de la calréticuline (CRT), de la sécrétion d'ATP et du relargage de la protéine HMGB1 et *in vivo* par xénogreffe d'une lignée colorectale murine dans le modèle immunocompétent C57BL/6J. En dernier lieu, nous avons mis en évidence une signature moléculaire corrélant l'expression de certains gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN à la réponse à l'oxaliplatine.

Synthetic lethality screening reveals ATR as a determinant of oxaliplatin resistance by triggering tumor cell death and immune response in colorectal cancer cells

Combès Eve^{1,2,4}, Andrade AF^{1,2,4}, Tosi Diego^{1,2}, Michaud Henri-Alexandre^{1,2}, Coquel Flavie⁵, Garambois Veronique^{1,2}, Désigaud Delphine^{1,2}, Arnaud Coquelle^{1,2}, Pasero Philippe⁵, Bonnefoy Nathalie^{1,2}, Moreaux Jerome⁵, Martineau Pierre^{1,2}, Del Rio Maguy^{1,2}, Beijersbergen Roderick³, Vie Nadia^{1,2,4} and Gongora Céline^{1,2,4}.

¹Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Inserm U1194, Université Montpellier, CNRS, France; ²Institut régional du Cancer – Montpellier – Val d'Aurelle, Montpellier, France. ³Division of Molecular Carcinogenesis and NKI Robotics and Screening Center, The Netherlands Cancer Institute, Plesmanlaan 121, 1066 CX, Amsterdam, The Netherlands. ⁴ Authors contribute equally to this work.

Abstract

Despite the recent advances achieved in the treatment of colon cancer, tumour resistance is a frequent cause of chemotherapy failure. Our work was aimed to determine the molecular mechanisms involved in the resistance to oxaliplatin, an anticancer agent widely used in colorectal cancer treatment. To this end, we used a previously established oxaliplatin-resistant cellular model from the colon adenocarcinoma cell line HCT-116. Among cellular clones available, we used one displaying mild resistance (10 fold named HCT116-R1) to perform a short hairpin RNA-based loss of function genetic screen in order to identify genes that can modulate the cellular response to oxaliplatin by revealing genes the silencing of which causes drug sensitivity (synthetic lethal interactions with the drug). Using this screen, we have identified ATR (Ataxia-telangiectasia mutated and rad3 related), a serine/threonine protein kinase that plays a key role in DNA repair by mediating the response to replication stress induced by various DNA damaging agents. We validated ATR implication in oxaliplatin resistance by showing that (i) shRNA-mediated repression of ATR in HCT116-R1 oxaliplatin-resistant CRC cells sensitizes such cells to the drug; (ii) co-incubation of ATR inhibitor VE-822 (or VX-970) with oxaliplatin led to a dramatic synergistic effect in six different CRC cell lines (HCT116 its oxaliplatin-resistant clones: HCT116-R1, HCT116-R2, SW48 and its oxaliplatin-resistant clone SW48-R and SW480, SW620 and HT29) using 2D and 3D cell growth inhibition assays and *in vivo* model. The synergistic effect was evaluated using

dose matrix data (an algorithm implemented by our group); (iii) the synergistic effects of oxaliplatin and VE-822 was accompanied by an increase in ssDNA and DNA double-strand breaks levels, growth arrest and apoptosis induction. Besides, we observed an increasing of signals related to immunogenic death such as calreticulin exposure and ATP release. In conclusion, we demonstrate for the first time the functional role of ATR in the sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the fourth most common cancer worldwide. In 2012, the estimated CRC incidence was of 1.3 million cases worldwide and CRC caused more than 700 000 deaths (Ferlay, 2010). 30 % of patients present synchronous metastases and 50-60 % will develop metastases that will require chemotherapy. The current management is based on various drugs (5-FU/LV, capecitabine, irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab and panitumumab) either in combination or as single agents (Van Cutsem, 2010). Thanks to these treatments, the patients' overall survival has been significantly improved, but tumor resistance is still a frequent cause of therapy failure.

Among the drugs used in CRC treatment, oxaliplatin is a third-generation platinum compound with a 1,2-diaminocyclohexane (DACH) carrier ligand and is used in combination with 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFOX regimen). It causes inter- and intra-strand DNA cross-links that halt replication and transcription, leading to apoptotic cell death (ref). Oxaliplatin exert also its anti-tumour effect by inducing Immunogenic Cell Death (ICD) (Kroemer). This type of death stimulates host anti-tumour responses, so that the host immune system is primed to recognize and eliminate treated tumour cells. Resistance to oxaliplatin is through several factors such as reduced cellular uptake, impaired DNA adducts formation, alterations in DNA repair genes such as ERCC1 and XRCC1, defect in apoptosis and modifications in the levels of copper transporters (ATP7A and ATP7B) (Samimi 2005, Desolze 2002, Gourdier 2002, Safael 2006, Virag 2011).

To overcome drug resistance, one possible way is to treat patients with combination of drugs but it has been proved challenging to choose from thousands of potential drugs. Since

a decade it is now accepted that high-throughput functional genetic screens (using ShRNA or Crispr/CAS9) provide a powerful tool to identify not only mechanisms of drug resistance but also new targets for efficient drug combination. Our study proposed to identify some of the molecular alterations that occurred in oxaliplatin-resistant CRC cell lines by performing kinome specific ShRNA genetic screen. We have identified ATR as responsible for oxaliplatin resistance and showed that the combination of ATR inhibitor and oxaliplatin is synergistic both *in vitro* and *in vivo* models. Molecularly, we have showed that the combination not only induced DNA double strand breaks leading to apoptosis but also promoted the activation of anti-tumour immunity signaling.

Material and Methods

Cell Culture

The human colorectal cancer cell lines HCT116, SW48, SW480, SW620, HT29 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, USA) and the murine colorectal cancer cell line CT26 kindly provided by Dr Nathalie Bonnefoy grown in RPMI-1640 supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) and 2 mmol/L L-glutamine at 37°C under a humidified atmosphere with 5 % CO₂. The murine colorectal cancer cell line MC38 provided by Dr Nathalie Bonnefoy grown in DMEM supplemented with 10 % FCS and 1mM of sodium pyruvate at 37°C under a humidified atmosphere with 5 % CO₂. The Oxaliplatin-resistant clones (HCT116-R1, HCT116-R2, SW48-R) were obtained as previously described by Gourdier et al. (2002). Briefly, the reference oxaliplatin-sensitive HCT116 cell clone was exposed to 5-10µM oxaliplatin and cloned to obtain the resistant HCT116-R1 and HCT116-R2 clones. SW48-R clone was obtained the same way from the parental colorectal cancer SW48 cell line.

Drugs

VE-822 (ATR inhibitor) was kindly provided by Dr Arnaud Coquelle and diluted at a final dose of 50 mM in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma® Chemical Co., USA). Oxaliplatin was obtained from ICM at the dose of 5mg/ml and diluted in PBS at a final concentration of 12mM (Oxaliplatine ACCORD Cip : 3400957954642). Both stock drugs solutions were aliquoted and stored at -20°C. Poly-L-ornithine was purchased from Sigma and Formaldehyde reagent 16 %

to Electron microscopy sciences. Concerning the antibodies : anti-ATR #13934, anti-ATM #2873, anti p-ATM (Ser1981) #13050, anti CDK2 #2546, anti p-CDK2 #2561, anti Chk1 2360#, anti p-Chk1 (Ser345) #2341, anti Chk2 #2662, anti p-Chk2 (Thr68) #2661, anti-GAPDH #5174, anti-p21 Waf1/Cip1 #2947, anti p-p53 (Ser15) #9284 were obtained from cell signaling technology. Anti -p-ATR (Thr1989) GTX128145 comes from Genetex, anti β -Tubuline T4026 from Sigma, and anti-p53 (DO-1) sc-126 from Santa Cruz Biotechnology).

Cell cytotoxicity

Growth inhibition assay was performed using the sulforhodamine B (SRB) assay as described by Skehan et al. (1990). Briefly, cells were seeded in 96-well plates (500-1000 cells/well) in complete medium. After 24h, drugs were applied in a dilution series. After 96 hours incubation, cells were fixed by adding trichloroacetic acid solution to a final concentration of 10 % and stained with a 0.4 % sulforhodamine B solution in 1 % acetic acid (Sigma Chemical Co., USA). Fixed sulforhodamine B was dissolved in 10 mM Tris-HCl solution and absorbance at 560 nm was read using a Thermo Scientific Multiskan EX plate reader (USA). IC₅₀ was determined graphically from the cytotoxicity curves. Each experiment was performed at least 3 times.

Three-dimension (3D) spheroid assay

For spheroid generation, 100 μ l/well of cell suspensions at optimized densities (50-300 cells/well) was dispensed into ultra-low attachment 96-well round-bottomed plates (Corning B.V. Life Sciences, The Netherlands). Plates were incubated for 4 days at 37°C, 5 % CO₂, 95 % humidity. Depending on their sensitivity, the spheroids were treated with the drugs VE-822 (0.01 to 2.5 μ M) and oxaliplatin (0.09 -30 μ M) at day 4 and at day 10 after plating.

At day 14, the images were captured with the Celigo™ imaging cytometer using the "Tumorsphere" application. The Celigo™ cytometer is a benchtop *in situ* cellular analysis system that provides images of wells using bright-field illumination (Nexcelom Bioscience, MA, USA). Cell viability was measured using a CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay (Promega, USA) according to the manufacturer instructions. Briefly, spheroids were incubated with 100 μ L/well for 15 minutes with CellTiter Glo reagents at RT. After incubation, three-dimensional cultures were pipette mixed, aspirated with multichannel

pipettes and transferred into non sterile white flat bottom plates (greiner, Austria) for luminescence measurement on 1450 MicroBeta TriLux Luminescence microplate reader (Perkin Elmer). IC₅₀ was determined graphically from the cytotoxicity curves. Each experiment was performed at least 3 times.

Quantification of the interaction effect

The interaction between the drugs tested *in vitro* was investigated with a dose matrix test, in which increasing doses of each single drug were tested with all possible dose combinations of the other drugs. For each dose combination, the percentage of surviving cells expected in the case of additivity was calculated according to the Loewe equation ²²⁸:

$$\frac{d_A}{IC_{x,A}} + \frac{d_B}{IC_{x,B}} = 1$$

where d_A and d_B are the doses of the inhibitory drugs A and B, and $IC_{x,A}$ and $IC_{x,B}$ their isoeffective doses that result in an effect of x %. The percentage of expected surviving cells in the case of effect independence was calculated according to the Bliss equation ²²⁸:

$$fu_c = fu_A fu_B$$

where fu_c is the expected fraction of cells unaffected by the drug combination in the case of effect independence, and fu_A and fu_B are the fractions of cells unaffected by treatment A and B, respectively. The generalized form of the Bliss equation for a combination of n treatments:

$$fu_c = \prod_{i=1}^n fu_i$$

was used to analyse the interaction effect of the combination of three drugs. The difference between the fu_c value and the fraction of living cells in the cytotoxicity test was considered as an estimation of the interaction effect, with positive values indicating synergism and negative values antagonism. In addition to this point-by-point estimation, a synthetic index of interaction for the entire dose matrix (called combination index, CI) was calculated using the method proposed by Lehár ^{229–231}:

$$CI = \ln f_A \ln f_B \sum (Z_O - Z_E)$$

where f_A and f_B are the dilution factors used in the cytotoxicity assay for drugs A and B, respectively, and Z_O and Z_E are the matrices of the survival percentage for the experimental

data and for the corresponding Loewe additivity or Bliss independence data, respectively. CI is a positive-gated, effect-weighted volume over Loewe additivity or Bliss independence, adjusted for the variable dilution factors f_A and f_B .

EDU assay

The cell proliferation was measured by Click-iT[®] EdU (Invitrogen, USA) assay according to the manufacturer's protocol. Briefly, 2.5×10^5 and 4×10^5 for HCT116 and HCT-116/R1 cells, respectively, were plated in 25 cm² flask, and 24h later the cells were treated with oxaliplatin and/or VE-822 alone or combined. Twenty hours before collecting, cells were incubated with EDU. After 48h of treatment, cells were washed in ice cold PBS, fixed in 75 % ethanol and then incubated with Click-iT reaction cocktail for 30min. The cells were washed with PBS and then analyzed by flow cytometry.

Cell cycle and subG1

To determine the cell cycle distribution, cells were plated at 2.5×10^5 and 4×10^5 for HCT116 and HCT-116/R1 cells, respectively, in 25 cm² flask, and 24h later the cells were exposed to the treatment of oxaliplatin (5 μ M) and VE-822 (1 μ M) doses. After 48h of treatment, untreated and treated cells were washed in ice cold PBS, fixed in 75 % ethanol and labeled with 40 μ g/ml propidium iodide (Sigma) containing 100 μ g/ml RNase A (Sigma). Cell cycle distribution was then determined with a Gallios Cytometer (Beckman Coulter). Cell cycle populations were quantified using histogram analysis Kaluza software (Beckman Coulter).

Apoptosis assay

Cells were seeded in 25 cm² flask (2.5×10^5 and 4×10^5 for HCT116 and HCT-116/R1 cells, respectively). After a 24-hour rest, cells were treated for 48h with the drugs alone or combined doses. Untreated and treated cells were labeled using the fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled annexin V (Annexin V/7-AAD - Beckman Coulter, Inc., USA) co-labeled with 7-AAD to determine apoptotic cells. Analyses were performed on a Gallios Cytometer (Beckman Coulter). For apoptosis determination positive annexin V- and 7-ADD

cells were quantified using Kaluza software (Beckman Coulter) histogram analysis software.

Western Blot

Once treated the cells, , are washed (1 × PBS) and directly lysed in Laemmli Tp (4 % SDS, 20 % glycerol, 1 % 2-β mercaptoethanol, 0.004 % bromophenol blue, 0.125 M Tris HCL) + benzonase. After denaturation 5 min at 95 ° C, the protein extracts (10,000 cells / μl) are deposited and separated on SDS-PAGE polyacrylamide gels at 10, 12 % or on a 4-20 % gradient. They are then transferred to a nitrocellulose membrane with a transfer buffer containing 20 % ethanol for 1 hour in semi-dry transfer (gel 10 and 12 %) or for 2 hours in liquid transfer. The membrane is then blocked in a solution of PBS-Tween 0.1 % + 5 % milk for 1 hour at room temperature under agitation. It is then incubated with the primary antibody overnight at 4 ° C under gentle agitation. After three washes in 0.1 % PBS-Tween, the membrane is incubated for 1 hour in the presence of the anti-species secondary antibody of the primary antibody coupled to HRP (Horse Radish Peroxidase) diluted to 1/5000 in milk 5 % PBS-Tween 0.1 % under gentle agitation. After washing, the proteins of interest are revealed by chemiluminescence (Kit ECL revelblot plus, and ECL revelblot intense) and visualized by a G-Box (Syngene).

ssDNA and DNA breaks : RPA32, γH2AX and Dapi Staining

Black sided 96 well, flat bottomed plates (Greiner, austria) were coated with poly-L-ornithine and seeded with HCT-116 (4000 to 9000 cells/well) or HCT116-R1 (8000 to 16000 cells/well). Cells were treated 24h later with VE-822 (1 μM) and/or Oxaliplatin (12.5 or 50 μM) during 3, 6, 16 and 24h. Following treatments, medium was remove and non chromatin bound RPA was extracted with PBS-Triton 0.2 % during 1min30s on ice. After this, all the steps require delicacy to keep cells attached to the plate. Between each step cells are washed with PBS + BSA 1mg/ml. The cells are first fixed using PBS + PFA at 4 % during 30 min and permeabilized with PBS-Triton 0.2 % during 10 min at room temperature (RT). Following a saturation step (30 min with PBS + BSA 1 %) the two primary antibodies (anti-RPA32, Abcam, ab2175 and anti-γH2AX, cell signaling technology, #9718) diluted in PBS + BSA 1 mg/mL are added in each well during 1h at RT. Then, secondary antibodies are mixed (anti-mouse A448, Invitrogen, A11029 and anti-rabbit A568, Fisher scientific, A11011) diluted in PBS + BSA 1

mg/mL and added in each well during 45 min at RT. Following this step cells are kept away from light, and exposed to Dapi at 1 µg/mL during 30 min at 37°C. After this final step cells are washed a last time and put in PBS. Détection of A488, A568 and dapi was done in a cytometer imaging system (Celigo) for each well.

Calreticulin (CRT) exposure

About $1.5\text{--}2 \times 10^5$ cells were plated in 6-well plates, the medium was changed 24 h later and treatment was added for 48 h (oxaliplatin (25µM) and/or VE-822 (1µM)). Cells were collected, washed with cold PBS-10 % FBS and stained with 7-Amino-Actinomycin D (7 AAD) (Beckman Coulter) for 30 min. After washing with PBS-10 % FBS, cells were fixed with 0.25 % paraformaldehyde for 5 min. After washing, cells were incubated for 1 h with CRT-Alexa647 antibody (ab196159) followed by washing. Cells were fixed with 1 % paraformaldehyde for 5 min. The samples were then analysed by Gallios Cytometer (Beckman Coulter) to identify CRT exposure. Fluorescent intensity of CRT positive stained cells was gated on 7'AAD-negative cells.

Detection of ATP and HMGB1 release

Detection of ATP and HMGB1 release were analyzed after 24 and 48h treatment with oxaliplatin [12.5-100µM] and/or VE-822 [1µM] where the supernatant was collected after incubation time and centrifuged to remove remaining dying cells. For ATP measurement it was used the luminescence assay ATPlite (PerkinElmer) according to manufacturer's instructions. Quantification of HMGB1 was assessed by ELISA assay according to the manufacturer's instructions (IBL International).

In vivo studies

Xenografts: Six eight-week-old female athymic *nu/nu* and C57/Bl6 mice (Charles River Laboratories, France) were injected subcutaneously (s.c.) with HCT116/R1 or MC38 tumor cells (2×10^6 and 5×10^5 , respectively) subcutaneously into the left flank of each mouse. Tumors were detected by palpation and measured with calipers weekly. Mice were euthanized when the tumor volume reached 1500 mm³. Ethical approvals were obtained according to local ethics committee (Ethics Committee approved by the French Ministry,

animal facility approval C34-172-27, personal approval (Céline Gongora) 34.142 and protocol approval CEEA-LR- X).

Oxaliplatin and VE-822 treatment: When tumors reached the volume of 100 mm³, mice were treated with: i) 0.2 ml of 0.9 % sodium chloride solution intraperitoneal (i.p.) + D- α -Tocopherol polyethylene glycol succinate (TPGS) (gavage) (control group) twice per week for four weeks; ii) 5 mg/kg oxaliplatin by i.p. injection once per week for four weeks (Oxaliplatin group); iii) 30 mg/kg VE-822 (diluted in TPGS) (for HCT116-R1) or 20 mg/kg VE-822 (for MC38) by gavage two times per week for four weeks (VE-822 group); or iv) 5 mg/kg oxaliplatin once per week + 30 mg/kg VE-822 (HCT116-R1) or 20 mg/kg VE-822 (MC38) two times per week (oxaliplatin + VE-822 group).

Statistical analysis: A linear mixed-regression model, containing both fixed and random effects, was used to determine the relationship between tumor growth and number of days after grafting. BLI data were first transformed using the natural log scale to better fit the assumptions of the linear mixed model. The fixed part of the model included variables corresponding to the number of post-graft days and the different treatments. Interaction terms were built into the model; random intercepts and random slopes were included to take time into account. The coefficients of the model were estimated by maximum likelihood and considered significant at the 0.05 level. Statistical analysis was performed using the STATA 10.0 software (StataCorp).

Gene expression profiling and statistical analyses and Building of DNA repair risk score

To analyse ATR gene expression we used data set GSE62322 from the prospective single-center study REGP [Del Rio et al., 2007; Del Rio et al., 2012]. These data set contains gene expression profiles of 17 normal mucosa, 20 primary tumor and 19 hepatic metastases tissue samples from patients with mCRC.

To build a DNA repair risk score, we used gene expression data originating from two cohorts. The Tsuji dataset (GSE28702) comprising 80 stage IV CRCs treated with FOLFOX regimen (Tsuji et al., 2012); Dr. Shingo Tsuji kindly provided the OS data for this series. The Del Rio dataset (GSE72970) including 36 stage IV CRCs, treated with FOLFOX regimen and their clinical data (Del Rio et al., 2017).

Gene expression data were normalized with the MAS5 algorithm and analyses processed with GenomicScape (<http://www.genomicscape.com>)¹ the R.2.10.1 and bioconductor version 2.5 programs.

A consensus list of genes coding for the proteins involved in DNA repair pathways have been obtained using REPAIRtoire database (<http://repairtoire.genesilico.pl>)² and by review of Medline (supplementary table S1). The DNA repair risk score (termed DNA repair score) was built using our previously published methodologies to develop prognostic scores using set of prognostic genes coding for related proteins³⁻⁶. DNA repair score is the sum of the Cox beta coefficients of each of the 12 DNA repair genes with a prognostic value, weighted by ± 1 if the patient tumor cell signal for a given gene is above or below the probeset maxstat value of this gene^{5,6}.

Results

Functional genetic screen reveal ATR as responsible for oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells

We addressed the sensitivity of numerous colorectal cancer cell to oxaliplatin growth in 2D (Fig 1A) and 3D (Fig 1B), respectively. We have tested five colorectal cancer cell lines (HCT116, SW48, SW480, SW620 and HT29) and three oxaliplatin-resistant (HCT116-R1, HCT116-R2 and SW48-R) established by long-term growth with Oxaliplatin doses (Gourdier, 2002). The cell lines used display different molecular characteristics in terms of MSI/MSS

status, origin, and mutations on *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* and *TP53* genes (Fig 1C1). As expected, the three oxaliplatin-resistant cell lines displayed the highest IC50 values for both 2D and 3D assays (Fig. 1).

To identify synthetic lethal interactions with oxaliplatin, we performed a loss-of-function genetic screen focused on kinome genes in oxaliplatin resistant cells. We used a shRNA library representing 518 human kinases and searched for genes whose inhibition confers sensitivity to oxaliplatin in oxaliplatin resistant HCT116-R1 cells (Prahallad, 2012). HCT116-R1 cells were infected with the lentiviral kinome ShRNA library and cultured in absence or in presence of 3 μ M of oxaliplatin (oxaliplatin dose required to kill all the sensitive HCT116 cells but inefficient for the HCT116-R1 cells (Fig 2A)) for 10 days. Then, shRNAs were recovered by PCR and relative abundance was determined by barcode identifiers present in each shRNA vector using next-generation sequencing. We considered shRNA vectors that were significantly depleted in oxaliplatin-treated cells by at least 50 % by the drug treatment, and genes represented by multiple shRNA matching this criteria were selected. Figure 2B shows that only few of the 1798 hairpins in the library met this criteria, among which three (out of four) were independent shRNA vectors targeting *ATR*. To validate this finding, we infected HCT116-R1 cells with *ATR* shRNA vector (Fig 2C) and we observed that suppression of *ATR* expression sensitize the HCT116-R1 cells to oxaliplatin (Fig 2D and suppl. Fig 1). Moreover, when comparing the IC50 values of *ATR* knocked-down cell HCT116-R1 and HCT-116 cell line we observe that the *ATR* depleted resistant cells become as sensitive to oxaliplatin as the HCT116 cell line (Fig 2E). This result suggests that *ATR* inhibition is sufficient to overcome oxaliplatin resistance, at least in HCT116-R1 clone.

We then tested if *ATR* or its target protein, *CHK1*, are constitutively activated in HCT116-R1 cells compared to the sensitive HCT116 cell line. Western blot analysis showed that neither *ATR* nor *CHK1* are activated in non-treated HCT116-R1 cells (Fig 1F). Additionally, we tested the *ATR* expression in a transcriptome dataset from patients with mCRC (Fig 1C), and compared normal tissue (n:17), primary colon tumour (n:20) and hepatic metastases (n:19). *ATR* expression was significantly higher in primary tumours and hepatic metastases, indicating that this gene is aberrantly expressed in tumour samples and might be a potential target.

The combination of ATR inhibitor (VE-822) and oxaliplatin is synergistic in colorectal cancer cells

At present two ATR inhibitors are clinically available, VX-970 (Merck) and AZD-6738 (Astra-Zeneca), with VX-970 more advanced in terms of clinical development. We then used the VX-970 (labelled VE-822 for *in vitro* experiments) to test the combination of oxaliplatin and this ATR inhibitor. The interaction of oxaliplatin and VE-822 was evaluated using a full-range dose matrix approach and SRB cytotoxicity tests. The combination was analyzed in HCT116-R1 cells (Fig. 3A) in 2D and 3D and also in seven other CRC cell lines (supplementary Fig. 3). Results are presented as the percentage of cell survival (blue matrix) and values of the additive, synergistic and antagonistic effects (black, red and green matrices, respectively). A synergistic interaction of oxaliplatin+VE-822 combination was observed in all the cell lines tested, with the highest values in HCT116-R1, HCT116-R2 and SW48-R, indicating that combination of ATRi with oxaliplatin can efficiently overcome oxaliplatin resistance. The distribution of the interaction effects was not always homogeneous over the dose matrices. For instance, focal areas with higher synergy were often located in dose regions corresponding to high doses of VE-822.

Next, we investigated whether ATR inhibition could affect oxaliplatin cytotoxic activity in mice injected s.c. with HCT116-R1 cells. Xenografted mice were divided into four groups: non-treated group, one treated with oxaliplatin alone, one with VE-822 alone, and the last group was treated with oxaliplatin and VE-822 (Figure 3B). Oxaliplatin and VE-822 alone had no effect on tumor growth compared to non-treated group. The combination of oxaliplatin and VE-822 was the most effective treatment ($p=0.018$). This result confirms the previous observation obtained *in vitro* and provides evidence that inhibition of ATR can enhance the therapeutic effect of oxaliplatin on drug resistant cells *in vivo*.

ATRi + oxaliplatin induces apoptosis, reduce cell proliferation and activates ATM/CHK2 pathway

We then investigated whether ATRi (VE-822) + oxaliplatin synergistic effect involves increase of cell death and/or inhibition of cell proliferation. Firstly, cell cycle analysis showed that while each treatment alone display only a minor effect, the association of VE-822 with

oxaliplatin induce a reduction of cells in the S-phase of the cell cycle and an increase of cells in the sub-G1 phase, representative of late apoptosis (Fig 4A).

Secondly, we assessed apoptosis by identification of Annexin-V positive cells (Figure 4B) (representative of early apoptosis). The results indicated that apoptosis induction in HCT116-R1 cells by each drugs alone was low and non-significant (compared to non-treated cells), but it was strongly induced by the combination of oxaliplatin + VE-822 (compared to non-treated and drugs alone). These experiments demonstrate that oxaliplatin + VE-822 induces apoptosis in oxaliplatin resistant cells, HCT116-R1, in a synergistic manner, as it had been observed for the cytotoxic assays in the matrix approach.

Next, we further tested the effect of oxaliplatin and VE-822 on cell proliferation using EdU assay. Oxaliplatin and VE-822 alone had no effect on cell proliferation, but the association of both drugs inhibited cell proliferation as indicated by the reduction of EdU-positive HCT116-R1 cells (from 75 % in untreated cells to 18 % in oxaliplatin + VE-822-treated cells; $p=0,0094$) (Figure 4C). These results demonstrate that ATR inhibition synergize with oxaliplatin to induce cell proliferation arrest.

We then performed immunoblot analysis of proteins belonging to ATR and ATM signaling pathways in HCT116-R1 (Fig 4D) and HCT116 (Supplemental Fig 2) after treatment with oxaliplatin and VE-822 alone or associated. In both cell lines, we observed that oxaliplatin activated phosphorylation of ATR and CHK1. The addition of VE-822 inhibited these enhanced phosphorylations, indicating that VE-822 is an efficient ATR inhibitor. Moreover, we observed oxaliplatin did not induced phosphorylation of ATM and CHK2, but VE-822 indeed induced CHK2 phosphorylation. The combination of Oxaliplatin + VE-822 induced an important increase of ATM and CHK2 phosphorylation, indicating that the inhibition of the ATR signaling pathway, in presence of oxaliplatin, induces also another DNA repair pathway, the ATM pathway. Finally, we could observe that p53 and p21 levels and p53 phosphorylation are increased by the drug combination, and CDK2 phosphorylation (a target of ATR pathway) is decreased.

Altogether, these results demonstrated that the association of oxaliplatin and the ATR inhibitor VE-822 has a cytotoxic and cytostatic effect on colorectal cancer cell lines, and this association, while inhibiting the ATR pathway activates the ATM one.

ATR inhibition + oxaliplatin induces high replication stress, leading to DNA breaks

It is well known that ATR plays an essential role in the cellular response to replication stress (RS), and one of the features of RS is the accumulation of ssDNA. Since the persisting ssDNA is coated with RPA, we analyzed RPA positive cells in untreated or VE-822 combined with oxaliplatin treated cells, and the extent of DNA damage by staining gH2AX (Fig 5A). When analyzing single labeling of RPA (Fig 5B), VE-822 induced a subtle increase of ssDNA, while oxaliplatin induced a greater increase. Interestingly, the VE-822 and oxaliplatin combination is more potent in inducing ssDNA than both drugs alone. Similarly, when analyzing gH2AX, we observed that DNA breaks was neither induced by VE-822 alone nor by oxaliplatin alone but the drug combination was highly potent to induce DNA breaks, indicating that the VE-822 and oxaliplatin association is synergistic to induce DNA damage (Fig 5B).

We then discriminate between cells showing RPA labelling alone (ssDNA), gH2AX alone (DNA damage), or both (Fig 5C) as a function of time. We could observe that oxaliplatin alone induced only a slight increase in RPA staining, but no gH2AX and no double labelling (RPA and gH2AX). On the other hand, in the presence of the drug combination, the cells with RPA labelling gradually became gH2AX/RPA positive, indicating replication catastrophe driven by excessive ssDNA accumulation (Toledo, Cell 2013).

ATRi + oxaliplatin induced anti-tumour immune signaling

It has been shown in 2010 that oxaliplatin induces immunogenic cell death of colorectal cancer cells (Tesniere, Oncogene, 2010). We then asked whether the addition of ATR inhibitor will enhance or inhibit this effect, and to do so we used syngenic graft of tumor cells. Before grafting, we tested in two murine cell lines the efficacy of the drug combination. We then performed the full-range dose matrix approach and SRB cytotoxicity tests using four oxaliplatin doses and five VE-822 doses, in CT-26 and MC-38 murine cells (Fig. 6A) in 2D and 3D. Results are presented as in the figure 3A. A strong synergistic interaction with the oxaliplatin+VE-822 combinations was observed for both cell lines, with the highest values in 3D compared to 2D, indicating that the combination is highly synergistic in murine cells as well.

We then monitored *in vitro* the ICD-associated processes such as calreticulin (CRT) exposure, ATP secretion and HMGB1 release (Kepp, 2014, oncoimmunol, consensus Guidelines) in murine MC38 cells and the oxaliplatin-resistant human HCT116-R1 (Fig 6). Translocation of CRT to the outer leaflet of the plasma membrane has been evaluated by flow cytometry on live cells (Fig 6B). In HCT116 and HCT116-R1, VE-822 does not increase the CRT exposure, but oxaliplatin and drug combination do so. In the murine MC38 cells, VE-822 or oxaliplatin alone induced a higher increase in CRT translocation, and the induction by the drug combination was synergistic. ATP secretion has been addressed by luminescent assay. We could observe that not only VE-822 and oxaliplatin alone induced ATP release in HCT116-R1 and MC-38 cells (Figure 6C), but also VE-822 and oxaliplatin association induced it but in a stronger manner, especially for MC-38 cells. We then tested the HMGB1 release in both cell lines. We could observe that only the drug association induced significant HMGB1 increase in MC38 cells (Figure 6D). All these results indicate that oxaliplatin is a *bona fide* ICD inducer, as it has been already published in other cell lines, but also that its association with the ATR inhibitor VE-822 increases significantly these characteristics, indicating that the drug association might increase the immunogenic cell death *in vivo*.

To confirm this hypothesis, we performed an *in vivo* experiment in immunocompetent mice grafted with MC-38 (Fig 6E). When tumors reached 100mm³, grafted mice were divided in four groups: one group was left untreated, one was treated with oxaliplatin alone, one with VE-822 alone and the last group with oxaliplatin and VE-822. As in the nude mice, VE-822 had no effect in tumor growth compared to the untreated mice. Oxaliplatin inhibited tumor growth, contrary to the previous experience on nude mice, confirming the role of ICD on oxaliplatin mode of action. The combination of oxaliplatin and VE-822 was statistically more effective than oxaliplatin alone (p=) or VE-822 alone (p=) and this anti-tumor growth effect of the combination was higher than in the nude mice, confirming the induction of ICD with the oxaliplatin+ VE-822 treatment. This result provides evidence that inhibition of ATR can not only reverse resistance to oxaliplatin *in vivo*, but also activates the ICD.

Identification of prognostic genes whose expression is regulated by oxaliplatin treatment in two independent cohorts of patients

As we found that an inhibitor (ATR inhibitor) that impacts the DNA repair is highly potent and most importantly is synergistic with oxaliplatin in colorectal cancer cells we asked whether we could identify deregulated DNA repair genes that can be associated with overall survival and response to oxaliplatin-based treatment in CRC patients. Microarray gene expression data from primary tumor before treatment (FOLFOX) from two independent cohorts of patients with colorectal cancer were used. One cohort with 80 patients (Tsuji cohort), and the other with 36 patients (DelRio cohort), treated with FOLFOX with response to treatment included. A list set of 176 genes involved in the six major DNA repair pathways [base excision repair (BER), NER, mismatch repair (MMR), homologous recombination repair (HRR), nonhomologous end joining (NHEJ) and FANC pathways] was defined using the REPAIRtoire database (<http://repairtoire.genesilico.pl>) and review of the literature (Bret et al., 2014, BJH). The Maxstat R function and Benjamini Hochberg multiple testing correction showed that 12 out of the 176 genes have a prognostic value (5 genes with poor and 7 with good prognostic values) (Figure 7-Table A). We obtained a DNA-repair gene signature, where the gene-expression profile-based risk score was created. Bad prognostic genes are highly expressed in patients with high DNA-repair score and the reverse for good prognostic genes. For each cohort, patients were ranked according to DNA-repair score.

Using Maxstat R function, a maximum difference in OS was obtained with a DNA-repair Score = -4.2464 splitting patients into a low survival-risk group of 67.5 % patients (DNA-repair score <4.2464) with a 12 months median OS and a high survival-risk group of 32.5 % patients (DNA-repair Score >4.2464) with not reached median survival ($p=6.58 \cdot 10^{-5}$). High-risk patients are characterized by a higher expression of the 5 bad prognostic genes and a lower expression of the 7 good ones used for DNA-repair Score building. The DNA-repair Score, computed using Tsuji's cohort parameters, is also prognostic in an independent cohort of 36 patients from Del Rio (Del Rio cohort) (figure 7B-C). The median OS of patients with high DNA-repair Score was 17 months and not reached for patients with low DNA-repair Score ($p=0.00181$). Finally, Del Rio's cohort also includes FOLFOX treatment response data after the first course according to the WHO criteria. We could observed, by using the same DNA-repair score (-4.2464) a significant difference in Progression Free Survival (PFS) ($p=0.0189$)

with a low survival-risk group with a 8 months median PFS and a high survival-risk group with a 21 median PFS.

Discussion

Resistance to oxaliplatin is an important problem in CRC. This study was aimed to identify a new therapeutic target to overcome oxaliplatin resistance in colorectal cancer. To identify such gene we performed a “chemical synthetic lethality screening” also called “drop out screen”. Indeed we found ATR, whose inhibition synergizes with oxaliplatin to induce cancer cells death. The combination of oxaliplatin with an ATR inhibitor is cytotoxic and cytostatic as it induces cell death and inhibits cell proliferation, phenomenon activated by high replication stress, DNA damages and activation of the ATM pathway. This cell autonomous effect of the drug combination is accompanied by induction of immune cell death. We have also identified a gene expression-based DNA-repair score, which is prognostic for CRC patient’s survival and predictive to oxaliplatin treatment.

Clinical efficacy of oxaliplatin has been largely demonstrated, and its mechanism of action is well known as well. As all the platinum derivatives, its primary target is DNA, where oxaliplatin can form intrastrand and inter-strand cross-links. The repair of these lesions is mostly occurring through nucleotide excision repair (NER), and this process involved ERCC1, 2, 3, 4, 5. An association between ERCC1 expression and response to platinum derivatives has been widely demonstrated, especially in advanced non-small cell lung cancer, bladder cancer, head-and-neck cancer and esophagus cancer in response to cisplatin and in colorectal cancer in response to oxaliplatin. Our predictive DNA-repair signature confirm the importance of ERCC1 in oxaliplatin resistance, and identify four others NER proteins involved in such resistance, which are GTF2H3, HMGN1, RPA2 and GTF2H2, confirming the impact of NER pathway in the repair of oxaliplatin-induced lesions. Even more interesting is the fact of having identified the implications the homologous recombination (HR) pathway in response to oxaliplatin. Indeed, 50 % of the genes in the DNA-repair signature belongs to the HR pathway (SCARP, XRCC2, DMC1, BARD1, C19orf40 and RPA2) which might be surprising at first glance, but which is very consistent with our discovery: ATR, the major protein of the HR pathway, is implicated in resistance to oxaliplatin. Thus, the DNA-repair signature could become a biomarker of oxaliplatin response in colorectal cancer patients and will permit to identify patients who will need the more the combination and who will need the more a new

treatment. Molecularly, we found for the first time that oxaliplatin can induce replicative stress and the ATR/CHK1 pathway. Oxaliplatin by itself induces ssDNA and its combination with the ATRi (VE-822) induce DNA damage and cell death.

Acquired resistance to oxaliplatin has limited the success of this colorectal cancer treatment. Loss of function genetic screen led us to identify the kinase ATR responsible, at least in part, of this resistance and to discover a highly potent drug combination therapy. Such screen has already identified ATR, CHK1 and WEE1 as involved in sensitivity to cisplatin in triple negative breast cancer (Zheng et al., 2017). Moreover, ATR inhibition has already been shown to exhibit synergy with chemotherapy, radiotherapy and PARP inhibitors, in ovarian cancer in combination with cisplatin and gemcitabine, in pancreatic cancer with gemcitabine, in breast cancer with camptothecin, and with cisplatin, oxaliplatin, gemcitabine, etoposide and SN38 in lung cancer. But none of these studies have shown that the combination of ATRi with chemotherapy or radiotherapy was able to overcome drug resistance. Moreover, concerning the role of ATR in sensitivity to oxaliplatin is somehow controversial, since at least two studies have shown the opposite effect. First, Lewis et al. have shown in 2009 that ATR contributes to survival after cisplatin but not oxaliplatin in fibroblast and osteosarcoma cell lines (Lewis, 2009, MCT) and Hall et al., demonstrated in 35 lung cancer cell lines that ATR inhibition sensitize cells to five DNA damaging drugs (cisplatin, oxaliplatin, gemcitabine, etoposide and SN38). While the combination of cisplatin or etoposide with the ATR inhibitor VX-970 are always synergistic, the combination with oxaliplatin is synergistic in only in 60 % of the cell lines tested and is antagonistic in the other 40 % (Hall et al., Oncotarget, 2014). These results indicates that the synergistic effect of oxaliplatin with ATR inhibitor depends on the cell line. Our results on colorectal cancer cell lines, where all the cell lines tested were sensitive to the combination of oxaliplatin and ATR inhibitor, even the drug resistant cells, reveal that CRC is specific to the synergistic interaction of oxaliplatin and ATR inhibition.

Finally, it has been recently shown that the antitumor activity of oxaliplatin is due, at least in part, to the activation of immune cell death (Tesniere et al., Oncogene, 2010). Tumor cells treated with oxaliplatin can produce adenosine-5'-triphosphate (ATP), release in the tumour microenvironment the DNA-binding protein HMGB1 and expose to the outer part of the plasma membrane the chaperone protein calreticuline. These three signals stimulates host antitumor immune responses to recognize and eliminate treated cells. Our results show that

in all cell lines tested oxaliplatin is able to induce the three signals, as expected, but above all, we demonstrate for the first time that the ATR inhibitor by itself can induce the three signals in some cell lines, and can enhance these signals when combined with oxaliplatin. This *in vitro* result is confirmed in the experiments on immunocompetent mice, where we have shown that the combination of oxaliplatin + VE-822 induce tumour graft inhibition and activate T cell compartment.

Altogether, our data indicate undoubtedly that the association of ATR inhibitor with oxaliplatin is highly efficient in colorectal cancer, even in drug resistant cells. Thereby, the result of our synthetic lethality screen will provide rational mechanistic basis for oxaliplatin+ ATRi clinical trial.

Acknowledgments

We thank the Montpellier RIO Imaging facility for flow cytometry and Celigo experiments, in particular Nadia Vié. We thank the IRCM animal facility. This work was supported by INSERM and ICM Val D'Aurelle, SIRIC and Cancéropole GSO. Eve Combes had a PhD studentship from the Labex Mablmpove. Augusto Faria Andrade was supported by São Paulo Research Foundation (14/06947-2) and Fondation de France (post-doctoral fellowship).

Figure legends

Figure 1 - Oxaliplatin IC50 values for colorectal cancer cells. Colorectal cell lines HCT116 and its resistant clones (HCT116-R1 and HCT116-R2), SW48 and its resistant clone (SW48-R), SW480, SW620 and HT29 were treated with increasing doses of oxaliplatin (0-30 μ M). The IC50 values were obtained using sulforhodamine b assay (SRB) (A) and 3D sphere formation (B). Error bars represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. C) molecular characteristics of colorectal cancer cell lines used in this study.

Figure 2 - Identification and validation of ATR gene using the synthetic lethality assay in oxaliplatin resistant colon cancer cells. A) schematic workflow of the “dropout” shRNA screen for genes whose inhibition was selectively lethal in oxaliplatin resistant colon cancer cell line. One oxaliplatin resistant clone HCT116-R1 was infected with the Kinome library shRNA library polyclonal virus and screened for shRNAs that cause lethality after oxaliplatin

treatment. B) ATR shRNAs were significantly depleted in HCT116-R1 treated cells. C) Differential gene expression of ATR in samples from patient with mCRC (NM-normal mucosa, PT-primary tumor, HM-hepatic metastasis). D) ATR pathway profile in HCT116 and the resistant clone HCT116-R1. ATR, p-ATR, Chk1 and p- Chk1 proteins were measured by western blot. Tubulin levels were used as loading control. ATR is synthetically lethal with oxaliplatin resistance phenotype in colorectal cell. HCT116-R1 were stably infected with a shRNA targeting ATR. E) The level of knockdown of ATR protein was measured by western blot. The shLuc vector was used as a control. ATR knocked-down cells were treated with increasing doses of oxaliplatin and viability was assessed by SRB (F) and IC50 values obtained (G). H) 3D sphere formation with ATP measurement was also performed.

Figure 3 - ATR inhibition combined with oxaliplatin treatment alters HCT116-R1 viability *in vitro* and *in vivo*. A) HCT116-R1 cells were treated with increasing doses of oxaliplatin and VE-822 and viability was assessed by SRB for 2D experiment and with ATP measurement for 3D experiment to obtain viability matrix. Synergy Matrix were calculated as described in material and methods. B) Effect of the ATR inhibitor combined with oxaliplatin on HCT116-R1 cells xenografts in nude mice. Mice received oxaliplatin or VE-822 alone (orange and green line), both treatment (red line) or were treated with vehicle (blue line).

Figure 4 - ATR inhibition combined with oxaliplatin treatment alters cell cycle distribution and induces cell death. Cells were treated for 48h either with agents alone (oxaliplatin [5 μ M] and VE-822 [1 μ M]) and/or combined, and then analyzed cell cycle distribution (A) using propidium iodide staining method, the number of annexin-V (B) and EdU-positive cells (C) by flow cytometry ($p=0.05$). Bars represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. $p<0.05$, *compared to control; # compared to the combination. (D) Quantification of ATM-Chk2 and ATR-Chk1 signaling pathway protein expression in HCT116-R1 by western blot.

Figure 5 - ATR inhibition combined with oxaliplatin induces high replication stress, and DNA breaks Illustration of the used method to determine the RPA, γ H2AX and RPA + γ H2AX parameters for (C), total RPA and total γ H2AX for (B); Example of labeling for the combination VE-822 [1 μ M] + oxaliplatin [50 μ M] in the HCT116-R1 cell line. (B) Analysis of

total RPA and total γ H2AX after 16h of treatment. Bars represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. $p < 0.05$, *compared to control; # compared to the combination. (C) Separated analysis of the of RPA, γ H2AX and RPA + γ H2AX labeling as a function of time after oxaliplatin [50 μ M] or VE-822 [1 μ M] + oxaliplatin [50 μ M] treatment.

Figure 6 - Oxaliplatin combined with ATR inhibitor VE-822 induces immune death signaling.

A) MC-38 and CT26 cells were treated with increasing doses of oxaliplatin and VE-822 in 2D and 3D to obtain viability and synergy matrix as described in figure 3. B) Calreticulin (CRT) exposure on the cell surface of MC38 and HCT116/R1 cells was assessed after 48 h with oxaliplatin (25 μ M) and/or VE-822 (1 μ M) treatment, or without treatment (control) by flow cytometric analysis. (C,D) Detection of ATP and HMGB1 release. ATP and HMGB1 release in the supernatants was assessed by luminescence and ELISA assays, respectively. MC38 and HCT116/R1 cells were treated with oxaliplatin (12.5 or 100 μ M) and/or VE-822 (1 μ M) for 24 and/or 48 h. Bars represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments. E) Effect of VE-822 combined with oxaliplatin on MC-38 cells xenografts in C57BL/6J mice model. Curves of tumoral progression for each mice (9 or 10) per treatment condition. Mice received oxaliplatin [5mg/kg] or VE-822 alone [20mg/kg] (orange and green line), both treatment (red line) or were treated with vehicle (blue line) as described in material and methods.

Figure 7 - Identification of prognostic genes whose expression is regulated by oxaliplatin treatment in two independent cohorts of patients. (A) DNA-repair gene signature obtained after The Maxstat R function and Benjamini Hochberg multiple testing correction, there is 5 genes with poor (orange background) and 7 with good prognostic values. (B-C) High DNA-repair score in primary colorectal cancer tumor could predict for shorter overall (OS) and progression free survival (PFS). Patients of the Tsuji's cohort (N=80) and Del Rio's cohort (N=36) were ranked according to increasing DNA-repair score and a maximum difference in OS and PFS was obtained using the Maxstat R function.

Supplementary figure 1 - suppression of ATR expression sensitizes the HCT116-R1 cells to oxaliplatin. (A) Pictures of cytotoxic assay in 2D culture after exposure of HCT116-R1 cells (mock, transduced with shLuc or shATR virus) to increasing doses of oxaliplatin evaluated by revelation of living cells with crystal violet. (B) End point pictures of cytotoxic assay in 3D

culture after exposure of HCT116-R1 cells (mock, transduced with shLuc or shATR virus) to increasing doses of oxaliplatin.

Supplementary figure 2 - Effect of ATR inhibition combined with oxaliplatin treatment in a panel of colorectal cell lines. Colorectal cell lines HCT116 and its resistant clones (HCT116-R1 and HCT116-R2), SW48 and its resistant clone (SW48-R), SW480, SW620 and HT29 were treated with increasing doses of oxaliplatin and VE-822 in 2D and 3D to obtain viability and synergy matrix as described in figure 3.

Supplementary figure 3 - Effect of ATR inhibition combined with oxaliplatin treatment on ATR and ATM pathways. Quantification of ATM-Chk2 and ATR-Chk1 signaling pathways proteins by western blot analysis in HCT116 cells.

Figure 1

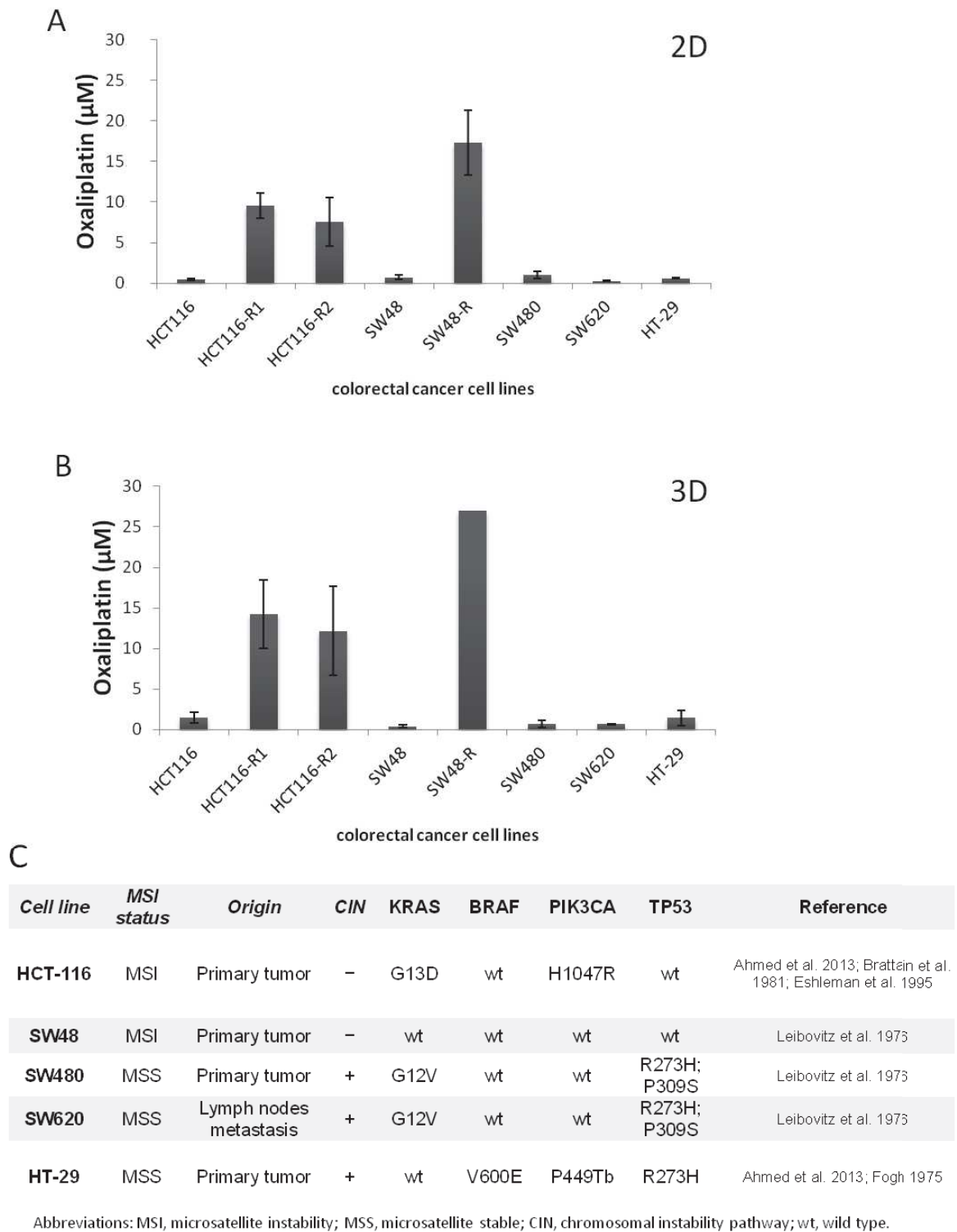


Figure 2

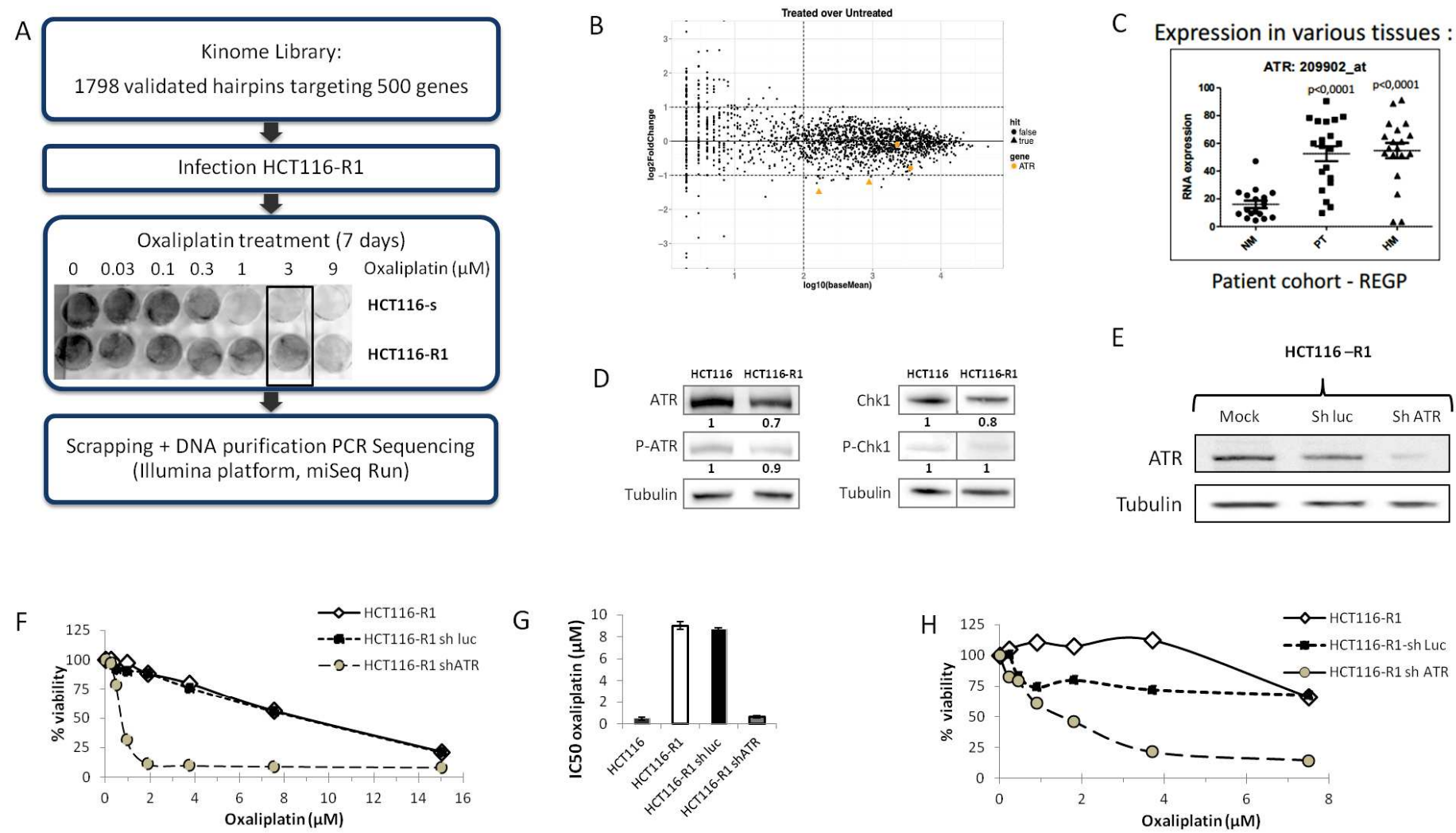


Figure 3

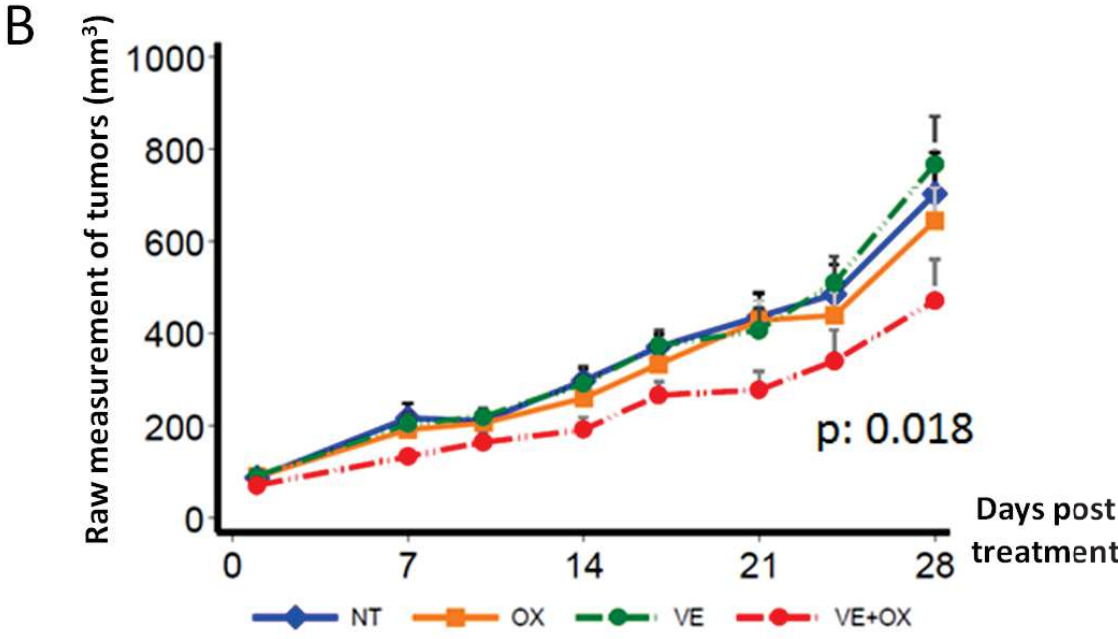
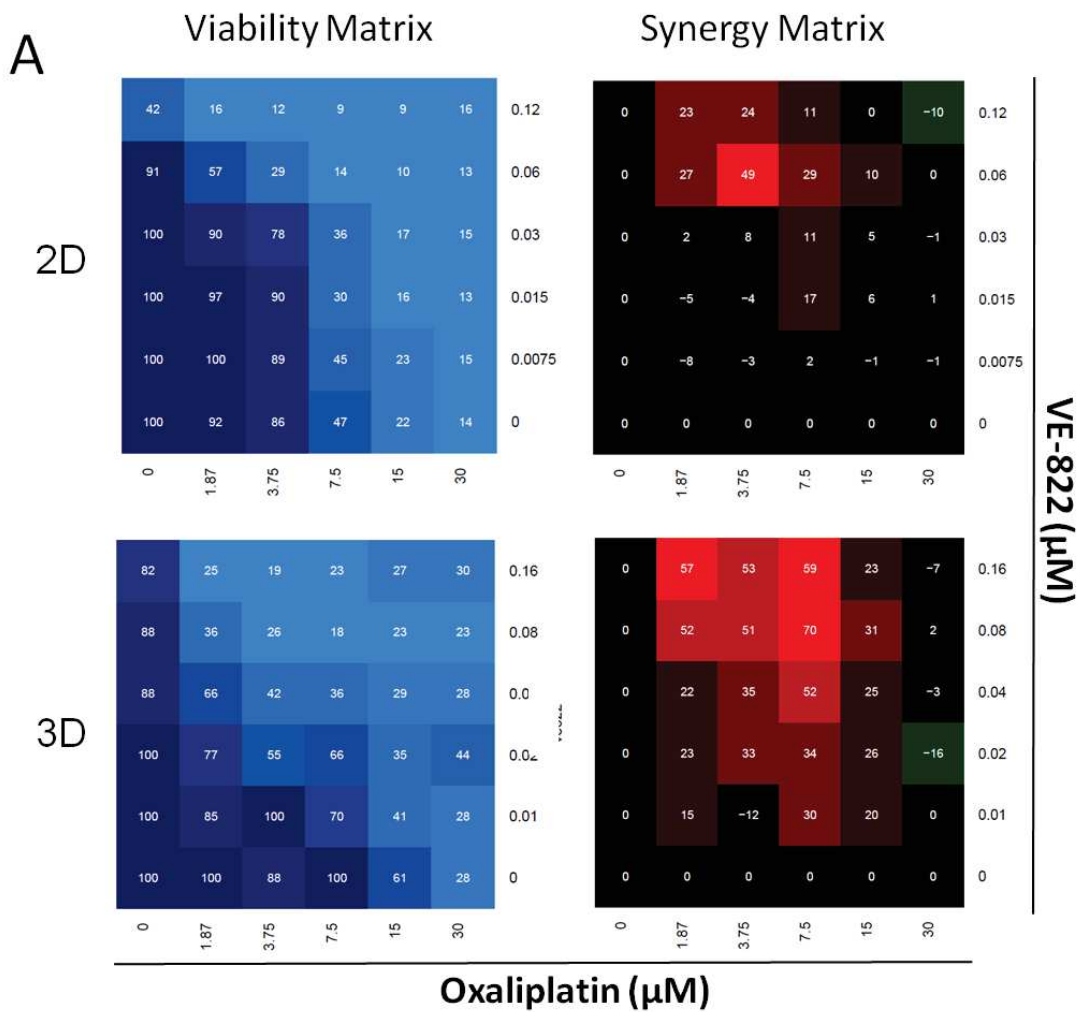


Figure 4

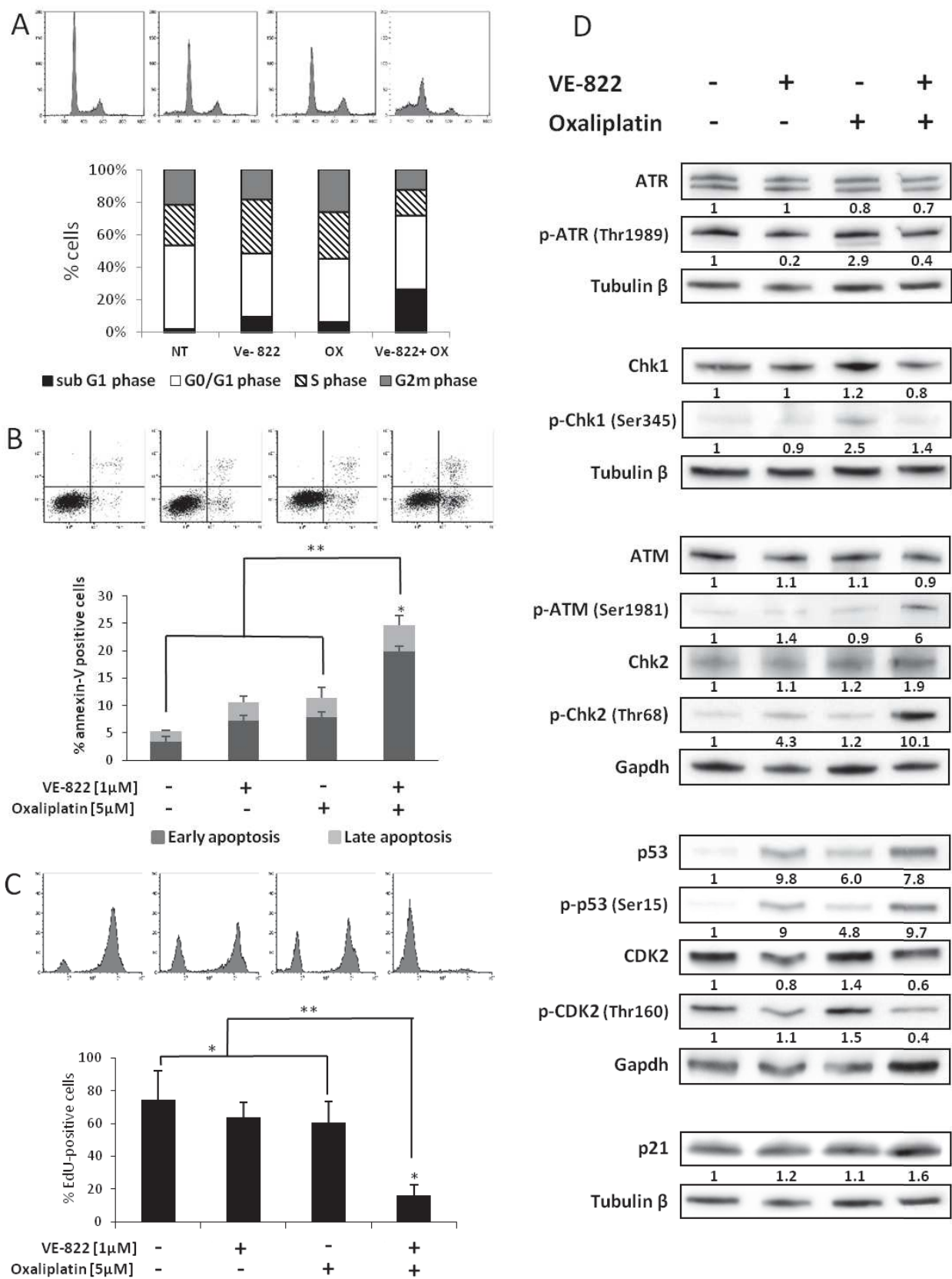


Figure 5

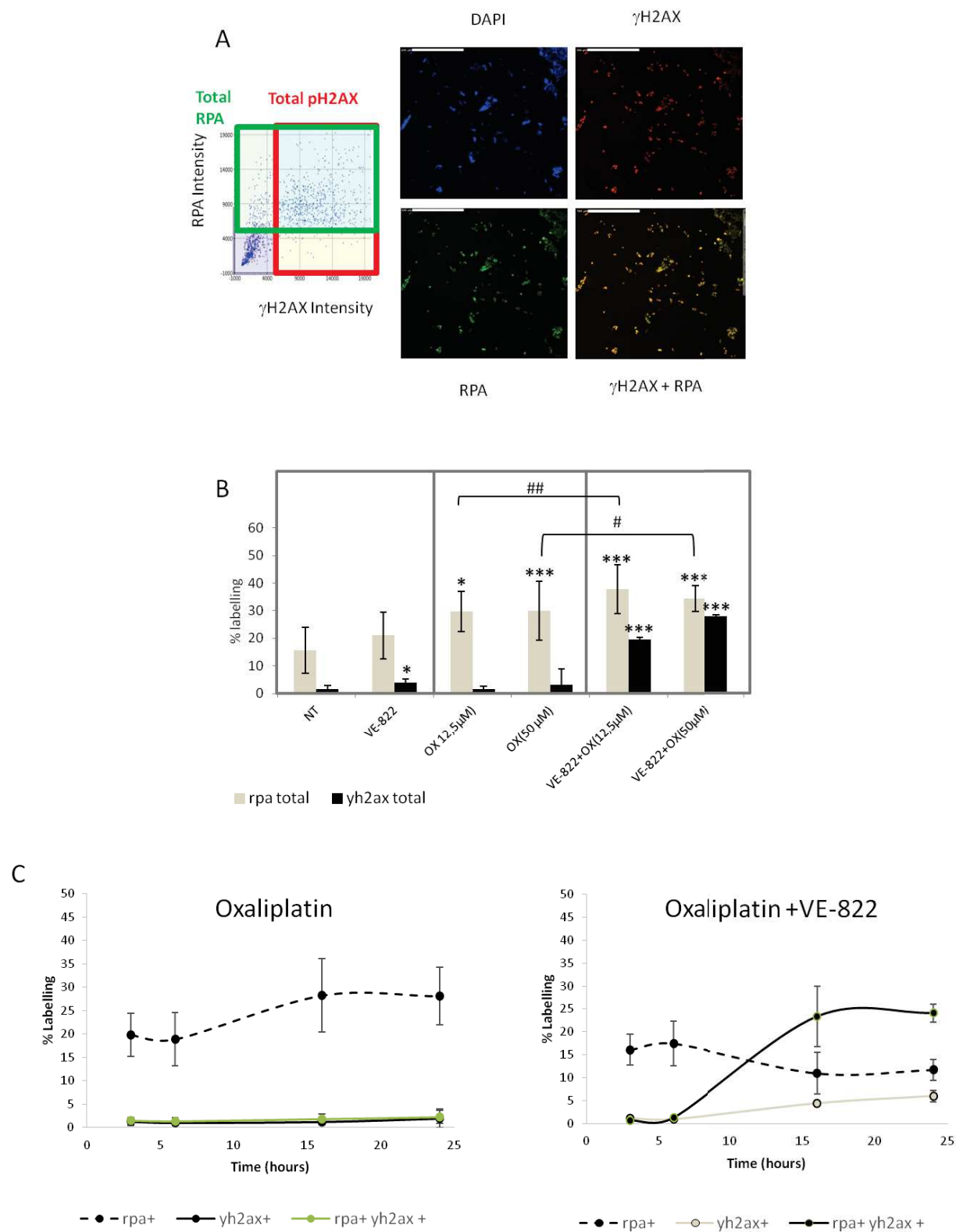


Figure 6

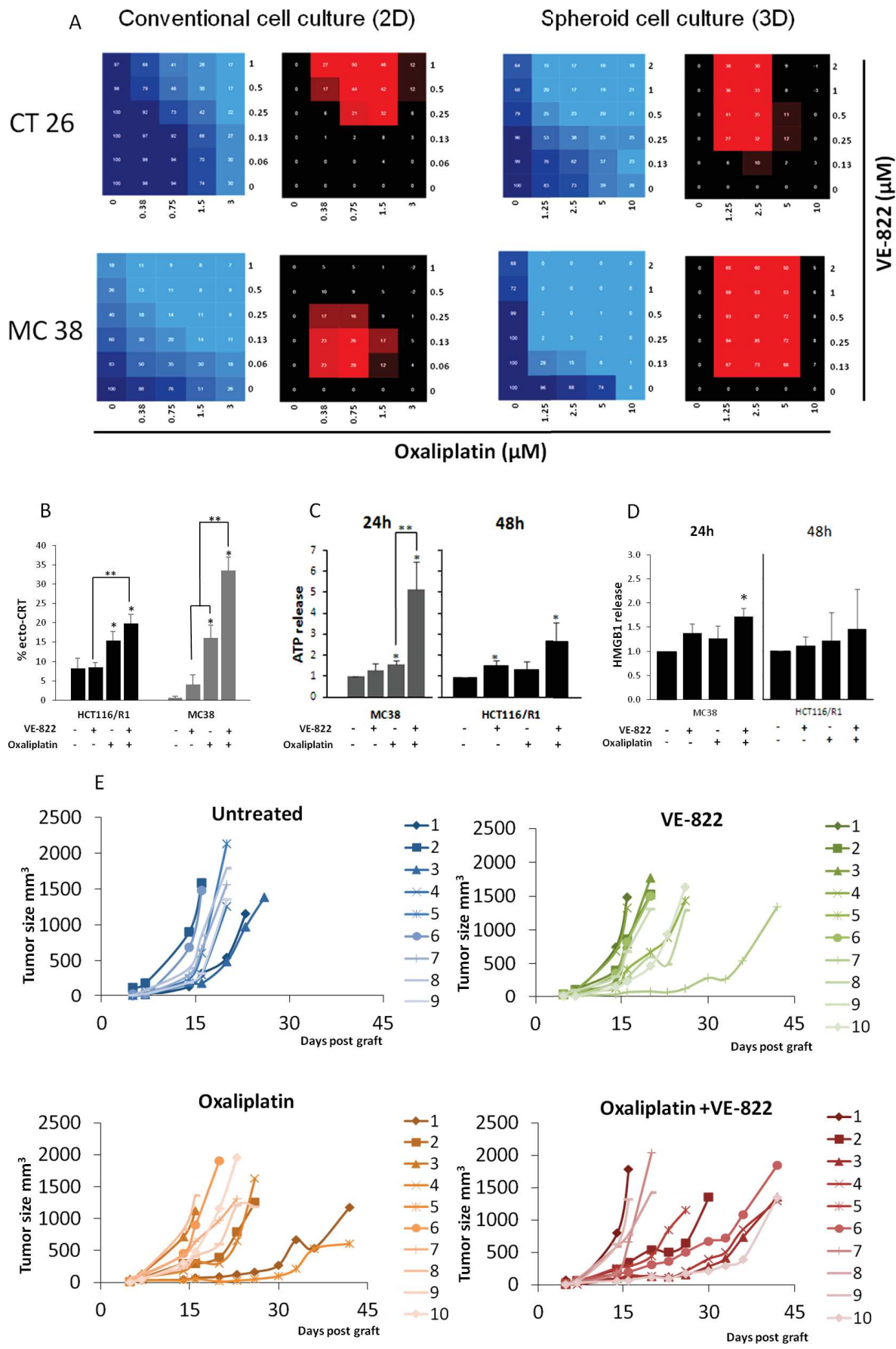


Figure 7

A
Commun DNA Repair genes

Probeset	Name	Voies	HR/tsuji	HR/montp
212275_s_at	SRCAP	HRR	0,1505462	0,25450099
207598_x_at	XRCC2	HRR	0,28395341	0,26780671
208386_x_at	DMC1	HRR	0,34060198	0,34456653
222104_x_at	GTF2H3	NER	0,36121645	0,38675619
205345_at	BARD1	HRR	0,37558193	0,34472748
205887_x_at	MSH3	MMR	0,39983035	0,38771263
214816_x_at	C19orf40	FANC/HRR	0,41314151	0,18429583
200943_at	HMGN1	NER	1,98924318	4,97994393
201756_at	RPA2	FANC/HRR/NER	2,08458013	3,62318662
223758_s_at	GTF2H2	NER	2,11891136	3,35324256
218685_s_at	SMUG1	BER	2,90766368	3,42176091
228131_at	ERCC1	NER/FANC	5,84605904	2,89981108

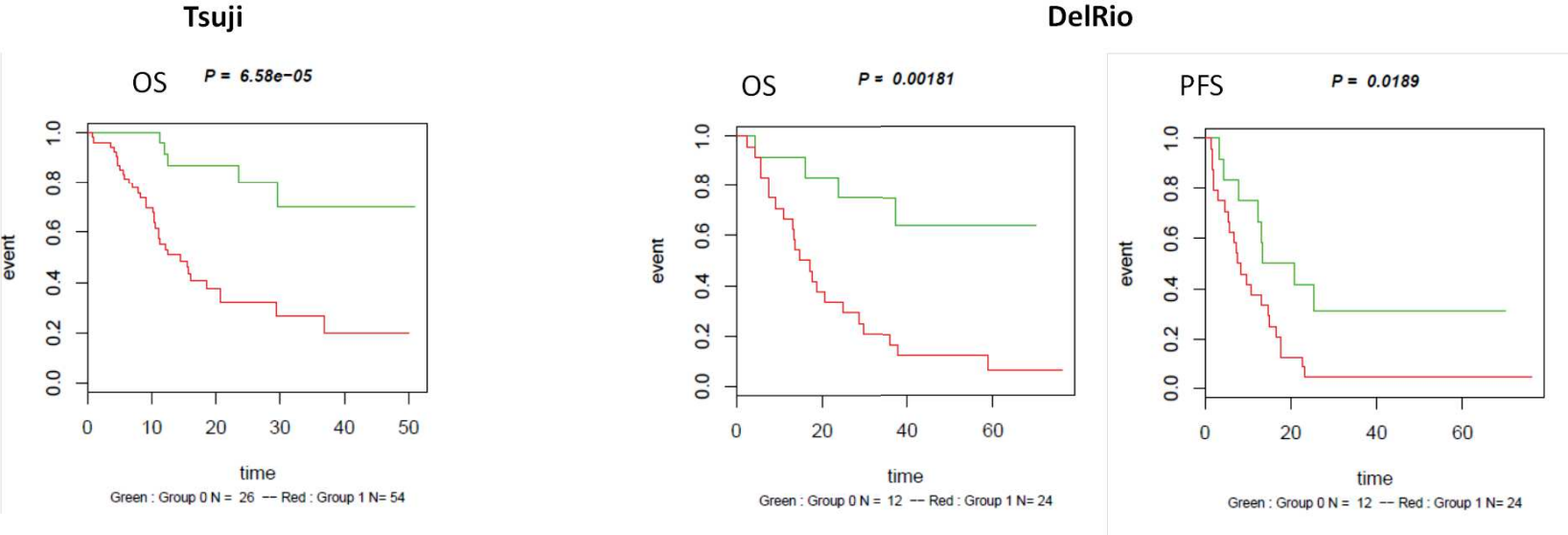


Figure supplémentaire 1

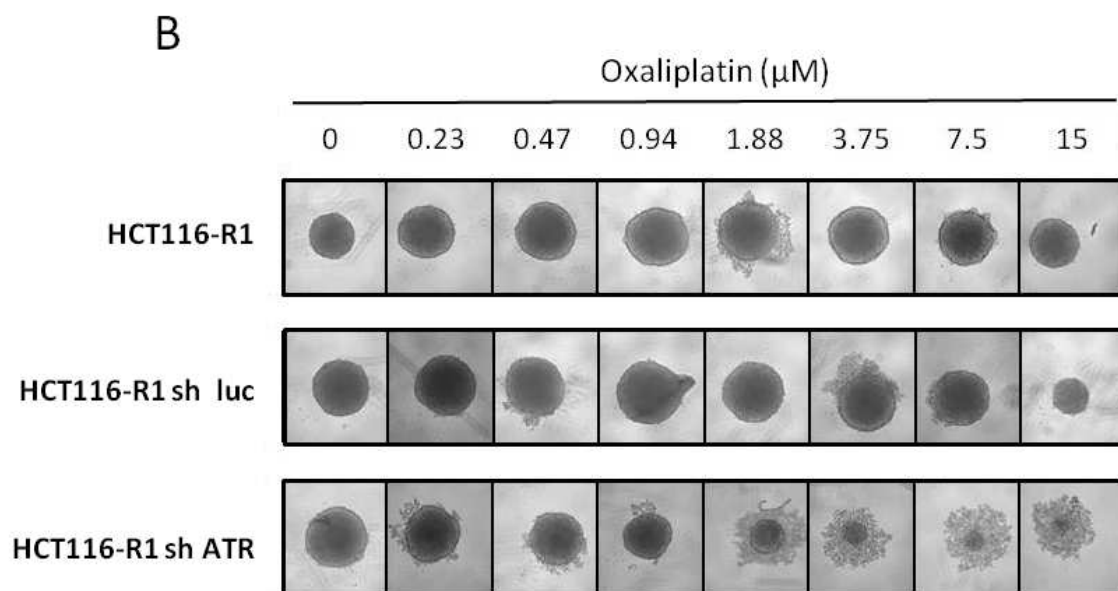
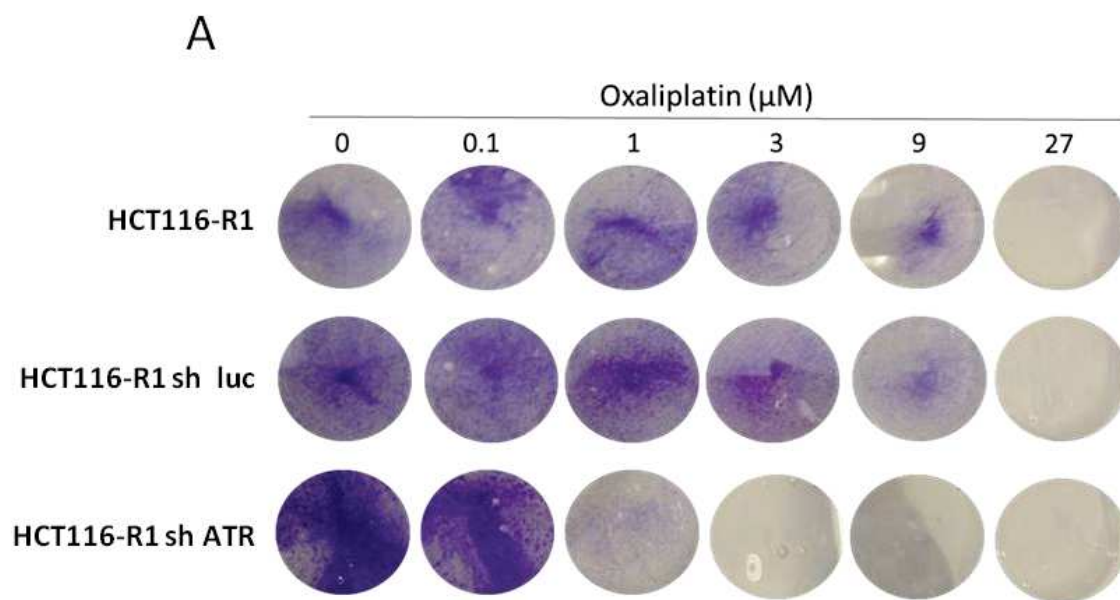


Figure supplémentaire 2

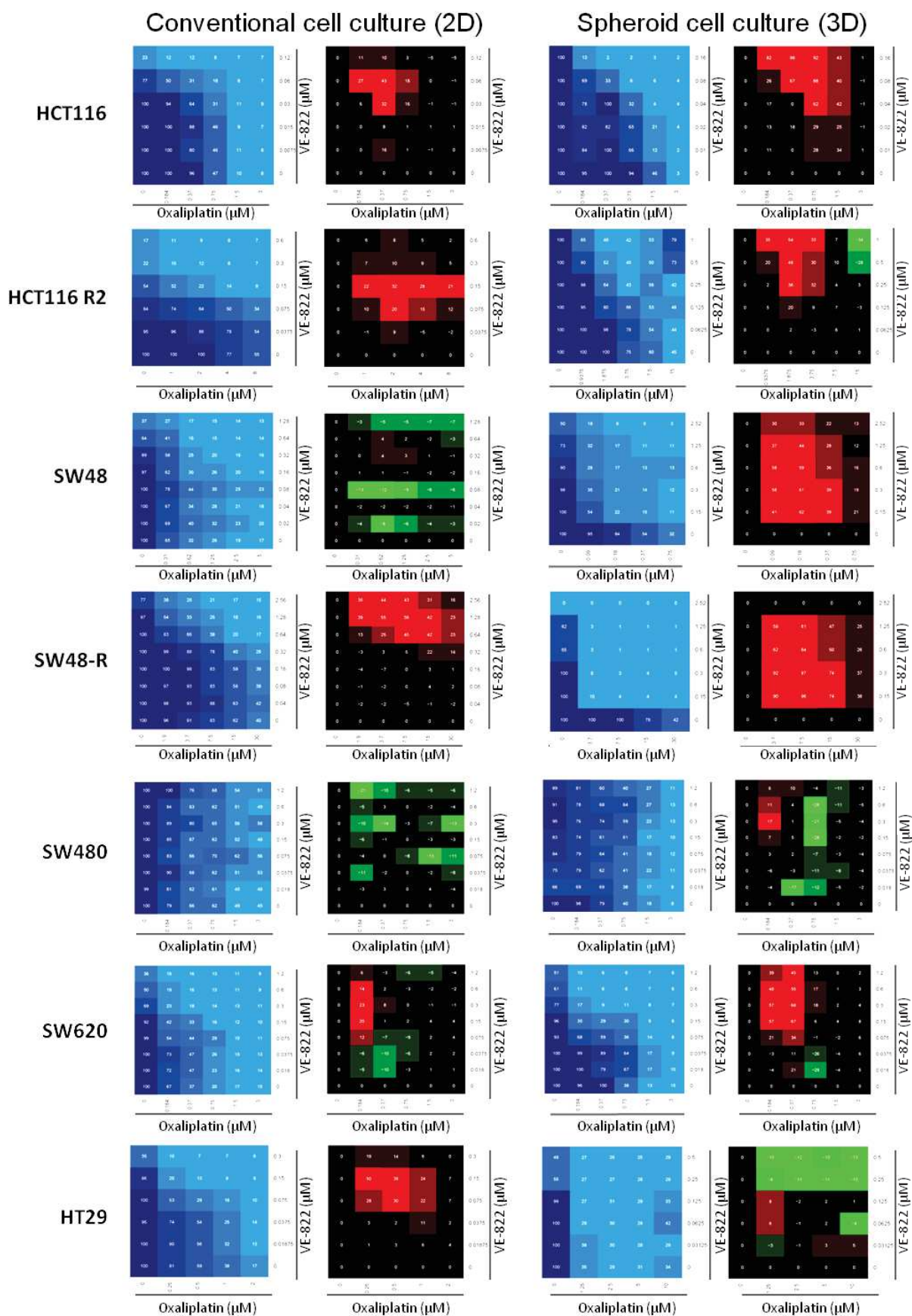
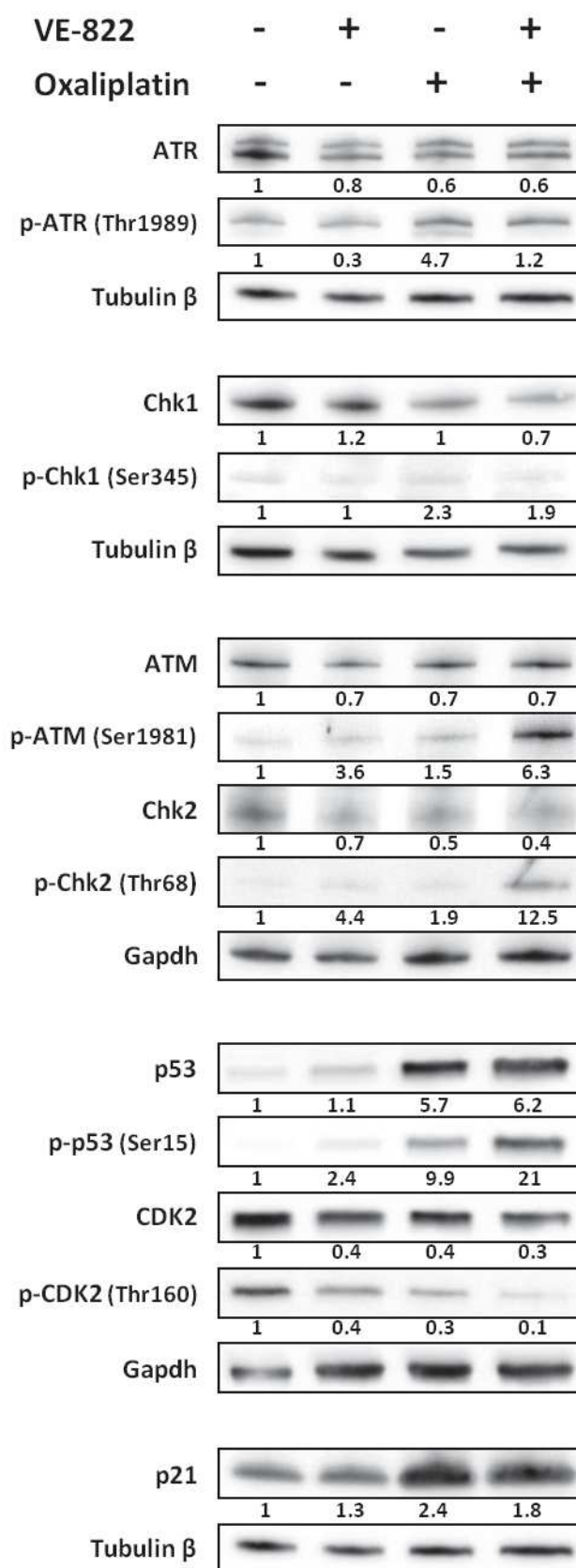


Figure supplémentaire 3



3-3 Commentaires de l'article

Dans cet article, nous montrons pour la première fois, l'implication de la protéine ATR dans la résistance à l'oxaliplatine. De plus, nous confirmons la synergie entre l'inhibition pharmacologique d'ATR et l'oxaliplatine dans diverses lignées cellulaires de cancer colorectal sensibles et résistantes à l'oxaliplatine. Nous démontrons également que l'effet cytotoxique et cytostatique de cette combinaison de traitements est causé par une accumulation de ssDNA provoquant in fine des cassures double brin et l'activation de la voie ATM-Chk2. Nous montrons également *in vitro* que l'inhibiteur d'ATR, le VE-822, a la capacité d'augmenter la présence des marqueurs de la mort cellulaire immunogène lorsqu'il est combiné avec l'oxaliplatine. Enfin, l'effet synergique de la combinaison de traitement a été confirmé *in vivo* dans deux modèles murins, l'un immunodéficient et l'autre immunocompétent, respectivement greffés avec la lignée HCT116-R1 ou la lignée de cancer colorectal murin MC38.

Nos résultats démontrent un lien entre les dommages induits par l'oxaliplatine et l'activation de la voie de signalisation ATR-Chk1. De plus, la combinaison entre le VE-822 et l'oxaliplatine provoque une augmentation du stress réplicatif dans le modèle HCT116-R1. Nos résultats suggèrent également que le VE-822 jouerait un rôle direct ou indirect dans l'induction des marqueurs de l'ICD en combinaison avec l'oxaliplatine. C'est ainsi qu'*in vivo*, utilisé à de faibles doses, le VE-822 augmente significativement les effets de ce médicament cytotoxique, suggérant que la combinaison VE-822 + oxaliplatine pourrait provoquer une forte réponse immunitaire anti-tumorale en clinique.

Dans la partie suivante, des commentaires ou compléments d'informations seront apportés sur les points suivants :

- i) L'effet du double traitement selon le statut mutationnel des lignées utilisées
- ii) Les modifications de la signalisation ATR-Chk1 et ATM-Chk2 dans la lignée HCT116 et HCT116-R1
- iii) L'étude du stress réplicatif, résultats préliminaires de l'étude des fourches de réplication

i) L'effet du double traitement selon le statut mutationnel des lignées utilisées

Un panel de lignées de cancer colorectal a été exposé à la combinaison du VE-822 et de l'oxaliplatine mettant en évidence des réponses différentes en 2D et en 3D à ce double traitement (article figure 3A et figure supplémentaire 2).

En 2D, une synergie forte est présente dans les lignées résistantes à l'oxaliplatine, et dans les lignées HCT116 et HT-29. Une légère synergie est observée dans la lignée SW620. Cependant une additivité (indice $\approx$ 0) voire un léger antagonisme (indice de synergie compris entre -15 et 0) prédomine dans les lignées SW48 et SW480.

En 3D, les effets synergiques de la combinaison sont majorés par rapport à la culture 2D dans toutes les lignées sauf dans les cellules HT-29 où il y a davantage d'additivité et d'antagonisme. Le changement le plus notable est observé dans la lignée SW48 pour laquelle nous observons un antagonisme léger en 2D mais une forte synergie en 3D. De manière globale, la culture 3D augmente les effets combinés du VE-822 et de l'oxaliplatine alors que l'effet de chaque traitement seul est lui globalement minoré. Á noter que la lignée HCT116-R2 qui possède un défaut dans l'apoptose mitochondriale lié à l'absence de la protéine BAX¹³⁸, répond au double traitement avec une synergie plus modérée que les autres lignées résistantes à l'oxaliplatine.

Au niveau mutationnel, il est connu que les lignées de cancer colorectal MSI sont de meilleurs pronostic²³⁴ et que la mutation de p53 fréquemment arborée dans les cancers CIN peut altérer la réponse aux thérapies à base de sels de platine^{137,235,236}. Ici, nos résultats ne confirment pas les données de la littérature car la combinaison n'est pas moins efficace dans les lignées p53 mutées issues de tumeurs CIN (SW480, SW620 et HT-29). Néanmoins, il est intéressant de constater que dans les lignées qui répondent moins bien en 2D, la combinaison démontre de meilleurs effets en 3D (SW48, SW480, SW620) et que lorsqu'il n'y a pas de synergie, l'antagonisme reste léger. Enfin, l'observation principale est la forte synergie de l'association entre le VE-822 et l'oxaliplatine observée dans les trois modèles cellulaires de résistance à l'oxaliplatine, démontrant du fort potentiel de ce double traitement dans la résistance acquise à ce médicament cytotoxique en clinique.

ii) Les modifications de la signalisation ATR-Chk1 et ATM-Chk2 dans la lignée HCT116 et HCT116-R1

La lignée HCT116 exposée à l'oxaliplatine répond par une activation soutenue de la voie ATR-Chk1-p53 et une accumulation de p21. En revanche, dans la lignée HCT116-R1 la même concentration d'oxaliplatine induit une activation de la voie ATR-Chk1-P53 qui ne conduit pas à une accumulation de p21. La combinaison du VE-822 et de l'oxaliplatine dans la lignée HCT116-R1 active la voie ATM-Chk2-p53 induisant une accumulation de la protéine p21. De façon intéressante la même activation a lieu dans la lignée HCT116 mais celle-ci induit une accumulation moins importante de protéine p21 que lorsqu'elle est exposée à l'oxaliplatine seul.

On observe donc que l'activation de la protéine p53 et l'accumulation de p21 surviennent uniquement dans les conditions où la survie de ces lignées est affectée par les traitements.

Enfin, dans la lignée HCT116-R1, le VE-822 seul est capable d'induire une activation de la protéine Chk2 et de la protéine p53 aussi importante que la combinaison de traitement, ce qui n'est pas le cas dans la lignée HCT116. On observe également une augmentation légère mais significative des DSB consécutive à ce même traitement (figure 5 de l'article). Ceci suggère que l'inhibition d'ATR seule est suffisante pour causer des dommages à l'ADN dans le modèle cellulaire HCT116-R1 et démontre ainsi la dépendance de la lignée HCT116-R1 à cette voie de signalisation.

iii) L'étude de l'origine du stress répliatif, résultats préliminaires de l'étude des fourches de réplication

Dans l'article, nous avons mis en évidence une induction de ssDNA et de DSB dans les cellules HCT116-R1 traitées par le VE-822 et l'oxaliplatine (article figure 5). On observe notamment que l'oxaliplatine et la combinaison VE-822 + oxaliplatine induisent une augmentation significative du ssDNA et que seule la combinaison induit des cassures double brin après 16 h de traitements aux concentrations utilisées (figure 5B). L'augmentation de la présence d'ADN simple brin peut être le témoin d'un stress répliatif provoqué par le

blochage ou le ralentissement des fourches de réplication. C'est pourquoi nous avons étudié la vitesse d'élongation des fourches de réplication après 24 h d'exposition aux différents traitements, en collaboration avec l'équipe du Dr P.Pasero (IGH, Montpellier). Nos premiers résultats montrent que l'oxaliplatine et le VE-822 sont capables d'induire un ralentissement significatif de la fourche réplivative comparé à la condition contrôle (figure 34). Ici, l'avancée de la fourche est étudiée par la mesure de l'incorporation d'un analogue de la thymidine, le CldU (cf : matériel et méthodes supplémentaires). On observe notamment que le VE-822 induit une diminution de la longueur des fourches réplitives bien plus importante que l'oxaliplatine. Á ce stade nous mettons donc en évidence que l'oxaliplatine et le VE-822 peuvent chacun induire un stress réplitatif, par une augmentation du ssDNA et/ou une action sur les fourches de réplication. Le ralentissement des fourches réplitives par un autre inhibiteur d'ATR, le VE-821, a déjà été démontré, alors que pour l'oxaliplatine seul un ralentissement de l'action des polymérases a été mis en évidence²³⁷⁻²³⁹. Les résultats obtenus démontrent donc que le VE-822 induit un fort niveau de stress réplitatif, pouvant ainsi être à l'origine de l'augmentation des DSB et de l'activation des protéines Chk2 et p53, observés dans la lignée HCT116-R1 (cf : figure 4 et 5 de l'article). Nous exposerons par la suite cette lignée au double traitement afin d'étudier la progression des fourches et espérons, au vue de ces résultats préliminaires, observer un très fort ralentissement voire un blocage de la réplication.

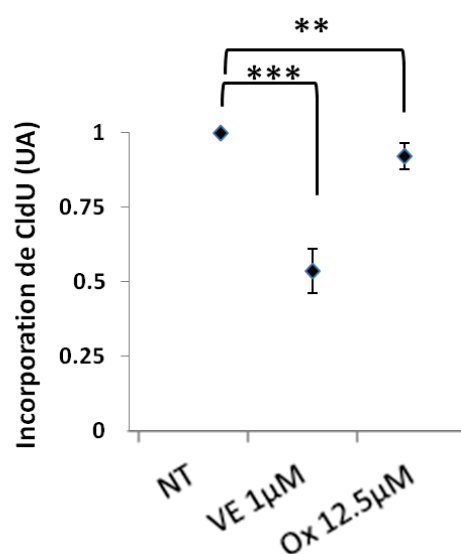


Figure 34: Le VE-822 et l'oxaliplatine ralentissent significativement la progression des fourches réplitives dans la lignée HCT116-R1. Les mesures de la longueur de l'incorporation de Cldu ont été effectuées après 24h de traitement et leur moyenne rapportée à la condition contrôle placée arbitrairement à 1.

3-4- Matériel et méthodes supplémentaires

Etude des fourches de réplication par étalement des fibres ADN :

i) Marquage:

Les cellules HCT116-R1 sontensemencées dans une plaque 6 puits à fond plat ($0,5 \times 10^6$ cellules/puits). Le lendemain, elles sont exposées aux traitements (VE-822 $1 \mu\text{M}$ ou oxaliplatine $12,5 \mu\text{M}$) durant 24h. L'ADN des cellules est ensuite marqué par deux analogues de la thymidine (IdU et CldU). L'IdU est ajouté dans le milieu à une concentration de $20 \mu\text{M}$ durant 15 minutes, puis le milieu est remplacé par un milieu contenant le CldU à la concentration de $40 \mu\text{M}$ durant 15 minutes. Enfin, le milieu est remplacé par du milieu contenant $400 \mu\text{M}$ de thymidine durant 2 h (période de chasse).

Par la suite, les cellules sont trypsinées, rincées, et mises en suspension dans du PBS à une concentration de 1×10^6 cellules/mL et la suspension cellulaire est conservée sur glace.

ii) Etalement (dans une chambre humide):

1) $2 \mu\text{L}$ de suspension cellulaire ($\approx 2\,000$ cellules) sont déposés en haut d'une lame de microscopie durant 5 minutes. 2) $7 \mu\text{L}$ de tampon de lyse (Tris-HCL $200 \mu\text{M}$, EDTA $50 \mu\text{M}$, SDS 0.5% dans H_2O milliQ) sont ajoutés à la suspension, délicatement mélangés à la pointe du cône et incubés durant 3 minutes. 3) La lame de microscopie est alors légèrement inclinée pour permettre à la goutte de lentement glisser jusqu'à atteindre le bas de la lame (figure 35). La lame est ensuite sortie de la chambre humide et, une fois sèche, est plongée dans un tampon de fixation (acide acétique 1:3 méthanol) durant 10 minutes et à nouveau séchée.

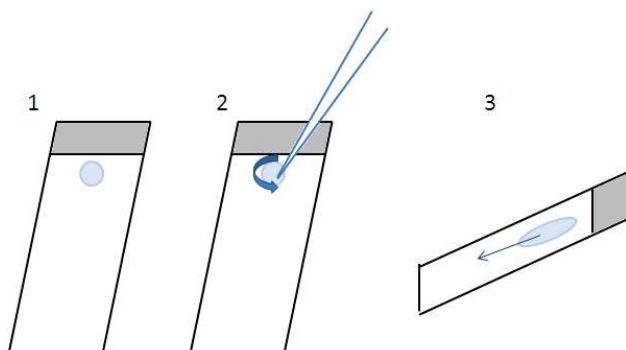


Figure 35: Etapes de l'étalement des fibres ADN sur lame

iii) Immunomarquage:

Chaque lame est réhydratée (2 x 5 minutes dans de l'H₂O), puis dénaturée (1 heure dans une solution d'HCl 2,5 M). Après avoir été rincées dans du PBS, les lames sont plongées dans une solution de blocage (PBS + BSA 5 %) durant 1 h. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-CldU (rat anti-BrdU OBT0030- Abcam) dilué au 1/50^e dans du PBS-triton 0,1 % pendant une heure à 37°C dans une atmosphère humide. Puis, après rinçage (PBS-triton 0,1 %), avec l'anticorps secondaire anti-espèce correspondant (anti-rat A488 A11006 - Thermofisher Scientific) dilué au 1/50^e dans du PBS-triton 0,1 % durant 45 minutes à 37°C dans une atmosphère humide. Après rinçage (PBS-triton 0,1 %), les lames sont incubées avec les anticorps primaires de souris anti-ssDNA et anti-IdU (IgG2a surnageant-DHSB, IgG1 347580-BD Biosciences) dilués au 1/50^e dans du PBS-triton 0,1 % pendant une heure à 37°C dans une atmosphère humide. Puis, après rinçage (PBS-triton 0,1 %), avec les anticorps secondaires correspondant (anti-IgG2a A647 A21241 et anti-IgG1 A546 A21123 - Thermofisher Scientific) dilués au 1/50^e dans du PBS-triton 0,1 % durant 45 minutes à 37°C dans une atmosphère humide. Après rinçage (PBS-triton 0,1 % x 2 et PBS x 1) les lames sont montées (prolong gold + lamelles) puis séchées à l'abri de la lumière 24 h à température ambiante.

iv) Détection:

Les fibres marquées présentes sur la lame sont prises en photo au moyen d'un microscope à fluorescence (Leica DMRM). Pour chaque condition entre 100 et 200 longueurs de CldU incorporé sont mesurées. Chaque expérience est effectuée en triplicat.



Figure 36: Exemple de mesure de progression de la fourche. Le CldU apparaît en vert, l'IdU en rouge.

Discussion

4-Discussion

Le but de notre projet était de mettre en évidence des kinases impliquées dans la résistance aux médicaments cytotoxiques et aux thérapies anti-EGFR utilisés dans le traitement du cancer colorectal (à l'exception de l'erlotinib) au moyen de criblages phénotypiques effectués dans des lignées résistantes à ces thérapies. Dans la résistance aux médicaments cytotoxiques, le criblage nous a permis d'obtenir des résultats très significatifs pour la majorité des shRNA identifiés. En revanche, dans la résistance aux thérapies ciblées (cétuximab, panitumumab, et erlotinib) aucun shRNA de la banque utilisée n'a montré de résultat significatif à la suite de la première analyse des résultats de ce criblage.

Pour expliquer cela nous émettons plusieurs hypothèses :

i) Différences dans le protocole : La diversité du site d'insertion des shRNA était 10 fois plus élevée dans les criblages consacrés aux médicaments cytotoxiques (10 000 contre 1 000) ; la représentation de chaque shRNA était, elle aussi plus élevée (1 500 contre 1 000). Ce qui a pu avoir un impact sur la significativité de nos résultats lors du dernier criblage phénotypique.

ii) les lignées choisies et les traitements utilisés: Dans le cas des criblages consacrés aux médicaments cytotoxiques les lignées clonales utilisées sont 10 à 20 fois moins sensibles aux médicaments cytotoxiques choisis que la lignée de référence (HCT116). Dans le dernier criblage la lignée HCT116 est totalement réfractaire aux traitements par le kétuximab et le panitumumab et répond très peu à l'erlotinib, ce qui a pu constituer un obstacle dans la découverte de létalité conditionnelle. De plus, l'oxaliplatine et l'irinotécan sont capables d'induire des dommages à l'ADN causant un arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose des cellules cancéreuses^{53,67}. *In vitro*, les thérapies anti-EGFR ont principalement un effet anti prolifératif, ce qui est peut être insuffisant pour obtenir un différentiel important pour chaque shRNA entre la condition traitée et non traitée.

De plus, beaucoup d'études ont comparé des lignées KRAS « sauvages » et mutées afin de mettre en évidence une létalité conditionnelle impliquant la mutation de KRAS. Cependant une seule étude, publiée en 2015, a étudié les thérapies anti-EGFR dans certaines lignées KRAS mutées. Dans cette étude, Astsaturov et al. ont mis en place un criblage phénotypique (siRNA) en plusieurs parties utilisant dans un premier temps la lignée A431

(KRAS « sauvage ») traitée par le cétuximab, le panitumumab, l'erlotinib ou l'irinotécan¹⁴⁵. La lignée A431 contrairement à la lignée HCT116 répond aux médicaments testés et c'est après une première sélection effectuée dans cette lignée que les cibles validées ont été testées dans d'autres lignées dont la lignée HCT116. Il est intéressant de voir que les protéines DDR2 et RAC1 font parties des cibles potentielles issues du premier criblage réalisé dans cette étude. Cependant, suite au second criblage phénotypique, l'implication de ces protéines n'a pas été confirmée. Dans cette étude, ce criblage en deux parties a permis d'obtenir des résultats y compris dans les lignées réfractaires aux thérapies anti-EGFR et de resserrer l'étau autour des cibles les plus robustes, limitant ainsi le risque de faux positifs. Un autre moyen pouvant être utilisé pour potentialiser l'effet d'anticorps thérapeutiques et pour obtenir de nouvelles interactions létales est le criblage phénotypique *in vivo*. Dans ce cas, les propriétés d'ADCC des anticorps monoclonaux comme le cétuximab⁸⁵ pourraient être prises en compte de même que le caractère hypoxique des tumeurs solides. Dans l'étude de Possik et al.²⁴⁰, les auteurs ont comparé un même criblage phénotypique effectué *in vitro* et *in vivo*, mettant en évidence les protéines DDR comme essentielles pour l'expansion des cellules tumorales de mélanomes *in vivo*. De cette façon, ils ont prouvé l'intérêt du criblage phénotypique *in vivo* pour obtenir des cibles thérapeutiques pertinentes, ainsi que sa faisabilité. Prises ensemble, ces différentes études suggèrent que le contexte choisi pour ce dernier criblage était sans doute trop ardu pour obtenir des résultats significatifs. Cependant, certaines améliorations peuvent être envisagées telles que le choix d'une lignée arborant la mutation KRAS mais étant moins réfractaire aux thérapies anti-EGFR (ex : DLD-1) ou encore l'établissement d'un criblage phénotypique *in vivo*, afin de prendre en compte l'effet des thérapies anti-EGFR dans leur globalité.

Enfin, malgré la faible significativité des résultats dans le dernier criblage, étudier les cibles pour lesquelles au moins la moitié des shRNA ont été déplétés dans la condition traitée a mis en évidence des cibles déjà impliquées dans la résistance aux thérapies anti-EGFR telles que BRAF, EGFR et PI3K¹²⁰. C'est pourquoi nous avons décidé de poursuivre l'analyse en croisant les cibles communes à plusieurs traitements afin de limiter les risques de faux positifs, nous permettant ainsi de valider l'implication de deux cibles potentielles : DDR2 et ATR dans la résistance aux thérapies anti-EGFR.

Dans les criblages phénotypiques consacrés aux médicaments cytotoxiques, oxaliplatine et irinotécan (SN-38), les deux cibles identifiées dans chacun des criblages présentent des profils d'activités très similaires. En effet, ATM et ATR sont deux protéines complémentaires dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN. Cependant, la protéine ATM est associée à la détection des cassures double brin que l'irinotécan peut induire^{55,213}, tandis que la protéine ATR est plutôt associée au stress réplicatif qui peut être généré par l'oxaliplatine. Cependant, nous observons que l'inhibition d'ATR est également effective dans la lignée résistante au SN-38 et dans la lignée HCT116 en combinaison avec l'irinotécan en 2D et en 3D (figures 37 et 38) confirmant ainsi les données de la littérature²³⁸. On observe tout de même, que pour la lignée HCT116, la synergie est plus forte lorsqu'elle est traitée par le VE-822 et l'oxaliplatine (article figure supplémentaire 2) que par le VE-822 et le SN-38 (ci-dessous).

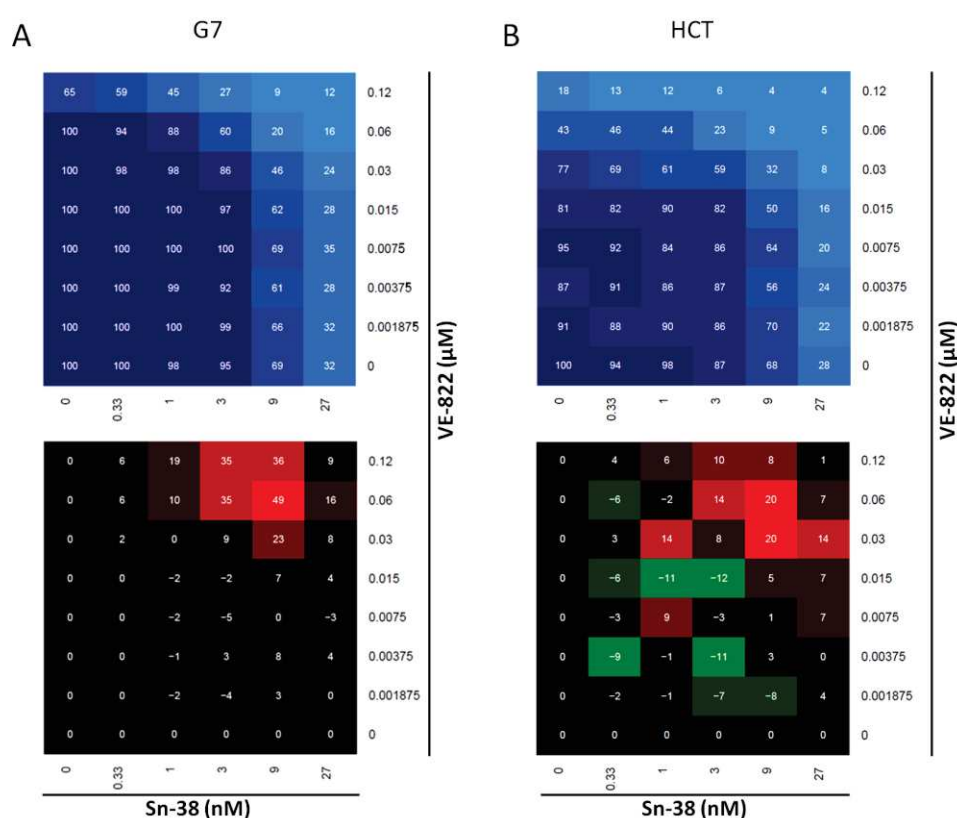


Figure 37: Matrices de viabilité et de synergie obtenues à la suite du traitement des lignées cellulaire G7 (A) et HCT116 (B) par le VE-822 associé au SN-38. Les résultats ont été obtenus après 96h de traitement (expérience représentative).

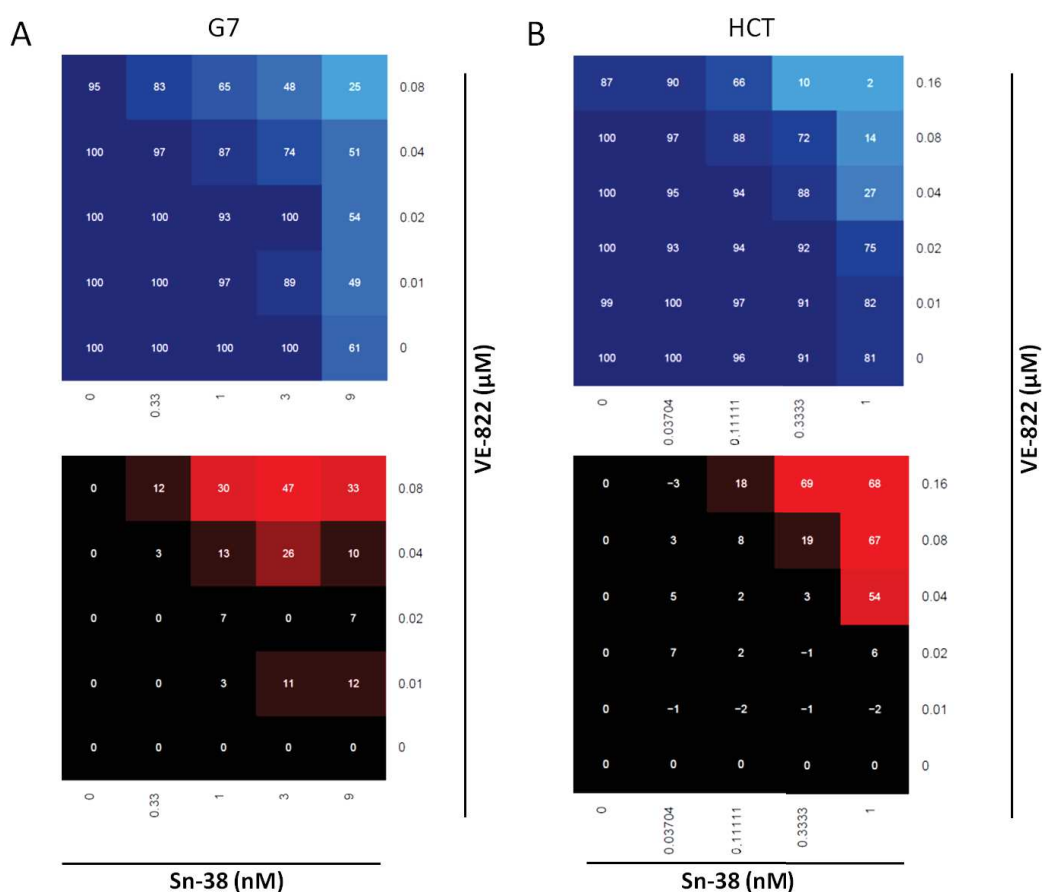


Figure 38 : Matrices de viabilité et de synergie obtenues à la suite du traitement des lignées cellulaire G7 (A) et HCT116 (B) par le VE-822 associé au SN-38, en culture trois dimension (expérience représentative).

Outre ATM et ATR, le rôle de la protéine RAC1 a été à plusieurs reprises étudié dans la réponse aux stress génotoxiques comme les UV ou les agents alkylants. La protéine RAC1 semble faire le lien entre la signalisation des dommages à l'ADN après des cassures double brin ou certaines lésions reconnues par la voie BER et la production d'espèces réactives de l'oxygène ^{241–243}. Enfin, très récemment, une étude montre que ROR2 joue un rôle dans la résistance au cisplatine par le biais d'un adaptateur transmembranaire capable d'induire l'expression de gènes de réparation de l'ADN BRCA1 (HR) et MLH1 (MMR) dans des tumeurs de l'endomètre ²⁴⁴.

De plus, les protéines RAC1 et ROR2 sont également, toutes deux, liées à la voie Wnt, qui est la première voie de signalisation dérégulée lors de la carcinogénèse colorectale ¹². Ces deux protéines sont plus particulièrement impliquées dans la voie non canonique de Wnt. Le rôle de RAC1 dans la voie Wnt est démontré depuis de nombreuses années,

notamment dans le développement embryonnaire, la migration cellulaire ainsi que dans l'initiation et la progression tumorale²⁴⁵⁻²⁴⁷. Le récepteur membranaire, autrefois orphelin, ROR2 qui interagit avec les ligands de la voie Wnt est à l'origine de la voie non canonique de Wnt²⁴⁸ et est très impliqué dans le développement embryonnaire¹⁹⁷. Ce rapport à la signalisation non canonique de Wnt est intéressant car dans le cancer colorectal le transfert entre la voie canonique et non canonique de Wnt peut être impliqué dans la résistance aux traitements²⁴⁹.

Ainsi, les deux criblages consacrés aux médicaments cytotoxiques ont mis en évidence des cibles qui sont toutes liées à la réparation des dommages à l'ADN. Les protéines ATM et RAC1 étant impliquées dans la reconnaissance et la signalisation après la survenue de DSB, lésions générées par l'irinotécan⁵⁵. Les protéines ATR et ROR2 sont, elles, directement ou indirectement impliquées dans la voie de réparation par recombinaison homologue : voie sollicitée après un stress au niveau des fourches de réplication, que les adduits de platine peuvent causer en gênant l'extension de brins d'ADN néoformés²⁵⁰. De plus, les deux protéines impliquées dans la signalisation des dommages à l'ADN appartiennent à la voie non canonique de Wnt. Cette recherche sans a priori nous a donc conduit à des cibles présentant un lien direct avec les thérapies testées. Les criblages confirment ainsi l'importance des voies de réparation de l'ADN dans la résistance acquise aux antinéoplasiques. Ils confirment aussi le rôle majeur de la voie Wnt dans le cancer colorectal et mettent en évidence son rôle dans la résistance aux médicaments cytotoxiques.

Dans la seconde partie des résultats nous nous sommes focalisés sur la protéine ATR qui était la seule cible dont l'inhibition restaurait totalement la sensibilité à l'oxaliplatine dans la lignée clonale résistante HCT116-R1. En étudiant les voies de signalisation ATR-Chk1 et ATM-Chk2 ainsi que la présence de ssDNA et de DSB, nous avons montré que la combinaison provoquait une activation de la voie ATM-Chk2 ainsi qu'une augmentation de ssDNA et de cassures double brin.

Dans l'article présenté, nous démontrons pour la première fois que l'oxaliplatine utilisé à de faibles concentrations est capable d'activer la voie ATR-chk1 dans la lignée HCT116 et HCT116-R1. Il est décrit dans la littérature que l'oxaliplatine provoque des dommages essentiellement reconnus par le NER, et dans une moindre mesure par le BER et

le HR²⁵¹. ATR intervient dans la voie de réparation HR^{215,216}, cependant cette protéine peut par sa reconnaissance de l'ADN simple brin lié par la protéine RPA avoir une action dans le NER²⁵². Ainsi, dans les modèles cellulaires HCT116 et HCT116-R1, la réparation des dommages induits par l'oxaliplatine semble être ATR dépendante.

Par ailleurs, dans la signature mise en évidence en collaboration avec le Dr J. Moreau à partir d'échantillons cliniques, nous démontrons que le niveau d'expression de certains gènes impliqués dans les voies de réparation HR et NER est crucial dans la réponse à l'oxaliplatine. De plus, la forte expression de certaines protéines du NER (dont ERCC1) est corrélée à une faible survie après un traitement par l'oxaliplatine, confirmant ainsi les données de la littérature mettant en évidence un lien entre surexpression d'ERCC1 et une mauvaise réponse ou résistance à l'oxaliplatine chez les patients atteints de CCR^{127,129}. Ce qui suggère que la lignée clonale HCT116-R1 pourrait réparer de façon plus efficace les dommages induits par l'oxaliplatine par une surexpression de protéines impliquées dans la voie NER.

Nous émettons alors l'hypothèse que l'addition du VE-822 à l'oxaliplatine permet d'augmenter le stress réplcatif que ce sel de platine provoque seul, induisant ainsi des dommages létaux dans les cellules cancéreuses. La littérature met en évidence que la stabilisation du stress réplcatif passe par la phosphorylation de la protéine RPA2 par ATR²⁵³. De plus, l'activation d'ATR inhibe l'initiation de nouvelles origines de réplication permettant de limiter la présence de ssDNA et prévenant ainsi l'épuisement des protéines RPA²⁵⁴. L'étude de Toledo et al. ainsi que nos résultats nous permettent donc de proposer le modèle suivant pour expliquer la synergie de la combinaison de l'oxaliplatine et du VE-822 dans la lignée clonale HCT116-R1 (figure 39).

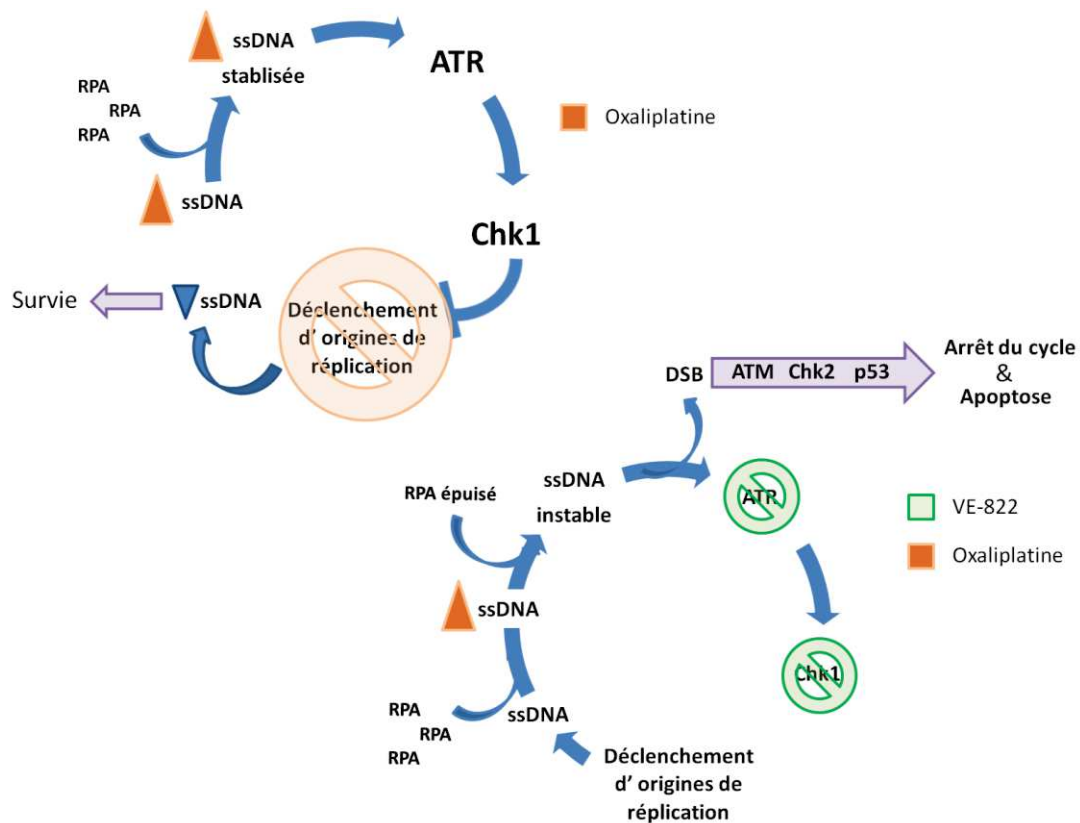


Figure 39: Modèle d'action de l'oxaliplatine et de la combinaison du VE-822 et de l'oxaliplatine dans la lignée HCT116-R1. Schémas inspirés de Toledo et al.²⁵⁴

Cette lignée, lorsque elle est exposée à l'oxaliplatine, subit une augmentation de ssDNA non suivie de DSB contrairement à ce que l'on peut observer dans des lignées sensibles²⁵⁵. Les protéines RPA permettent de protéger l'ADN simple brin ainsi généré et l'activation de la voie ATR-Chk1 limite l'initiation de la réplication à partir de nouvelles origines de réplication induisant une forte baisse de ssDNA lié à la réplication. Ainsi, le stock de protéines RPA n'est pas complètement épuisé et le ssDNA recouvert est stabilisé jusqu'à réparation des dommages ; la cellule survit. Lors d'une exposition au double traitement, la voie ATR-Chk1 est inhibée, le déclenchement de nouvelles origines de réplication n'est donc pas freiné, ainsi les protéines RPA libres s'épuisent, à la fois sollicitées par le processus réplcatif et par le ssDNA généré par l'oxaliplatine. Le ssDNA serait alors instable, d'une part car ATR n'est pas activé et ne peut donc pas stabiliser le RPA2, et d'autre part, il n'y aurait pas suffisamment de protéines RPA pour recouvrir tout le ssDNA présent. Le stress généré par cette situation n'est donc pas régulé, causant des DSB au niveau des zones de ssDNA non stabilisés puis une activation de la voie ATM-Chk2 conduisant à un arrêt du cycle cellulaire ou à l'apoptose des cellules traitées.

Le mécanisme d'action de cette combinaison de traitements tire, dans ce modèle cellulaire, partie du niveau de stress réplicatif basal présent dans les lignées cancéreuses colorectales de type MSI. Ce stress réplicatif endogène a permis d'obtenir des effets létaux avec des concentrations minimales de traitements et donc potentiellement très peu d'effets délétères sur les cellules saines environnantes. Ces résultats sont très favorables à la mise en place d'un essai clinique dans cette localisation cancéreuse. Nous nous demandons désormais si l'effet synergique entre l'oxaliplatine et le VE-822 est spécifique du cancer colorectal ou s'il peut survenir dans d'autres localisations cancéreuses. Á noter, qu'à ce jour, la combinaison entre l'oxaliplatine et le VE-822 a déjà été testée dans un panel de lignées cancéreuses pulmonaires avec un effet bénéfique pour moins de 50 % des lignées ²⁵⁶, ainsi dans ce contexte c'est la combinaison entre le cisplatine et le VE-822 qui avait montré les meilleurs résultats. Ceci Suggère tout de même que l'inhibition d'ATR présente un très fort potentiel thérapeutique dans le domaine de la cancérologie que ce soit en combinaison avec des sels de platine, des inhibiteurs de topoisomérase I ou de la radiothérapie ^{175,177,238}.

Conclusion générale et perspectives

Aujourd'hui, la survie globale des patients atteints de cancer colorectaux métastatiques a été fortement améliorée par les combinaisons de chimiothérapies conventionnelles à base de 5-FU, d'oxaliplatine et/ou d'irinotécan et de thérapies dirigées contre le récepteur de l'EGF ou le VEGF. Cependant, la résistance innée et acquise aux traitements est une cause fréquente d'échec thérapeutique.

C'est pourquoi mon projet de thèse, en accord avec la thématique de l'équipe, vise à découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou de nouveaux biomarqueurs dans la résistance aux traitements utilisés pour traiter le cancer colorectal.

Pour répondre à cet objectif, nous avons effectué plusieurs criblages phénotypiques par ARN interférence en ciblant les gènes du kinome humain pour découvrir des kinases respectivement impliquées dans la résistance à l'oxaliplatine, à l'irinotécan ou aux thérapies anti-EGFR (cétuximab, panitumumab, erlotinib). Le but final de ce projet étant de révéler des kinases dont l'inhibition provoque une interaction létale avec l'un des traitements utilisés. Pour ce faire, nous avons adapté cette technique de criblage à la lignée d'adénocarcinome colique HCT116, résistante aux thérapies anti-EGFR, ainsi qu'à des lignées clonales résistantes à l'oxaliplatine (HCT116-R1) ou à l'irinotécan (G7) générées au laboratoire à partir de cette même lignée cellulaire.

Les résultats obtenus par criblages phénotypiques dans des lignées présentant une résistance acquise aux médicaments cytotoxiques (HCT116-R1 et G7) nous ont permis de mettre en évidence deux protéines impliquées dans la résistance à l'oxaliplatine, ATR et ROR2 ainsi que deux protéines impliquées dans la résistance à l'irinotécan, ATM et RAC1. Tandis que l'intérêt des protéines ATR et DDR2 dans la résistance aux thérapies anti-EGFR a été confirmé dans la lignée HCT116, la première en combinaison avec le panitumumab, la seconde en association avec le cetuximab et le panitumumab. Les autres kinases potentiellement impliquées dans la résistance aux thérapies anti-EGFR (YSK4 et TNNI3K) n'ont pu être confirmées par ARN interférence et ne possèdent pas d'inhibiteur spécifique, cependant dans l'étude de Boehme et al.²⁰⁸ il est fait mention de certains composés en développement utilisés pour inhiber la protéine YSK4 que nous pourrions tester (Tableau 6).

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus à la suite des trois criblages phénotypiques

Traitements utilisés	Gène	Confirmation par ShRNA	Confirmation par anticorps / inhibiteur spécifique
SN-38	ATM	Non fait	✓
	RAC1	✓	✓
Oxaliplatine	ATR	✓	✓
	ROR2	✓	En cours
Cétuximab	ATR	Non fait	✗
	DDR2	Tendance (ns)	✓
	TNNI3K	ShRNA non effectifs	Inhibiteur non disponible
	YSK4	✗	Inhibiteur non disponible
Panitumumab	ATR	Non fait	✓
	DDR2	✗	✓
	TNNI3K	ShRNA non effectifs	Inhibiteur non disponible
	YSK4	Tendance (ns)	Inhibiteur non disponible
Erlotinib	YSK4	Tendance (ns)	Inhibiteur non disponible



Validé



Non validé

ns: non significatif

Dans la résistance à l'irinotécan, l'implication des cibles potentielles ATM et RAC1 a été confirmée. Cependant, l'inhibiteur d'ATM utilisé dans la lignée résistante G7 n'est fortement synergique (indice > 15) avec le SN-38 qu'à des concentrations inhibant à la fois ATM, PI3K et DNA-PK. L'impact de l'inhibition d'ATM est donc limité dans ce contexte, le potentiel de cette inhibition devra tout de même être testé en culture 3D et/ou avec un inhibiteur plus spécifique¹⁷² (ex : KU59403 ou AZD0156¹⁷⁴) avant de pouvoir conclure sur cette cible. L'inhibition de RAC1 combinée au SN-38 semble plus prometteuse dans la lignée résistante G7, il faudrait donc confirmer cette cible dans d'autres modèles de résistance à l'irinotécan. À noter que de nouveaux inhibiteurs plus spécifiques de RAC1 potentiellement utilisables en clinique sont disponibles¹⁸⁹.

Les cibles potentielles obtenues à la suite du criblage phénotypique effectué dans la lignée clonale résistante à l'oxaliplatine ont été confirmées. L'interaction létale entre ROR2 et l'oxaliplatine a, à ce stade, seulement été confirmée par ShRNA. Cependant, des résultats préliminaires intéressants ont été obtenus avec deux anticorps candidats sélectionnés par la

plateforme GenAC. Il reste donc à reproduire ces résultats *in vitro*, puis à choisir l'anticorps candidat le plus prometteur pour poursuivre les études *in vivo*. D'une part, pour observer l'ADCC qu'induit l'anticorps anti-ROR2 (format IgG1) et, d'autre part, pour prendre en compte l'ICD résultant de l'utilisation de l'oxaliplatine.

ATR, cible la plus prometteuse, identifiée comme un déterminant de la résistance à l'oxaliplatine, joue un rôle clé dans la réparation de l'ADN à la suite de divers dommages à l'ADN et de stress réplcatif. La combinaison entre l'inhibiteur d'ATR (VE-822 aussi appelé VX-970) et l'oxaliplatine montre une forte synergie, et ce, pour des concentrations minimales de traitement dans différentes lignées cellulaires de cancer colorectal et modèles de résistance à l'oxaliplatine (HCT116, HCT116-R1, HCT116-R2, SW48, SW48-R1, SW620) en 3D. De plus, *in vivo*, à des concentrations pour lesquelles chaque traitement seul n'a aucun effet, la combinaison de ces molécules est efficace, réduisant significativement la croissance des xénogreffes de HCT116-R1 chez des souris nude.

Dans la lignée HCT116-R1 l'effet synergique de l'oxaliplatine et du VE-822 s'accompagne d'une augmentation de la présence d'ADN simple brin suivie de nombreuses cassures double brin de l'ADN, d'un arrêt de la prolifération et d'une induction de l'apoptose. L'apparition de ces dommages à l'ADN est également corrélée avec l'activation de la voie ATM, de p53 et l'inhibition de l'activité CDK2. De plus, *in vitro* le double traitement provoque une augmentation des signaux moléculaires à l'origine de la mort cellulaire immunogène par rapport au traitement par l'oxaliplatine seul.

Enfin, *in vivo* l'association de l'oxaliplatine et du VE-822 est également efficace, sur la lignée de cancer colorectal murin MC38 greffée dans un modèle de souris immunologiquement compétent avec un effet synergique permettant un contrôle tumoral de plus de la moitié du groupe traité. Dans le modèle nude, seule une diminution de la croissance tumorale des cellules HCT116-R1 avait été observée. Ces résultats indiquent que la mort immunitaire (ICD) fait partie du mécanisme d'action de cette combinaison de médicaments.

En conclusion, grâce à l'adaptation d'une technique de criblage phénotypique dans des lignées résistantes à différents traitements du CCR nous avons mis en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et démontré pour la première fois le rôle fonctionnel de la protéine ATR dans la sensibilité à l'oxaliplatine.

Pour compléter ce projet, *in vitro*, les études sur l'origine du stress réplcatif dans la lignée HCT116-R1 exposée au double traitement vont se poursuivre pour comprendre l'origine de la synergie entre VE-822 et oxaliplatine. Pour y répondre, nous étudierons la vitesse des fourches de réplcation, ainsi que la présence ssDNA cytoplasmique. D'autre part, l'origine de la résistance à l'oxaliplatine de ce modèle cellulaire doit être découverte. À cette fin, nous étudierons la quantité d'adduits de platine ainsi que l'expression de protéines impliquées dans la voie NER ou HR dans le modèle HCT116-R1 et HCT116. Par la suite, l'efficacité de la combinaison de traitement (VE-822 et oxaliplatine) devra être testée pour d'autres localisations cancéreuses pouvant être traitées avec de l'oxaliplatine en clinique (pancréas, ovaire). De plus, au vue des résultats du criblage consacré aux thérapies anti-EGFR, il pourra également être envisagé de tester une triple combinaison (oxaliplatine, panitumumab et VE-822) dans les lignées HCT116 et HCT116-R1. *In vivo*, nous souhaitons tester la combinaison VE-822 et oxaliplatine dans un modèle de souris greffée par PDX (*patient derived xenograft*) de cancer colorectal issus d'un patient traité par le protocole FOLFOX. Enfin, l'étude de l'impact du traitement par la combinaison VE-822 et oxaliplatine sur l'ICD sera poursuivie en effectuant le suivi des différents compartiments immunitaires au court du temps dans un modèle murin immunocompétent xénogreffé.

D'un point de vue scientifique, ces travaux ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux agents cytotoxiques, plus particulièrement à l'oxaliplatine en démontrant le rôle du stress réplcatif dans ce phénomène. De plus, la combinaison entre l'oxaliplatine et le VE-822 permet de diminuer fortement les concentrations de chacune des thérapies utilisées en conservant une forte toxicité pour les cellules cancéreuses. Enfin, nous démontrons également pour la première fois le potentiel du VE-822 combiné à l'oxaliplatine dans l'induction de l'ICD. Ainsi, les résultats de ce travail vont conduire à la mise en place d'un premier essai clinique combinant le VE-822 et l'oxaliplatine, pouvant offrir à terme, une alternative thérapeutique aux patients souffrants de CCR métastatiques devenus résistants au protocole FOLFOX. D'autre part, la valeur pronostique de la signature moléculaire mise en évidence dans l'article pourrait également permettre l'orientation des patients vers une thérapie à base d'oxaliplatine ou vers des protocoles basés sur d'autres médicaments cytotoxiques en fonction du « score » obtenu après l'analyse du transcriptome tumoral.

ANNEXES

Keywords: cetuximab; FOXO3a; MAPK p38; colorectal cancer; signalling

FOXO3a and the MAPK p38 are activated by cetuximab to induce cell death and inhibit cell proliferation and their expression predicts cetuximab efficacy in colorectal cancer

L Marzi^{1,2,3,4,7}, E Combes^{1,2,3,4,7}, N Vié^{1,2,3,4}, A Ayrolles-Torro^{1,2,3,4}, D Tosi^{1,2,3,4}, D Desigaud^{1,2,3,4}, E Perez-Gracia^{1,2,3,4}, C Larbouret^{1,2,3,4}, C Montagut⁵, M Iglesias⁵, M Jarlier^{1,2,3,4}, V Denis^{1,2,3,4}, L K Linares^{1,2,3,4}, EW-F Lam⁶, P Martineau^{1,2,3,4}, M Del Rio^{1,2,3,4} and C Gongora^{*,1,2,3,4}

¹IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France; ²INSERM, U1194, Montpellier F-34298, France; ³Université Montpellier, Montpellier F-34298, France; ⁴Institut régional du Cancer Montpellier, Montpellier F-34298, France; ⁵Department of Medical Oncology, Hospital del Mar, Barcelona 08003, Spain and ⁶Department of Surgery and Cancer, Imperial Centre for Translational and Experimental Medicine (ICTEM), Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, London W12 0NN, UK

Background: Cetuximab, a monoclonal antibody against EGFR used for the treatment of colorectal cancer (CRC), is ineffective in many patients. The aim of this study was to identify the signalling pathways activated by cetuximab in CRC cells and define new biomarker of response.

Methods: We used *in vitro*, *in vivo* models and clinical CRC samples to assess the role of p38 and FOXO3a in cetuximab mechanism of action.

Results: We show that cetuximab activates the MAPK p38. Specifically, p38 inhibition reduced cetuximab efficacy on cell growth and cell death. At the molecular level, cetuximab activates the transcription factor FOXO3a and promotes its nuclear translocation via p38-mediated phosphorylation, leading to the upregulation of its target genes *p27* and *BIM* and the subsequent induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation. Finally, we found that high FOXO3a and p38 expression levels are associated with better response rate and improved outcome in cetuximab-treated patients with CRC harbouring WT KRAS.

Conclusions: We identify FOXO3a as a key mediator of cetuximab mechanism of action in CRC cells and define p38 as its activator in this context. Moreover, high FOXO3a and p38 expression could predict the response to cetuximab in patients with CRC harbouring WT KRAS.

Colorectal cancer (CRC) is the fourth most common cancer worldwide. In 2012, the estimated CRC incidence was of 1.3 million cases worldwide and CRC caused >700 000 deaths (Ferlay *et al.*, 2010). CRC is classified into four stages from the TNM classification data. The cure for CRC depends on the stage at which

it is detected. The first treatment is the surgical resection which removes the colonic segment with the tumour and the surrounding lymph nodes, which can be carriers of micrometastases. This surgery is accompanied by chemotherapy for stage III and IV or radiochemotherapy for advanced rectal cancers. In all, 30% of

*Correspondence: Dr C Gongora; E-mail: celine.gongora@inserm.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Revised 8 July 2016; accepted 6 September 2016

© 2016 Cancer Research UK. All rights reserved 0007–0920/16

patients present synchronous metastases and 50–60% will develop metastases that will require chemotherapy. The current management is based on various drugs (5-FU/LV, capecitabine, irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab and panitumumab) either in combination or as single agents (Van Cutsem *et al.*, 2010). Thanks to these treatments, the patients' overall survival has been significantly improved, but tumour resistance is still a frequent cause of therapy failure.

Among the drugs used in CRC treatment, cetuximab is a monoclonal antibody that targets the extracellular domain of epithelial growth factor receptor (EGFR) and can overcome acquired resistance to irinotecan chemotherapy (Cunningham *et al.*, 2004). However, patients with KRAS-mutated metastatic CRC (mCRC) do not benefit from this treatment (Amado *et al.*, 2008; Karapetis *et al.*, 2008) and 40–60% of patients with wild-type KRAS mCRC do not respond to cetuximab. Cetuximab binding to EGFR inhibits receptor activation and, subsequently, signal transduction of the RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT pathways (Okada *et al.*, 2014). This leads to cell cycle arrest and/or induction of apoptosis. The downstream cellular targets of cetuximab are not fully characterised and most of the transcription factors induced by cetuximab have not been identified.

The serine/threonine MAPK p38 (Zarubin and Han, 2005) is activated through phosphorylation at the Thr¹⁸⁰-Gly-Tyr¹⁸² motif by MKK3, MKK4 and MKK6 (Wilson *et al.*, 1996). Phosphorylated p38 activates a wide range of substrates, leading to diverse responses, such as cell differentiation, cell cycle arrest, apoptosis, senescence, cytokine production, regulation of RNA splicing and inflammatory responses (Cuenda and Rousseau, 2007). We previously showed that p38 is activated by treatment with SN38 (the active metabolite of irinotecan) and that pharmacological inhibition of p38 overcomes irinotecan and SN38 resistance (Paillas *et al.*, 2011). Recently, Ho *et al.* (2012) showed that p38 can phosphorylate the transcription factor FOXO3a and contributes to its nuclear localisation and activation. FOXO3a biological activity is mainly modulated via inhibitory phosphorylation by the PI3K/AKT and MEK/ERK pathways (Biggs *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2008; van der Vos and Coffey, 2011). Conversely, inhibition of AKT and ERK can lead to de-phosphorylation, nuclear localisation of FOXO3a and to its activation. This activation induces cell cycle arrest and/or apoptosis through upregulation of its target genes, such as *p27^{Kip1}* (*CDKN1B*) and *BIM* (van der Vos and Coffey, 2011).

In the present study, we investigated the molecular pathways induced by cetuximab and involved in cetuximab-mediated cell proliferation inhibition and apoptosis induction. Particularly, we explored the role of p38 in FOXO3a regulation in response to cetuximab in wild-type KRAS CRC cells. Finally, we studied FOXO3a and p38 expression levels in CRC samples and correlated them with the patients' response to cetuximab treatment.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Cetuximab (Erbix) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). SB202190 and SP600125 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lapatinib (Tyverb) and erlotinib (Tarceva) were purchased from ICM (Montpellier, France). Primary antibodies against phospho-p38, phospho-AKT, phospho-ERK, phospho-JNK, phospho-ATF2, p38 α , cleaved-caspase 3, tubulin, FOXO3a, BIM and p27 were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); the anti-FOXO3a-phosphoSer7 antibody was obtained from EW-F Lam (Ho *et al.*, 2012). Secondary antibodies were horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antisera (Sigma-Aldrich).

Kinase assay. The p38 kinase assay was performed using the non-radioactive p38 MAPK Assay Kit from Cell Signaling Technology, as previously described (Gongora *et al.*, 2008).

Cell culture and retroviral infections. The human EGFR-over-expressed, WT KRAS, rectum adenocarcinoma DiFi cell line was obtained from Dr Clara Montagut (Montagut *et al.*, 2012; Siravegna *et al.*, 2015). Cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂. DiFi cells expressing ShRNAs targeting *luciferase*, *p38 α* , *FOXO3a*, *BIM* and *p27* were obtained by retroviral gene transduction of the pSIREN vector in which the ShRNAs were cloned. Cells were selected with 1 μ g ml⁻¹ puromycin and then stable clones were pooled.

Plasmids. The pCMV-FLAG-tagged human wild-type FOXO3a and mutated FOXO3a S7A expression vectors have been previously described (Ho *et al.*, 2012).

Subcellular protein extraction and immunoprecipitation. In all, 3×10^6 DiFi cells were scraped, lysed and centrifuged at 3500 r.p.m. Supernatants containing cytosolic proteins were stored. Pellets were then lysed in 3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and protease inhibitors, and then vortexed to obtain the nuclear protein fraction. Immunoprecipitations were performed using 0.4 mg of proteins, protein A/G magnetic beads (Pierce, Waltham, MA, USA) and the anti-FOXO3a antibody (Cell Signaling Technology).

Immunofluorescence. Cells were plated on 12 mm glass coverslips in culture dishes. They were fixed in 3.7% formaldehyde, blocked in PBS with 1% BSA and 0.3% Triton and incubated with an anti-FLAG monoclonal antibody Sigma-Aldrich and then with an anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). DAPI was used to stain nuclei. Coverslips were then mounted in Moviol and images were recorded using a 63XNA objective and a Leica inverted microscope (Wetzlar, Germany).

RNA preparation and RT-qPCR. Total RNA was isolated from DiFi cells using the RNeasy mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with a DNase digestion step. Total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed using the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using the LC480 cyclor (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to the manufacturer's instruction. The amplification specificity was verified by melting curve analysis. Real-time PCR values were determined by reference to a standard curve that was generated by real-time PCR amplification of a serially diluted cDNA sample using primers specific for *p27*, *BIM* and *28s*. The quantification data were normalised to the amplification data for the reference gene *28s*.

Drug sensitivity assay. Cell growth inhibition and cell viability after cetuximab incubation were assessed using the sulforhodamine B (SRB) assay, as previously described (Candeil *et al.*, 2004; Paillas *et al.*, 2011).

Cell death analysis. Cell death analysis was performed using the Annexin V-FITC/7-AAD Kit (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Cells were incubated with 0.5 μ g ml⁻¹ cetuximab, 5 μ M SB202190, or 0.5 μ g ml⁻¹ cetuximab + 5 μ M SB202190 for 48 h. Cells (1×10^6) and the corresponding supernatants were labelled using the Annexin V-FITC/7-AAD Kit (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Analyses were done on a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer (Beckman Coulter). Annexin V-FITC positive cells were quantified using the Flow Jo analysis software (Treestar, Ashland, OR, USA).

Cell cycle analysis. Cells were treated with 0.5 μ g ml⁻¹ cetuximab, 5 μ M SB202190, or 0.5 μ g ml⁻¹ cetuximab + 5 μ M SB202190 for 48 h. In all, 1×10^6 cells were pelleted, washed with PBS, fixed in 75% ethanol, treated with 100 μ g ml⁻¹ RNase (Qiagen) and stained with 40 μ g ml⁻¹ propidium iodide. The cell cycle

distribution was determined with a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer using the FL-3 channel. Cells were gated on a dot plot that displayed the DNA-pulse-peak vs the DNA-pulse area to exclude doublets. Cell cycle distributions were illustrated using the Flow Jo analysis software (Treestar, FLOWJO, Ashland, OR, USA).

Cell proliferation analysis. Cell proliferation was measured by incorporating 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) into DNA during the active DNA synthesis (i.e., the last 30 h of culture). After cell fixation—permeabilization in 75% ethanol/PBS—incorporated EdU was labelled and detected with the Click-IT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen). Analyses were done on a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer. Alexa Fluor 488-conjugated EdU-positive cells were quantified using the Flow Jo analysis software (Treestar).

In vivo studies

Xenografts. Female athymic *nu/nu* mice were purchased from Harlan Laboratories (Gannat, France) and used when 6–8-week-old. A total of 2×10^6 DiFi or Caco2 tumour cells in Matrigel were injected subcutaneously (s.c.) into the left flank of each mouse. Tumours were detected by palpation and measured with calipers weekly (or every 10 days). Mice were killed when the tumour volume reached 1000 mm^3 . We obtained ethical approvals for these experiments (ethics committee approved by the French Ministry, animal facility approval C34-172-27, personal approval (Cécile Gongora) 34.142 and protocol approval CEEA-LR-12104).

Cetuximab and SB202190 treatment. When tumours reached the volume of 100 mm^3 , mice were treated with: (i) 5 mg kg^{-1} cetuximab by intraperitoneal (i.p.) injection twice per week for 4 weeks; (ii) 0.2 ml of 0.9% sodium chloride solution (control group) by i.p. injection twice per week for 4 weeks; (iii) $0.05 \mu\text{mol kg}^{-1}$ SB202190 (stock solution diluted in 0.9% sodium chloride) by i.p. injection five times per week for 4 weeks; or (iv) cetuximab + SB202190: 5 mg kg^{-1} cetuximab twice per week + $0.05 \mu\text{mol kg}^{-1}$ SB202190 five times per week, both for 4 weeks.

Statistical analysis. A linear mixed-regression model, containing both fixed and random effects, was used to determine the relationship between tumour growth and number of days after grafting. BLI data were first transformed using the natural log scale to better fit the assumptions of the linear mixed model. The fixed part of the model included variables corresponding to the number of post-graft days and the different treatments. Interaction terms were built into the model; random intercepts and random slopes were included to take time into account. The coefficients of the model were estimated by maximum likelihood and considered significant at the 0.05 level. Statistical analysis was performed using the STATA 10.0 software (Stata Corp., College Station, TX, USA).

Clinical samples. We have recovered from public database transcriptome data of the cetuximab-treated patient's cohort of Khambata-Ford data set, (GSE5851; Khambata-Ford *et al.*, 2007) that includes gene-expression data from 80 patients with mCRC enrolled for treatment with cetuximab monotherapy. Authors indicate that written informed consent was obtained from all patients before they entered the study. The protocol was approved by the institutional review boards at the participating institutions. On the basis of the assessment of the best clinical response, patients with mCRC harbouring WT KRAS ($n=43$) could be classified as responders (partial response, $n=5$; and stable disease, $n=15$; total = 20) and non-responders (progressive disease, $n=19$). The response in 4 of these 43 patients could not be determined. KRAS status was assessed in 69 patients (WT KRAS = 42 and mutated KRAS = 27).

RESULTS

The MAPK p38 is activated by cetuximab. Cetuximab inhibits EGFR activation and subsequently signal transduction of the RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways. However, its impact on other major cell signalling pathways is not clear. Here, we analysed cetuximab effect on the two stress kinases JNK and p38. To this aim, we used the DiFi colon cancer cell line that is characterised by high-level EGFR amplification, WT KRAS and BRAF and is highly sensitive to cetuximab. Indeed, exposure to very low cetuximab concentrations leads to growth arrest and apoptosis (Lu *et al.*, 2007a, b; Montagut *et al.*, 2012; Kawakami *et al.*, 2014). Western blot analysis using anti-p38 and -JNK phospho-specific antibodies showed an increase of p38 and JNK phosphorylation in the DiFi human CRC cell line following incubation with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of cetuximab for 24 h (Figure 1A). As expected, AKT and ERK phosphorylation were strongly decreased in cetuximab-treated DiFi cells, indicating that DiFi cells respond accurately to this anti-EGFR treatment.

We then analysed whether JNK and p38 activation had a functional impact on cetuximab effect on cell death and proliferation. To this aim, we inhibited JNK or p38 with specific inhibitors (SP600125 for JNK and SB202190 for p38) and then tested cetuximab cytotoxicity using the SRB assay (Figure 1B). Cetuximab cytotoxicity was not affected by JNK inhibition, but was greatly reduced following p38 inhibition, as indicated by the higher IC_{50} of cetuximab (55 ng ml^{-1}) when associated with SB202190 compared with when used alone (35 ng ml^{-1} ; P -value: 0.005). This indicates that inhibition of p38 makes DiFi cells more resistant to cetuximab.

We then measured phosphorylation of the p38 target protein ATF2 by kinase assay to evaluate the effect of cetuximab and SB202190 on p38 activity (Figure 1C, upper panel). ATF2 phosphorylation was increased in cetuximab-treated DiFi cells and this effect was lost when cetuximab was combined with SB202190. Immunoblot analysis using a phospho-specific anti-p38 antibody confirmed cetuximab effect on p38 basal activity (Figure 1C, lower panel). We then investigated whether inhibition of p38 activity by SB202190 could affect also cetuximab-mediated ERK and AKT inhibition (Figure 1D). SB202190 alone reduced only slightly AKT phosphorylation, but strongly inhibited AKT phosphorylation when in combination with cetuximab. Conversely, SB202190 increased ERK phosphorylation when used alone, and reduced cetuximab-mediated inhibition of ERK phosphorylation when associated with the antibody.

These data suggest that the MAPK p38 is activated by cetuximab and contributes to its cytotoxic effect.

The MAPK p38 is necessary for the cytotoxic effect of EGFR-targeting compounds. We then investigated the effect of p38 activity inhibition on cetuximab sensitivity in mice injected s.c. with DiFi cells. When tumours reached 100 mm^3 , xenografted mice were divided in four groups: one group was left untreated, one was treated with cetuximab alone, one with SB202190 alone, and the last group with cetuximab and SB202190 (Figure 1E). Cetuximab was the most effective treatment compared with no treatment ($P<0.001$) or SB202190 alone ($P<0.001$), which had only a minor effect on tumour growth. The combination of cetuximab and SB202190 also was less effective than cetuximab alone ($P=0.022$). This result confirms the previous observation obtained *in vitro* (Figure 1B) and provides evidence that inhibition of p38 activity can partially inhibit sensitivity to cetuximab *in vivo*.

We then tested *in vitro*, whether p38 silencing could affect cetuximab cytotoxic activity in the same way as the p38 inhibitor SB202190. By using the SRB assay we showed that sensitivity to cetuximab was reduced in DiFi cells in which p38 was

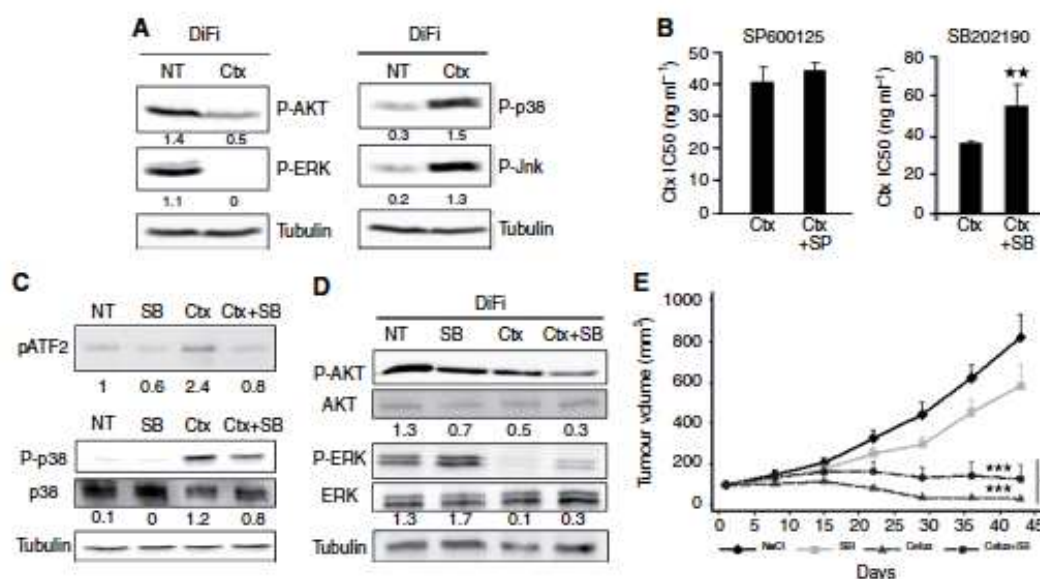


Figure 1. The MAPK p38 is activated by cetuximab. (A) Western blot analysis of phospho-AKT (P-AKT), phospho-ERK (P-ERK), phospho-p38 (P-p38) and phospho-JNK (P-JNK) in DiFi cells incubated with cetuximab (Cbx) for 24 h. Equal loading is shown by tubulin (Tub). (B) SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells incubated with cetuximab alone or together with the JNK inhibitor SP600125 (SP) or the p38 inhibitor SB202190 (SB). (C) Top panel: kinase assay to test p38 activity (performed with immunoprecipitated P-p38) in cells incubated with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab alone (Cbx), 5 μM SB202190 (SB) alone or with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Cbx + SB) for 24 h. Western blot analysis of phosphorylated ATF2. Lower panels: western blot analysis of P-p38 and total p38 expression level in DiFi cells incubated with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab alone (Cbx), 5 μM SB202190 (SB) alone or 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Cbx + SB) for 24 h. Equal loading is shown by tubulin (Tub). (D) Western blot analysis of AKT, P-AKT, ERK and P-ERK in DiFi cells incubated with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab alone (Cbx), 5 μM SB202190 (SB) alone or with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Cbx + SB) for 24 h. Equal loading is shown by tubulin. NT, not treated. ** $P < 0.01$. (E) Tumour growth inhibition experiment assessed in nude mice xenografted with DiFi cells and treated with SB202190, cetuximab or cetuximab + SB202190.

downregulated by ShRNA (Shp38x1 and Shp38x2; Figure 2A, left panels) compared with control cells (shLuc), as indicated by their significantly different IC₅₀ values (ShLuc: 41.7 nM; Shp38x1: 67.2 nM, P -value: 0.008; Shp38x2: 74.5 nM, P -value: 0.032; Figure 2A, right panel).

We thus asked whether p38 could also be involved in the effect of other drugs targeting EGFR, such as the two tyrosine kinase inhibitors (TKI) lapatinib (EGFR and HER2 inhibitor) and erlotinib (EGFR inhibitor). Using the SRB assay and the p38 inhibitor SB202190, we found that the cytotoxic activity of lapatinib (Figure 2B) and erlotinib (Figure 2C) in DiFi cells was significantly reduced when they were associated with SB202190, as shown by their IC₅₀ (680 nM for lapatinib alone and 1385 nM for lapatinib + SB202190, P -value: 0.0007; 150 nM for erlotinib alone and 300 nM for erlotinib + SB202190, P -value: 0.0006). These results indicate that CRC cell sensitivity to cetuximab and anti-EGFR TKIs is dependent, at least in part, on p38 activity.

We then confirm the effect of p38 downregulation or inhibition on cetuximab cytotoxic effect on three other KRAS WT CRC cell lines: LIM1215 (Figures 2D and E), Caco2 and SW48 (Supplementary Figure 2). By using the SRB assay we showed that sensitivity to cetuximab was reduced in LIM1215 cells in which p38 was downregulated by ShRNA (Shp38x1 and Shp38x2; Figure 2D, left panels) compared with control cells (shLuc). Moreover, we showed that cetuximab cytotoxicity was reduced following p38 inhibition with SB202190 compared with when used alone in LIM1215 (Figure 2E) and Caco2 and SW48 cells (Supplementary Figures 2A and C). Finally, we also confirm the effect of p38 activity inhibition on cetuximab sensitivity *in vivo* in Caco2 cells (Supplementary Figure 2B).

The MAPK p38 participates in the apoptotic and anti-proliferative effects of cetuximab. We then investigated whether p38 role in cetuximab effect involves increase of cell death or inhibition of cell proliferation. Immunoblot analysis of cleaved-caspase 3 expression after incubation of DiFi cells with increasing doses of cetuximab for 24 h indicated that 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab was sufficient to induce caspase cleavage (Figure 3A). We then assessed apoptosis using increasing concentrations of cetuximab for 48 h with two other assays: (i) identification of Annexin V-positive cells (Figure 3B, upper panels), representative of early apoptosis, and (ii) quantification of cells in the subG1 phase (Figure 3B, lower panels), representative of late apoptosis. The results of these assays indicated that apoptosis of DiFi cells was induced by 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (24% Annexin V-positive cells and 24.3% subG1 cells) and the percentage of apoptotic cells increased with the concentration of cetuximab. These experiments demonstrate unequivocally that cetuximab induces apoptosis in DiFi cells.

We then analysed the combined effect of cetuximab (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and SB202190 on apoptosis using the three methods described above (Figures 3C–E). Cetuximab alone induced apoptosis in DiFi cells, while SB202190 alone had no effect. Conversely, when associated with cetuximab, SB202190 reduced cetuximab-induced apoptosis. Specifically the percentage of Annexin V-labelled cells (Figure 3C) and subG1 cells (Figure 3D) decreased from 24% and 29% (cetuximab) to 12% and 13% (cetuximab + SB202190), respectively, (P -value: 2×10^{-7}). Similarly, immunoblot analysis (Figure 3E) showed that induction of caspase 3 cleavage by cetuximab was reduced when SB202190 was associated. These results demonstrate that the MAPK p38 contributes to the apoptotic effect of cetuximab in DiFi cells.

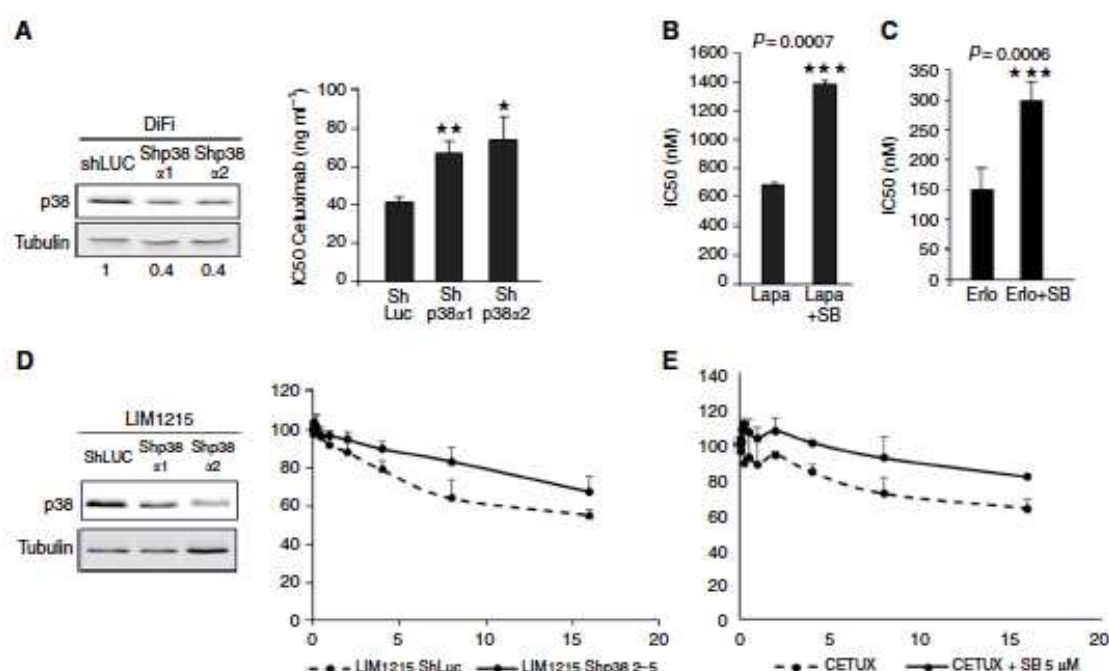


Figure 2. The MAPK p38 is necessary for the cytotoxic effect of EGFR-targeted therapies. **(A)** Left panel: western blot analysis of p38α expression in DiFi cells transduced with ShRNAs against p38α (Shp38α1 and Shp38α2) or against Luciferase (ShLuc; control). Equal loading is shown by tubulin. Right panel: SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells transduced with two different ShRNAs against p38α (Shp38α1 and Shp38α2). **(B)** SRB assays to assess the cytotoxicity of lapatinib (Lapa) or erlotinib (Erlo); **(C)** alone or in combination with 5 μM SB202190 (SB, p38 inhibitor) in DiFi cells. NT, not treated. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. **(D)** Left panel: western blot analysis of p38α expression in LIM1215 cells transduced with ShRNAs against p38α (Shp38α1 and Shp38α2) or against Luciferase (ShLuc; control). Equal loading is shown by tubulin. Right panel: SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in LIM1215 cells transduced with ShRNA against p38α. **(E)** SRB assays to assess the cytotoxicity of cetuximab alone or in combination with 5 μM SB202190 (SB, p38 inhibitor) in LIM1215 cells.

Next, we tested the effect of cetuximab and SB202190 on cell proliferation and cell cycle. Cetuximab inhibited cell proliferation as indicated by the reduction of EdU-positive DiFi cells (from 75% in untreated cells to 10.7% in cetuximab-treated cells; P -value 3.1×10^{-7} ; Figure 3F). Cetuximab inhibition of cell proliferation was significantly reduced when SB202190 was also added (40.4% EdU-positive cells compared with only 10.7% with cetuximab alone), indicating that p38 is also necessary for cetuximab anti-proliferative effect. Furthermore, cetuximab-induced accumulation of cells in the G1 phase (from 56% in untreated to 74% in cetuximab-treated DiFi cells, P -value: 0.01; Figure 3G) was not observed when SB202190 was associated with cetuximab (61% of cells in G1 in cetuximab + SB202190 DiFi cells, P -value: 0.03 compared with cetuximab). Altogether these results demonstrate that the MAPK p38 is necessary for cetuximab functional activity and is involved in apoptosis induction and proliferation inhibition.

Cetuximab activates the transcription factor FOXO3a in a MAPK p38-dependent manner. We then tried to identify transcription factor(s) involved in cetuximab effect on cell growth and apoptosis. As cetuximab inhibits the AKT and ERK signalling pathways and activates the MAPK p38 pathway, we focused on FOXO3a, because it is inactivated by ERK and AKT and can be activated by p38 (Roy *et al*, 2010; Ho *et al*, 2012). Phosphorylation by ERK and AKT results in FOXO3a cytoplasmic accumulation and subsequent degradation, while phosphorylation by p38 leads to FOXO3a nuclear re-localisation and activation (Ho *et al*, 2012). Immunoblot analysis of cytoplasmic and nuclear extracts from DiFi cells treated with cetuximab showed that FOXO3a was detected easily in the cytoplasmic fraction (Figure 4A, upper left panel), but was hardly detectable in the nuclear fraction. Therefore, to enrich FOXO3a in the nuclear fraction we performed

immunoprecipitation experiments with an antibody targeting FOXO3a and then immunoblot analysis (Figure 4A, upper right panel). We could thus detect FOXO3a also in the nucleus of non-treated cells, and show that, after incubation with cetuximab for 1 h, FOXO3a decreased in the cytoplasm and increased in the nucleus.

As p38 can phosphorylate and activate FOXO3a (Ho *et al*, 2012) and p38 is activated by cetuximab, we investigated whether p38 phosphorylated FOXO3a in DiFi cells incubated with cetuximab. Immunoprecipitation of FOXO3a in nuclear extracts after treatment with cetuximab or cetuximab + SB202190 (Figure 4A, lower panels) showed that nuclear accumulation of FOXO3a after cetuximab treatment was inhibited when the p38 inhibitor SB202190 was added. Moreover, immunoblotting of the immunoprecipitated proteins with an antibody against FOXO3a phosphorylated at ser-7 (p38-specific phosphorylation of FOXO3a) showed that phosphorylated FOXO3a on ser-7 was enriched in cells incubated with cetuximab, whereas it was diminished when SB202190 was associated with cetuximab. Altogether, these results indicate that cetuximab-induced nuclear accumulation of FOXO3a is dependent on p38 activity. To confirm this result, we examined by immunofluorescence staining the subcellular localisation of FLAG-tagged wild-type FOXO3a in DiFi cells incubated or not with cetuximab, SB202190 or both (Figure 4B). The efficacy of transfection was low, but we could detect some cells expressing tagged FOXO3a. Consistent with the previous results, FOXO3a was localised predominantly in the cytoplasm in untreated cells and almost exclusively in the cytoplasm in SB202190-treated cells. Conversely, FOXO3a was predominantly in the nucleus after incubation with cetuximab, but was delocalised to the cytoplasm when SB202190 was associated with cetuximab. On the other hand, in cells that express a ser-7-phosphorylation-deficient FLAG-

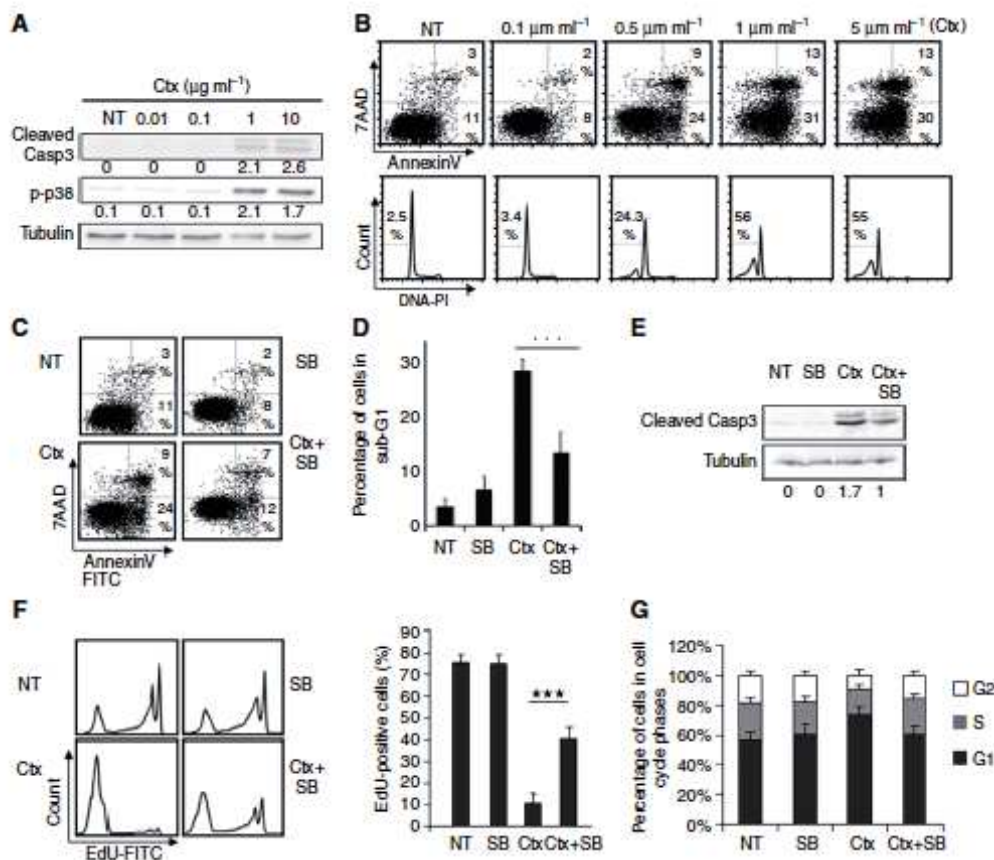


Figure 3. The MAPK p38 participates in cetuximab apoptotic and anti-proliferative effect. (A) Western blot analysis of cleaved-caspase 3 (Cleaved Casp3) or phospho-p38 (p-p38) in DiFi cells incubated with increasing concentrations of cetuximab (Cbx, 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for 48 h. Equal loading was assessed with an anti-tubulin antibody. (B) DiFi cells were incubated with increasing concentrations of cetuximab (Cbx) for 48 h and apoptosis was determined by quantifying the number of 7AAD-negative and Annexin V-positive cells with a FC500 flow cytometer (top panels) or by quantifying the proportion of cells in the subG1 phase of the cell cycle (lower panels). (C) Quantification of apoptosis in DiFi cells incubated with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Cbx) alone, 5 μM SB202190 alone (SB) or 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Cbx + SB) for 48 h by calculating the number of 7AAD-negative and Annexin V-positive cells with a FC500 flow cytometer or (D) the proportion of cells in the subG1 phase of the cell cycle. (E) Western blot analysis of cleaved-caspase 3 (Cleaved Casp3) in DiFi cells incubated with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Cbx) alone, 5 μM SB202190 (SB) alone or 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Cbx + SB) for 24 h. Equal loading was assessed with an anti-tubulin antibody. (F) Cell proliferation was analysed by quantifying the percentage of Edu-labelled DiFi cells after incubation with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Cbx) alone, 5 μM SB202190 alone (SB) or 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Cbx + SB) for 48 h (left panels). The histogram shows the mean of three experiments (right panel). (G) Cell cycle distribution in DiFi cells was assessed by quantifying propidium iodide staining with a FC500 flow cytometer after incubation with 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Cbx) alone, 5 μM SB202190 alone (SB) or 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + 5 μM SB202190 (Cbx + SB) for 48 h. NT, not treated. *** $P < 0.001$.

tagged FOXO3a mutant (FOXO3a-A7; Figure 4D), nuclear re-localisation of FOXO3a-A7 in response to cetuximab treatment was reduced compared with wild-type FOXO3a. These results show that FOXO3a can be activated by cetuximab in CRC cells and that this activation is dependent on its phosphorylation on ser-7 by p38 (Figure 4C, lower panel).

To determine whether FOXO3a is involved in cetuximab cytotoxic activity, we generated stable DiFi cell lines in which FOXO3a was knocked down with retroviruses that express three different anti-FOXO3a ShRNAs (F1 to F3). The F2 ShRNA efficiently reduced FOXO3a expression in DiFi cells (Figure 4C, upper panels) and this cell line was used for testing cetuximab cytotoxic activity by SRB assay. Cetuximab cytotoxicity was reduced in the ShFOXO3a-F2 DiFi cell line compared with control cells (ShLuc), as indicated by the higher IC_{50} of cetuximab (101 ng ml^{-1}) in F2 cells than in ShLuc cells (68 ng ml^{-1} ; P -value 0.005). The finding that sensitivity to cetuximab is reduced when

FOXO3a is downregulated indicates that FOXO3a is involved in the cytotoxic effect of cetuximab in CRC cells.

BIM and p27, downstream targets of FOXO3a, participate in cetuximab apoptotic effect. To identify FOXO3a target genes induced by cetuximab, and involved in the apoptotic and anti-proliferative effect of cetuximab, we performed a proteome profiler analysis combined with specific immunoblot and qPCR assays. Proteome profiler identified two downstream targets of FOXO3a, BIM and p27, being specifically overexpressed upon cetuximab treatment and downregulated when SB202190 was added. RT-qPCR analysis using DiFi cells incubated with cetuximab and/or SB202190 showed that BIM and p27 were upregulated in DiFi cells treated with cetuximab (BIM: 2.8-fold, P -value: 0.0002, p27: 1.6-fold, P -value: 0.0002), and that their upregulation was inhibited by co-incubation with SB202190 (BIM: 1.9-fold, P -value: 0.01; p27:

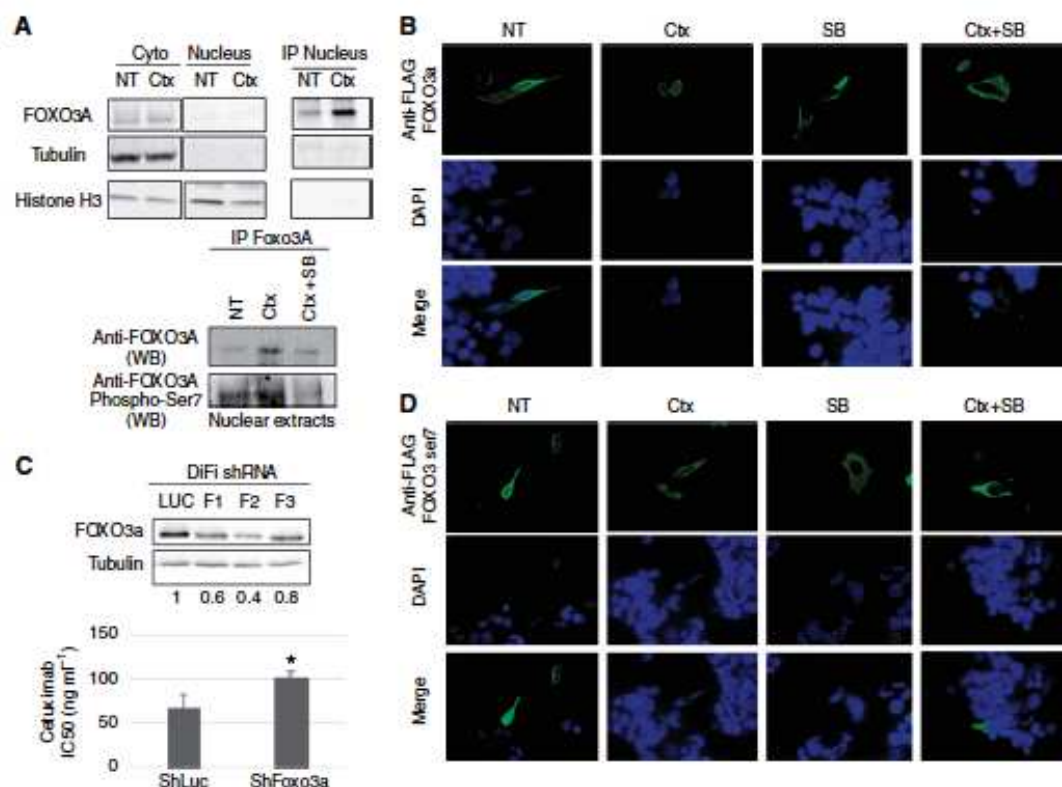


Figure 4. Cetuximab activates the transcription factor FOXO3a in a MAPK p38-dependent manner. **(A)** Western blot analysis of FOXO3a, tubulin and histone H3 in the cytoplasm, in the nucleus and after FOXO3a immunoprecipitation. DiFi cell were incubated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Ctx) for 1 h (top panels). Western blot analysis of FOXO3a and phospho-ser-7-FOXO3a in nuclear extracts after FOXO3a immunoprecipitation. DiFi cell were treated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab alone (Ctx) or $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + $5 \mu\text{M}$ SB202190 (Ctx + SB) for 1 h (lower panels). **(B)** Detection of FLAG-tagged wild-type FOXO3a by immunofluorescence in DiFi cells incubated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Ctx), $5 \mu\text{M}$ SB202190 (SB) or $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + $5 \mu\text{M}$ SB202190 (Ctx + SB) for 1 h. **(C)** Western blot analysis of FOXO3a expression in DiFi cells transduced with three different shRNAs against FOXO3a (F1, F2 and F3) or against Luciferase (Luc; control). Equal loading is shown by tubulin expression (top panels). SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells transduced with the F2 shRNA against FOXO3a (lower panel). **(D)** Detection of FLAG-tagged mutant FOXO3a-7A by immunofluorescence in DiFi cells incubated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Ctx), $5 \mu\text{M}$ SB202190 (SB) or $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + $5 \mu\text{M}$ SB202190 (Ctx + SB) for 1 h. NT, not treated. * $P < 0.05$.

1.1-fold, P -value: 0.004; Figure 5A). We confirmed these results at protein level by immunoblot analysis (Figure 5B).

We then generated stable DiFi cell lines in which BIM or p27 was knocked down with retroviruses that express three different anti-BIM shRNAs or one anti-p27 shRNA. The shRNA-BIM-2 and 3 efficiently reduced BIM expression in DiFi cells (Figure 5C, left panels) and these two stable cell lines were used to test cetuximab cytotoxicity by SRB assay. Cetuximab cytotoxicity was reduced in DiFi cells in which BIM was downregulated compared with controls (ShLuc), as indicated by their IC₅₀ (53 ng ml^{-1} in ShLuc and 73 ng ml^{-1} in ShBIM2 cells, P -value: 0.02; 71 ng ml^{-1} ShBIM3, P -value: 0.04). Of note, cetuximab IC₅₀ values in DiFi ShBIM cells and in control cells treated with cetuximab + SB202190 were similar, indicating that BIM loss has the same biological effect than p38 inhibition. Similar results were obtained with DiFi-Shp27 cells (cetuximab IC₅₀: 58.5 ng ml^{-1} in DiFi-Shp27 and 42 ng ml^{-1} in ShLuc cells, P -value: 0.02; Figure 5D). These results show that cetuximab induces FOXO3a and the transcription of its downstream targets BIM and p27 that are implicated in the cytotoxic effect of cetuximab in CRC cells.

The expression levels of FOXO3A and p38 are linked to impaired response to cetuximab in patients with CRC. To address the clinical relevance of p38 activation in the response to

cetuximab treatment, FOXO3a and p38 mRNA expression levels were analysed in a transcriptome data set created by Khambata-Ford *et al* (2007), (GSE5851) from 80 patients with mCRC and treated with cetuximab monotherapy. Among patients with mCRC harbouring WT KRAS ($n = 43$), FOXO3a and p38 expression were higher in cetuximab responders ($n = 20$) than in non-responders ($n = 19$; $P = 0.009$ for FOXO3a and $P = 0.04$ for p38; Figure 6A). This is in agreement with our *in vitro* and *in vivo* results showing that FOXO3a and p38 are required for cetuximab full activity.

Recently, different CRC molecular subtypes have been defined based on the combined analysis of their gene-expression profile (Schlicker *et al*, 2012; Budinska *et al*, 2013; De Sousa *et al*, 2013; Marisa *et al*, 2013; Sadanandam *et al*, 2013; Roepman *et al*, 2014). The association between CRC molecular subtypes and response to cetuximab has been evaluated using the Sadanandam and De Sousa E Melo's classifications (De Sousa *et al*, 2013; Sadanandam *et al*, 2013) and the Marisa's classification by our group (Del Rio *et al*, manuscript submitted). We found that in the 43 patients with mCRC harbouring WT KRAS from the Khambata-Ford data set, patients with a cancer classified as C1 or C5 (Marisa's subtypes) had a significantly longer progression-free survival than patients with other subtypes (Del Rio *et al*, manuscript submitted). Similarly, the Sadanandam's TA subtype was associated with a better response to cetuximab (Sadanandam *et al*, 2013) and

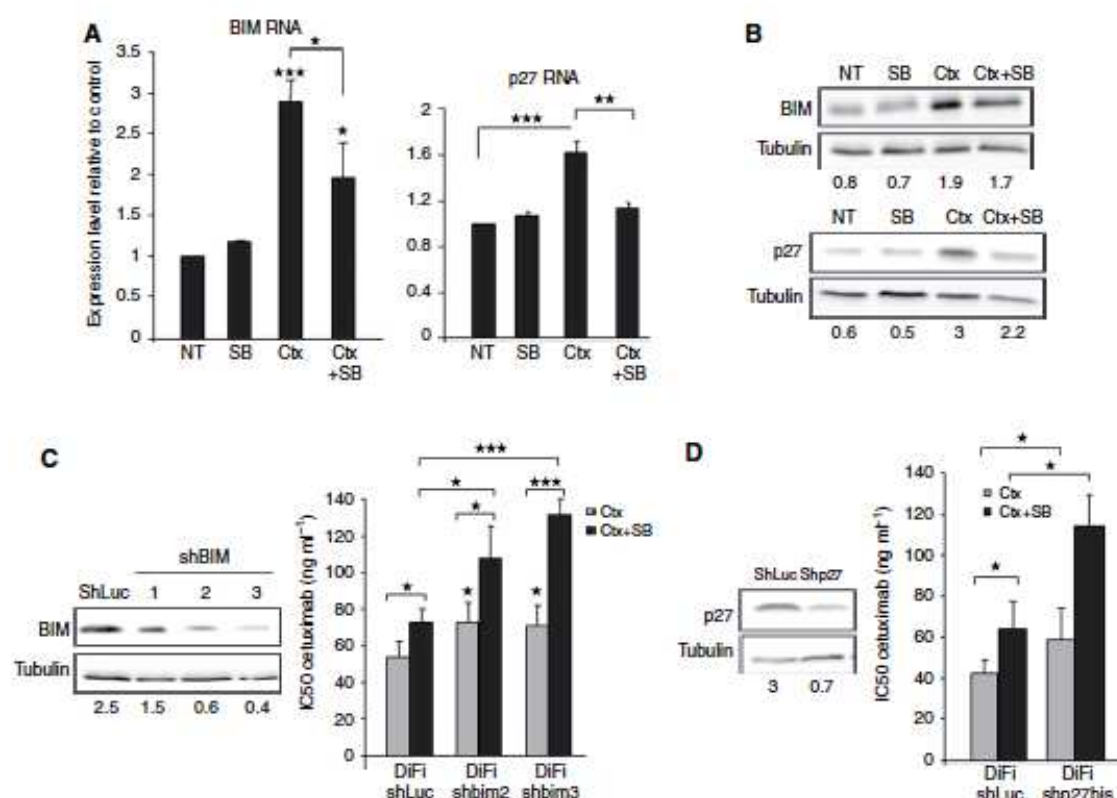


Figure 5. BIM and p27, downstream targets of FOXO3a, participate in cetuximab apoptotic effect. **(A)** RT-qPCR quantification of BIM (left panel) and p27 transcripts (right panel) in DiFi cells incubated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Ctx) alone, $5 \mu\text{M}$ SB202190 alone (SB) or $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + $5 \mu\text{M}$ SB202190 (Ctx + SB) for 24 h. **(B)** Western blot analysis of BIM and p27 expression in DiFi cells incubated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab (Ctx) alone, $5 \mu\text{M}$ SB202190 alone (SB) or $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ cetuximab + $5 \mu\text{M}$ SB202190 (Ctx + SB) for 24 h. Equal loading was assessed with an anti-tubulin antibody. **(C)** Western blot analysis of BIM expression in DiFi cells transduced with three different ShRNAs directed against BIM (ShBIM1, ShBIM2 and ShBIM3) or against Luciferase (ShLuc; control). Equal loading is shown by tubulin expression (left panels). SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells transduced with ShRNAs against BIM (shbim2 and shbim3) or Luciferase (shLuc) and incubated with cetuximab alone (Ctx) or cetuximab + $5 \mu\text{M}$ SB202190 (Ctx + SB) for 96 h (right panel). **(D)** Western blot analysis of p27 expression in DiFi cells transduced with ShRNAs against p27 (Shp27) or against Luciferase (ShLuc; control). Equal loading is shown by tubulin expression (left panels). SRB assays to assess cetuximab cytotoxicity in DiFi cells that express ShRNAs against p27 and incubated with cetuximab alone (Ctx) or cetuximab + $5 \mu\text{M}$ SB202190 (Ctx + SB) for 96 h (right panel). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

De Sousa E Melo's CCS1 subtype with better disease control rate (De Sousa *et al.*, 2013). Here, we analysed FOXO3a and p38 gene-expression level in the different CRC molecular subtypes and found the highest expressions in the C1, C5 ($P = 8.4 \times 10^{-5}$ for FOXO3a, $P = 0.019$ for p38), CCS1 ($P = 0.0013$ for FOXO3a, $P = 0.0054$ for p38) and TA ($P = 0.0053$ for FOXO3a, $P = 0.016$ for p38) subtypes (Figure 6B). These results indicate that high FOXO3a and p38 expression are associated with a better response to cetuximab and good outcome in these three classifications.

Analysis of FOXO3a and MAPK14 expression has finally been evaluated on the recently published consensus subtypes (Supplementary Figure 3). This figure shows that FOXO3a and MAPK p38 are highly expressed in the CMS2 subtype. The CMS2 subtypes is called 'canonical' and correspond to the CCS1 of De Sousa's, TA and Enterocyte of Sadanandam and C1 and C5 of Marisa's. This result is in accordance with the data obtained with the three other classifications.

Altogether, our findings suggest that FOXO3a and p38 expression levels are markers of cetuximab response in CRC and the variations in their expression level may partially explain the different sensitivity of CRC subtypes to this drug.

DISCUSSION

In the present study, we show for the first time in CRC cells that p38 phosphorylation is increased upon cetuximab treatment. We demonstrate the role of p38, FOXO3a, BIM and p27 in cetuximab cytotoxic and cytostatic effects. Moreover, we found that FOXO3a and p38 expression levels are higher in responder patients, indicating that FOXO3a and p38 could be used as specific biomarkers of cetuximab efficacy in patients with WT KRAS CRC.

Our study shows that upon cetuximab treatment, p38 can activate FOXO3a. Ho *et al.* (2012) have recently reported that p38 phosphorylates directly FOXO3a on ser-7, promoting its nuclear translocation and activation. This new p38 target protein is specific, because the other mammalian members of the FOXO family (FOXO1, FOXO4 and FOXO6) do not harbour this phosphorylation site. Moreover, FOXO3a phosphorylation on ser-7 is exclusively mediated by p38, because inhibition of JNK, PI3K and ERK has no effect on this phosphorylation. These data reinforce the role of p38 in FOXO3a activation after cetuximab treatment. While most FOXO3a phosphorylation sites have

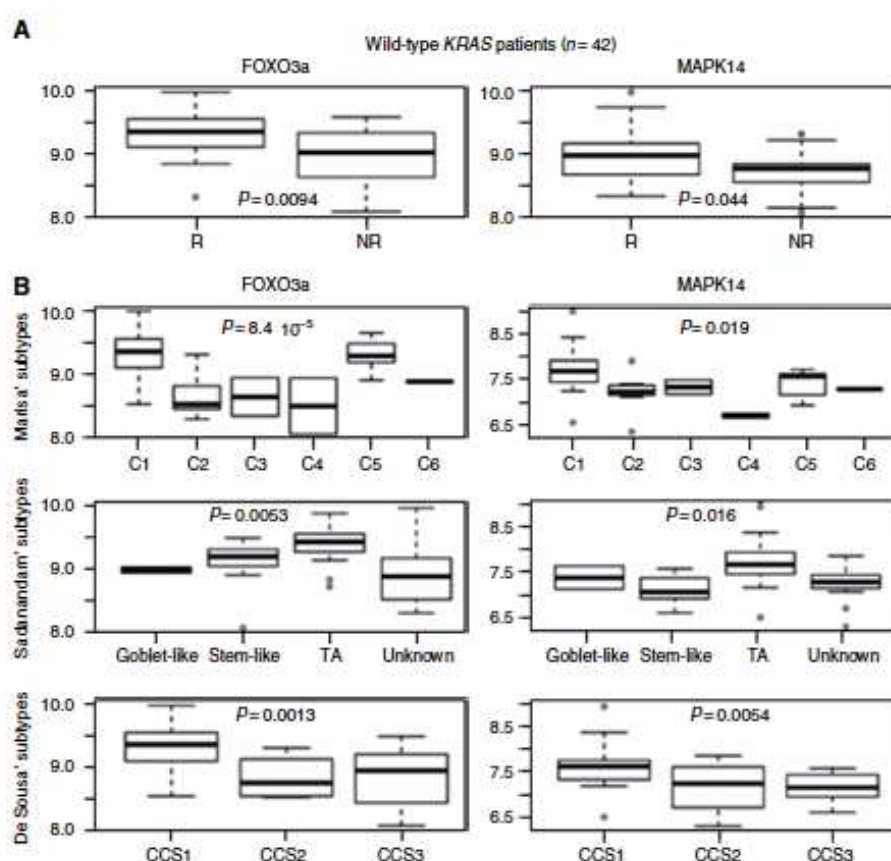


Figure 6. FOXO3a and p38 are expressed in cetuximab-responder patients. (A) Box plot depiction of FOXO3a and p38 (MAPK14) mRNA expression in CRC samples from patients with mCRC harbouring WT KRAS and treated with cetuximab monotherapy (Khambata-Ford *et al* (2007); GSE5851 data set). R, cetuximab responders (n=20) and NR, cetuximab non-responders (n=19). (B) Box plot representation of FOXO3a and p38 (MAPK14) mRNA expression in the same CRC samples described in A and classified according to the molecular classifications by Marisa *et al* (2013) (upper panels), Sadanandam *et al* (2013) (middle panels) and De Sousa *et al* (2013) (lower panels).

inhibitory effects on its activity and nuclear localisation, ser-7-phosphorylation is associated with FOXO3a nuclear accumulation and the subsequent induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation.

While FOXO3a activation upon incubation of CRC cells with cetuximab was never reported, some publications have shown that drugs targeting the EGFR signalling, particularly erlotinib in cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (Ganesan *et al*, 2013) or gefitinib, lapatinib and trastuzumab in breast cancer cells (Real *et al*, 2005; Hegde *et al*, 2007; Krol *et al*, 2007), can activate FOXO3a, leading to cell death and/or cell cycle arrest. These results indicate that cell death and the anti-proliferative effects induced by EGFR inhibition can be attributed, at least in part, to the specific activation of FOXO3a and that, as a consequence, FOXO3a nuclear localisation could become a useful biomarker of the therapeutic success of EGFR inhibitors.

However, our results contradict the work by Simone's group showing that p38 inhibition (and not p38 activation like in the present study) in CRC cells induces FOXO3a activation and subsequently autophagy, cell death and tumour growth reduction (Chiacchiera *et al*, 2012). They demonstrated that p38 inhibition leads to a decrease in intracellular ATP levels and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK in turn activates FOXO3a (phosphorylation at Thr-179, Ser-399, Ser-413, Ser-555, Ser-588 and Ser-626) without affecting its cytoplasmic/nuclear distribution. These differences may be linked to the specific

FOXO3a phosphorylation. We have shown that p38-specific ser-7-phosphorylation of FOXO3a is essential because the ser-7-phosphorylation-defective FOXO3a mutant could not localise to the nucleus any longer upon cetuximab treatment. Moreover, Chiacchiera *et al* (2012) used KRAS or BRAF mutated CRC cells and chemotherapy, whereas we used an anti-EGFR antibody in wild-type KRAS CRC cells.

In conclusion, here we show that p38 participates in the cytotoxic and cytostatic effect of cetuximab in CRC cells KRAS WT. Altogether our results highlight a new pathway induced by cetuximab in wild-type KRAS CRC cells. We propose a model of p38 role in cetuximab-induced cytotoxicity. In the absence of cetuximab (Supplementary Figure 1A), EGF binds to EGFR and activates the AKT and ERK signalling pathways, which are involved in cell survival and proliferation. AKT and ERK phosphorylate FOXO3a and this phosphorylation leads to FOXO3a re-localisation from the nucleus to the cytoplasm and to its degradation. The two FOXO3a target genes *BIM* and *p27* are therefore not transcribed any longer and this leads to cell survival and cell proliferation. On the other hand, cetuximab binding to EGFR (Supplementary Figure 1B) leads to inhibition of AKT and ERK signalling, relieving their negative effect on FOXO3a. At the same time, cetuximab activates the MAPK p38 that further inhibits ERK signalling and activates FOXO3a by specific phosphorylation on serine 7. FOXO3a activation combined with the lack of ERK and AKT signalling leads to FOXO3a nuclear accumulation,

transcription of its target genes, among which there are *BIM* and *p27*, and induction of apoptosis and inhibition of proliferation.

The molecular mechanism of p38 activation via cetuximab has not been identified. A possible mechanism of cetuximab induction of p38 phosphorylation is via the protein phosphatase MKP-1. MKP-1 has been shown to be activated by EGFR pathway, transcriptionally and post-translationally (Takeuchi *et al.*, 2009). Once activated, MKP-1 inhibits phosphorylation of MAPK, whose p38 and JNK is part. So, one can imagine that cetuximab will inhibit MKP-1, leading to an enhanced p38 and JNK phosphorylation and activation. Figure 1B is consistent with this hypothesis since cetuximab leads to activation of p38 and JNK. In agreement with this explanation, Montagut *et al.* (2010) demonstrated in 2010 that MKP-1 overexpression impairs the response to cetuximab in mCRC patients. Our interpretation could be that overexpression of MKP-1 inhibits p38 activity and then prevent cetuximab maximal effect. Our results on CRC patients samples showing that the overexpression of p38 correlates with a good response to cetuximab, is in accordance with this study.

The results in clinical samples validate the role of FOXO3a and p38 in cetuximab mechanism of action. Indeed, high FOXO3a and p38 levels are associated with better disease control in patients treated with cetuximab, because cetuximab therapy is more likely to be effective in tumours expressing high levels of FOXO3a and p38.

We and others have previously shown that p38 is involved in the mechanism of action of other anti-cancer drugs. For example, inhibition of p38 sensitises colon cancer cells to SN38 (Paillas *et al.*, 2011, 2012), 5-fluorouracil (Yang *et al.*, 2011), sorafenib (Grossi *et al.*, 2012) and cisplatin (Germani *et al.*, 2014). Moreover, p38 contributes to the cytotoxic effect of oxaliplatin (Chiu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Dey and Liu, 2012). Altogether, these results indicate that p38 is a major player in the treatment of CRC.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Montpellier RIO Imaging facility for flow cytometry experiments, in particular Nadia Vié. The Supplementary Figure 1 was generated using the Servier medical art (www.servier.fr). This work was supported by INSERM and ICM Val D'Aurelle. LM had a PhD studentship from the French government. EC has a PhD studentship from the Labex Mablmpove. AT had a Mablmpove post-doctoral fellowship. The research leading to this publication was funded by the French National Research Agency under the programme 'Investissements d'avenir' Grant Agreement LabEx Mablmpove: ANR-10-LABX-53 and SIRIC (INCA-DGOS-Inserm 6045).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang D (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626–1634.
- Biggs WH, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHRL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7421–7426.
- Budinska E, Popovici V, Tejpar S, D'Ario G, Lapique N, Sakora KO, Di Narzo AF, Yan P, Hodgson JG, Weinrich S, Bosman F, Roth A, Delorenzi M (2013) Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol* 231: 63–76.
- Candell L, Gourdier I, Peyron D, Vezio N, Copois V, Bibeau F, Orsetti B, Scheffer GL, Ychou M, Khan QA, Pommier Y, Pau B, Martineau P, Del Rio M (2004) ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int J Cancer* 109: 848–854.
- Chiacchiera F, Grossi V, Cappellari M, Peserico A, Simonato M, Germani A, Russo S, Moyer MP, Resta N, Murzilli S, Simone C (2012) Blocking p38/ERK crosstalk affects colorectal cancer growth by inducing apoptosis *in vitro* and in preclinical mouse models. *Cancer Lett* 324: 98–108.
- Chiu S-J, Chao J-I, Lee Y-J, Hsu T-S (2008) Regulation of gamma-H2AX and securin contribute to apoptosis by oxaliplatin via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human colorectal cancer cells. *Toxicol Lett* 179: 63–70.
- Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358–1375.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337–345.
- De Sousa E, Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, de Jong JH, de Boer OJ, van Leersum R, Bijlsma MF, Rodermond H, van der Heijden M, van Noesel CJ, Tuynman JB, Dekker E, Markowitz F, Medema JP, Vermeulen L (2013) Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 19: 614–618.
- Dey H, Liu Z-R (2012) Phosphorylation of p68 RNA helicase by p38 MAP kinase contributes to colon cancer cells apoptosis induced by oxaliplatin. *BMC Cell Biol* 13: 27.
- Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893–2917.
- Ganesan S, Unger BL, Comstock AT, Angel KA, Mancuso P, Martinez FJ, Sajjan US (2013) Aberrantly activated EGFR contributes to enhanced IL-8 expression in COPD airways epithelial cells via regulation of nuclear FOXO3A. *Thorax* 68: 131–141.
- Germani A, Matrone A, Grossi V, Peserico A, Sanese P, Liuzzi M, Palermo R, Murzilli S, Campese AF, Ingravallo G, Canetieri G, Tezil T, Simone C (2014) Targeted therapy against chemoresistant colorectal cancers: Inhibition of p38 α modulates the effect of cisplatin *in vitro* and *in vivo* through the tumor suppressor FoxO3A. *Cancer Lett* 344: 110–118.
- Gongora C, Candell L, Vezio N, Copois V, Denis V, Breil C, Molina F, Prasad C, Conseiller E, Pau B, Martineau P, Del Rio M (2008) Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol Ther* 7: 822–832.
- Grossi V, Liuzzi M, Murzilli S, Martelli N, Napoli A, Ingravallo G, Del Rio A, Simone C (2012) Sorafenib inhibits p38 α activity in colorectal cancer cells and synergizes with the DFG-inhibitor SB202190 to increase apoptotic response. *Cancer Biol Ther* 13: 1471–1481.
- Hegde PS, Rusnak D, Bertiaux M, Allgood K, Strum J, Gagnon R, Gilmer TM (2007) Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast cancer cell lines using global gene expression profiles. *Mol Cancer Ther* 6: 1629–1640.
- Ho K-K, McGuire VA, Koo C-Y, Muir KW, de Olano N, Maifoshie E, Kelly DJ, McGovern UB, Monteiro LJ, Gomes AR, Nebreda AR, Campbell DG, Arthur JS, Lam EW (2012) Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin. *J Biol Chem* 287: 1545–1555.
- Liu H-F, Hu H-C, Chao J-I (2010) Oxaliplatin down-regulates survivin by p38 MAP kinase and proteasome in human colon cancer cells. *Chem Biol Interact* 188: 535–545.
- Lu Y, Liang K, Li X, Fan Z (2007a) Responses of cancer cells with wild-type or tyrosine kinase domain-mutated epidermal growth factor receptor (EGFR) to EGFR-targeted therapy are linked to downregulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol Cancer* 6: 63.
- Lu Y, Li X, Liang K, Luwor R, Siddik ZH, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z (2007b) Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res* 67: 8240–8247.
- Karapetis CS, Kambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zakberg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359: 1757–1765.

- Kawakami H, Okamoto I, Yonesaka K, Okamoto K, Shibata K, Shinkai Y, Sakamoto H, Kitano M, Tamura T, Nishio K, Nakagawa K (2014) The anti-HER3 antibody patritumab abrogates cetuximab resistance mediated by heregulin in colorectal cancer cells. *Oncotarget* 5: 11847–11856.
- Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris 3rd HA, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ (2007) Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 25: 3230–3237.
- Krol J, Francis RE, Albergaria A, Susters A, Polychronis A, Coombes RC, Lam EW (2007) The transcription factor FOXO3a is a crucial cellular target of gefitinib (Iressa) in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6: 3169–3179.
- Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selver J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi MC, Schiappa R, Guenot D, Ayadi M, Kirz S, Chazal M, Fléjou JF, Benchimol D, Berger A, Lagarde A, Pencreach E, Piard F, Elias D, Parc Y, Olschwang S, Milano G, Laurent-Puig P, Boige V (2013) Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 10: e1001453.
- Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, Salido M, Gallen M, Marsters S, Tsai SP, Minoche A, Seshagiri S, Serrano S, Himmelbauer H, Bellmunt J, Rovira A, Settleman J, Bosch F, Albanell J (2012) Identification of a mutation in the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med* 18: 221–223.
- Montagut C, Iglesias M, Arumi M, Bellosillo B, Gallen M, Martínez-Fernández A, Martínez-Aviles L, Cañadas I, Dalmases A, Moragón E, Lema L, Serrano S, Rovira A, Rojo F, Bellmunt J, Albanell J (2010) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) impairs the response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 102: 1137–1144.
- Okada Y, Miyamoto H, Goji T, Takayama T (2014) Biomarkers for predicting the efficacy of anti-epidermal growth factor receptor antibody in the treatment of colorectal cancer. *Digestion* 89: 18–23.
- Paillas S, Boissière F, Bibeau F, Denouel A, Mollevi C, Causse A, Denis V, Vezzio-Vie N, Marzi L, Cortijo C, Ait-Arsa I, Askari N, Pourquier P, Martineau P, Del Rio M, Gongora C (2011) Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 71: 1041–1049.
- Paillas S, Causse A, Marzi L, de Medina P, Poirot M, Denis V, Vezzio-Vie N, Expert L, Arzouk H, Coquelle A, Martineau P, Del Rio M, Pattingre S, Gongora C (2012) MAPK14/p38 α confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy. *Autophagy* 8: 1098–1112.
- Real PJ, Benito A, Cuevas J, Berciano MT, de Juan A, Coffey P, Gomez-Roman J, Lafarga M, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL (2005) Blockade of epidermal growth factor receptors chemosensitizes breast cancer cells through up-regulation of Bnip3L. *Cancer Res* 65: 8151–8157.
- Roepman P, Schlicker A, Tabernero J, Majewski I, Tian S, Moreno V, Snel MH, Chresta CM, Rosenberg R, Nitsche U, Macarulla T, Capella G, Salazar R, Orphanides G, Wessels LF, Bernards R, Simon IM (2014) Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer* 134: 552–562.
- Roy SK, Srivastava RK, Shankar S (2010) Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal* 5: 10.
- Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wulschleger S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray JW, Hanahan D (2013) A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* 19: 619–625.
- Schlicker A, Beran G, Chresta CM, McWalter G, Pritchard A, Weston S, Runswick S, Davenport S, Heathcote K, Castro DA, Orphanides G, French T, Wessels LF (2012) Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics* 5: 66.
- Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, Ponzetti A, Cremolini C, Amatu A, Lauricella C, Lamba S, Hobor S, Avallone A, Valiorta E, Rospo G, Medico E, Motta V, Antoniotti C, Tatangelo F, Bellosillo B, Veronese S, Budillon A, Montagut C, Racca P, Marsoni S, Falcone A, Corcoran RB, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Siena S, Sartore-Bianchi A, Bardelli A (2015) Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 21: 795–801.
- Takeuchi K, Shin-ya T, Nishio K, Ito F (2009) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 modulated JNK activation is critical for apoptosis induced by inhibitor of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase. *FEBS J* 276: 1255–1265.
- Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A (2010) Advanced colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for treatment. *Ann Oncol* 21(Suppl 5): v93–v97.
- van der Vos KE, Coffey PJ (2011) The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid Redox Signal* 14: 579–592.
- Wilson KP, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Griffith JP, Chen W, McCaffrey PG, Chambers SP, Su MS (1996) Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271: 27696–27700.
- Yang J-Y, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, Lang JY, Lai CC, Chang CJ, Huang WC, Huang H, Kuo HP, Lee DF, Li LY, Lien HC, Cheng X, Chang KJ, Hsiao CD, Tsai FJ, Tsai CH, Sahin AA, Muller WJ, Mills GB, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* 10: 138–148.
- Yang SY, Miah A, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet M (2011) Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *Int J Oncol* 38: 1695–1702.
- Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cdr Res* 15: 11–18.

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 4.0 Unported License.

Supplementary Information accompanies this paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

RESEARCH

Open Access



Antibody targeting of claudin-1 as a potential colorectal cancer therapy

S. Cherradi^{1†}, A. Ayrolles-Torro^{1†}, N. Vezzo-Vié^{1,2}, N. Gueguinou¹, V. Denis¹, E. Combes¹, F. Boissière², M. Busson¹, L. Canterel-Thouennon^{1,2}, C. Mollevi^{1,2}, M. Pugnière¹, F. Bibeau^{1,2}, M. Ychou^{1,2}, P. Martineau¹, C. Gongora¹ and M. Del Rio^{1,2*} 

Abstract

Background: Metastatic colorectal cancer (mCRC) is one of the major causes of cancer-related death. Despite the substantial progress in mCRC management, it remains important to identify new therapeutic options and biological markers for personalized medicine. Here, we investigated the expression of claudin-1 (CLDN1), a major tight junction transmembrane protein, in the different colorectal cancer (CRC) molecular subtypes and then assessed the anti-tumor effect of a new anti-CLDN1 monoclonal antibody (mAb).

Methods: Gene expression profiling and immunohistochemistry analysis of normal and tumor tissue samples from patients with stage IV CRC were used to determine CLDN1 gene expression. Then, the 6F6 mAb against CLDN1 extracellular part was generated. Its effect on CRC cell cycle, proliferation, survival and migration was assessed in vitro, using a 3D cell culture system, flow cytometry, clonogenic and migration assays. In vivo, 6 F6 mAb efficacy was evaluated in nude mice after subcutaneous xenografts or intrasplenic injection of CRC cells.

Results: Compared with normal mucosa where it was almost exclusively cytoplasmic, in CRC samples CLDN1 was overexpressed ($p < 0.001$) and mainly localized at the membrane. Moreover, it was differentially expressed in the various CRC molecular subtypes. The strongest expressions were found in the consensus molecular subtype CMS2 ($p < 0.001$), the transit-amplifying ($p < 0.001$) and the C5 subtypes ($p < 0.001$). Lower CLDN1 expression predicted a better outcome in the molecular subtypes C3 and C5 ($p = 0.012$ and $p = 0.004$, respectively). CLDN1 targeting with the 6 F6 mAb led to reduction of survival, growth and migration of CLDN1-positive cells. In preclinical mouse models, the 6F6 mAb decreased tumor growth and liver metastasis formation.

Conclusion: Our data indicate that CLDN1 targeting with an anti-CLDN1 mAb results in decreased growth and survival of CRC cells. This suggests that CLDN1 could be a new potential therapeutic target.

Keywords: Metastatic, Colorectal cancer, Claudin-1, Antibody, Targeted therapy

Background

Colorectal cancer (CRC) is one of the major causes of cancer-related death in the Western world. When localized, CRC is often curable by surgery, but the prognosis of patients with metastatic CRC (mCRC) remains very poor [1]. Standard chemotherapy regimens (FOLFIRI or FOLFOX) used in combination with targeted therapies

have improved response rates and survival [2–4]. However, 30 to 50% of patients are intrinsically resistant to treatments and nearly all patients who are initially responsive will eventually develop resistance. Therefore, other first-line treatment options for patients with mCRC are required.

Claudins (CLDN) are integral membrane proteins that determine the barrier features of tight junctions [5, 6] and are considered potential therapeutic targets for antibody-based treatments [7]. They have four transmembrane domains, two extracellular loops and cytoplasmic tails [8, 9]. Claudin-1 (CLDN1) is one of the 27 members of the claudin family [10]. Several groups have

* Correspondence: maguy.delrio@comunicancer.fr

[†]Equal contributors

¹Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRC), Inserm U1194, Université de Montpellier, Institut Régional du Cancer de Montpellier (IRC), 208 rue des Apothicaires, F-34298 Montpellier Cedex 5, France

²Institut régional du Cancer de Montpellier (IRC), Montpellier F-34298, France



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

reported increased expression of CLDN1 in primary CRC and metastases as well as in CRC cell lines but with marked differences in its localization [11–14]. Indeed, immunohistochemistry analyses in CRC and normal mucosa samples showed that cancer cells display a membranous [11] or membranous/cytoskeletal [12] staining of CLDN1. Other studies found a strong CLDN1 expression at the cell–cell boundaries and in the cytoplasm of cancer cells [13]. Moreover, CLDN1 nuclear localization in tumor samples was reported [14]. Aberrant CLDN1 expression in tumor cells can lead to alteration of the tight junction structure and function, or dysregulation of cell signaling pathways [15]. CLDN1 could be involved in WNT and NOTCH signaling. Indeed, CLDN1 is a known target of TCF/LEF signaling [13], but seems also to participate in the regulation of the WNT signaling pathway [16]. Through NOTCH signaling upregulation, CLDN1 has a role in colon epithelium homeostasis [17] and in promoting colon tumorigenesis [18].

Much effort has been focused on understanding CLDN1 function and regulation in cancer; however, little is known about its potential usefulness as a therapeutic target. Therefore, the aim of this study was to accurately assess CLDN1 expression in CRC samples and to determine the potential of CLDN1 as a therapeutic target for antibody-based treatments in CRC.

Methods

CRC samples

For gene expression profiling, we selected 143 tumor samples from 143 patients included in three cohorts: the prospective single-center study REGP (19 patients) (GSE62322) [19, 20], the retrospective multi-center study COSIVAL (68 patients) and the prospective multi-center study BIOCOLON (56 patients) (GSE62080 and GSE72970) [21]. For these three studies, Inclusion criteria were: histologically proven colon adenocarcinoma, advanced and bidimensionally measurable tumor (stage IV), age between 18 and 75 years, and World Health Organization (WHO) performance status ≤ 2 . Before any treatment, all patients underwent surgery for primary tumor resection or endoscopic biopsy.

For western blot analysis, 13 additional tumor samples from the prospective single-center study REGP but not included in the 143 samples were used.

For immunohistochemistry analysis, tissue samples from 52 additional patients with CRC were retrospectively selected from the Institute of Cancer Research of Montpellier pathology files only when normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma samples were available for the same patient.

All the studies using human tissue samples were approved by the relevant ethics committees and all participants were informed about the study objectives

and methods and signed a written informed consent before enrolment.

Gene expression analysis

Colon samples (normal colon, primary tumor and hepatic metastasis samples for the REG/P study, but only primary tumor specimens for the COSIVAL and BIOCOLON trials) were collected at the time of surgery following a standardized procedure to obtain high quality RNA [22]. Samples were then hybridized to human genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA).

To identify new therapeutic targets for antibody-based therapy in mCRC, we compared the gene expression profiles of normal mucosa ($n = 17$), primary tumor ($n = 20$) and hepatic metastases ($n = 19$) tissue samples.

As CRC heterogeneity must be taken into account when comparing gene expression profiles, primary tumor samples ($n = 143$) were classified using the CRC molecular classifications based on gene expression profiles that have been proposed by three independent groups [23–25] and the recent consensus classification [26]. Briefly, De Sousa E. Melo et al. proposed to group tumors in three classes: CCS1 (CRC with microsatellite instability, MSI), CCS2 (cancer with chromosomal instability, CIN) and CCS3 (new subtype) [25]. Sadanandam et al. identified five molecular subtypes, based on the cell phenotype: Goblet-like, Transit-Amplifying (TA), Enterocyte, Stem-like, and Inflammatory [24]. Marisa et al. described six molecular subtypes (C1 to C6) with the following main features: C1 = CIN and downregulation of immune pathways, C2 = MSI, C3 = mutated KRAS, C4 = stem cell phenotype-like, C5 = CIN and upregulation of the WNT pathways, and C6 = CIN and normal-like gene expression profile [23]. Finally, starting from six previously published signatures, an international consortium presented a classification with four consensus subtypes: MSI (CMS1), canonical (CMS2), metabolic (CMS3), and mesenchymal (CMS4) [26] (for review [27]). The CRC sample distribution according to the molecular subtype is shown in Additional file 1: Table S1.

Immunohistochemistry analysis

Samples were assembled in a tissue micro-array (TMA) using three tissue cores (0.6-mm diameter each) as previously described [28]. Briefly, 3- μ m sections of the TMA were de-paraffinized and rehydrated in graded alcohols. Heat-induced antigen retrieval was performed by incubating TMA sections in EDTA buffer (pH 9) at 98 °C in a water bath for 20 min. After neutralization of the endogenous peroxidase activity, TMA sections were incubated with a polyclonal anti-CLDN1 antibody (JAY-8, Zymed laboratories Inc, CA, USA) or antibody diluent (Dako, Glostrup, Denmark) alone for 60 min. Primary antibody binding was visualized using the Envision®

system and the Dako Autostainer* (Dako, Glostrup, Denmark). The percentage of CLDN1-positive cells and the staining intensity (0, no staining; 1, yellowish; 2, brown; and 3, dark brown) were evaluated for each individual TMA spot.

Western blot analysis

Tumor tissue samples from patients were directly grinded in lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 2 mM PMSF, 100 mM NaF, 10 mM sodium orthovanadate, one cocktail protease inhibitor tablet for 10 ml) using a Mixer Mill* MM 300 unit (Qiagen, Valencia, CA). Protein concentration was determined with the Bradford assay (Pierce Coomassie Plus Protein Assay). Then, 50 µg of total proteins were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Whatman* Protran*, pore size 0.45 µm). Non-specific binding sites were blocked with 5% (wt/vol) nonfat milk in PBS with 0.1% (vol/vol) Tween 20 (PBS-T) at room temperature for 1 h and then membranes were incubated at 4 °C with a polyclonal anti-CLDN1 antibody (JAY-8) overnight. Membranes were then washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h. Revelation was performed with a chemiluminescence system (Amersham Biosciences); β -tubulin expression was used for normalization.

Subcellular protein extraction

Protein extraction was carried out as previously described [29]. For each sample, 20-µm thick sections were cut with a cryotome, mixed in liquid nitrogen and gently ground with a micro-pestle. For subcellular protein extraction, the ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit was used according to the manufacturer's instructions (Calbiochem). Subcellular fractions (10 µg/each) were loaded on 12% SDS-PAGE gels. Immunoblotting was done as described above with the following primary antibodies: anti-CLDN1 (JAY-8), -CD71 (Invitrogen), -Histone H3 (Pierce) and - β -tubulin (Sigma T4026).

Cell lines

The following human CRC cell lines were used: SW480 (ATCC CCL-228), SW620 (ATCC CCL-227), Caco-2 (ATCC HTB-37), Difi [30] (a gift from C. Montagut, Department of Medical Oncology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain), HCT116 (CCL-247), and LS174T (ATCC CL-188). To obtain the CLDN1-positive SW480 cell line (SW480-CLDN1), SW480 cells were stably transfected with the human CLDN1 cDNA clone (Invitrogen MGC collection) or with empty vector (pcDNA) using the jetPRIME[™] transfection reagent (Polyplus-transfection Inc., France). CLDN1-positive clones were selected by

growing transfected cells in the presence of 500 µg/ml of geneticin. For CLDN1 silencing, SW620 was transduced with the pSIREN vector containing the shRNA against CLDN1 (SW620shCLDN1) or against luciferase (shLUC, negative control). After 24 h, cells were selected with 1 µg/mL puromycin and stable clones were pooled. All transient transfections were done using the jetPRIME[™] transfection reagent.

Production of anti-CLDN1 mAb 6 F6

For antibody production, 6–8 weeks-old female BALB/c mice (Harlan, Gannat, France) were challenged by intraperitoneal (i.p.) injection of 4 million mouse NIH cells transiently transfected with CLDN1 cDNA (NIH-CLDN1 cells) every two weeks (five injections in total). NIH-CLDN1 cells were mixed with complete Freund's adjuvant (Sigma) for the first injection, and with incomplete Freund's adjuvant (Sigma) for the other four injections. An intravenous booster injection of NIH-CLDN1 cells was given three months after the fifth immunization. Three days later, spleen cells from immunized mice were fused with the mouse myeloma cell line P3-X63-Ag.8.653 to produce mouse hybridomas. Supernatants from newly generated clones were screened by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using SW480-CLDN1 and SW480 cells (negative control). The screening results were confirmed by performing and additional screening using SW620 and SW620-shCLDN1 cells. The anti-CLDN1 hybridoma 6 F6 clone was selected and cloned by limiting dilution. Antibody isotyping showed that 6 F6 was an IgG3k.

All animal experiments were performed in compliance with the French government guidelines for experimental animal studies (agreement CEEA-LR-12052).

Radiolabeling and SPECT-CT imaging

Female athymic nude mice (6–8-week-old) were purchased from Harlan. The 6 F6 mAb was radiolabeled with ¹²⁵I (Perkin Elmer) at the specific activity of 370 MBq/mg for single-photon emission computed tomography (SPECT) imaging, using the IODO-GEN (Pierce Chemical Co.) method. After tail vein injection of 16 MBq/50 µg ¹²⁵I-labeled 6 F6, whole-body single photon emission tomography/computed tomography (SPECT/CT) images were acquired with a 4-head multiplexing multi-pinhole NanoSPECT camera (Bioscan Inc., Washington, USA) at various times (48, 72 and 96 h). Concomitantly, whole-body micro-CT images were acquired for anatomic co-registration with SPECT data. Reconstructed SPECT and CT data were visualized and co-registered using Invivoscope[™].

Clonogenic assay

Colorectal cancer cells were seeded in a 6-well plate (150, 250 or 400 cells/well) and allowed to adhere at 37 °C overnight. Then, 1 ml of RPMI with or without 6 F6 mAb

(final concentration: 100 µg/ml) was added to each well and cells were cultured for six days. After six more days in medium without antibody, plates were read using a Celigo™ imaging cytometer and the “Single colony verification” application. The Celigo™ cytometer is a benchtop *in situ* cellular analysis system that provides images of wells using bright-field illumination (Nexcelom Bioscience, MA, USA).

Establishment of three-dimensional (3D) spheroid cultures

Ultra-low attachment, round-bottomed 96-well plates (Corning Costar) were used for spheroid formation. SW480, SW480-CLDN1 or SW620 cells were seeded at a density of 5×10^4 . Cells aggregated and merged in 3D spheroids within 24–72 h. Images of wells were taken with a phase-contrast microscope using a 5× objective or captured with the Celigo™ imaging cytometer using the “Tumorsphere” application. Cell viability was assessed with the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA). After addition of 100 µl of CellTiter Glo reagent to each well for 10 min, luminescence was measured on a 1450 MicroBeta TriLux Luminescence microplate reader (Perkin Elmer).

Cell cycle and proliferation analysis in spheroids

Spheroids were prepared by plating 1000 DiFi cells per well in ultra-low attachment 96-well plates, and growing them in the presence of 100 µg/ml of the 6 F6 mAb or irrelevant mAb (retuximab) for 5 days. For cell cycle analysis, cells were pelleted, trypsinized, washed with PBS, fixed in 75% ethanol, and stained with 40 µg/ml propidium iodide in the presence of 100 µg ml⁻¹ RNase (Qiagen). The cell cycle distribution was determined with a FC500 Beckman Coulter Flow Cytometer using the FL-3 channel. Cells were gated on a dot plot that displayed the DNA-pulse-peak vs the DNA-pulse area to exclude doublets. Cell cycle distributions were illustrated using the Flow Jo analysis software (Treestar, FLOWJO, Ashland, OR, USA).

At day 4 of culture, cell proliferation was measured by incubating cells with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for 24 h. EdU is incorporated into DNA during active DNA synthesis. Then, after cell trypsinization and fixation/permeabilization in 75% ethanol/PBS, incorporated EdU was labeled and detected with the Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen). Cells were then incubated with 1 µg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in PBS/0.1% Triton X100 at 37 °C for 30 min. The Celigo™ “Expression Analysis” (Target 1 + Mask) application was used to quantify the fluorescent signal and for data analysis. Cells were identified using the DAPI nuclear stain and DNA synthesis was quantified by measuring EdU incorporation.

Mouse xenograft models

1.5×10^6 SW620 cells or 3×10^6 DiFi cells were suspended in culture medium and injected subcutaneously (s.c.) into the right flank of 6–8-week-old female athymic nude mice from Harlan. When the tumor volume reached approximately 100 mm³, mice were randomized in different groups and treated by i.p. injection of 0.9% NaCl or 6F6 mAb (15 mg/Kg per injection) twice a week for three consecutive weeks for the first experiment and thrice a week for the second experiment. Tumors were measured bi-weekly with a caliper and volumes calculated with the formula: $D1 \times D2 \times D3/2$.

Intrasplenic hepatic colonization model

In each experiment, 2 million luciferase-expressing SW620 cells (SW620-LUC cells) were injected in the spleen of 6–8-week-old female athymic nude mice. Spleen was removed 2 min after cell injection. On day 1 after injection, mice were randomly divided in two groups of 10 mice that were treated either with 15 mg/kg of 6 F6 mAb or 0.9% NaCl by i.p. injection, thrice per week. To evaluate metastatic formation and dissemination, luciferase expression was monitored by luminescence imaging after injection of luciferin (Camera Ivis Lumina II, PerkinElmer) once per week. At week 5 after surgery, mice were sacrificed, livers were removed, photographed and macroscopically visible metastases on the liver surface were counted.

Statistical analysis

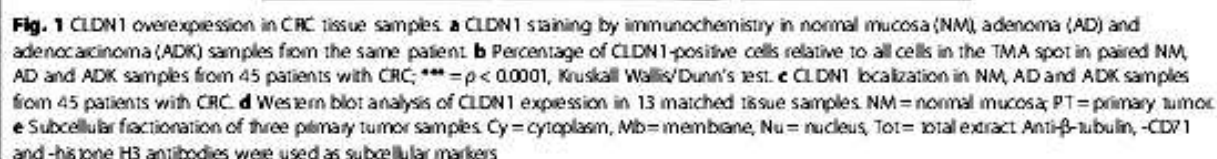
Statistical analysis was done using the STATA 13.0 software (StataCorp). For gene expression or immunohistochemistry experiments, differences between groups were analyzed using the Kruskal Wallis/Dunn's test. Correlations between CLDN1 gene expression and progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were evaluated in the entire group ($n = 143$ patients) and according to the tumor molecular subtype. To this end, the 143 patients were divided in two groups based on the median CLDN1 gene expression (i.e., 9.75 [arbitrary units]). PFS and OS values were compared using the Kaplan-Meier method and differences between survival distributions assessed using the log-rank test.

The paired *t*-test was used to compare the effect of incubation with the 6 F6 mAb in *in vitro* experiments.

In *in vivo* experiments, a linear mixed regression model was used to determine the relationship between tumor growth and number of days after injection. The fixed part of the model included variables corresponding to the number of post-graft days and different treatment groups. Interaction terms were built into the model; random intercepts and random slopes were included to take into account the time effect. The coefficients of the model were estimated by maximum likelihood. Survival rates were

Among the 52 matched samples, 45 samples with matched normal tissue, adenoma and adenocarcinoma were used to confirm CLDN1 overexpression by immunohistochemistry (Fig. 1a). No staining was observed in the sections incubated with diluent alone. CLDN1 staining was significantly higher in the adenoma and adenocarcinoma samples compared with the matched normal mucosa ($p < 0.001$) (Fig. 1b). CLDN1 was expressed in the cytoplasm in 87% of normal mucosa (39/45 patients) and in 40% of adenoma samples (18/45). Conversely, it was localized both at the membrane and in the cytoplasm in 56%

Gene expression analysis of CRC samples showed that *CLDN1* was overexpressed in primary tumors ($p < 0.0001$) and metastases ($p < 0.0001$) compared with normal mucosa (Additional file 2: Figure S1A). In 15 pairs of normal



of adenoma (25/45) and 80% of adenocarcinoma samples (36/45). In 9% of adenocarcinoma samples (4/45), it was exclusively localized at the cell membrane (Fig. 1c).

CLDN1 overexpression in CRC tumors was also assessed by western blotting of matched samples from 13 additional patients (Fig. 1d). CLDN1 was strongly overexpressed in eight of these primary CRC tumors, compared with the matched normal mucosa, and moderately in three others. Western blot analysis of subcellular protein extracts from three of the primary tumor samples with moderate or strong CLDN1 expression showed that CLDN1 expression was mainly localized at the membrane (Fig. 1e).

CLDN1 is differently expressed in CRC molecular subtypes and has a prognostic value

Then, *CLDN1* gene expression was evaluated in 143 primary tumor samples that were classified in the different

molecular subtypes [21]. *CLDN1* was significantly up-regulated in the TA subtype of the Sadanandam's classification compared with the other subtypes ($p < 0.001$) (Fig. 2a). Among the Marisa's subtypes, the strongest *CLDN1* expression was found in the C1 and C5 subtypes ($p < 0.001$) (Fig. 2a). *CLDN1* expression was slightly increased in CCS1 compared with CCS2 and CCS3 (De Sousa E Melo's subtypes) (Fig. 2a). *CLDN1* differential overexpression was confirmed in the four molecular subtypes of the consensus classification [26]. Specifically, *CLDN1* expression was higher in the CMS2 consensus subtype that includes the TA, C1, C5 and CCS1 subtypes (Fig. 2b).

No significant correlation was found between *CLDN1* gene expression (low/high) and OS and PFS in the whole patients' group. Conversely, PFS was significantly longer in patients with C3 and C5 tumors with low *CLDN1* gene expression. Indeed, the median PFS values were 9.8

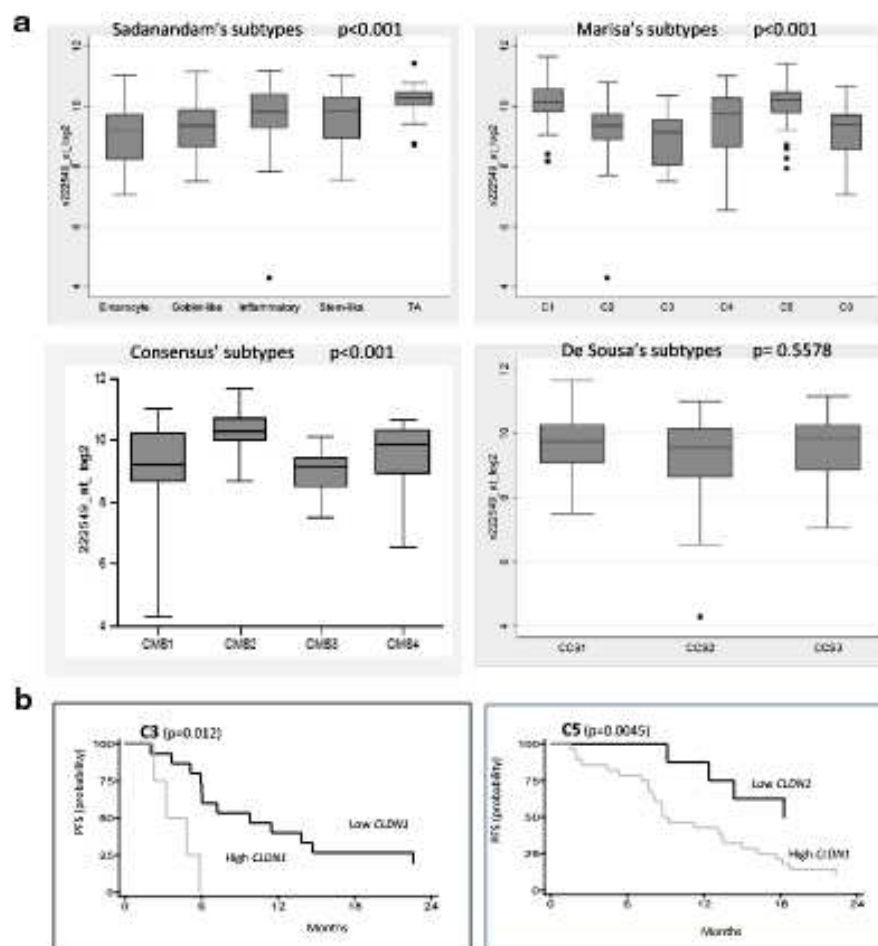


Fig. 2 Differential expression and clinical value of *CLDN1* gene expression in CRC samples from patients with mCRC. **a** *CLDN1* gene expression in 143 primary CRC samples classified according to the five molecular subtypes described by Sadanandam et al. [24], the six molecular subtypes described by Marisa et al. [23], the three molecular subtypes described by De Sousa et al. [25] and the four consensus subtypes [26] (Kruskal Wallis/Dunn's test). **b** Associations between *CLDN1* gene expression level and progression-free survival (PFS) in patients with C3 and C5 subtype tumors (log-rank test). High *CLDN1*: >median; low *CLDN1*: <median *CLDN1* expression (9.75 arbitrary units)

and 3.2 months for patients with C3 tumors with low or high *CLDN1* gene expression, respectively ($p = 0.012$), and 18 and 8.8 months for patients with C5 tumors with low or high *CLDN1* gene expression, respectively ($p = 0.0045$) (Fig. 2c).

Characterization of a monoclonal antibody against human *CLDN1*

A murine mAb against the extracellular part of human *CLDN1* (6 F6 mAb) was generated. Its specificity was demonstrated by showing that (i) the 6 F6 mAb bound only to *CLDN1*-positive CRC cell lines (SW620, SW480-*CLDN1*, Difi, Caco2), but not to *CLDN1*-negative cell

lines (SW480, SW620sh*CLDN1*, HCT116, LS174T) (Additional file 2: Figure S2A and Fig. 3a), (ii) the 6 F6 mAb could bind to non-permeabilized SW480-*CLDN1* cells, but not to parental SW480 cells (Additional file 2: Figure S2B; Additional file 3) and (iii), the 6 F6 mAb, but not an irrelevant mAb could bind to SW620 membrane extracts, as indicated by Surface Plasmon Resonance (Additional file 2: Figure S2C; Additional file 3). The 6 F6 mAb bound to SW620 cells with an apparent K_D of $37 \text{ nM} \pm 7.8$ (Fig. 3b). Then, 6 F6 cross-reactivity with murine *CLDN1*, human *CLDN7* and human *CLDN8* was assessed after transient transfection of human *CLDN8* and murine or human *CLDN1* in SW480 cells that express

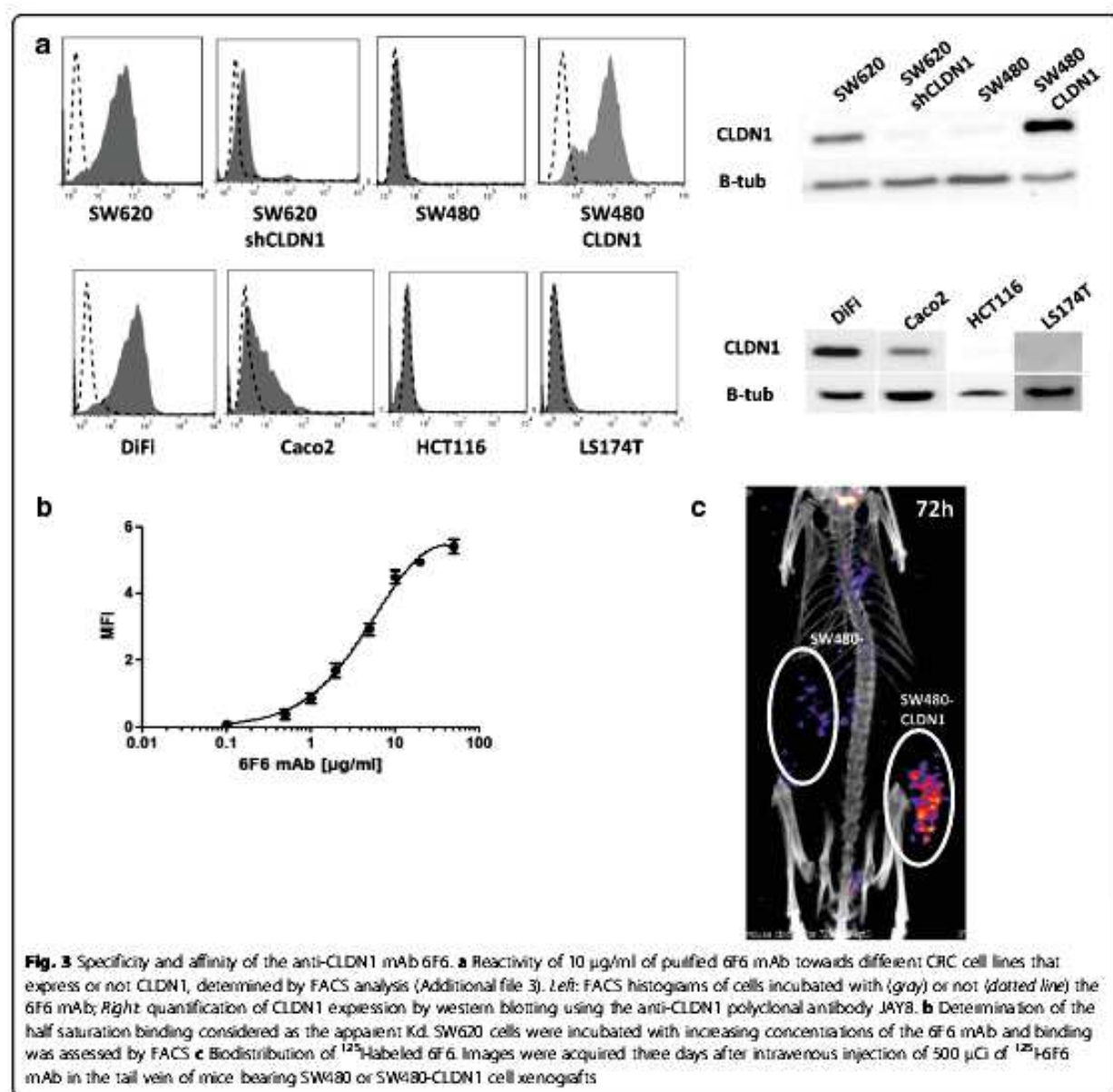


Fig. 3 Specificity and affinity of the anti-*CLDN1* mAb 6F6. **a** Reactivity of 10 $\mu\text{g/ml}$ of purified 6F6 mAb towards different CRC cell lines that express or not *CLDN1*, determined by FACS analysis (Additional file 3). Left: FACS histograms of cells incubated with (gray) or not (dotted line) the 6F6 mAb; Right: quantification of *CLDN1* expression by western blotting using the anti-*CLDN1* polyclonal antibody JAY8. **b** Determination of the half saturation binding considered as the apparent K_D . SW620 cells were incubated with increasing concentrations of the 6F6 mAb and binding was assessed by FACS. **c** Biodistribution of ^{125}I -labeled 6F6. Images were acquired three days after intravenous injection of 500 μCi of ^{125}I -6F6 mAb in the tail vein of mice bearing SW480 or SW480-*CLDN1* cell xenografts

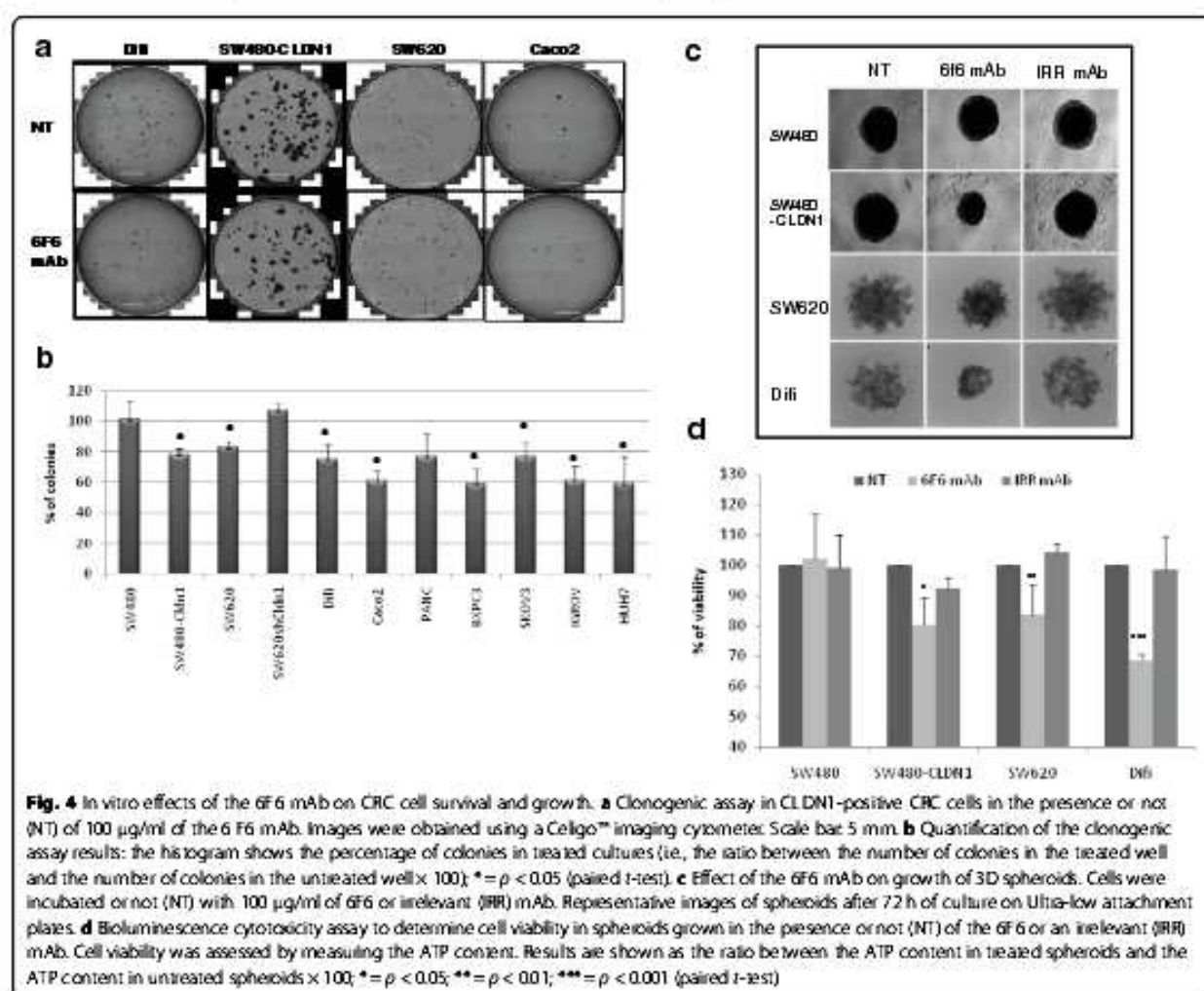
CLDN7 [31] (Additional file 2: Figure S2D, upper panels). The 6 F6 mAb did not cross-react with CLDN8, CLDN7 and mouse CLDN1. (Additional file 2: Figure S2D, lower panels). Finally, to determine the tumor uptake and the ability of the 6 F6 mAb to specifically target CLDN1 in vivo, 125 I-labeled 6 F6 was injected in mice with SW480-CLDN1 and SW480 cell xenografts. Analysis of the SPECT/CT data showed high and specific uptake of 125 I labeled-6F6 mAb only in SW480-CLDN1 tumor cell xenografts (Fig. 3c).

CLDN1 targeting reduces CRC cell survival, growth, proliferation and migration

The number of colony-forming cells was significantly reduced in CLDN1-positive CRC cell lines incubated with the 6 F6 mAb, compared with untreated cells (Fig. 4a, b). To confirm that this effect was specifically caused by CLDN1 targeting, the same experiment was performed using two CLDN1-negative cell lines (SW480 and SW620shCLDN1) (Fig. 4b). In these cells, the number of

colony-forming cells was not affected by incubation with 6F6 compared with untreated cells. To further validate these results, the 6 F6 mAb was tested in other cancer cell lines that overexpress CLDN1 (BXP3, PANC-1, SKOV-3, IGROV1 and HuH-7 cells) (Additional file 2: Figure S3 and Fig. 4b). The 6F6 mAb inhibited colony formation (17 to 41% of inhibition) in all tested CLDN1-positive cell lines.

In spheroids made of CLDN1-positive CRC cell lines (SW480-CLDN1, SW620 and Difi cells), spheroid size was smaller in antibody-treated than in untreated cultures (Fig. 4c). Conversely, no effect was observed in spheroids incubated with an irrelevant antibody or in spheroids made of CLDN1-negative SW480 cells. Similarly, the viable cell number (between 17 and 32%) was significantly reduced in spheroids made of SW480-CLDN1 ($p = 0.03$), SW620 ($p = 0.005$) and Difi ($p = 0.0001$) cells incubated with the 6F6 mAb, but not in SW480 spheroids ($p = 0.7$), compared with controls (untreated cultures or incubated with the irrelevant antibody) (Fig. 4d).



To determine whether 6F6 inhibitory effects involved promotion of cell death or inhibition of cell proliferation, the growth of DiFi spheroids was monitored over time. After 5 days of culture in the presence of the 6F6 mAb, the spheroid area was significantly reduced (by more than two-fold) compared with untreated cultures or incubated with the irrelevant antibody (Fig. 5a). Then, quantification of propidium iodide staining showed a similar cell cycle distribution in treated and untreated spheroids, although

the S phase fraction was slightly reduced in 6F6-treated spheroids (from 13.3 to 9.45%) (Fig. 5b). Thus, the percentage of cells in S phase was evaluated by quantifying EdU incorporation between day 4 and 5 of culture. In DiFi spheroids incubated with the 6F6 mAb, the number of DAPI-labeled cells (total cell count) was significantly reduced ($p = 0.02$ vs untreated cultures) (Fig. 5c, d) as well as the percentage of EdU-positive cells (19% in untreated and 7.7% in 6F6-treated cultures; $p = 0.05$) and EdU mean

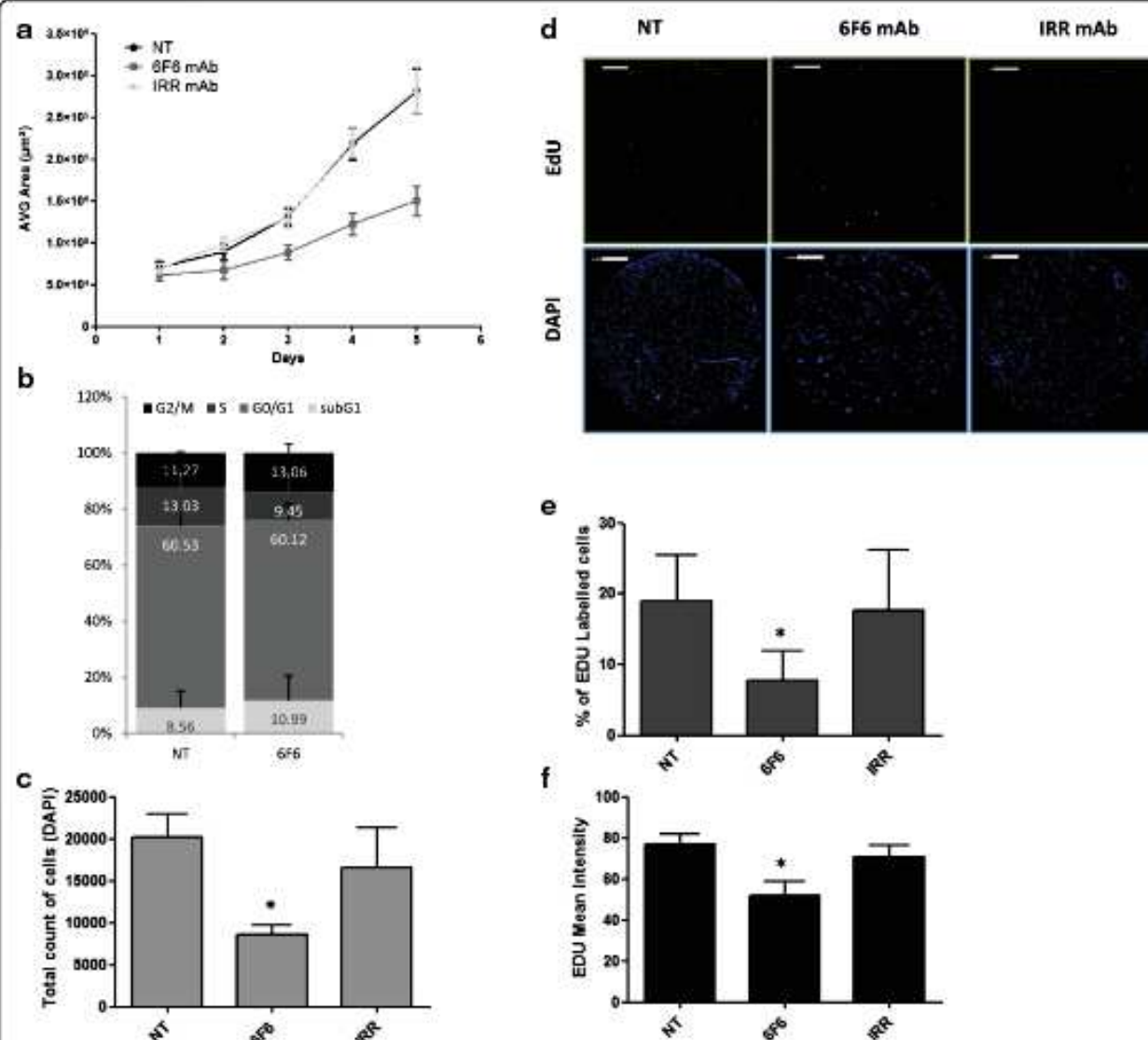


Fig. 5 Anti-proliferative effect of the 6F6 mAb on DiFi spheroids. **a** The Celligo™ imaging cytometer was used to monitor growth and measure the average (AVG) spheroid area over 5 days. Bright-field images of DiFi spheroids incubated or not (NT) with the 6F6 mAb or the irrelevant (IRR) mAb (negative control) were acquired every day. **b** Cell cycle distribution in DiFi spheroids was assessed by quantifying propidium iodide staining with a FC500 flow cytometer after incubation or not (NT) with the 6F6 mAb for 5 days. **c** Quantification of the number of DAPI-positive cells in DiFi spheroids incubated or not (NT) with the 6F6 or the irrelevant (IRR) mAb at day 5. **d** Zoomed images at day 5 of spheroids incubated or not (NT) with the 6F6 or the irrelevant (IRR) mAb and then stained with EdU (green) and DAPI (blue) for the last 24 h. **e** After 24 h EdU incorporation, quantification of EdU-positive cells and **f** measurement of EdU fluorescence intensity at day 5 in spheroids incubated or not (NT) with the 6F6 or the irrelevant (IRR) mAb. * = $p < 0.05$ (paired t-test)

intensity ($p = 0.01$ vs untreated cultures) (Fig. 5d, e, f). The irrelevant antibody did not have any effect.

Quantification of caspase-3 activation (a marker of apoptosis) in live Difi spheroids at day 5 did not show any significant difference in caspase-3 activation between negative controls and spheroids incubated with the 6F6 mAb (Additional file 2: Figure S4; Additional file 3). As a positive control, incubation with cetuximab significantly increased caspase-3 activation in spheroids compared with the other conditions ($p = 0.05$), as already described [32].

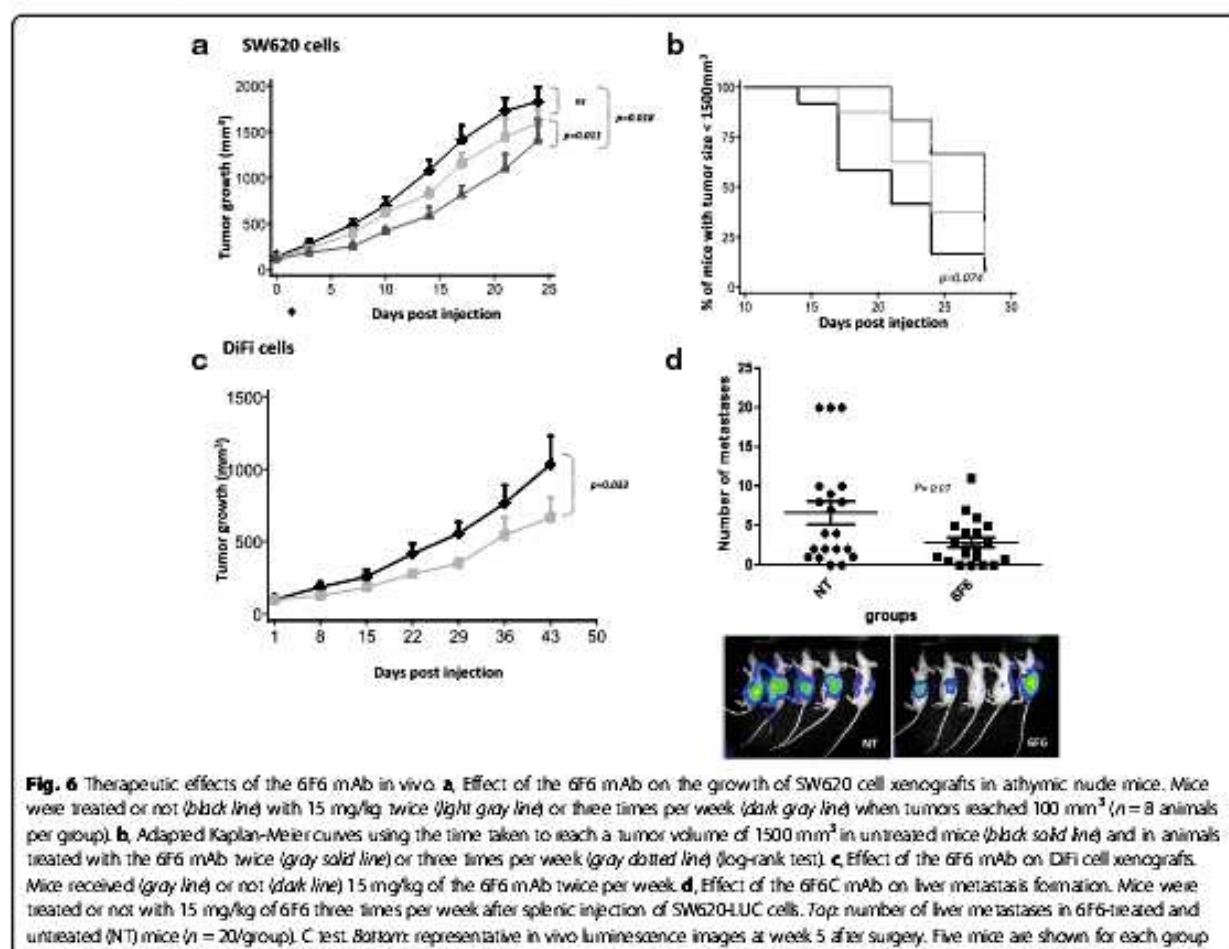
Finally, the 6F6 mAb reduced migration of the CDN1-positive SW620 and Caco2 cell lines ($43 \pm 9\%$ reduction in Caco2 cells compared with untreated cells or incubated with the irrelevant antibody). Similarly, in wound healing assays, migration of SW620 cells was inhibited by the 6F6 mAb (Additional file 2: Figure S5; Additional file 3).

The anti-CLDN1 monoclonal antibody delays CRC cell xenograft growth and metastasis formation

To evaluate the therapeutic potential of the anti-CLDN1 6F6 mAb, athymic nude mice were xenografted with

SW620 cells (*KRAS*-mutated) and treated with 0.9% NaCl or the 6F6 mAb. Measurement of the tumor volume over time showed that tumor growth was significantly reduced in the two 6F6 mAb-treated groups ($p = 0.018$) compared with controls. This effect was significantly stronger ($p = 0.011$) in the group treated three times per week than in the group that received the mAb only twice per week (Fig. 6a). The median time needed for the tumor to reach the volume of 1500 mm^3 was longer in the group treated three times/week compared with controls (28 days vs 21 days, respectively; $p = 0.07$) (Fig. 6b). The inhibitory effect of the 6F6 mAb on tumor growth was confirmed in mice xenografted with DiFi CRC cells (wild type *KRAS*) that overexpress CLDN1 ($p = 0.03$) (Fig. 6c).

Finally, analysis of the effects of the 6F6 mAb on the formation of liver metastases showed that SW620 cells metastasized to the liver, as previously reported [14], but the number of metastases per liver was lower in the mAb-treated group than in controls ($p = 0.07$) (Fig. 6d).



Discussion

In this study, we assessed CLDN1 as a potential therapeutic target in CRC. We found that CLDN1 is mainly localized at the cell membrane of CRC cells and described, for the first time, CLDN1 expression in the different CRC molecular subtypes. We also found that CLDN1 expression has a prognostic value in the C3 and C5 Marisa's subtypes. Using a new mAb (6F6) that specifically recognizes the extracellular part of human CLDN1, we demonstrated that CLDN1 targeting reduces CRC xenograft growth and liver metastasis formation. Finally, we showed that 6F6 activity is mediated through inhibition of cell proliferation.

CLDN1 membrane overexpression in all tested primary tumor samples from patients with mCRC supports the hypothesis that CLDN1 could represent a target for antibody-based therapy. Analysis of CLDN1 expression in the new CRC molecular subtypes [23–25] and the recent consensus subtypes [26] highlighted important variations among the different CRC classes, in agreement with CRC heterogeneity. Specifically, *CLDN1* expression is significantly higher in CRC subtypes associated with marked WNT signaling activation, such as the Marisa's C5, Sadanandam's TA and CMS2 consensus subtypes. These findings are in accordance with the already described involvement of CLDN1 in WNT signaling [13, 14, 16]. Moreover, we demonstrated for the first time that *CLDN1* expression level could be used for outcome prediction in patients with mCRC and that this prognostic value is dependent on the molecular subtype. CLDN1 could become a marker to guide the choice of targeted therapy in mCRC. Indeed, CRCs belonging to the Marisa's C5 and C3 subtypes could be targeted with an anti-CLDN1 mAb, particularly the C3 subtype because it is enriched in CRCs from patients with mutated *KRAS* who are not eligible to anti-EGFR targeted therapy [33]. Moreover, the *in vivo* anti-tumor effect (tumor growth delay and survival improvement) of the 6F6 mAb in mice xenografted with CLDN1-positive CRC cells seems to be independent of *KRAS* mutational status.

In vitro, the 6F6 mAb negatively influences cell growth when CRC cells are grown in a 3D culture system. Growing evidence indicates that cancer cells cultured in 3D spheroids are closer to *in vivo* models than cell cultured in 2D systems and that they might better predict the *in vivo* outcome [34]. Indeed, CLDN1 is critical for maintaining cell growth in 3D, but does not affect cell growth in monolayer cultures [35]. Our findings indicate that in 3D culture, the 6F6 mAb has a cytostatic effect on tumor cells. As both treated and untreated spheroids showed similar cell cycle distribution, this cytostatic effect reflects a global slowing down of cell cycle progression and not an arrest in a particular phase.

In the intrasplenic model of liver metastases, which results in the rapid liver colonization by tumor cells with

extremely aggressive growth [36], treatment with the 6F6 mAb decreased the number of liver metastases. These results are supported by the *in vitro* finding that the 6F6 mAb decreases the number of colonies and reduces cell survival in a large panel of CLDN1-positive cancer cell lines. Moreover, the 6F6 mAb affected the migration capacity of all tested CLDN1-positive CRC cell lines. In agreement, siRNA-mediated *CLDN1* knock-down in metastatic CRC cells inhibits migration [14]. Conversely, CLDN1 overexpression increases cell motility [37]. Our anti-CLDN1 mAb, by affecting tumor cell migration, could play an important role in the control of cancer cell invasiveness.

The efficacy of the 6F6 mAb could be improved by increasing its Fc-dependent properties. Indeed, the 6F6 mAb is an IgG3 and, therefore, only binds with low affinity to FcγRI [38] that mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Another approach to enhance 6F6 mAb efficacy would be to associate a cytotoxic effector agent in order to create an antibody-drug conjugate [39]. Before that, its toxicity in healthy tissues must be evaluated, although a recent study excluded major toxicity or side effects induced by another anti-CLDN1 mAb in mice [40].

Conclusions

This study demonstrated that CLDN1 could be a new potential therapeutic target in CRC and that CLDN1 targeting with a specific antibody has anti-tumor effects *in vivo* and *in vitro*. Moreover, analysis of CLDN1 expression in primary tumor samples from patients with mCRC allowed the identification of two CRC molecular subclasses (C3 and C5) that could benefit from CLDN1-targeting therapies. Finally, this work provides the proof of concept for the development of new therapeutic strategies against tight junction proteins in CRC.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Distribution of patients with mCRC according to the tumor molecular subtype. (DOCX 33 kb)

Additional file 2: Figure S1. *CLDN1* gene (222549_at) expression. **a**, in 17 normal colonic mucosa (NM), 20 primary tumor (PT) samples and 19 hepatic metastases (HM); *** = $p < 0.0001$ (Kruskal-Wallis/Dunn's test). **b**, Ratio between *CLDN1* expression in PT and *CLDN1* expression in NM for the 15 paired NM and PT samples from patients with mCRC. Data from the Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Array Set (GSE 62322).

Figure S2. The 6F6 mAb is specific for CLDN1. **a**, Reactivity of the hybridoma supernatant 6F6 against CLDN1. Western blotting of protein extracts from SW480 cells stably transfected with CLDN1 and from SW620 cells transfected with shLUC (control) or shCLDN1. FACS histograms show the binding of the hybridoma supernatant to CLDN1-positive cell lines (SW480-CLDN1 and SW620shLUC) (■), negative control (—), CLDN1-negative cell lines (—). **b**, Immunofluorescence experiments in cells that express CLDN1 (SW480-CLDN1) or transfected with empty vector (SW480-pcDNA) using the 6F6 mAb as primary antibody (green). Images were recorded using a 63X NA objective on a Leica inverted microscope.

c, Surface plasmon resonance measurements of the interaction of 6F6 or of an irrelevant mAb (Ir) with membrane extracts from SW620 cells that express CLDN1. **d**, Cross-reactivity analysis of the 6F6 mAb towards other CLDN proteins. Top: The expression of the various CLDN proteins (as indicated) in cell lysates from parental or CLDN-transfected SW620 cells was tested by western blotting using the relevant antibodies; Bottom: FACS histograms of 6F6 binding (10 µg/ml) to parental or CLDN-transfected SW620 cells. Gray, 6F6 mAb; dotted line, no antibody; black line, irrelevant mAb. **Figure S3**, CLDN1 is expressed in various cancer cell lines. **a**, FACS histograms of the 6F6 mAb binding (gray histogram) to different cancer cell lines (pancreatic cancer: PANC-1, BXPC-3; ovarian cancer: SKOV-3, IGROV-1; hepatocarcinoma: HUH7). **b**, Quantification of total CLDN1 expression in the cell lines used in **a** by western blotting using the anti-CLDN1 polyclonal antibody JAY-8. **c**, CLDN1 mRNA expression in cell lines from the Cancer Cell Line Encyclopedia (<http://www.broadinstitute.org/ccle>). **Figure S4**, Detection of apoptosis in Dll1 spheroids using the Celigo™ imaging system and the NucView™ 488 cell membrane-permeable fluorescent caspase-3 substrate. Dll1 cells were seeded at a density of 10⁴/ml in Fluorobrite™ DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated or not (NT) with 100 µg/ml of the 6F6 mAb, the anti-EGFR cetuximab (cetux) or an irrelevant mAb (IRR). The caspase-3 substrate was added (5 µM) at the same time. Images were acquired at day 5. The bright-field and caspase 3 (green) images were merged (top panels) and the histogram (lower panel) represents the mean fluorescence intensity. * = $p < 0.05$ (t-test). **Figure S5**, Effects of the 6F6 mAb on cancer cell migration in vitro. **a**, Wound healing assay: confluent SW620 cell monolayers were scratched and then grown in the presence or not (NT) of 100 µg/ml of the 6F6 mAb or irrelevant antibody (IRR). Images were captured at day 0 (D0) and day 5 (D5) after wounding. **b**, Cell migration assay in Boyden chambers. Caco2 cells were pre-incubated or not (NT) with 100 µg/ml of 6F6 or irrelevant (IRR) mAb. Data used for statistical analysis were from at least three independent experiments; ** $p < 0.01$ (Kruskal Wallis/Dunn's test). (PPTX 2370 kb)

Additional file 3: Supplementary methods: Flow cytometry experiments. Immunofluorescence studies. Surface plasmon resonance measurements. Cell migration assays. Apoptosis assay. (DOCX 37 kb)

Acknowledgments

The authors thank Inade Ait Arsa, Véronique Garambois, Christelle Laitboret and Charles Vincent for their help with animal experiments. The animal facility staff is greatly acknowledged. We thank Patrick Balaguer for providing the SW620-LUC cell line and Hervé Water for helpful discussions. Flow cytometry analyses were performed using equipment at the Montpellier RIO Imaging facility.

Funding

This work was supported by grants from the French National Research Agency under the program "Investissements d'avenir" Grant Agreement LabEx MAbimprove: ANR-10-LABX-53, SIRIC Montpellier Cancer Grant « INCA-DGOS-Inserm 6045 », Inca grant INCA-REC10356, Ligue Régionale Contre le Cancer (comité du Gard) and GEFLUC.

Availability of data and materials

Transcript Profiling- GSE62322, GSE62080 and GSE72970

Authors' contributions

MDR: concept, design and supervision of the project; MY, FB provided tissue and clinical/pathological assistance; FIB performed IHC studies; MDR, CM and PM acquired and analyzed the transcriptomic data; MDR, AA, NV, NG, SC and VD performed in vitro experiments; NV supervised all FACS experiments; MP did surface plasmon resonance experiments; EC, LCT and MB set up intrasplenic mouse model and did SPECT/CT experiments; CM did statistical analysis; MDR, AA, SC, NV and CG have analyzed and interpreted the data; MDR wrote the manuscript with critical revision of AA, CG, SC and PM. All authors approved the content of the manuscript.

Authors' information

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

We used in this study tumor samples from patients coming from three cohorts, REGP [19, 20] COSMAL and BIOCOLON (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00599676>; [21]). The three studies were approved by ethical committees and all participating patients were informed of the study and had to provide signed written informed consent before enrollment.

All animal experiments were performed in compliance with the French government guidelines for experimental animal studies (agreement CEEA-LR-12052).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. Some of the results presented in the paper have been patented by INSERM (PCT/EP2014/05676).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 22 February 2017 Accepted: 19 June 2017

Published online: 28 June 2017

References

- Fakhri MG. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *J Clin Oncol*. 2015;33:1809–24.
- Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2004;22:229–37.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:337–45.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:2335–42.
- Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 1998;141:1539–50.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2:285–93.
- Offner S, Hekele A, Teichmann U, Weinberger S, Gross S, Küfer P, et al. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancreatic cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:431–45.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778:631–45.
- Lai-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol*. 2009;10:235.
- Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Comp Physiol*. 2012;2:1819–52.
- Gröne J, Weber B, Staub E, Heinze M, Kraman I, Pilarsky C, et al. Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22:651–9.
- Huo Q, Khugasa T, Wang L, Huang J, Zhao J, Shibaguchi H, et al. Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2009;29:851–7.
- Miya N, Furuse M, Tsukita S, Nishikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res*. 2001;12:469–76.
- Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou S-R, Schmidt C, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*. 2005;115:1765–76.
- Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*. 2010;2010:541957.
- Singh AB, Sharma A, Smith JJ, Krishnan M, Chen X, Eschrich S, et al. Claudin-1 up-regulates the repressor ZEB-1 to inhibit E-Cadherin expression in colon cancer cells. *Gastroenterology*. 2011;142:58–65.
- Pope JL, Bhat AA, Sharma A, Ahmad R, Krishnan M, Washington MK, et al. Claudin-1 regulates intestinal epithelial homeostasis through the modulation of Notch-signaling. *Gut*. 2014;63:522–34.

18. Pope JL, Ahmad R, Bhat AA, Washington MK, Singh AB, Dhawan P. Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenomatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis. *Mol Cancer*. 2014;13:167.
19. Del Rio M, Molina F, Bascoul-Molleu C, Copois V, Bibeau F, Chalbos P, et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007;25:773–80.
20. Del Rio M, Molleu C, Vezzio-Mie N, Bibeau F, Ychou M, Martineau P. Specific extracellular matrix remodeling signature of colon hepatic metastases. *PLoS One*. 2013;8:e74599.
21. Del Rio M, Molleu C, Bibeau F, Mie N, Selves J, Emile JF, et al. Molecular subtypes of metastatic colorectal cancer are associated with patient response to irinotecan-based therapies. *Eur J Cancer*. 2017;76:68–75.
22. Copois V, Bibeau F, Bascoul-Molleu C, Salvetat N, Chalbos P, Bareil C, et al. Impact of RNA degradation on gene expression profiles: assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *J Biotechnol*. 2007;127:549–59.
23. Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*. 2013;10:e1001453.
24. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Horiike K, Collisson BA, Gibb WJ, Wulschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013;19:19–25.
25. De Sousa EMelo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LPMH, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*. 2013;19:614–8.
26. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;19:614–8.
27. Rodríguez-Salas N, Domínguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;109:9–19.
28. Granci V, Bibeau F, Kamar A, Boissière-Michot F, Théodanis S, Thirion A, et al. Prognostic significance of TRAIL-R1 and TRAIL-R3 expression in metastatic colorectal carcinomas. *Eur J Cancer Onc Engl*. 2008;44:2312–8.
29. Bömer A, Wamken U, Schneider M, von Hagen J, Giese N, Bauer A, et al. Subcellular protein extraction from human pancreatic cancer tissues. *BioTechniques*. 2009;46:297–304.
30. Olive M, Untchale S, Coffey RJ, Scitiano MJ, Wildrick DM, Fritsche H, Pathak S, Cherry LM, Blick M, Lointier P, et al. Characterization of the CDFI rectal carcinoma cell line derived from a familial adenomatous polyposis patient. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1993;29A(3 Pt 1):239–48. PubMed PMID: 8385096.
31. Dhawan P, Ahmad R, Chaturvedi R, Smith JJ, Midha R, Mittal MK, et al. Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene*. 2011;30:3234–47.
32. Marzi L, Combes E, Mé N, Ayrolles-Torres A, Tosi D, Desgauld D, et al. FOXO3a and the MAPK p38 are activated by cetuximab to induce cell death and inhibit cell proliferation and their expression predicts cetuximab efficacy in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016;115:1223–33.
33. Hedt JR, Douillard J-Y, Schwartzberg L, Grothey A, Kopetz S, Rong A, et al. Extended RAS analysis for anti-epidermal growth factor therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*. 2015;41:653–9.
34. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:839–45.
35. Huang J, Zhang L, He C, Qu Y, Li J, Zhang J, et al. Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anikis in gastric cancer. *Oncotarget*. 2015;6:1652–65.
36. Hack C, Man S, Franda G, Milsom C, Xu P, Keibel RS. Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut*. 2013;62:259–71.
37. Leotila PD, Wade MS, Duray PH, Rhode MU, Brown HF, Rosenthal DT, et al. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene*. 2007;26:3846–56.
38. Buhrs P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*. 2012;119:5640–9.
39. Lambert JM. Drug-conjugated antibodies for the treatment of cancer. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76:248–62.
40. Mailly L, Xiao F, Lupberger J, Wilson GK, Aubert P, Duong FHT, et al. Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol*. 2015;33:549–54.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Références bibliographiques

1. Institut National Du Cancer. Le côlon - Cancer du côlon. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Le-colon>.
2. Institut National Du Cancer. Le cancer du côlon : points clés - Cancer du côlon. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Points-cles>.
3. Lichtenstein, P. *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* **343**, 78–85 (2000).
4. Grady, W. M. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology* **124**, 1574–1594 (2003).
5. Jaspersion, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2044–2058 (2010).
6. Lynch, H. T. & de la Chapelle, A. Hereditary Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919–932 (2003).
7. Hampel, H. *et al.* Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5783–5788 (2008).
8. Stoffel, E. *et al.* Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* **137**, 1621–1627 (2009).
9. Burt, R. W. *et al.* Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **127**, 444–451 (2004).
10. Guillem, J. G. *et al.* ASCO/SSO review of current role of risk-reducing surgery in common hereditary cancer syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 4642–4660 (2006).
11. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
12. Morán, A. *et al.* Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J. Gastrointest. Oncol.* **2**, 151–158 (2010).
13. Rusan, N. M. & Peifer, M. Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. *J. Cell Biol.* **181**, 719–726 (2008).
14. Dobre, M., Comănescu, M., Arsene, D., Iosif, C. & Bussolati, G. K-ras gene mutation status in colorectal cancer: comparative analysis of pyrosequencing and PCR-RFLP. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **54**, 567–574 (2013).

15. Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y. & Niitsu, Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J. Gastroenterol.* **41**, 185–192 (2006).
16. Grady, W. M. & Pritchard, C. C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol. Pathol.* **42**, 124–139 (2014).
17. Kubbutat, M. H., Jones, S. N. & Vousden, K. H. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299–303 (1997).
18. Raskov, H., Pommergaard, H.-C., Burcharth, J. & Rosenberg, J. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 18151–18164 (2014).
19. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
20. Kruse, J.-P. & Gu, W. Modes of p53 Regulation. *Cell* **137**, 609–622 (2009).
21. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561 (1993).
22. Thibodeau, S. N., Bren, G. & Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**, 816–819 (1993).
23. Kane, M. F. *et al.* Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* **57**, 808–811 (1997).
24. Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**, 5248–5257 (1998).
25. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073–2087.e3 (2010).
26. Stades du cancer colorectal - Cancer du côlon | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Stades-du-cancer-colorectal>.
27. FR-Cancer-Colorectal-Guide-pour-les-Patients.pdf. Available at: <http://www.esmo.org/content/download/15727/270760/file/FR-Cancer-Colorectal-Guide-pour-les-Patients.pdf>.
28. Perou, C. M. *et al.* Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9212–9217 (1999).
29. Guinney, J. *et al.* The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat. Med.* **21**, 1350–1356 (2015).

30. Budinska, E. *et al.* Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J. Pathol.* **231**, 63–76 (2013).
31. Marisa, L. *et al.* Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* **10**, e1001453 (2013).
32. Roepman, P. *et al.* Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer* **134**, 552–562 (2014).
33. De Sousa E Melo, F. *et al.* Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* **19**, 614–618 (2013).
34. Sadanandam, A. *et al.* A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.* **19**, 619–625 (2013).
35. Schlicker, A. *et al.* Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med. Genomics* **5**, 66 (2012).
36. Dienstmann, R. *et al.* Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 79–92 (2017).
37. Roseweir, A. K., McMillan, D. C., Horgan, P. G. & Edwards, J. Colorectal cancer subtypes: Translation to routine clinical pathology. *Cancer Treat. Rev.* **57**, 1–7 (2017).
38. Institut National du CAncer. *Les cancers en France*. (2015).
39. Traitements selon le stade - Traitements | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Traitements/Traitements-selon-le-stade>. (Accessed: 14th August 2017)
40. Traitements en fonction du stade - Cancer du rectum | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-rectum/Traitements-en-fonction-du-stade>. (Accessed: 14th August 2017)
41. Tournigand, C. *et al.* FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 229–237 (2004).
42. Mody, K. Optimizing Sequencing Beyond Disease Progression After Second-Line Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Am. J. Hematol. Oncol.* **13**, (2017).
43. Loree, J. M. & Kopetz, S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **9**, 551–564 (2017).
44. Pellerin, O. & Geschwind, J.-F. Traitement intra-artériel des métastases hépatiques de cancer colorectal. *J. Radiol.* **92**, 835–841 (2011).

45. Heidelberger, C. *et al.* Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* **179**, 663–666 (1957).
46. Curreri, A. R., Ansfield, F. J., McIVER, F. A., Waisman, H. A. & Heidelberger, C. Clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Res.* **18**, 478–484 (1958).
47. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
48. Poon, M. A. *et al.* Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **7**, 1407–1418 (1989).
49. Meropol, N. J. Oral fluoropyrimidines in the treatment of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **34**, 1509–1513 (1998).
50. Köhne, C. H. & Peters, G. J. UFT: mechanism of drug action. *Oncol. Williston Park N* **14**, 13–18 (2000).
51. Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J. & Hecht, S. M. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry (Mosc.)* **28**, 4629–4638 (1989).
52. Kawato, Y., Aonuma, M., Hirota, Y., Kuga, H. & Sato, K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* **51**, 4187–4191 (1991).
53. Hsiang, Y. H. *et al.* DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res.* **49**, 4385–4389 (1989).
54. Lodish, H. *et al.* The Role of Topoisomerases in DNA Replication. (2000).
55. Topoisomerase I and Irinotecan - LUNIRI. Available at: https://www.luniri.com/Topoisomerase_I_and_Irinotecan.
56. Saltz, L. B. *et al.* Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. *The Oncologist* **6**, 81–91 (2001).
57. Cui, C. *et al.* UGT1A1*6, UGT1A7*3 and UGT1A9*1b polymorphisms are predictive markers for severe toxicity in patients with metastatic gastrointestinal cancer treated with irinotecan-based regimens. *Oncol. Lett.* **12**, 4231–4237 (2016).
58. Research, C. for D. E. and. Genomics - Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>.
59. Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **222**, 385–386 (1969).

60. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 573–584 (2007).
61. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **0**, 364–378 (2014).
62. Rixe, O. *et al.* Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1855–1865 (1996).
63. Kline, C. L. B. & El-Deiry, W. S. Personalizing Colon Cancer Therapeutics: Targeting Old and New Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals* **6**, 988–1038 (2013).
64. Woynarowski, J. M., Chapman, W. G., Napier, C., Herzig, M. C. & Juniewicz, P. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol. Pharmacol.* **54**, 770–777 (1998).
65. Scheeff, E. D., Briggs, J. M. & Howell, S. B. Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol. Pharmacol.* **56**, 633–643 (1999).
66. Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J. M. & Chaney, S. G. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol.* **25**, 4–12 (1998).
67. Perego, P. & Robert, J. Oxaliplatin in the era of personalized medicine: from mechanistic studies to clinical efficacy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 5–18 (2016).
68. Di Francesco, A. M., Ruggiero, A. & Riccardi, R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **59**, 1914–1927 (2002).
69. Bianchi, M. E. Killing cancer cells, twice with one shot. *Cell Death Differ.* **21**, 1–2 (2014).
70. Tesniere, A. *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**, 482–491 (2010).
71. André, T., Louvet, C., Maindrault-Goebel, F. & Gramont, A. D. [Oxaliplatin in combination with 5-fluoro-uracil and folinic acid as treatment of metastatic colorectal cancer]. *Bull. Cancer (Paris)* **88 Spec No**, S20-25 (2001).
72. Masi, G. *et al.* First-line 5-fluorouracil/folinic acid, oxaliplatin and irinotecan (FOLFOXIRI) does not impair the feasibility and the activity of second line treatments in metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **17**, 1249–1254 (2006).
73. Cassidy, J. & Misset, J.-L. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin. Oncol.* **29**, 11–20 (2002).
74. O'Dwyer, P. J. & Benson, A. B. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin. Oncol.* **29**, 10–17 (2002).

75. Wang, Y., Schmid-Bindert, G. & Zhou, C. Erlotinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: an update for clinicians. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **4**, 19–29 (2012).
76. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
77. Broutin, M. & Watier, H. Les biomédicaments. in *apbg Biologie Géologie n° 2*, (2016).
78. Ng, K. & Zhu, A. X. Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **65**, 8–20 (2008).
79. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor | Cancer Network. Available at: <http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/targeting-epidermal-growth-factor-receptor>.
80. No EGFR Mutation Detected in Non-Small Cell Lung Cancer - My Cancer Genome. Available at: <https://www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/79/>.
81. Masui, H. *et al.* Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **44**, 1002–1007 (1984).
82. Mendelsohn, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **3**, 2703–2707 (1997).
83. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P. & Mendelsohn, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **1**, 1311–1318 (1995).
84. Kawamoto, T. *et al.* Polymorphonuclear leukocytes-mediated lysis of A431 cells induced by IgG1 mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* **28A**, 782–786 (1992).
85. Kurai, J. *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1552–1561 (2007).
86. Yang, X. *et al.* Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **21**, 91–100 (2013).
87. Cunningham, D. *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 337–345 (2004).
88. Voigt, M. *et al.* Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab. *Neoplasia N. Y. N* **14**, 1023–1031 (2012).
89. Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P. & Davis, C. G. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **38**, 17–23 (2001).

90. Foon, K. A. *et al.* Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 984–990 (2004).
91. Hammond, W. A., Swaika, A. & Mody, K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8**, 57–84 (2016).
92. Ciombor, K. K. & Berlin, J. Targeting metastatic colorectal cancer - present and emerging treatment options. *Pharmacogenomics Pers. Med.* **7**, 137–144 (2014).
93. Gottesman, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**, 615–627 (2002).
94. Meijer, G. A. *et al.* Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* **52**, 450–454 (1999).
95. Candeil, L. *et al.* ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *Int. J. Cancer* **109**, 848–854 (2004).
96. Nakatomi, K. *et al.* Transport of 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by Breast Cancer Resistance Protein ABCG2 in Human Lung Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 827–832 (2001).
97. Tuy, H. D. *et al.* ABCG2 expression in colorectal adenocarcinomas may predict resistance to irinotecan. *Oncol. Lett.* **12**, 2752–2760 (2016).
98. Zhao, J. *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in MTHFR and ABCG2 with the different efficacy of first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Med. Oncol.* **31**, 802 (2014).
99. Hinoshita, E. *et al.* Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 2401–2407 (2000).
100. Liu, Z. *et al.* Establishment and biological characteristics of oxaliplatin-resistant human colon cancer cell lines. *Chin. J. Cancer* **29**, 661–667 (2010).
101. Mirakhorli, M. *et al.* Lack of association between expression of MRP2 and early relapse of colorectal cancer in patients receiving FOLFOX-4 chemotherapy. *Oncol. Lett.* **4**, 893–897 (2012).
102. Li, Z., Zheng, R., Chen, J., Jia, J. & Qiu, M. The role of copper transporter ATP7A in platinum-resistance of esophageal squamous cell cancer (ESCC). *J. Cancer* **7**, 2085–2092 (2016).
103. Samimi, G. *et al.* Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 4661–4669 (2004).

104. Tadini-Buoninsegni, F. *et al.* Translocation of platinum anticancer drugs by human copper ATPases ATP7A and ATP7B. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 1297–1301 (2014).
105. Martinez-Balibrea, E. *et al.* Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int. J. Cancer* **124**, 2905–2910 (2009).
106. Tashiro, A. *et al.* High expression of organic anion transporter 2 and organic cation transporter 2 is an independent predictor of good outcomes in patients with metastatic colorectal cancer treated with FOLFOX-based chemotherapy. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 528–536 (2014).
107. Wang, T. *et al.* Inhibition of Transient Receptor Potential Channel 5 Reverses 5-Fluorouracil Resistance in Human Colorectal Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 448–456 (2015).
108. Wilson, B. J. *et al.* ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **71**, 5307–5316 (2011).
109. Takebe, N. *et al.* Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther.* **8**, 966–973 (2001).
110. Salonga, D. *et al.* Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 1322–1327 (2000).
111. Martinez-Balibrea, E. *et al.* Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 1767–1776 (2015).
112. Zaanani, A. *et al.* ERCC1, XRCC1 and GSTP1 Single Nucleotide Polymorphisms and Survival of Patients with Colon Cancer Receiving Oxaliplatin-Based Adjuvant Chemotherapy. *J. Cancer* **5**, 425–432 (2014).
113. Bai, W., Wu, Y., Zhang, P. & Xi, Y. Correlations between expression levels of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase, and efficacy of 5-fluorouracil-based chemotherapy for advanced colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 12333–12345 (2015).
114. McLeod, H. L. & Keith, W. N. Variation in topoisomerase I gene copy number as a mechanism for intrinsic drug sensitivity. *Br. J. Cancer* **74**, 508–512 (1996).
115. Palshof, J. A. *et al.* Topoisomerase I copy number alterations as biomarker for irinotecan efficacy in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* **17**, 48 (2017).

116. Jensen, N. F. *et al.* Characterization of DNA topoisomerase I in three SN-38 resistant human colon cancer cell lines reveals a new pair of resistance-associated mutations. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **35**, 56 (2016).
117. Gongora, C. *et al.* New Topoisomerase I mutations are associated with resistance to camptothecin. *Mol. Cancer* **10**, 64 (2011).
118. Tsurutani, J. *et al.* Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Lung Cancer Amst. Neth.* **35**, 299–304 (2002).
119. Burgess, D. J. *et al.* Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9053–9058 (2008).
120. Bardelli, A. & Siena, S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 1254–1261 (2010).
121. Lièvre, A. *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992–3995 (2006).
122. Misale, S. *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **486**, 532–536 (2012).
123. Braig, F. *et al.* Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 42988–42995 (2016).
124. Esposito, C. *et al.* The S492R EGFR ectodomain mutation is never detected in KRAS wild-type colorectal carcinoma before exposure to EGFR monoclonal antibodies. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 1143–1146 (2013).
125. Longley, D. B. & Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.* **205**, 275–292 (2005).
126. Shirota, Y. *et al.* ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19**, 4298–4304 (2001).
127. Choueiri, M. B. *et al.* ERCC1 and TS Expression as Prognostic and Predictive Biomarkers in Metastatic Colon Cancer. *PloS One* **10**, e0126898 (2015).
128. Seetharam, R. N. *et al.* Oxaliplatin resistance induced by ERCC1 up-regulation is abrogated by siRNA-mediated gene silencing in human colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* **30**, 2531–2538 (2010).
129. Baba, H. *et al.* Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **107**, 1950–1955 (2012).

130. Monzo, M. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes XPA, XPD, XPG and ERCC1 in advanced colorectal cancer patients treated with first-line oxaliplatin/fluoropyrimidine. *Oncology* **72**, 364–370 (2007).
131. Liang, J. *et al.* The combination of ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms better predicts clinical outcome to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66**, 493–500 (2010).
132. Lv, H. *et al.* Genetic polymorphism of XRCC1 correlated with response to oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Cancer Invest.* **31**, 24–28 (2013).
133. Hu, T., Li, Z., Gao, C.-Y. & Cho, C. H. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J. Gastroenterol.* **22**, 6876–6889 (2016).
134. Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T. & Housman, D. E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**, 957–967 (1993).
135. Boyer, J. *et al.* Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 2158–2167 (2004).
136. McDermott, U. *et al.* Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, Fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Res.* **65**, 8951–8960 (2005).
137. Benhattar, J., Cerottini, J. P., Saraga, E., Mettetz, G. & Givel, J. C. p53 mutations as a possible predictor of response to chemotherapy in metastatic colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* **69**, 190–192 (1996).
138. Gourdier, I. *et al.* Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett.* **529**, 232–236 (2002).
139. Paillas, S. *et al.* Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res.* **71**, 1041–1049 (2011).
140. Bridges, C. B. The Origin of Variations in Sexual and Sex-Limited Characters. *Am. Nat.* **56**, 51–63 (1922).
141. Hartwell, L. H., Szankasi, P., Roberts, C. J., Murray, A. W. & Friend, S. H. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* **278**, 1064–1068 (1997).
142. O’Neil, N. J., Bailey, M. L. & Hieter, P. Synthetic lethality and cancer. *Nat. Rev. Genet.* (2017). doi:10.1038/nrg.2017.47
143. Thompson, J. M., Nguyen, Q. H., Singh, M. & Razorenova, O. V. Approaches to identifying synthetic lethal interactions in cancer. *Yale J. Biol. Med.* **88**, 145–155 (2015).
144. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913–917 (2005).

145. Astsaturov, I. *et al.* Synthetic lethal screen of an EGFR-centered network to improve targeted therapies. *Sci. Signal.* **3**, ra67 (2010).
146. Turcotte, S. *et al.* A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell* **14**, 90–102 (2008).
147. Anbalagan, S. *et al.* Radiosensitization of renal cell carcinoma in vitro through the induction of autophagy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **103**, 388–393 (2012).
148. Jacquemont, C., Simon, J. A., D’Andrea, A. D. & Taniguchi, T. Non-specific chemical inhibition of the Fanconi anemia pathway sensitizes cancer cells to cisplatin. *Mol. Cancer* **11**, 26 (2012).
149. Barbie, D. A. *et al.* Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* **462**, 108–112 (2009).
150. Xia, Y., Shen, S. & Verma, I. M. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 823–830 (2014).
151. Deng, T. *et al.* shRNA kinome screen identifies TBK1 as a therapeutic target for HER2+ breast cancer. *Cancer Res.* **74**, 2119–2130 (2014).
152. Prahallad, A. *et al.* Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* **483**, 100–103 (2012).
153. Yaeger, R. *et al.* Pilot trial of combined BRAF and EGFR inhibition in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 1313–1320 (2015).
154. Doudna, J. A. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096 (2014).
155. Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.-P., Velasco-Herrera, M. D. C. & Yusa, K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat. Biotechnol.* **32**, 267–273 (2014).
156. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**, 84–87 (2014).
157. Evers, B. *et al.* CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nat. Biotechnol.* **34**, 631–633 (2016).
158. CRISPR-Cas9: des ciseaux génétiques pour le cerveau. *CNRS Le journal* Available at: <https://lejournel.cnrs.fr/articles/crispr-cas9-des-ciseaux-genetiques-pour-le-cerveau>.
159. Gongora, C. *et al.* Altered expression of cell proliferation-related and interferon-stimulated genes in colon cancer cells resistant to SN38. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 822–832 (2008).

160. Huang, S. *et al.* MED12 controls the response to multiple cancer drugs through regulation of TGF- β receptor signaling. *Cell* **151**, 937–950 (2012).
161. Rask-Andersen, M., Zhang, J., Fabbro, D. & Schiöth, H. B. Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 604–620 (2014).
162. Protein Kinase Inhibitors in Oncology Drug Pipeline Update 2016 - Research and Markets. (2016). Available at: <http://www.businesswire.com/news/home/20160302005662/en/Protein-Kinase-Inhibitors-Oncology-Drug-Pipeline-Update>.
163. Ahmed, D. *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* **2**, e71 (2013).
164. Mátrai, J., Chuah, M. K. L. & VandenDriessche, T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 477–490 (2010).
165. Weber, A. M. & Ryan, A. J. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* **149**, 124–138 (2015).
166. Khalil, H. S., Tummala, H., Chakarov, S., Zhelev, N. & Lane, D. P. Targeting ATM pathway for therapeutic intervention in cancer. *BioDiscovery BioDiscovery* **Volume 1**, (2012).
167. Rainey, M. D., Charlton, M. E., Stanton, R. V. & Kastan, M. B. Transient inhibition of ATM kinase is sufficient to enhance cellular sensitivity to ionizing radiation. *Cancer Res.* **68**, 7466–7474 (2008).
168. Choi, M., Kipps, T. & Kurzrock, R. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 1781–1791 (2016).
169. Ahmed, M. & Rahman, N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene* **25**, 5906–5911 (2006).
170. Beggs, A. D. *et al.* Loss of expression of the double strand break repair protein ATM is associated with worse prognosis in colorectal cancer and loss of Ku70 expression is associated with CIN. *Oncotarget* **3**, 1348–1355 (2012).
171. Suenaga, M. *et al.* Genetic variants of DNA repair-related genes predict efficacy of TAS-102 in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 1015–1022 (2017).
172. Batey, M. A. *et al.* Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor, KU59403, in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 959–967 (2013).
173. Morgado-Palacin, I. *et al.* Targeting the kinase activities of ATR and ATM exhibits therapeutic potential in a mouse model of MLL-rearranged AML. *Sci. Signal.* **9**, ra91 (2016).

174. Pike, K. G. Abstract 4859: Identifying high quality, potent and selective inhibitors of ATM kinase: Discovery of AZD0156. *Cancer Res.* **76**, 4859–4859 (2016).
175. Karnitz, L. M. & Zou, L. Molecular Pathways: Targeting ATR in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 4780–4785 (2015).
176. Reaper, P. M. *et al.* Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 428–430 (2011).
177. Fokas, E. *et al.* Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis.* **3**, e441 (2012).
178. Fokas, E. *et al.* Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 109–117 (2014).
179. Manic, G., Obrist, F., Sistigu, A. & Vitale, I. Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy. *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e1012976 (2015).
180. Vogel, W. Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **13 Suppl**, S77-82 (1999).
181. von Mässenhausen, A. *et al.* Targeting DDR2 in head and neck squamous cell carcinoma with dasatinib. *Int. J. Cancer* **139**, 2359–2369 (2016).
182. Payne, L. S. & Huang, P. H. Discoidin domain receptor 2 signaling networks and therapy in lung cancer. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **9**, 900–904 (2014).
183. Jakubowska, J. & Czyz, M. [Novel inhibitors of Bcr-Abl]. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* **60**, 697–706 (2006).
184. Yang, J. *et al.* Discoidin domain receptors: a promoter of the aggressive behavior of ameloblastomas. *IUBMB Life* **66**, 292–299 (2014).
185. Sasaki, S. *et al.* DDR2 Expression Is Associated with a High Frequency of Peritoneal Dissemination and Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **37**, 2587–2591 (2017).
186. Badiola, I., Olaso, E., Crende, O., Friedman, S. L. & Vidal-Vanaclocha, F. Discoidin domain receptor 2 deficiency predisposes hepatic tissue to colon carcinoma metastasis. *Gut* **61**, 1465–1472 (2012).
187. Park, J.-W. *et al.* Downregulation of discoidin domain receptor 2 decreases tumor growth of hepatocellular carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **141**, 1973–1983 (2015).
188. Bosco, E. E., Mulloy, J. C. & Zheng, Y. Rac1 GTPase: a ‘Rac’ of all trades. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **66**, 370–374 (2009).

189. Bid, H. K., Roberts, R. D., Manchanda, P. K. & Houghton, P. J. RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1925–1934 (2013).
190. Pervaiz, S., Cao, J., Chao, O. S., Chin, Y. Y. & Clément, M. V. Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* **20**, 6263–6268 (2001).
191. Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J. & Zheng, Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7618–7623 (2004).
192. Espina, C. *et al.* A Critical Role for Rac1 in Tumor Progression of Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *Am. J. Pathol.* **172**, 156–166 (2008).
193. Matos, P. & Jordan, P. Increased Rac1b expression sustains colorectal tumor cell survival. *Mol. Cancer Res. MCR* **6**, 1178–1184 (2008).
194. Gómez del Pulgar, T. *et al.* Differential expression of Rac1 identifies its target genes and its contribution to progression of colorectal cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 2289–2302 (2007).
195. Bao, Y. *et al.* Blocking hepatic metastases of colon cancer cells using an shRNA against Rac1 delivered by activatable cell-penetrating peptide. *Oncotarget* **7**, 77183–77195 (2016).
196. Mei, H. *et al.* High expression of ROR2 in cancer cell correlates with unfavorable prognosis in colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 703–709 (2014).
197. Debebe, Z. & Rathmell, W. K. Ror2 as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol. Ther.* **150**, 143–148 (2015).
198. Lara, E. *et al.* Epigenetic repression of ROR2 has a Wnt-mediated, pro-tumourigenic role in colon cancer. *Mol. Cancer* **9**, 170 (2010).
199. Ma, S. S. Q. *et al.* ROR2 is epigenetically inactivated in the early stages of colorectal neoplasia and is associated with proliferation and migration. *BMC Cancer* **16**, 508 (2016).
200. Ma, S. S. Q. *et al.* Validation of specificity of antibodies for immunohistochemistry: the case of ROR2. *Virchows Arch.* **470**, 99–108 (2017).
201. Zhao, Y. *et al.* Cloning and characterization of a novel cardiac-specific kinase that interacts specifically with cardiac troponin I. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **81**, 297–304 (2003).
202. Milano, A., Lodder, E. M. & Bezzina, C. R. TNNI3K in cardiovascular disease and prospects for therapy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **82**, 167–173 (2015).
203. Wang, X. *et al.* TNNI3K, a Cardiac-Specific Kinase, Promotes Physiological Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice. *PLOS ONE* **8**, e58570 (2013).

204. Wang, Y. *et al.* Overexpression of Cardiac-Specific Kinase TNNI3K Promotes Mouse Embryonic Stem Cells Differentiation into Cardiomyocytes. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **41**, 381–398 (2017).
205. Lal, H., Ahmad, F., Parikh, S. & Force, T. Troponin I-interacting protein kinase: a novel cardiac-specific kinase, emerging as a molecular target for the treatment of cardiac disease. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **78**, 1514–1519 (2014).
206. Prognostic value of TNNI3K mRNA expression in Colorectal cancer. Available at: http://www.abren.net/PrognScan-cgi/PrognScan.cgi?TITLE=Prognostic+value%20of%20TNNI3K%20mRNA%20expression%20in%20Colorectal%20cancer&DATA_POSTPROCESSING=None&TEST_NUM=68&PROBE_ID=4029700&MODE=SHOW_GRAPH.
207. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 397–406 (2014).
208. Boehme, S. A. *et al.* MAP3K19 Is Overexpressed in COPD and Is a Central Mediator of Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation and Lower Airway Destruction. *PloS One* **11**, e0167169 (2016).
209. Boehme, S. A., Franz-Bacon, K., DiTirro, D. N., Ly, T. W. & Bacon, K. B. MAP3K19 Is a Novel Regulator of TGF- β Signaling That Impacts Bleomycin-Induced Lung Injury and Pulmonary Fibrosis. *PloS One* **11**, e0154874 (2016).
210. Liskova, P., Dudakova, L., Krepelova, A., Klema, J. & Hysi, P. G. Replication of SNP associations with keratoconus in a Czech cohort. *PloS One* **12**, e0172365 (2017).
211. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **12**, 207–218 (2014).
212. Lopez-Contreras, A. J. & Fernandez-Capetillo, O. Signalling DNA Damage. (2012). doi:10.5772/50863
213. Maréchal, A. & Zou, L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
214. Yi, C. & He, C. DNA Repair by Reversal of DNA Damage. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
215. Jalal, S., Earley, J. N. & Turchi, J. J. DNA repair: From genome maintenance to biomarker and therapeutic target. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 6973–6984 (2011).
216. Yoshimoto, K. *et al.* Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Front. Oncol.* **2**, (2012).

217. Zou, L. & Elledge, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542–1548 (2003).
218. Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. & Lindahl, T. Human DNA repair genes. *Science* **291**, 1284–1289 (2001).
219. López-Contreras, A. J. & Fernandez-Capetillo, O. The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair* **9**, 1249–1255 (2010).
220. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
221. Cimprich, K. A. & Cortez, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 616–627 (2008).
222. Pauklin, S., Kristjuhan, A., Maimets, T. & Jaks, V. ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediated apoptosis upon oncogenic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 386–394 (2005).
223. Kaina, B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1547–1554 (2003).
224. Dauth, I., Krüger, J. & Hofmann, T. G. Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res.* **67**, 2274–2279 (2007).
225. Saito, S. *et al.* ATM Mediates Phosphorylation at Multiple p53 Sites, Including Ser46, in Response to Ionizing Radiation. *J. Biol. Chem.* **277**, 12491–12494 (2002).
226. Myers, K., Gagou, M. E., Zuazua-Villar, P., Rodriguez, R. & Meuth, M. ATR and Chk1 Suppress a Caspase-3–Dependent Apoptotic Response Following DNA Replication Stress. *PLOS Genet.* **5**, e1000324 (2009).
227. Hilton, B. A. *et al.* ATR Plays a Direct Antiapoptotic Role at Mitochondria, which Is Regulated by Prolyl Isomerase Pin1. *Mol. Cell* **60**, 35–46 (2015).
228. Greco, W. R., Bravo, G. & Parsons, J. C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* **47**, 331–385 (1995).
229. Lehár, J. *et al.* Chemical combination effects predict connectivity in biological systems. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 80 (2007).
230. Lehár, J., Stockwell, B. R., Giaever, G. & Nislow, C. Combination chemical genetics. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 674–681 (2008).
231. Lehár, J. *et al.* Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat. Biotechnol.* **27**, 659–666 (2009).

232. Del Rio, M. *et al.* Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 773–80 (2007).
233. Del Rio, M. *et al.* Specific extracellular matrix remodeling signature of colon hepatic metastases. *PLoS One* **8**, e74599 (2013).
234. Popat, S., Hubner, R. & Houlston, R. s. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 609–618 (2005).
235. Bunz, F. *et al.* Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* **104**, 263–269 (1999).
236. Reles, A. *et al.* Correlation of p53 Mutations with Resistance to Platinum-based Chemotherapy and Shortened Survival in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2984–2997 (2001).
237. Petermann, E., Woodcock, M. & Helleday, T. Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16090–16095 (2010).
238. Jossé, R. *et al.* ATR inhibitors VE-821 and VX-970 sensitize cancer cells to topoisomerase I inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res.* **74**, 6968–6979 (2014).
239. Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E. & Wu, Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**, 3–11 (2005).
240. Possik, P. A. *et al.* Parallel in vivo and in vitro melanoma RNAi dropout screens reveal synthetic lethality between hypoxia and DNA damage response inhibition. *Cell Rep.* **9**, 1375–1386 (2014).
241. Fritz, G. & Kaina, B. Rac1 GTPase, a multifunctional player in the regulation of genotoxic stress response. *Cell Cycle* **12**, 2521–2522 (2013).
242. Kang, M. A., So, E.-Y., Simons, A. L., Spitz, D. R. & Ouchi, T. DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death Dis.* **3**, e249 (2012).
243. Hajas, G. *et al.* 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. *Free Radic. Biol. Med.* **61**, 384–394 (2013).
244. Saygin, C. *et al.* CD55 regulates self-renewal and cisplatin resistance in endometrioid tumors. *J. Exp. Med.* **214**, 2715–2732 (2017).
245. Habas, R., Dawid, I. B. & He, X. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev.* **17**, 295–309 (2003).
246. Ishida-Takagishi, M. *et al.* The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nat. Commun.* **3**, 859 (2012).

247. Malliri, A. *et al.* The Rac Activator Tiam1 Is a Wnt-responsive Gene That Modifies Intestinal Tumor Development. *J. Biol. Chem.* **281**, 543–548 (2006).
248. Oishi, I. *et al.* The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **8**, 645–654 (2003).
249. Bordonaro, M., Tewari, S., Cicco, C. E., Atamna, W. & Lazarova, D. L. A switch from canonical to noncanonical Wnt signaling mediates drug resistance in colon cancer cells. *PLoS One* **6**, e27308 (2011).
250. Chaney, S. G. *et al.* Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1551–1559 (2004).
251. Hill, E. J., Nicolay, N. H., Middleton, M. R. & Sharma, R. A. Oxaliplatin as a radiosensitiser for upper and lower gastrointestinal tract malignancies: what have we learned from a decade of translational research? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **83**, 353–387 (2012).
252. Auclair, Y., Rouget, R., Affar, E. B. & Drobetsky, E. A. ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17896–17901 (2008).
253. Vassin, V. M., Anantha, R. W., Sokolova, E., Kanner, S. & Borowiec, J. A. Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *J. Cell Sci.* **122**, 4070–4080 (2009).
254. Toledo, L. I. *et al.* ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* **155**, 1088–1103 (2013).
255. Pires, I., Ward, T. & Dive, C. Oxaliplatin responses in colorectal cancer cells are modulated by CHK2 kinase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1326–1338 (2010).
256. Hall, A. B. *et al.* Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970. *Oncotarget* **5**, 5674–5685 (2014).

Abstract

Today, treatments for metastatic colorectal cancer have evolved through the combination of conventional chemotherapy 5-FU, oxaliplatin and / or Irinotecan and targeted therapies directed against the EGF receptor or VEGF. Despite an improved survival rate through the combination of these drugs, innate and acquired resistance to treatment is a common cause of therapeutic failure.

In order to discover new therapeutic targets we carried out three phenotypic screenings using cellular resistance models acquired to chemotherapies (oxaliplatin and irinotecan) generated in the laboratory as well as the HCT116 line which exhibits an innate resistance to anti-EGFR therapies (cetuximab , panitumumab, erlotinib). The ultimate goal of this project is to reveal genes, whose inhibition restores sensitivity to one of these treatments, thus displaying a lethal interaction with the drug.

Once the kinases potentially involved in resistance to CCR therapies identified, specific inhibition by shRNA or a specific inhibitor was performed to confirm the potential therapeutic targets and / or biomarkers for response to treatments. The most promising target, identified as a determinant of resistance to oxaliplatin is the ATR protein (Ataxia-telangiectasia mutated and rad3 related). A protein that plays a key role in DNA repair and is activated in response to the presence of persistent single stranded DNA (ssDNA) or replicative stress, which can be generated by certain anti-cancer therapies.

The inhibition of ATR via its pharmacological inhibitor VE-822 (VX-970) combined with oxaliplatin was then studied by the use of cytotoxic tests supplemented by an additivity study. Thus, we demonstrated that the inhibition of ATR combined with oxaliplatin leads to a strong synergy in the HCT116-R1 cell line in both 2D and 3D. This effect is also found in other oxaliplatin resistant clonal lines (HCT116-R2, SW48-R) as well as in the colorectal cell lines HCT116 and SW48.

We have also shown that the synergistic effect of oxaliplatin and VE-822 in the HCT116-R1 line is accompanied by an increase in the presence of single-stranded DNA followed by numerous double-stranded DNA breaks, stopping proliferation and inducing apoptosis. The occurrence of this damage to DNA is also correlated with activation of the ATM pathway, p53 and inhibition of CDK2 activity. Moreover, *in vitro* the double treatment causes an induction of the molecular signals triggering the immunogenic cell death equivalent or superior to the treatments by oxaliplatin alone.

Finally, the combination of oxaliplatin and VE-822 is also effective *in vivo* in immunodeficient mice xenografted with HCT116-R1 cells as well as in immunologically competent mice with a higher synergistic effect indicating that immune death (ICD) is part of the mechanism of this combination of drugs.

In conclusion, all these data confirm the interest of phenotypic screening in the discovery of new therapeutic targets by demonstrating for the first time the functional role of ATR in sensitivity to oxaliplatin

Résumé

Aujourd'hui, les traitements du cancer colorectal métastatique ont évolué grâce à la combinaison de chimiothérapies conventionnelles à base de 5-FU, d'oxaliplatine et/ou d'irinotécan et de thérapies ciblées dirigées contre le récepteur de l'EGF ou le VEGF. Malgré un taux de survie amélioré par la combinaison de ces médicaments, la résistance innée et acquise aux traitements est une cause fréquente d'échec thérapeutique.

Dans le but de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques nous avons effectué trois criblages phénotypiques en utilisant des modèles cellulaires de résistance acquise à certains médicaments cytotoxiques (oxaliplatine et irinotécan) générés au laboratoire ainsi que la lignée HCT116 qui présente une résistance innée aux thérapies anti-EGFR (cétuximab, panitumumab, erlotinib). Le but de ce projet est d'identifier des kinases dont l'inhibition permet de rétablir la sensibilité à l'un de ces traitements.

Nous avons ensuite validé les protéines identifiées à la suite des criblages phénotypiques, par l'utilisation de shRNA et/ou d'inhibiteur spécifique. La cible la plus prometteuse, impliquée dans la résistance à l'oxaliplatine est la protéine ATR (Ataxia-telangiectasia mutated and rad3 related). Une protéine jouant un rôle clé dans la réparation de l'ADN et qui est activée en réponse à la présence d'ADN simple brin persistant (ssDNA) ou de stress réplcatif, pouvant être généré par certaines thérapies anticancéreuses.

L'inhibition d'ATR par le biais de son inhibiteur pharmacologique le VE-822 (VX-970) combinée à l'oxaliplatine a alors été étudiée par l'utilisation de tests de viabilité cellulaire complétés par une étude d'additivité. Ainsi, nous avons démontré que l'inhibition d'ATR combinée avec l'oxaliplatine est synergique dans la lignée HCT116-R1 à la fois en 2D et en 3D. Cet effet est également retrouvé dans d'autres lignées clonales résistantes à l'oxaliplatine (HCT116-R2, SW48-R1) ainsi que dans les lignées cellulaires de cancer colorectal HCT116 et SW48.

Nous avons également montré que l'effet synergique de l'oxaliplatine et du VE-822 dans la lignée HCT116-R1 s'accompagne d'une augmentation de la présence d'ADN simple brin et de cassures double brin de l'ADN ainsi que d'un arrêt de la prolifération et d'une induction de l'apoptose. L'apparition de ces dommages à l'ADN est corrélée avec l'activation de la voie ATM, de p53 et l'inhibition de l'activité CDK2. De plus, *in vitro* le double traitement provoque une induction des signaux moléculaires à l'origine de la mort cellulaire immunogène supérieure au traitement par l'oxaliplatine seul.

Enfin, l'association de l'oxaliplatine et du VE-822 est efficace *in vivo* dans un modèle murin immunodéprimées xéno greffé avec les cellules HCT116-R1, ainsi que, dans un modèle murin immunologiquement compétent, avec un effet synergique plus élevé indiquant que la mort immunitaire (ICD) fait partie du mécanisme de cette combinaison de médicaments.

En conclusion, toutes ces données confirment l'intérêt du criblage phénotypique dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques en démontrant pour la première fois le rôle fonctionnel de la protéine ATR dans la sensibilité à l'oxaliplatine.