



Analyse des isoformes du récepteur tyrosine kinase HER4 : vers un ciblage thérapeutique à l'aide d'anticorps en cancérologie

Romain Lanotte

► To cite this version:

Romain Lanotte. Analyse des isoformes du récepteur tyrosine kinase HER4 : vers un ciblage thérapeutique à l'aide d'anticorps en cancérologie. Cancer. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT090 . tel-02955615

HAL Id: tel-02955615

<https://theses.hal.science/tel-02955615>

Submitted on 2 Oct 2020

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 - Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche INSERM U1194

Analyse des isoformes du récepteur tyrosine kinase HER4 : vers un ciblage thérapeutique à l'aide d'anticorps en cancérologie

Présentée par Romain LANOTTE

Le 29 novembre 2018

Sous la direction de Thierry CHARDÈS

Devant le jury composé de

M. Éric REITER, DR, INRA

M. Stéphane BIRKLÉ, Pr, INSERM U1232

M. André PÈLEGRIN, DR, INSERM U1194

M. Thierry CHARDÈS, DR, INSERM U1194

Rapporteur

Rapporteur

Président du jury

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

A mon grand-père.

Remerciements

Après quelques mois de retranchement dans la « salle des blouses » à rédiger cette thèse, entre les cintres et les cartons, voici venu le temps, non pas des cathédrales mais des remerciements. J'aurais bien écrit quelques mots pour chacun d'entre vous, mais je vais restreindre ces remerciements et vous épargner un peu de lecture car il y a bien 250 pages sur HER4 qui suivent... (je vois déjà HAléx tourner de l'œil)

Je souhaite adresser mes premiers remerciements à tous les membres de l'IRCM et de l'ICM que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse. Sachez que chacun d'entre vous, par vos discussions sérieuses ou pas, avez contribué à l'avancée et au bon déroulement de ce doctorat. Soyez tous chaleureusement remerciés pour cela.

Je remercie les membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer ce travail. Merci aux docteurs Eric REITER et Stéphane BIRKLÉ d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également aux membres de mon comité de thèse, Christiane MENDRE, Pierre MARTINEAU et André PÈLEGRIN, pour leurs conseils lors des différents comités. Christiane, merci pour ta grande gentillesse et pour m'avoir initié à la recherche lors de mon stage de M1. C'est grâce à ce stage que j'ai pu me familiariser avec tous les concepts des GPCR et les intégrer dans ma réflexion générale. Merci pour tout ce que tu m'as appris.

Ce travail n'aurait pas pu être mené sans le soutien du LabEx MAbImprove et de la Ligue Nationale contre le Cancer. Par ces quelques lignes, je tiens à remercier le LabEx pour le financement de mes trois premières années de thèse et pour m'avoir permis d'évoluer dans un environnement scientifique et humain de qualité, ce qui peut se voir chaque année lors des retraites scientifiques du Mont-Dore... Je remercie également la Ligue Nationale contre le Cancer pour le financement de ma quatrième année, sans laquelle ce travail n'aurait pas été aussi abouti.

J'ai effectué mes recherches au sein de l'équipe IRO dirigée par André PÈLEGRIN. André, je te remercie pour m'avoir accueilli dans ton équipe. Malgré ton emploi du temps chargé, tu as toujours été disponible lorsque j'ai fais appel à toi. Je me souviendrai de tes « tours de garde » dans le couloir, à 8h comme à 19h ! Je te remercie aussi pour avoir accepté d'examiner mon travail (au fait, à quand un projet ANR Dual pan-isoformes de HER4 ?).

Mes remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse, Thierry CHARDÈS. Thierry, je te remercie pour m'avoir permis de travailler sur ce projet dès mon stage de M2. A cette époque, les résultats obtenus sur HER4 nous paraissaient quand même beaucoup plus clairs ! Et puis la thèse a commencé... Merci pour m'avoir maintenu ta confiance tout au long de ce projet, même dans les moments les plus compliqués : l'absence de résultats pendant plusieurs mois, les problèmes techniques les plus inimaginables qui soient, les machines qui tombent en panne uniquement les jours des manipulations les plus importantes (et bien sûr les plus lourdes techniquement, sinon c'est pas drôle). En fait, c'était pas drôle. Merci aussi pour m'avoir laissé une grande liberté dans mes recherches, tu n'es fermé à aucun point de vue et ça c'est une très grande qualité. De nombreuses personnes devraient s'en inspirer. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, tant du point de vue scientifique que pratique. Merci pour tes conseils distillés tout au long de la rédaction, savoir rendre simple les choses compliquées, ce n'est pas facile et c'est aussi frustrant. Enfin, j'espère que tu ne regrettes pas de m'avoir confié ce projet pour lequel j'ai beaucoup donné durant toutes ces années.

Je remercie également les membres de l'URT, Alexandre, Evelyne et Florence pour leur collaboration sur le projet HER4. Je remercie notamment Alexandre pour tout son travail sur les échantillons TNBC et pour sa patience, pour avoir répondu à mes (très nombreuses) questions, mes demandes de Kaplan-Meier et autres ! Je remercie aussi la plateforme GenAc avec Pierre, Bruno, Mady et Myriam. Merci à Mady et Myriam pour m'avoir aidé à débiter sur le *phage display*. Pierre, je te remercie pour ton aide tout au long de ma thèse et pour toutes tes connaissances. Je dois t'avouer que tu me faisais un peu peur au début, mais maintenant ça va mieux :D

Cette thèse s'est aussi bien déroulée grâce à l'ambiance qui règne dans le labo. Merci aux membres de l'équipe AP d'avoir rendu les grosses journées de travail un peu moins difficiles à supporter. Je ne sais pas comment débiter ces remerciements mais sachez que vous êtes indissociables de cette thèse. Depuis mon arrivée en M2, j'ai vu passer pas mal de monde dans cette équipe, et je suis très heureux d'avoir partagé avec vous de très bons moments. Merci Marie-Alix pour tes questions scientifiques toujours pertinentes, tes conseils et ta bonne humeur. Merci à Muriel et Christel pour leur gentillesse et leurs conseils. Merci aussi aux personnes passées par l'équipe et avec lesquelles j'ai passé de bons moments, Cécile (*bon appétiiiiiiiiit*), Marianne, Charline, Pauline, Rana, Julia, Christophe. J'ai une petite pensée pour Geneviève, pour sa grande gentillesse et pour avoir tenu la pièce de culture cellulaire d'une main de maître, ce qui n'est pas de tout repos. Après son départ à la retraite, Sabine a repris le flambeau de la culture. Merci Sabine pour avoir pris soin de mes cellules et m'avoir aidé lorsque j'en ai eu besoin. Merci aussi pour toutes tes anecdotes sur le labo, et pour nous avoir montré quelques photos d'époque ! Malgré mon départ, tu pourras encore profiter d'un petit jeune pour descendre à l'azote avec toi puisque j'ai adoubé Adrien.

Belle transition pour remercier ce petit « *geek* » venu du Nord, parce que oui, tout ce qui vient d'au-delà de Pignan est au Nord. Merci aussi pour m'avoir aidé pour les stats et m'avoir dépanné pour tout ce qui touche à l'informatique, même si je comprends pas toujours ces sujets de discussion que tu nous lances au café, sur le dernier software en vogue ou sur la configuration de latex sous processeur Pandemonium avec proxy pixelisé d'après la barbe du Grand Schtroumpf ! Merci en tout cas pour ta bonne humeur et ta disponibilité lorsqu'il faut donner un coup de main dans le labo. Pas de transition pour remercier Emilia, car je ne peux pas rebondir sur la bonne humeur... Non je rigole bien sûr. Emilia, je te remercie pour l'énergie que tu transportes avec toi, malgré le chemin tumultueux qu'a emprunté ta thèse. Tu es dynamique et ça apporte de l'enthousiasme au labo ! Je te souhaite bon courage pour la poursuite de la thèse, et je te mandate pour donner un coup de main à Thierry et Véro pour le *vivo* ;))

Je remercie également tous les stagiaires, avec qui nous avons partagé de bons moments. Merci aux « papas » docteurs Sylvain et Xavier pour mes nombreux fonds d'écran, qui enjolivaient mon logo Windows bien terne. Les périodes de Noël étaient assez sympas ! Merci à Alexis, j'ai bien rigolé en te voyant faire des tractions sur la porte pendant que celle-ci se refermait petit à petit sur le couloir ! Je remercie aussi DJ PON pour avoir mis l'ambiance dans le labo. Le seul capable de voir la caspase 3 clivée sans saturation... Merci à Timothée, mon premier stagiaire, pour ton aide sur toutes ces purifications d'anticorps (y compris le week-end), qui m'auront permis de gagner un temps précieux ! On aurait presque pu monter un petit *business* de production d'anticorps à nous deux. J'espère ne pas t'avoir trop martyrisé durant ton stage, et je te souhaite bonne chance pour cette aventure qu'est la thèse. Eva, je ne sais pas si je dois te mettre dans la catégorie stagiaire ou famille (ahah), mais je te remercie pour ton dynamisme et pour cette belle GAPDH (elle est dans la thèse, si si, à toi de la trouver). Merci pour ces bons moments de rigolade même si j'étais à deux doigts de te tuer pour avoir mis tes gants sur mon téléphone ! Merci Clara d'avoir apporté une touche espagnole au bureau, et désolé de t'avoir fait si souvent peur en culture ou au labo !

Une journée de thèse doit s'attaquer le ventre bien rempli ! Je remercie donc les pâtisseries en chef, Ariane et Véro, pour leur maîtrise du chocolat et autres ingrédients indispensables ! Merci à Ariane, notre thésarde médecin en chef, pour m'avoir accompagné à certains moments sur la voie des manips-qui-ne-marchent-pas/plus, mais surtout merci pour les *shortbread millionaire*, bons pour le moral mais pas pour le tour de taille ! Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse. Merci à Véro, la Reine de l'IF, du *vivo* et des gâteaux ! Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité, et merci pour ton aide précieuse pour le lancement des manips sur les souris ! Je remercie aussi Laura, qui veille à maintenir l'ordre dans le labo (et les tours de ménage) mais toujours avec sa douceur habituelle.

Je remercie également Nadège, qui m'a initié au CRISPR et à l'art du clonage, un truc bien crispant quand ça ne marche pas. Je te l'avais déjà dit mais je recommence, c'est en partie grâce à toi que j'ai pu avancer dans mon projet. Merci pour toutes tes discussions intéressantes, pour toutes tes idées et tes conseils ! Je te souhaite bonne continuation pour la suite. Je remercie enfin Marie-Lise, ma voisine de paillasse d'en face, pour m'avoir tenu compagnie les vendredis matins, de 9h à 10h30 (parce que bon, faut pas pousser non plus). J'attends que tu me dises comment tu fais pour prendre tes congés + ceux des doctorants ! Plaisanterie mise à part, merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta non-susceptibilité (ce doit être le poste qui veut ça, faudra que je demande à Sabrina...)

Durant la thèse, on se fait beaucoup de collègues et on rencontre quelquefois des amis. Même si on se supporte maintenant depuis plus de 10 ans, je remercie Maë pour continuer de rire à mes blagues, même après tout ce temps. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse, mais bon, tu as fini d'écrire les résultats là non ? Enfin pas tout à fait, j'attends toujours la co-IP HER4/AMHR2... Bref, il y aurait beaucoup à dire, mais merci pour ton soutien sans faille durant cette thèse. Merci aussi pour toutes ces soirées qui font décompresser et oublier les difficultés de la thèse pour quelques heures. Je ne te souhaite pas bonne continuation ici car vu qu'on se suit, j'aurai sûrement l'occasion de te le dire de vive voix n'importe où dans le monde ahah ! Je remercie ensuite le docteur (héhé) Alexandre Pichard pour tous ses conseils et sa façon de voir les choses. Merci Alex pour nos longues discussions, qu'elles soient scientifiques ou personnelles. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Agathe, qu'il soit à Limoges ou ailleurs ! Enfin, je souhaite remercier Junior, arrivé imberbe dans l'équipe puis parti couper des citrons à l'autre bout du monde. Merci Junior pour l'ambiance que tu as mis dans le labo, pour tes conseils sur les manips, merci pour les matchs de foot, les entraînements de boxe, et autres. Je n'ai besoin que de deux mots en fait pour résumer ça : merci Tchatcheur !

Merci également à Sabrina, la précédente gardienne du RILA, pour les deux doigts sous le verre à la cantine, et aux conjoints/conjointes de cette joyeuse bande. Micka et sa PS4, sans qui nous ne pourrions mettre de roustes à Junior, Agathe et Max (que je ne devrais pas remercier pour nous avoir montré cette vidéo KdK...). Merci pour ces moments passés en votre compagnie.

J'associe évidemment à cette bonne ambiance les membres du couloir « N1F2 » et l'équipe JPP. Merci à Riado pour son déhanché fabuleux nous faisant passer pour des clowns sur Maître Gims, à Isabelle, Catherine et Jean-Pierre, pour leur gentillesse et les moments agréables passés en leur compagnie. Merci à Agathe, Camille, Malick, Lisa et Christophe. Bon courage aux petits nouveaux, Jihad et Julie (qui dépasse ses créneaux de culture). Merci au pharmacien Pierre pour son crâne chauve et les bonnes soirées que l'on a passé ensemble (et pour m'avoir fourni de l'anticorps « contrôle », merci merci merci), et au médecin Manu, compagnon d'écriture, qui va me précéder d'un jour pour la soutenance. Bon courage à toi, on se retrouve de l'autre côté !

Je remercie aussi les collègues de l'autre côté de la passerelle, les équipes LLC, PM et CG. Merci à Laetitia pour tes conseils pour faire avancer mon projet, et à Giuseppe et Samuel pour m'avoir montré le fractionnement subcellulaire. Merci aux équipes PM/CG pour les pauses cafés, les apéros, et pour tous vos délires. Merci à Céline, Maguy, Vincent, Laurence, Eve, Matthieu, Sara, Emilie, Tristan et Célestine. Merci à Déborah pour les discussions et encouragements mutuels dans les couloirs le samedi matin. Je vous souhaite à tous une bonne continuation. J'adresse quand même des remerciements spéciaux pour mes Claudettes, et je terminerai en disant que ce qu'il se passe au Mont-Dore... se passe au Mont-Dore.

Merci au couloir « N2F2 » de m'avoir accueilli sur votre territoire pour la rédaction de cette thèse ! Je vous souhaite à tous une bonne continuation, des alcooliques (pardon, accolytes) Laurent-Eric-HAlex aux filles de l'équipe AM, Sara, Emilie, Laura et Anaïs. Merci à Maicol pour ses conseils de manips. Sans Maicol, je n'aurais

pas pu avoir le soutien de la photo Panini d'Antoine Griezmann pour l'écriture (à défaut d'avoir son vrai soutien). Enfin, merci à HAlex pour toutes les discussions farfelues que nous avons pu avoir, merci pour tes conseils pour les post-docs et toutes les autres sortes de discussion. Mais je t'attends toujours pour monter un projet HER4 et lymphocytes... je passerai te voir au Cytoff un de ces jours !

Je remercie également les doctorants (maintenant docteurs) que j'ai pu côtoyer durant cette thèse, et avec qui j'ai partagé quelques moments, au détour d'un couloir ou lors des Happy Hours. Merci à mes collègues d'écriture, avec qui j'ai partagé les derniers mois. Merci Nabiya pour toutes les infos administratives, merci Sara pour m'avoir débloqué pour la partie Résultats, merci Laetitia pour les moments de rigolade (et ton rire résonne encore dans la cantine). Tu arrives au bout de cette thèse malgré les galères et tu as tenu bon, bien joué ma petite Laeti ! Merci aussi à Hanane, tu m'as bien fait rire avec certaines de tes interrogations...

Merci aussi au personnel administratif de l'IRCM, à la laverie, au service informatique, à la plateforme MRI, aux gens que j'oublie, aux personnes qui font un travail invisible mais indispensable à la bonne marche de l'institut. Merci Carmen pour résoudre nos moindres soucis du quotidien.

Je terminerai en adressant mes plus forts remerciements à tous les membres de ma famille. Quatre ans de thèse, c'est long, avec de nombreuses heures passées au labo (vous pouvez le voir par la longueur de ces remerciements), c'est pas facile tous les jours, alors je vous remercie pour tous les sacrifices que vous avez consenti. Je remercie mes parents pour m'avoir toujours soutenu et m'avoir donné tous les moyens d'en arriver là. Je vous remercie pour toutes les valeurs que vous m'avez inculquées, notamment de travail et d'abnégation. C'est aussi grâce à vous que j'ai accompli ce travail. Je remercie mes grands-parents, ma grand-mère qui me fait de bons petits plats le samedi midi, même si des fois je mange en coup de vent pour cause de manip. Je remercie mon petit frère pour son soutien, entraîne-toi bien car maintenant je vais avoir plus de temps pour jouer au tennis ! Merci à mon frère Laurent et ma sœur Nathalie, mon Parrain, mon oncle Christian et ma tante Cathie, pour leur soutien indéfectible et l'intérêt qu'ils ont toujours porté à mon travail. Merci à tous, je vous aime.

Je remercie aussi ma belle-famille, Martine, Killian, Marion, Elise, Maxime et Hugo, pour tous ces moments qui me permettent de m'aérer la tête. Merci Papi et Mamie pour tout ce que vous faites pour Audrey et moi, je vous en suis très reconnaissant.

Je clos ces remerciements par quelques lignes pour toi, même si elles ne sont pas à la hauteur de tout ce que tu m'apportes dans ma vie. Merci Audrey pour ton soutien sans faille, merci pour tous les sacrifices que tu as endurés. Nous avons traversé des épreuves, la maladie, mais nous avons toujours tenu bon tous les deux. Et nous tiendrons bon, où que l'on aille. Tu me dis souvent que j'ai fait pareil pour ton agreg, mais c'est faux, je ne peux pas mesurer à quel point ça a été difficile pour toi. Tu es beaucoup plus forte que je ne le serai jamais. Je t'aime.

« La Force est puissante dans ma famille... »

Luke Skywalker - Le retour du Jedi -

Analyse des isoformes du récepteur tyrosine kinase HER4 :

**Vers un ciblage thérapeutique à
l'aide d'anticorps en cancérologie**

Avant-propos

Ce travail de thèse a été financé par le LabEx MAbImprove, groupement de recherche issu d'un partenariat entre les universités de Tours et Montpellier et formé par des équipes de recherches travaillant sur les anticorps thérapeutiques, puis par la Ligue Nationale contre le Cancer.

Mes recherches se sont déroulées au sein de l'unité INSERM U1194 (IRCM- Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier) dans l'équipe Immunociblage et Radiobiologie en Oncologie (IRO) dirigée par le docteur André Pèlegri. Son équipe s'intéresse, entre autres, à l'étude et au ciblage des récepteurs de la famille HER dans les tumeurs solides, à l'aide d'anticorps thérapeutiques.

Les travaux récents de l'équipe ont permis de mettre à jour de nouveaux mécanismes d'action des anticorps, avec l'exemple de l'anticorps anti-HER3 9F7-F11 développé par Thierry Chardès, qui présente la particularité de se fixer plus fortement à sa cible lorsque le récepteur est stimulé par son ligand.

Alors que les trois premiers récepteurs de cette famille sont très bien étudiés et ciblés par des anticorps thérapeutiques, le dernier récepteur de cette famille, HER4, n'est que peu étudié et son implication dans la cancérogenèse est controversée. Il n'existe à ce jour pas d'anticorps thérapeutique anti-HER4 sur le marché ou en phase clinique.

Mes travaux de thèse se sont donc focalisés sur l'étude de ce récepteur HER4 et de ses isoformes, avec l'étude de la signalisation du récepteur et de l'effet de son ligand NRG1. La littérature et nos résultats initiaux montrant que HER4 pouvait être une cible thérapeutique pertinente et prometteuse, nous avons développé des anticorps monoclonaux ciblant HER4 et étudié leurs effets biologiques.

Contrairement au ciblage « classique » des récepteurs HER avec des anticorps monoclonaux, dont l'action est d'inhiber l'activation du récepteur, nos résultats et observations suggèrent que le ciblage du récepteur HER4 doit être abordé d'une manière différente. En effet, comme nous le détaillerons dans l'introduction ainsi que dans la première partie des résultats, la capacité de suppression de tumeur de HER4 nous laisse supposer qu'il faut activer certaines signalisations de ce récepteur au lieu de les bloquer. Le ciblage thérapeutique d'un récepteur HER à l'aide d'anticorps agonistes ou modulateurs allostériques positifs n'a jamais été démontré, alors que ce concept est largement étudié lors du ciblage des GPCR à l'aide d'anticorps.

C'est pourquoi j'ai choisi d'orienter ma première partie d'introduction sur la présentation des récepteurs EGFR, HER2 et HER3 en mettant particulièrement l'accent sur leur mode

d'activation et les mécanismes moléculaires qui apportent des évidences qu'un tel ciblage de ces récepteurs est possible. Ce mécanisme de « biais » de la signalisation d'un RTK à l'aide d'anticorps sera le fil conducteur de cette thèse.

La seconde partie bibliographique sera consacrée à la présentation du récepteur HER4 et de ses particularités, tant du point de vue de la description de multiples isoformes du récepteur que de son mécanisme d'action particulier, engendrant des signalisations non conventionnelles, avec des impacts cliniques très différents selon les isoformes.

Enfin, après une description, dans une troisième partie, des anticorps thérapeutiques et de leurs fonctions, notamment en termes de « biais » de la signalisation, je présenterai les résultats obtenus durant ma thèse concernant le récepteur HER4 : dans un premier temps, nous étudierons la signalisation induite par les isoformes du récepteur HER4 et son ligand NRG1 sur les cellules cancéreuses. Sur la base de ces résultats et de nos hypothèses, je présenterai ensuite notre stratégie de ciblage du récepteur HER4 ainsi que la sélection et la caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-HER4. Ces résultats innovants ont permis la mise en place d'une étude pré-clinique, afin de valider l'effet de ces anticorps, et un dépôt de brevet est en cours par Inserm Transfert.

Table des matières

Remerciements	5
Avant-propos.....	13
Table des matières.....	15
Table des figures	19
Liste des tableaux.....	22
Liste des abréviations	23

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE25

I - Les récepteurs de la famille HER.....	26
A - Place des récepteurs dans la super-famille des RTK	26
B - Historique de leur découverte	27
C - Structure et mécanisme d'activation	28
1. Structure des récepteurs HER	28
2. Mécanisme d'activation des récepteurs HER.....	30
a. 1 ^{ère} étape : liaison du ligand.....	30
b. 2 ^{ème} étape : homo/hétéro/(oligo)dimérisation des récepteurs	31
c. 3 ^{ème} étape : trans-activation des kinases.....	35
D - Principales voies de signalisations des récepteurs HER	39
1. Voie PI3K/AKT	40
2. Voie Ras/MAPK.....	44
3. Régulation de la signalisation.....	47
a. Régulation des voies PI3K/AKT et MAPK	47
b. Régulation de l'activation des récepteurs HER	47
4. Vers une signalisation biaisée	50
E - EGFR/HER2/HER3 : Implication dans la tumorigenèse et localisations subcellulaires associées	51
1. Le récepteur EGFR	51
a. Expression tumorale et signalisation	51
b. Localisations subcellulaires d'EGFR	53
2. Le récepteur HER2.....	55
a. Expression tumorale et signalisation	55
b. Localisations subcellulaires de HER2.....	57
3. Le récepteur HER3.....	59
a. Expression tumorale et signalisation	59
b. Localisations subcellulaires de HER3.....	61

II : Le(s) récepteur(s) HER4	62
A- ERBB4 : un gène pour quatre récepteurs	62
B- Spécificités, mécanismes d'activation et signalisations des isoformes de HER4	64
1. Les isoformes JM : to be RIPped or not to be	64
a. Un mécanisme en deux-étapes commun à d'autres récepteurs et RTK	64
b. Ligands du récepteur HER4 et initiation du RIP	67
c. 1 ^{ère} étape : un clivage extracellulaire de HER4	68
d. 2 ^{ème} étape : un clivage intracellulaire de HER4	69
e. 3 ^{ème} étape : signalisation de 4ICD au noyau	70
2. Les isoformes CYT : quelques acides aminés qui font la différence	71
3. Les combinaisons JM-CYT : un bon gros schmilblick !	72
a. CYT1 : vers la suppression de tumeur ?	72
b. CYT2 : vers la progression tumorale ?	75
c. Les isoformes « full-length » HER4 : un niveau de complexité supplémentaire !	77
4. Le cas particulier de la NRG sur HER4 : effets oncogéniques et suppresseurs de tumeur	80
a. L'axe NRG-HER4 : une signalisation oncogénique	81
b. L'axe NRG-HER4 : une signalisation suppresseur de tumeur	82
C - Expressions physiologique et tumorale du récepteur HER4	85
1. Expression physiologique	85
2. Expression tumorale	89
a. Mutations du récepteur HER4	96
b. Implication de HER4 dans la résistance aux traitements	97
D - Les stratégies de ciblage du récepteur HER4	98
1. Inhibiteurs de tyrosine kinase et autres stratégies	98
2. Anticorps monoclonaux anti-HER4	99
 III : Modulation de la signalisation par les anticorps monoclonaux	 103
A - Les anticorps monoclonaux : structure et fonctions	103
1. Différentes structures et formats d'anticorps	103
a. Structure générale des anticorps	103
b. Les différentes classes et formats d'anticorps	104
c. Ingénierie et sélection des anticorps	107
2. Mécanismes d'action des anticorps : un effet « kiss-cool »	109
a. Mécanismes Fab-dépendant : l'effet « kiss »	110
b. Mécanismes Fc-dépendant : l'effet « cool »	111
B - La modulation de la signalisation par les anticorps : au-delà d'un simple effet « on/off »	112
1. L'exemple des GPCR et leurs ligands biaisés	112
2. Différents types de modulation par les anticorps monoclonaux	114

OBJECTIFS DE LA THESE ET HYPOTHESES DE TRAVAIL119

MATERIELS ET METHODES123

Etude de l'expression/signalisation du récepteur HER4	124
Culture cellulaire	124
Traitements par les anticorps +/- NRG1	124
Analyse de l'expression des récepteurs HER4 par cytométrie en flux	124
Analyse des isoformes du récepteur HER4 par RT-PCR et RT-qPCR.....	125
Extinction sélective des isoformes de HER4 par siRNA	125
Génération de lignées stables exprimant les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 de HER4	126
Création de plasmides pour l'expression transitoire des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 de HER4	127
Etude de la signalisation par Western Blot	128
Analyse de l'apoptose et du cycle cellulaire par cytométrie en flux	129
Mesure des niveaux d'ATP et du relargage d'Adénylate Kinase par bioluminescence	130
Mesure de l'activité mitochondriale par MTS	130
Mesure des niveaux protéiques par SRB	131
Mesure de la production de ROS.....	131
Mesure de la dépolarisation mitochondriale par marquage DioC6	131
Fractionnement subcellulaire	132
Développement et caractérisation d'anticorps anti-HER4	133
Criblage d'anticorps anti-HER4 par phage display sur cellules	133
Etude de la liaison des anticorps au récepteur HER4 par ELISA	136
Analyse des épitopes des anticorps sur membrane SPOT	136
Analyses statistiques.....	137

RESULTATS ET DISCUSSION139

IV - La signalisation HER4 au niveau tumoral	140
A - Expression du récepteur HER4 dans des lignées cancéreuses in vitro.....	140
1. Expression membranaire de HER4.....	140
2. Expression différentielle des isoformes du récepteur HER4	143
3. Sélection de lignées « modèles » pour l'étude de la signalisation	146
a. Extinction sélective des isoformes par siRNA	146
b. Extinction sélective des isoformes par CRISPR-Cas9	148
c. Construction de modèles de surexpression stable des isoformes.....	148
d. Construction de modèles de surexpression transitoire des isoformes	150
B - Effets biologiques induits par l'axe NRG1 - HER4	152
1. Induction d'une mort cellulaire par la NRG1....	152
2. ... mort cellulaire dépendante des isoformes de HER4	158

a. La NRG1 induit la suppression de tumeur via JMa/CYT1	158
b. La NRG1 induit la survie cellulaire via JMa/CYT2	160
3. Mécanisme d'action des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2	162
C - Discussion.....	165
Expression tumorale du récepteur HER4	166
Expression tumorale des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2	167
Des rôles biologiques différents pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2.....	171
V - Développement et caractérisation d'anticorps anti-HER4.....	181
A - Développement d'anticorps anti-HER4 par phage display.....	181
1. Stratégie de criblage d'anticorps anti-HER4	181
2. Criblage et production d'anticorps anti-HER4	184
a. Sélection de candidats scFv	184
b. Reformatage des scFv au format IgG1.....	188
c. Production des anticorps anti-HER4 en cellules HEK293T	189
B - Caractérisation des anticorps anti-HER4 sélectionnés	191
1. Liaison au récepteur HER4	191
a. Liaison sur le récepteur HER4 membranaire +/- NRG1	191
b. Liaison sur le récepteur HER4 recombinant	194
c. Détermination des épitopes des anticorps anti-HER4	195
2. Effets des anticorps anti-HER4 sur la lignée BT549 transfectée HER4.....	198
3. Modulation de la signalisation HER4 par les anticorps	201
a. Différentes localisations de 4ICD induites par les anticorps.....	201
b. Effets des anticorps anti-HER4 sur la phosphorylation du récepteur	205
c. Au-delà de HER4 : capacité des anticorps à biaiser la signalisation des RTK : preuve de concept avec les anticorps anti-HER4 C6 et Ab77.....	208
4. Effets in vitro des anticorps anti-HER4 D5 et C6 sur les lignées cancéreuses.....	209
C - Discussion.....	213
Développement d'anticorps anti-HER4	214
Caractérisation des anticorps anti-HER4	216
Effets des anticorps anti-HER4 sur les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2	218
Biais de la signalisation du récepteur HER4 par les anticorps C6 et H2.....	220
<i>Brevet en préparation :</i>	<i>231</i>
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	245
BIBLIOGRAPHIE	249

Table des figures

Figure 1 : Schéma représentatif des sous-familles et membres des Récepteurs Tyrosine Kinase	26
Figure 2 : Schéma représentatif des quatre récepteurs de la famille HER	29
Figure 3 : Organisation structurale des récepteurs HER.....	30
Figure 4 : Ligands des récepteurs HER	31
Figure 5 : Structure des récepteurs HER en conformation inactive	33
Figure 6 : Modèle du changement conformationnel de l'EGFR induit par la liaison du ligand	34
Figure 7 : Interaction des kinases du récepteur EGFR, selon un modèle « CDK/cyclin-like »	36
Figure 8 : Schéma général d'activation des récepteurs tyrosine kinase de la famille HER	37
Figure 9 : Préférence des kinases HER pour les positions activatrices ou receveuses.....	38
Figure 10 : Vue d'ensemble de la signalisation HER	39
Figure 11 : Voie de signalisation PI3K/AKT et ses principaux effecteurs.....	41
Figure 12 : Principaux sites de phosphorylation des récepteurs HER et leurs sites de docking associés	44
Figure 13 : Voies ERK, JNK et p38, principales voies MAPK activées par les récepteurs HER.....	45
Figure 14 : Voies de dégradation/recyclage (/signalisation) des récepteurs HER	49
Figure 15 : Schéma de l'épissage alternatif conduisant aux différentes isoformes de HER4	63
Figure 16 : La voie Notch, exemple du mécanisme d'activation RIP	64
Figure 17 : De nombreux RTK concernés par le RIP	66
Figure 18 : Les isoformes JMa et JMb, différences structurales et conséquence sur le clivage.....	69
Figure 19 : RIP des isoformes JMa du récepteur HER4 et signalisation majeure de 4ICD	70
Figure 20 : Les différences CYT1-CYT2 et leurs conséquences sur la signalisation.....	71
Figure 21 : Mauvais pronostic de l'expression de CYT1 dans le cancer de l'ovaire	75
Figure 22 : L'axe KITENIN-HER4 CYT2 durant la progression tumorale dans le cancer colorectal	77
Figure 23 : Mécanisme d'action général des quatre isoformes de HER4	78
Figure 24 : La NRG1, essentielle à l'homéostasie neuronale et cardiaque.....	81
Figure 25 : Expression physiologique du récepteur HER4 dans différents organes	85
Figure 26 : Expression physiologique des isoformes JM et CYT dans les différents tissus.....	87
Figure 27 : Perte progressive du récepteur HER4 au cours de la progression tumorale	88
Figure 28 : Kaplan-Meier représentatif de l'expression de HER1/2/3 versus HER4 sur la survie	89
Figure 29 : Effets opposés de l'expression de HER4 sur la survie sans récurrence dans le cancer du sein	92
Figure 30 : Mutations du récepteur HER4 dans différents cancers.....	96
Figure 31 : Mécanisme d'action et épitope du mAb1479	101
Figure 32 : Structure d'un anticorps de format IgG1	104
Figure 33 : Les différentes classes d'anticorps	105
Figure 34 : Les différents formats d'anticorps existants	106
Figure 35 : Les méthodes de sélection des anticorps : hybridomes et phage display	108
Figure 36 : Les effets Fab et Fc-dépendants des anticorps	111
Figure 37 : Mécanismes d'action des ligands biaisés et modulateurs allostériques	113

Figure 38 : Potentiels mécanismes d'action des anticorps modulateurs.....	115
Figure 39 : Profils d'expression des récepteurs HER par cytométrie en flux	140
Figure 40 : Expression des isoformes JMa, JMb, CYT1 et CYT2 dans diverses lignées par RT-qPCR	143
Figure 41 : les différentes combinaisons d'amorces permettant d'amplifier par PCR les isoformes " <i>full-length</i> " de HER4.....	144
Figure 42 : Visualisation des isoformes " <i>full-length</i> " de HER4 après migration sur gel d'agarose.....	145
Figure 43 : Extinction de HER4 et de ses isoformes par siRNA	147
Figure 44 : Expression des isoformes de HER4 par transduction lentivirale	149
Figure 45 : Expression transitoire des isoformes de HER4.....	150
Figure 46 : Expression membranaire des isoformes de HER4 sur un modèle de cellules BT549 transfectées transitoirement	151
Figure 47 : Induction par la NRG1 d'un mécanisme de mort cellulaire <i>via</i> HER4	153
Figure 48 : Marquage Annexine V/7-AAD de cellules C-33A traitées avec la NRG1.....	153
Figure 49 : La NRG1 augmente les niveaux d'ATP et diminue l'activité mitochondriale de cellules C-33A	154
Figure 50 : Effet de la NRG1 sur l'activité mitochondriale de cellules T-47D et ZR-75-1	155
Figure 51 : Mesure indirecte par SRB de la mort cellulaire induite par la NRG1	155
Figure 52 : Clivage de PARP induit par la NRG1 sur les lignées C-33A et COV318.....	156
Figure 53 : Le phénotype de mort cellulaire induit par la NRG1 est associé à une augmentation des niveaux protéiques dans les lignées COV318 et HCC1187	157
Figure 54 : Mesure des niveaux d'ATP et du relargage d'Adénylate Kinase dans des cellules HCC1187 après stimulation par la NRG1	157
Figure 55 : Expression et effets de l'isoforme JMa/CYT1 dans la lignée BT549 après stimulation ou non par la NRG1	158
Figure 56 : Surexpression de l'isoforme JMa/CYT1 dans la lignée C-33A et effets de la NRG1	159
Figure 57 : Expression et effets de l'isoforme JMa/CYT2 dans la lignée BT549 après stimulation ou non par la NRG1	160
Figure 58 : Surexpression de l'isoforme JMa/CYT2 dans la lignée C-33A et effets de la NRG1	161
Figure 59 : Fractionnement subcellulaire de cellules BT549 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 stimulées ou non par la NRG1 pendant 24h	162
Figure 60 : Mesure de l'induction de ROS dans les cellules BT549 transfectées avec les isoformes de HER4 et stimulées ou non par la NRG1	163
Figure 61 : Mesure des variations du potentiel mitochondrial induites par les isoformes de HER4 et la NRG1	165
Figure 62 : Phénotype des cellules HCC1395 transduites avec JMa/CYT1 et JMa/CYT2	170
Figure 63 : Mesure de la mort cellulaire des cellules BT549 transfectées avec les isoformes de HER4, stimulées ou non par la NRG1	175
Figure 64 : Analyse du cycle cellulaire de cellules BT549 transfectées avec les isoformes HER4 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 et stimulées pendant 30h avec la NRG1	176
Figure 65 : Modèle d'activation des isoformes du récepteur HER4 stimulées ou non par la NRG1 ..	178
Figure 66 : Stratégie de criblage d'anticorps anti-HER4 par <i>phage display</i> sur cellules	182

Figure 67 : Expression membranaire des récepteurs EGFR, HER2 et HER4 sur les lignées P1, P1H4, P2 et P2H4	183
Figure 68 : Profils de liaison au récepteur HER4 de différents scFv de la sélection P1H4, par FACS	185
Figure 69 : Profil de liaison en FACS de scFv anti-HER4 sélectionnés par <i>phage display</i> sur protéine HER4 recombinante	187
Figure 70 : Profil de liaison sur le récepteur HER4 des candidats scFv après reformatage en anticorps IgG1.....	188
Figure 71 : Profils de liaison au récepteur HER4 des anticorps purifiés, par FACS	190
Figure 72 : Liaison des anticorps D5, F4, C6 et H2 sur le récepteur HER4 en absence ou en présence de NRG1	192
Figure 73 : Liaison des anti-HER4 +/- NRG1 sur les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2	193
Figure 74 : Mesure de la liaison des anticorps D5, F4, C6 et H2 sur les protéines recombinantes HER4 d'origine humaine et murine	194
Figure 75 : Détermination des épitopes d'anticorps anti-HER4 par membrane SPOT	196
Figure 76 : Prédiction des épitopes des anticorps C6 et D5 sur le récepteur HER4 en absence de NRG1	196
Figure 77 : Modélisation de l'épitope de l'anticorps C6 sur le récepteur HER4 en absence de NRG1	197
Figure 78 : Effets des anticorps anti-HER4 +/- NRG1 sur la lignée BT549 transfectée JMa/CYT1 ...	198
Figure 79 : Effets des anticorps anti-HER4 +/- NRG1 sur la lignée BT549 transfectée JMa/CYT2 ...	199
Figure 80 : Potentialisation de l'activité suppresseur de tumeur de HER4 par les anticorps	200
Figure 81 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 transfectées HER4 et traitées avec les anticorps pendant 6h.....	201
Figure 82 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 transfectées HER4 et traitées avec les anticorps en présence de NRG1 pendant 6h à 37°C	202
Figure 83 : Mesure des variations du potentiel mitochondrial induites par les anticorps D5 et C6 sur les cellules BT549 transfectées HER4	204
Figure 84 : Mesure de la production de ROS induite par les anticorps D5 et C6 sur la lignée BT549 transfectée HER4	205
Figure 85 : Phosphorylations induites sur les deux isoformes de HER4 après 1h et 1h30 de traitement par les anticorps D5 et C6.....	206
Figure 86 : Effets des anticorps D5 et C6 sur le clivage de l'isoforme JMa/CYT1	207
Figure 87 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 après traitement par les anticorps C6 et Ab77	208
Figure 88 : Effet des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h sur la lignée de cancer du sein triple-négatif HCC1187.....	210
Figure 89 : Effet des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h-120h sur la lignée de cancer du sein triple-négatif MDA-MB-453.....	211
Figure 90 : Effet des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h-120h sur la lignée de cancer de l'ovaire KURAMOCHI	212
Figure 91 : Effets des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h sur la lignée de cancer du col de l'utérus C-33A	213

Figure 92 : Mesure par HTRF des niveaux de phosphorylation d'AKT et de ERK1/2 dans la lignée C-33A après stimulation par la NRG1 seule, l'anticorps F4 seul ou l'anticorps F4 en présence de NRG1	220
Figure 93 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 transfectées avec JMa/CYT1 et traitées avec les anticorps D5 et C6 pendant 12h et 17h	222
Figure 94 : Mesure des variations des niveaux protéiques et d'ATP induites par les anticorps D5 et C6 après 120h de traitement de cellules HCC1187	224
Figure 95 : Effets de l'anticorps anti-HER4 C6 sur les cellules tumorales exprimant HER4, en absence et en présence de NRG1	226
Figure 96 : Effets de l'anticorps anti-HER4 D5 sur les cellules tumorales exprimant HER4, en absence et en présence de NRG1	228

Liste des tableaux

Tableau 1 : Couples ligands-dimères HER possibles	32
Tableau 2 : Expression tumorale du récepteur EGFR	52
Tableau 3 : Expression tumorale du récepteur HER2	56
Tableau 4 : Expression tumorale du récepteur HER3	59
Tableau 5 : Expression tumorale du récepteur HER4	90
Tableau 6 : Principaux rôles des quatre isoformes du récepteur HER4	121
Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification des isoformes de HER4 par PCR	125
Tableau 8 : Séquences des siRNA utilisés pour éteindre HER4 et ses isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2	126
Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour la création des plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2	127
Tableau 10 : Anticorps primaires utilisés en WB	129
Tableau 11 : Amorces PCR utilisées pour amplifier les V _H /V _L des scFv candidats	136
Tableau 12 : Expression du récepteur HER4 sur un large panel de lignées cancéreuses	142

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé	KD : Kinase-Dead
ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease	kDa : kiloDalton
AIF : Apoptosis-Inducing Factor	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
AR : Amphiregulin	MDM2 : Mouse Double Minute 2
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	MMP : Matrix MetalloProteinase
ATP : Adénosine TriPhosphate	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
BAD : Bcl-2 Agonist of cell Death	NF-κB : Nuclear Factor <i>kappa</i> B
BAK : Bcl-2 homologous Antagonist/Killer	NGF : Nerve Growth Factor
BAX : Bcl-2 Associated X	NLS : Nuclear Localization Signal
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2	NRG : NeuRÉGuline
Bcl-X_L : B-cell lymphoma eXtra Large	NSCLC : Non Small Cell Lung Cancer
BIK : Bcl-2 Interacting Killer	PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymerase
BRCA1 : BREast CANcer type 1 susceptibility protein	PH : Pleckstrin Homology
BTC : Betacellulin	PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
CDR : Complementary Determining Regions	PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisPhosphate
CYT : CYToplasmic	PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisPhosphate
DNA-PK : DNA-dependent Protein Kinase	PKC : Protein Kinase C
ECD : ExtraCellular Domain	PKD : Protein Kinase Domain
EGF : Epidermal Growth Factor	PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	RE : Réticulum Endoplasmique
EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition	RIP : Regulated Intramembrane Proteolysis
EPG : Epigen	ROS : Reactive Oxygen Species
EPR : Epiregulin	RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2	RT-qPCR : Real Time quantitative (Reverse Transcription) Polymerase Chain Reaction
ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport	SAPK : Stress-Activated Protein Kinase
(v-)ErbB : (viral)-Erythroblast B	scFv : single chain Fragment variable
Fab : Fragment antibody binding	Shc : Src homology 2 domain containing
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting	SNC : Système Nerveux Central
Fc : Fragment crystalline	SRB : SulfoRhodamine B
FoxO : Forkhead box Other	STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
GPCR : G Protein Coupled Receptor	TACE : Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme
Grb2 : Growth factor receptor bound protein 2	TGFα : Transforming Growth Factor α
GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3 β	TM : TransMembrane domain
HB-EGF : Heparin-Binding EGF like Growth Factor	TNBC : Triple Negative Breast Cancer
HER : Human Epidermal growth factor Receptor	TNF-α : Tumor Necrosis Factor- α
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein	TPA : 12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
ICD : IntraCellular Domain	TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
4ICD : HER4 IntraCellular Domain	WB : Western Blot
INTERNET : INtegral Trafficking from the ER to the Nuclear Envelope Transport	WT : Wild-Type
JM : JuxtaMembrane	WWOX : WW domain-containing
JNK : c-Jun N-terminal Kinase	OXidoreductase
RIRR : ROS-Induced ROS Release	

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



I - Les récepteurs de la famille HER

A - Place des récepteurs dans la super-famille des RTK

Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK) forment avec les GPCR (*G Protein Coupled Receptors*), les canaux ioniques et les récepteurs aux cytokines, la super-famille des récepteurs membranaires (Uings and Farrow, 2000). Ces récepteurs permettent de transmettre et de transformer un signal extracellulaire en un signal intracellulaire, interprétable par la cellule et lui permettant de répondre en conséquence à ce stimulus. Parmi eux, les RTK forment une famille comprenant 58 récepteurs, divisés en 20 sous-familles (**Figure 1**) (Lemmon and Schlessinger, 2010).

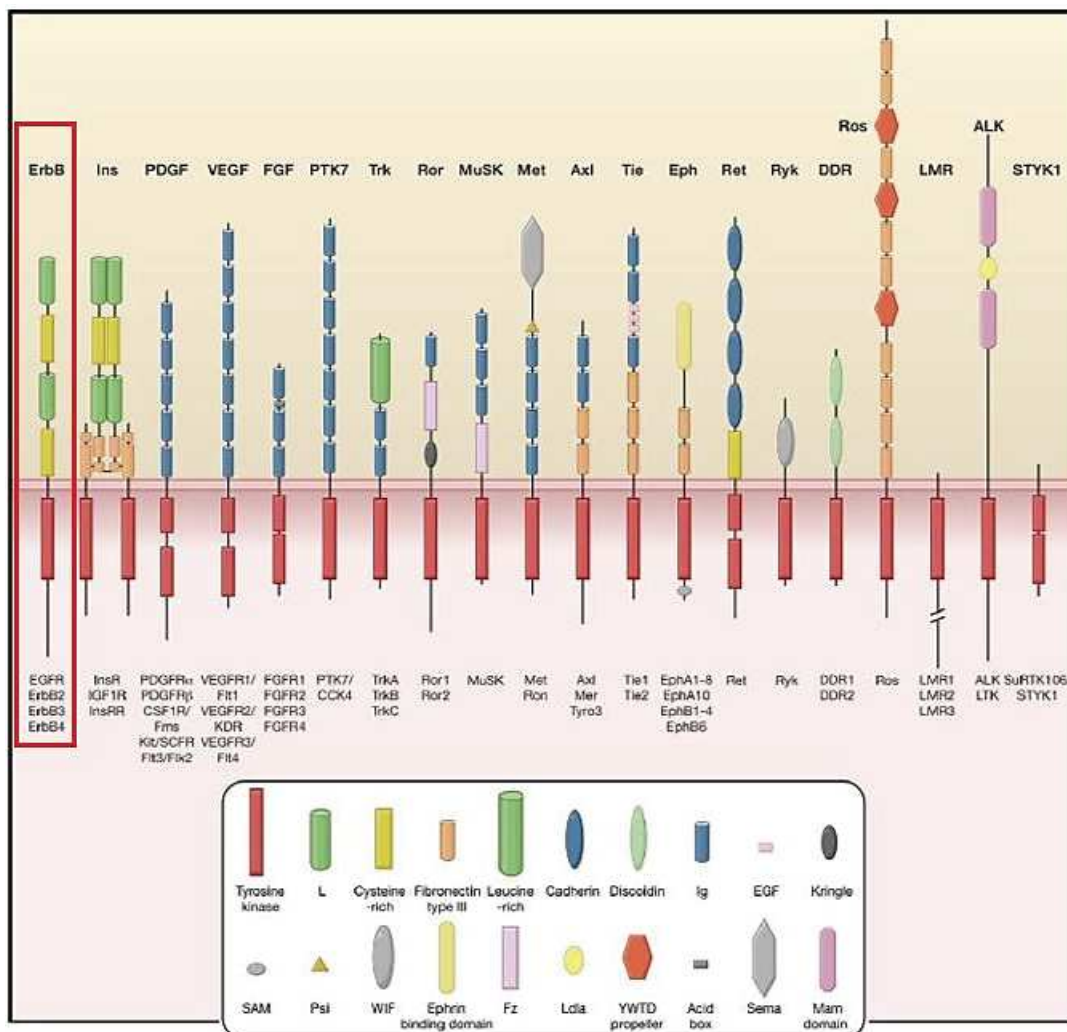


Figure 1 : Schéma représentatif des sous-familles et membres des Récepteurs Tyrosine Kinase

Les 20 sous-familles formant la classe des RTK sont représentées, et leurs membres sont listés sous chaque type de récepteur. Le domaine portant l'activité tyrosine kinase est représenté par un rectangle rouge dans la partie intracellulaire du récepteur. Les parties extracellulaires des récepteurs sont formées par différents motifs légendés dans l'encart. La famille HER (aussi appelée ErbB) est composée de quatre membres (d'après Lemmon et Schlessinger, 2010).

Tous ces récepteurs possèdent une architecture moléculaire similaire, à savoir un domaine extracellulaire comportant le site de fixation du ligand (quand ce dernier existe), un domaine transmembranaire permettant d'enchâsser le récepteur dans la membrane plasmique et un domaine intracellulaire portant l'activité kinase.

Parmi tous ces récepteurs, ceux de la famille HER (*Human Epidermal growth factor Receptor*) sont les plus étudiés. Pour une raison historique d'une part, puisque le récepteur à l'EGF (aussi appelé EGFR ou ErbB1) a été le premier RTK mis en évidence, mais surtout pour leurs rôles extrêmement importants dans le développement et l'homéostasie des différents organes, et par extension dans le développement de cancers. C'est pour cette dernière raison que cette famille est une cible de choix pour l'établissement de nouvelles thérapies contre le cancer.

B - Historique de leur découverte

C'est autour des années 1960 que Stanley Cohen découvre, isole et caractérise le premier facteur de croissance, le NGF (*Nerve Growth Factor*), à partir d'extraits de glandes salivaires. En injectant ces extraits à des souris, il mit en évidence une activité pro-proliférative (en observant notamment que leurs ganglions sympathiques étaient beaucoup plus gros que ceux des souris non traitées) et surtout, un rôle dans le développement animal : les souris traitées ouvraient leurs yeux à un stade très précoce et leurs dents poussaient beaucoup plus vite. C'est en s'intéressant de plus près à ces observations et aux facteurs qui pourraient être responsables de cela (car le NGF purifié n'avait pas d'effet sur l'ouverture précoce des yeux) qu'il découvrit le polypeptide responsable de ces effets, l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Cohen, 2008).

Quelques années plus tard, il a été démontré que l'EGF stimulait la croissance de fibroblastes humains en culture, et qu'il était capable de se lier à un récepteur (Carpenter et al., 1975). Dès lors, les observations et découvertes de l'action de l'EGF sur les cellules se sont multipliées, grâce notamment aux études sur la lignée cancéreuse modèle A431, qui exprime très fortement le récepteur à l'EGF : Graham Carpenter, Stanley Cohen et Lloyd King Jr découvrent alors qu'une protéine membranaire est phosphorylée suite à la liaison de l'EGF (Carpenter et al., 1979) et que cette protéine d'environ 170 kDa est probablement le récepteur à l'EGF lui-même, portant une activité kinase (King et al., 1980). Mais la relation entre EGFR et cancer, bien que soupçonnée (Chinkers and Cohen, 1981), restait à établir.

Elle fut mise en évidence lorsque les études ont rapporté une forte homologie de séquences de l'EGFR avec celles d'un oncogène viral aviaire, v-erbB (*viral-erythroblast-B*) (Downward et al., 1984). Le gène erb, découvert par Martine Roussel en 1979 (Roussel et al., 1979) dans le virus de l'érythroblastose aviaire et présent chez l'homme induit une transformation rapide des cellules *in vitro* et la formation de sarcomes (Saule et al., 1981).

Certaines souches de ce virus portent cependant deux gènes différents appelés v-erbA et v-erbB. Il a été montré que c'était ce dernier qui pouvait seul induire la transformation des cellules, que le produit de ce gène était adressé à la membrane plasmique (Hayman and Beug, 1984) et que sa partie N-terminale était suffisante pour transformer des fibroblastes en culture (Yamamoto et al., 1983). La très forte homologie entre EGFR et l'oncogène v-erbB était démontrée et les études confirmaient le pouvoir oncogène de l'EGFR (Ullrich et al., 1984). Plus tard, le clonage du récepteur dans la lignée de fibroblastes NIH3T3 facilitait l'étude du récepteur *in vitro* (Mroczkowski et al., 1988).

Le premier RTK à avoir été découvert (EGFR/ErbB1), en même temps que son potentiel oncogénique, est donc un récepteur de la famille HER. Depuis, l'implication majeure de cette famille de RTK dans le développement de cancers n'est plus à démontrer (Roskoski, 2014).

C - Structure et mécanisme d'activation

1. Structure des récepteurs HER

Les récepteurs HER, famille composée de quatre membres (ErbB1/EGFR/HER1 ; ErbB2/Neu/HER2 ; ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4) possèdent une architecture et un mécanisme d'activation communs. Ils sont composés de trois domaines bien différenciés : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire (**Figure 2**).

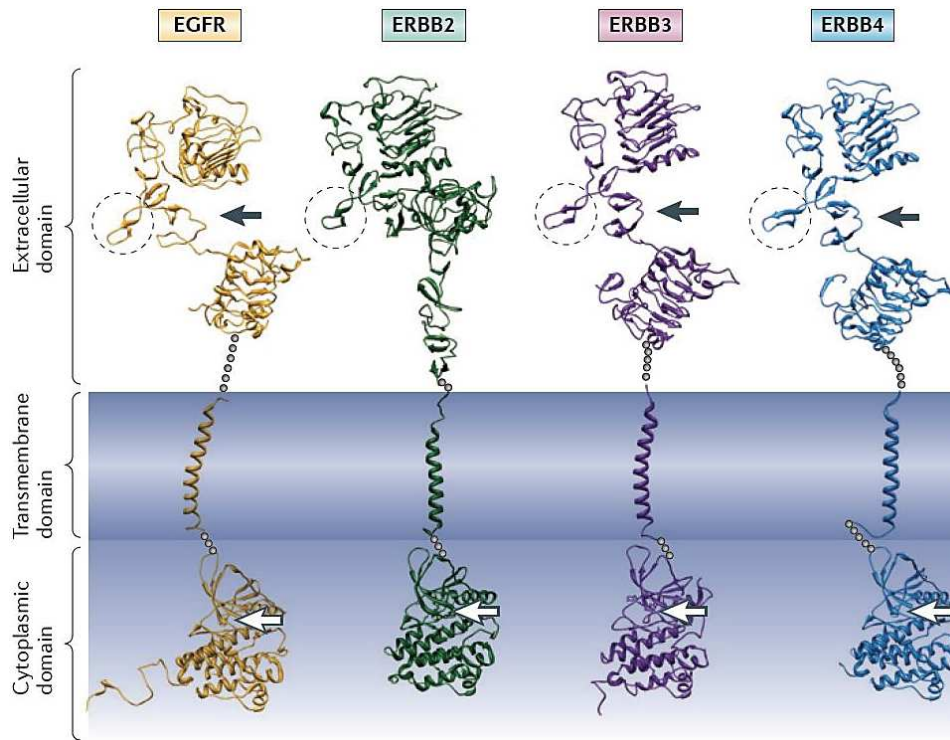


Figure 2 : Schéma représentatif des quatre récepteurs de la famille HER

Les quatre récepteurs HER (aussi appelés EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4) sont représentés par leur structure cristallographique, ici en conformation active. Le domaine extracellulaire comporte notamment le site de fixation du ligand (flèche noire) et la boucle de dimérisation, nécessaire à l'homo/hétérodimérisation des récepteurs (cercle en pointillé). On notera que HER2 ne possède pas de site de fixation de ligand et que sa boucle de dimérisation est étendue, conférant au récepteur une capacité d'hétérodimérisation plus grande que celle des autres récepteurs. Le domaine transmembranaire permet d'enchâsser le récepteur dans la membrane plasmique. Le domaine cytoplasmique porte l'activité kinase du récepteur, le site de liaison de l'ATP étant indiqué par la flèche blanche. Bien que le récepteur HER3 soit considéré comme ayant une activité kinase très faible, son site de liaison de l'ATP existe. Les particularités de chaque récepteur seront détaillées dans le chapitre qui leur est dédié (Yarden and Pines, 2012).

Le domaine extracellulaire, d'environ 650 acides aminés (AA), est composé de quatre sous-domaines notés I à IV. Les domaines I et III, enrichis en Leucine, participent à la fixation du ligand *via* un changement de leur conformation lors de l'activation du récepteur (voir plus bas). Les domaines II et IV sont des domaines riches en Cystéine et participent à la formation de ponts disulfures, nécessaires à la stabilisation et l'activation des récepteurs (Moriki et al., 2001). Le domaine II, contenant le bras de dimérisation du récepteur, est responsable de l'homo/hétérodimérisation de ces derniers.

Le domaine transmembranaire, segment de 19 à 25 AA, enchâsse le récepteur dans la membrane plasmique et fait la jonction entre les parties extracellulaire et intracellulaire du récepteur, permettant la transduction du signal (Fleishman et al., 2002).

Enfin, le domaine intracellulaire, d'environ 550 AA, porte le domaine kinase entre le segment juxtamembranaire et la queue C-terminale du récepteur (**Figure 3**).

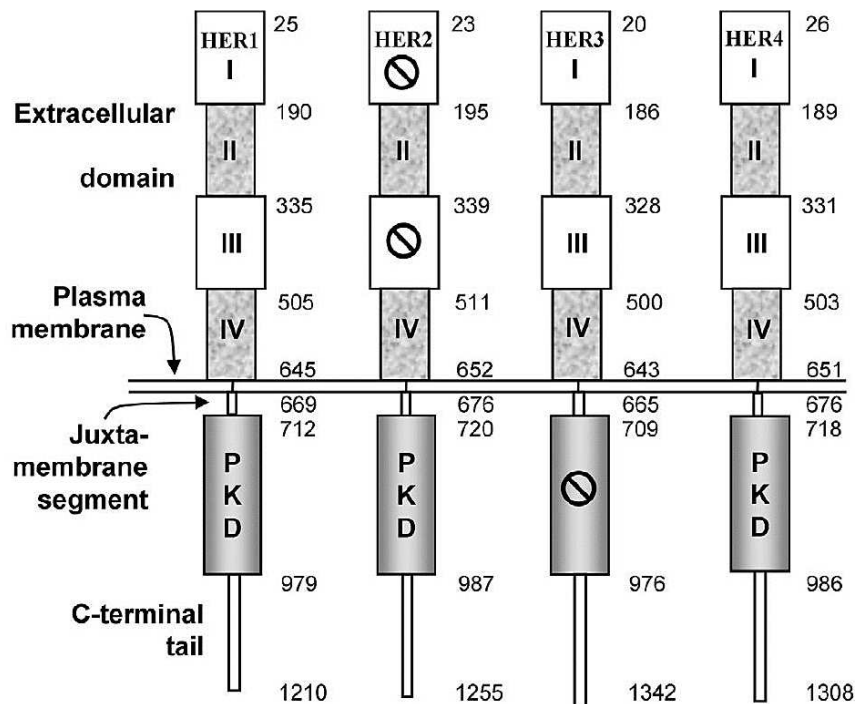


Figure 3 : Organisation structurale des récepteurs HER

Les récepteurs HER possèdent quatre domaines (I à IV) dans leur partie extracellulaire. Les domaines I et III participent à la liaison du ligand (à l'exception de HER2 dont la conformation spécifique ne la permet pas) et le domaine II à la formation des dimères de récepteurs, seuls ces derniers étant actifs. La partie intracellulaire porte principalement le domaine kinase du récepteur (PKD), essentiel pour la signalisation intracellulaire. Bien que le domaine kinase de HER3 existe, son activité de signalisation est considérée comme très faible. Les nombres annotés près des domaines correspondent aux AA de la protéine native et délimitent les tailles de chaque domaine (d'après Roskoski, 2014).

2. Mécanisme d'activation des récepteurs HER

a. 1^{ère} étape : liaison du ligand

Les récepteurs HER sont des entités monomériques mais ce sont les dimères de récepteurs qui sont actifs, et l'homodimérisation (à partir de deux entités identiques) ou l'hétérodimérisation (à partir de deux entités différentes) de ces récepteurs est en partie induite par la liaison du ligand.

Il existe 11 ligands pouvant lier les récepteurs HER : l'EGF, l'EPG (*Epigen*), le TGF- α (*Transforming Growth Factor α*), l'AR (*Amphiregulin*), la BTC (β -cellulin), l'HB-EGF (*Heparin-Binding EGF like Growth Factor*), l'EPR (*Epiregulin*) et les NRG¹ (*NeuRéGulin*) 1 à 4 (**Figure 4**).

¹ Note de l'auteur : il existe plus d'une dizaine d'isoformes des NRG. J'ai volontairement utilisé le terme générique « NRG » lorsque les isoformes ne sont pas précisées ou que plusieurs peuvent conduire à l'effet décrit.

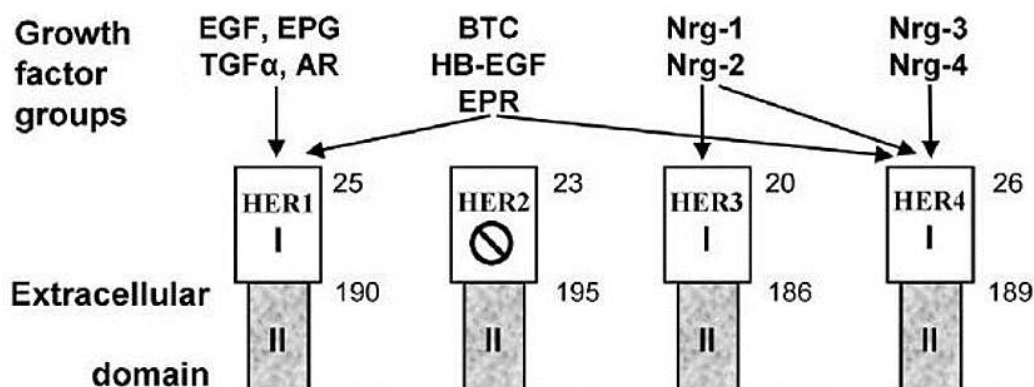


Figure 4 : Ligands des récepteurs HER

Les ligands des récepteurs HER peuvent être classés en 4 groupes : le 1^{er} groupe (EGF, EPG, TGF- α et AR) constitue les ligands d'EGFR, le 2nd (BTC, HB-EGF et EPR) peut lier EGFR et HER4, le 3^{ème} groupe (NRG1 et NRG2) peut lier HER3 et HER4 alors que le 4^{ème} groupe (NRG3 et NRG4) contient des ligands exclusifs à HER4 (d'après Roskoski, 2014).

Ces ligands sont codés par 10 gènes, dont certains (les 4 gènes des NRG) subissent un épissage alternatif pour donner plusieurs isoformes de ligands. Ils sont produits de façon contrôlée (à l'état physiologique) et envoyés à la membrane sous forme de précurseurs transmembranaires (pro-ligands). Ils peuvent alors y être clivés par des métalloprotéases (*Disintegrin And Metalloprotease* : ADAM10 et ADAM17), ce qui permet leur relargage dans le milieu extracellulaire et leur action autocrine, juxtacrine ou paracrine, selon les besoins de l'organisme (Blobel, 2005). Ces protéases sont surexprimées dans certains types de cancers (comme le cancer du poumon) et peuvent contribuer à la tumorigenèse, leur activité amplifiant le clivage des facteurs de croissance produits par les cellules tumorales, permettant ainsi une prolifération accrue.

Une fois le ligand lié sur son récepteur monomérique, un autre monomère va s'associer au complexe pour former un dimère de récepteurs, état indispensable pour l'activation et la signalisation des récepteurs HER.

b. 2^{ème} étape : homo/hétéro/(oligo)dimérisation des récepteurs

Le **Tableau 1** liste les différentes combinaisons possibles de dimères pouvant se former entre les récepteurs HER ainsi que les ligands participants aux interactions. Contrairement à EGFR/HER2/HER3, le récepteur HER4 est présent sous quatre isoformes à la surface cellulaire, appelées JMa/CYT1, JMa/CYT2, JMb/CYT1 et JMb/CYT2, faisant de ce récepteur le partenaire pouvant engendrer les signalisations les plus complexes (la description détaillée du récepteur HER4 sera l'objet du chapitre suivant). Il existe 28 dimères HER possibles et 611 combinaisons potentielles de dimères activés par leurs ligands (Roskoski, 2014).

Dimères potentiels	Ligands mis en jeu	Signalisations potentielles engendrées par les dimères
EGFR-EGFR	<i>EGF, EPG, TGFα, AR, BTC, HB-EGF, EPR</i>	28
EGFR-HER2		7
EGFR-HER3	<i>EGF, EPG, TGFα, AR, BTC, HB-EGF, NRG1, NRG2</i>	14
EGFR-HER4 JMa/CYT1	<i>EGF, EPG, TGFα, AR, BTC, HB-EGF, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4</i>	49
EGFR-HER4 JMa/CYT2		49
EGFR-HER4 JMb/CYT1		49
EGFR-HER4 JMb/CYT2		49
HER2-HER2	<i>aucun</i>	<i>aucune</i>
HER2-HER3	<i>NRG1, NRG2, EGF*, BTC*</i>	4
HER2-HER4 JMa/CYT1	<i>BTC, HB-EGF, EPR, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4</i>	7
HER2-HER4 JMa/CYT2		7
HER2-HER4 JMb/CYT1		7
HER2-HER4 JMb/CYT2		7
HER3-HER3	<i>NRG1, NRG2</i>	3
HER3-HER4 JMa/CYT1	<i>BTC, HB-EGF, EPR, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4</i>	14
HER3-HER4 JMa/CYT2		14
HER3-HER4 JMb/CYT1		14
HER3-HER4 JMb/CYT2		14
HER4 JMa/CYT1-HER4 JMa/CYT1	<i>BTC, HB-EGF, EPR, NRG1, NRG2, NRG3, NRG4</i>	28
HER4 JMa/CYT1-HER4 JMa/CYT2		28
HER4 JMa/CYT1-HER4 JMb/CYT1		28
HER4 JMa/CYT1-HER4 JMb/CYT2		28
HER4 JMa/CYT2-HER4 JMa/CYT2		28
HER4 JMa/CYT2-HER4 JMb/CYT1		28
HER4 JMa/CYT2-HER4 JMb/CYT2		28
HER4 JMb/CYT1-HER4 JMb/CYT1		28
HER4 JMb/CYT1-HER4 JMb/CYT2		28
HER4 JMb/CYT2-HER4 JMb/CYT2		28
HER4 JMb/CYT2-HER4 JMb/CYT2		28
HER4 JMb/CYT2-HER4 JMb/CYT2		28

Tableau 1 : Couples ligands-dimères HER possibles

Les 28 combinaisons possibles de dimères HER peuvent engendrer 616 complexes ligands-récepteurs potentiels (613 si l'on exclut les couples HER2-HER2 et HER3-HER3, considérés comme inactifs) : la signalisation pouvant être engendrée par le récepteur HER4 et ses quatre isoformes en fait le récepteur le plus complexe de la famille HER. * (Alimandi et al., 1997) ont démontré que l'EGF et la BTC pouvaient lier et induire une signalisation via les hétérodimères HER2/HER3 (adapté d'après Roskoski, 2014).

Bien que la dimérisation des récepteurs HER soit le mécanisme admis comme étant le moteur de leur activation, de nombreuses études décrivent une plus haute organisation des récepteurs sous la forme d'oligomères, certains déjà formés à l'état basal ou se formant suite à la liaison du ligand, et pouvant contenir jusqu'à 10 monomères ! Ces oligomères pourraient former de véritables plateformes de signalisation, et il a été récemment suggéré qu'ils pourraient être à l'origine de l'orientation des domaines kinases, et en partie responsables de la cinétique de phosphorylation-déphosphorylation des récepteurs. Needham et ses collaborateurs ont montré que le retour à l'état basal de la phosphorylation induite par l'EGF

était corrélé à une dissociation des oligomères, pour tendre vers un état proche du dimère (Needham et al., 2016). Ces études ont utilisé l'EGFR comme modèle, mais il est probable que le même mécanisme se produise pour les autres récepteurs, avec des différences majeures dues aux particularités structurales de chacun d'eux (Ferguson et al., 2000). Toutefois, l'oligomérisation semble impliquer une minorité de récepteurs (du moins une part beaucoup moins importante que la dimérisation), et le mécanisme d'activation le plus important reste la dimérisation des récepteurs.

A l'état inactif, hormis pour le récepteur HER2 dont la conformation naturellement « ouverte » favorise la dimérisation (Garrett et al., 2003), les trois autres membres de la famille ont une conformation « fermée » avec leur bras de dimérisation replié (**Figure 5**). Les récepteurs sont principalement sous forme monomérique à l'état inactif bien que plusieurs études suggèrent que les récepteurs HER peuvent aussi se trouver dans un état de dimères préformés inactifs (Macdonald-Obermann et al., 2012).

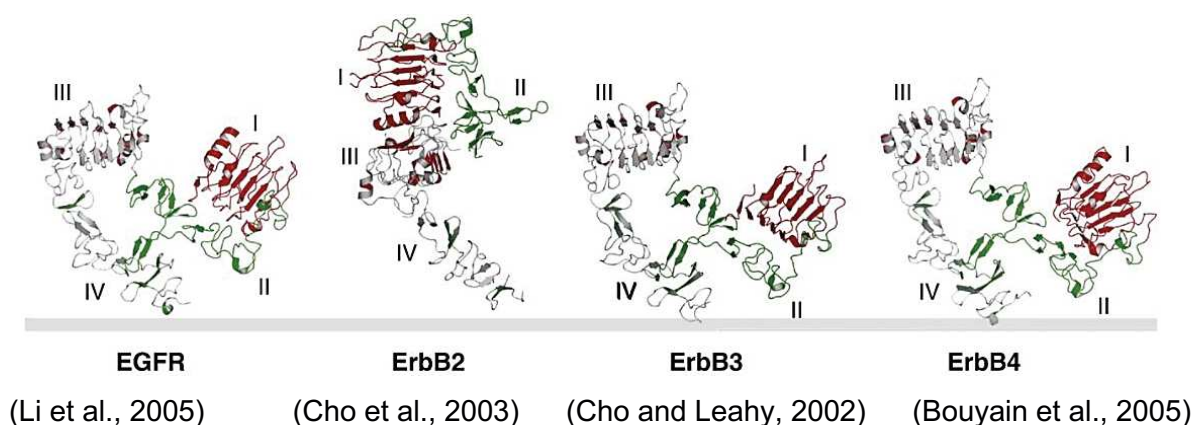


Figure 5 : Structure des récepteurs HER en conformation inactive

Les structures cristallographiques des parties extracellulaires en absence de ligand sont représentées et les quatre domaines annotés. A la membrane, le récepteur HER2 est déjà en conformation ouverte, avec les domaines I et III rapprochés et le bras de dimérisation accessible, ressemblant à l'état activé. Les autres récepteurs EGFR, HER3 et HER4 sont dans une conformation fermée avec le bras de dimérisation replié. Les références renvoient aux articles et données cristallographiques (Lemmon, 2009).

La liaison du ligand entre les domaines I et III va induire une rotation à 130° du récepteur, entraînant un changement de conformation de ce dernier et rendant accessible son bras de dimérisation. Le monomère activé peut alors lier d'autres monomères, eux aussi préalablement activés par le ligand ou non (**Figure 6**). On peut dès à présent comprendre que la structure déjà « ouverte » du récepteur HER2 en fait le meilleur partenaire de dimérisation de la famille HER. L'activation des récepteurs (et les cascades de signalisation résultantes) est donc principalement dépendante de la liaison du ligand.

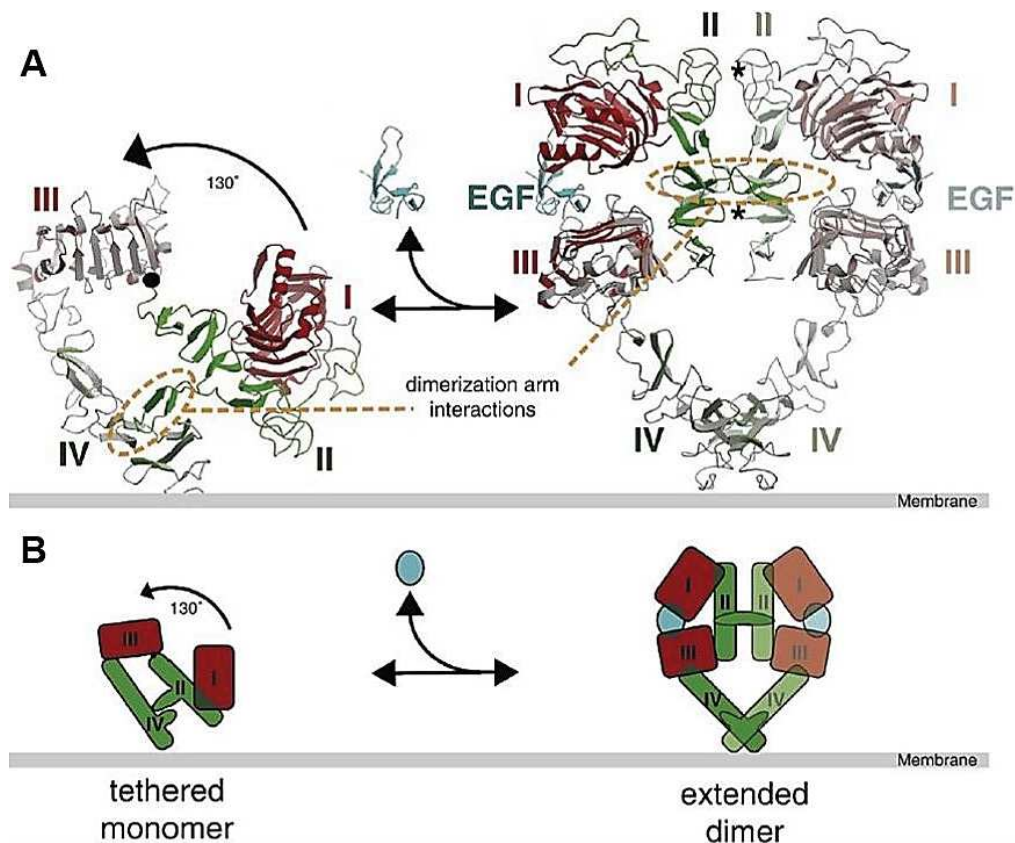


Figure 6 : Modèle du changement conformationnel de l'EGFR induit par la liaison du ligand

(A) Représentation en ruban de la partie extracellulaire de l'EGFR. A l'état inactif le bras de dimérisation (cercle pointillé orange) est enfoui et inaccessible. La liaison du ligand (ici l'EGF) va induire un changement conformationnel du monomère avec une rotation du récepteur de 130° entre les domaines I et III et libérer le bras de dimérisation. Le récepteur peut alors rencontrer un autre monomère, entraînant l'homo/hétérodimérisation. On notera que pour l'EGFR, un monomère lié par l'EGF peut rencontrer un autre monomère lui aussi lié par son ligand. (B) Représentation schématique du modèle d'activation (Lemmon, 2009).

Cependant, ce n'est pas le ligand seul qui entraîne la dimérisation des récepteurs : les différents domaines (Moriki et al., 2001) ainsi que l'équilibre dynamique monomère-dimère au niveau de la membrane cellulaire (Chung et al., 2010) sont à prendre en compte et influencent fortement l'activation des récepteurs HER.

Ce perpétuel état dynamique monomère-dimère a été décrit pour l'EGFR par Chung et ses collaborateurs, mais il est probable que ce mécanisme existe aussi pour les autres récepteurs HER. En analysant en temps réel la vitesse de diffusion de molécules seules (monomère d'EGFR) marquées par des *quantum dots*, les auteurs ont mis en évidence une dimérisation spontanée de l'EGFR en absence de ligand, stabilisée dans un temps court par le bras de dimérisation. De plus, en démontrant que l'EGF induisait une diffusion plus lente des récepteurs dans la membrane, que cette diffusion lente était toujours précédée par un état dimérique et qu'elle ne se produisait pas avec un mutant dépourvu d'activité kinase (*kinase-dead*), les auteurs suggèrent une probable corrélation entre diffusion lente et activation des récepteurs. De ce fait, la faible diffusion du dimère dans la membrane pourrait être un paramètre physique favorisant la liaison du ligand. Cependant, après stimulation par l'EGF,

les dimères de mutants *kinase-dead* ne persistent pas plus longtemps que les dimères non « *ligandés* », indiquant que même si le ligand est nécessaire à l'activation des récepteurs, il ne stabilise pas l'état dimérique.

Enfin, en observant des dimères formés par des mutants DelD (délétés de leur bras de dimérisation), les auteurs montrent que ce bras n'est pas indispensable pour la formation de dimères. De ce fait, l'association entre deux monomères est plus complexe que le schéma classique décrit plus haut en **Figure 6**. Cette observation soutient l'hypothèse que toutes les parties du récepteur - extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique - jouent un rôle complémentaire dans le processus de dimérisation des récepteurs, et donc dans leur activation. Puisque ces réarrangements structuraux sont très fins, il est possible de « forcer » et de maintenir les récepteurs dans une conformation précise, afin de les rendre inactifs : c'est le cas avec des anticorps bloquant la dimérisation des récepteurs comme le pertuzumab (anticorps anti-HER2) ou empêchant la liaison du ligand comme le cetuximab (anticorps anti-EGFR).

La dimérisation des récepteurs HER est la première étape dans la transmission du signal et résulte de réarrangements structuraux complexes. Elle est principalement dictée par le domaine extracellulaire mais fait aussi intervenir les autres parties du récepteur, essentielles pour la bonne transmission de l'information. La partie intracellulaire du récepteur, portant le domaine kinase, est le dernier maillon de la chaîne. L'activité de ce domaine est cruciale et reflète la capacité du récepteur et sa puissance à induire une signalisation. Ainsi, l'activité kinase d'un récepteur est souvent le discriminant majeur qui permet d'établir un « classement » des récepteurs HER : les récepteurs EGFR et HER2 sont les plus puissants, suivis par les récepteurs HER4 puis HER3.

L'activation du domaine kinase, par le mécanisme décrit ci-dessous, permet l'aiguillage de la signalisation cellulaire, par un jeu de trans-phosphorylations menant au recrutement de différents effecteurs et adaptateurs cellulaires.

c. 3^{ème} étape : trans-activation des kinases

Suite à la liaison du ligand, la dimérisation des récepteurs, *via* les domaines extracellulaires, va engendrer des réarrangements structuraux le long du dimère qui se terminent dans la partie intracellulaire de ce dernier. Ces réarrangements sont principalement induits par les segments juxtamembranaires des deux monomères. Ces derniers vont former un dimère d'hélices anti-parallèles et ainsi verrouiller les deux domaines kinases, les faisant passer d'un état « auto-inhibé » à un état « activable », permettant une plus grande flexibilité et une plus grande dynamique d'interaction entre les domaines (Jura et al., 2009). Les phosphorylations des domaines kinases du dimère néoformé signent alors véritablement l'activation des récepteurs. Ces phosphorylations sont permises par l'arrangement particulier

des domaines kinases des deux monomères, qui forment un dimère asymétrique : le lobe C-terminal de la kinase « activatrice » interagit avec le lobe N-terminal de la kinase « receveuse », selon un modèle « CDK/cyclin-like » (Zhang et al., 2006). Cela permet une phosphorylation en *trans* des récepteurs (**Figure 7**).

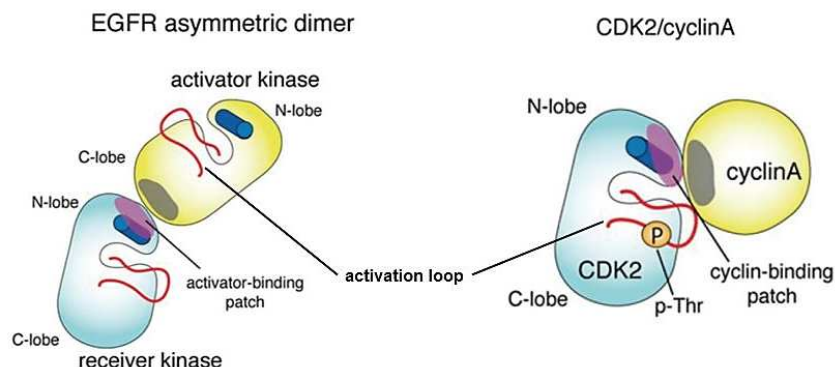


Figure 7 : Interaction des kinases du récepteur EGFR, selon un modèle « CDK/cyclin-like »

Lorsque les récepteurs HER sont activés, leurs domaines kinases forment entre eux un dimère asymétrique : le lobe C-terminal de la kinase activatrice interagit avec le lobe N-terminal de la kinase receveuse, sur le même modèle que l'interaction CDK/cycline. Le cylindre bleu représente l'hélice αC , importante pour la stabilisation des kinases activées. La phosphorylation de la boucle d'activation n'est pas requise pour activer les kinases des récepteurs HER, contrairement à celle des CDK/cyclines (adapté d'après Jura et al., 2011).

L'ordre d'activation des kinases (quelle est la kinase activatrice ? Quelle est la kinase receveuse ?) a été étudié par Macdonald-Obermann et ses collaborateurs, à l'aide d'un système de complémentation de fragments de luciférase sur des hétérodimères EGFR/HER2. Les auteurs ont élaboré différentes constructions des récepteurs, fusionnées à une « moitié » de luciférase. Selon les combinaisons (divers mutants de récepteurs WT -*Wild-Type*- et KD -*Kinase-Dead*-), la luciférase « reconstruite » permettait alors de suivre par luminescence l'activation des récepteurs. Ils ont ainsi démontré, dans ce modèle EGFR/HER2, que le récepteur liant le ligand adopte la position de kinase « receveuse » pour être activé en premier (Macdonald-Obermann et al., 2012). Le récepteur lié au ligand va phosphoryler la kinase de son partenaire (appelée kinase « activatrice »), qui à son tour va phosphoryler la kinase du récepteur « ligandé » (appelée kinase « receveuse ») : c'est la *trans*-phosphorylation des récepteurs. L'activation des kinases entraîne ensuite la phosphorylation des queues C-terminales des récepteurs, dont les divers sites servent de « *docking* » pour les protéines de signalisations sous-jacentes (**Figure 8**).

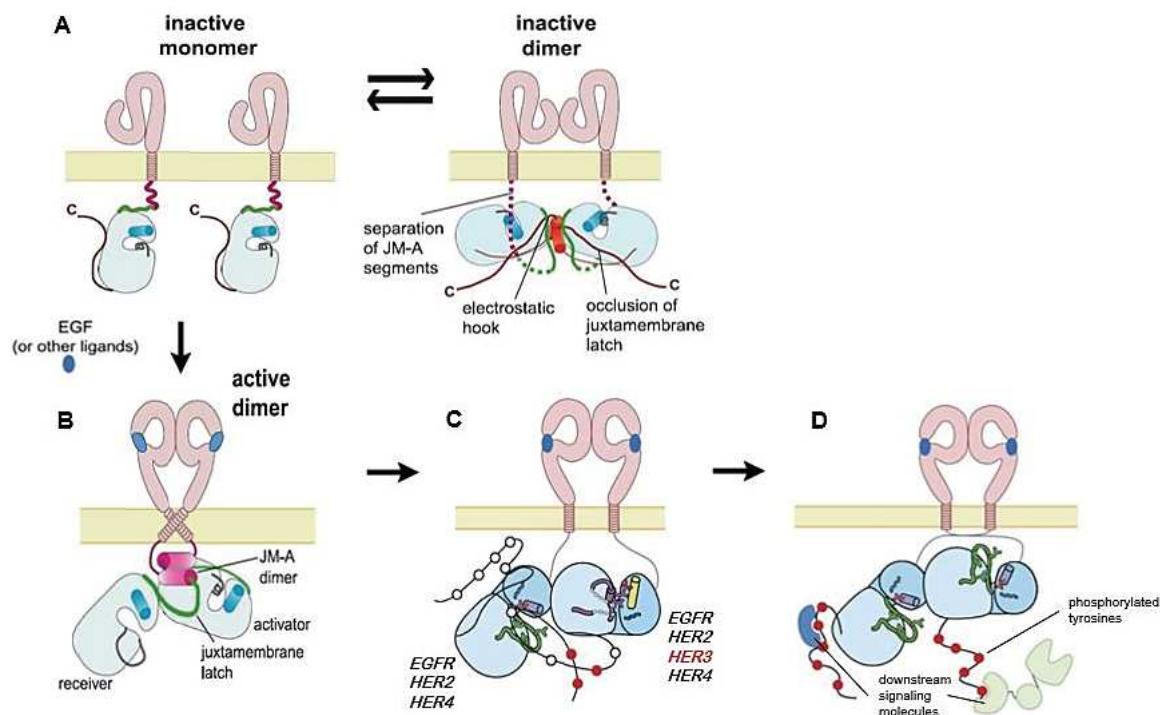


Figure 8 : Schéma général d'activation des récepteurs tyrosine kinase de la famille HER

(A) A l'état basal, les récepteurs se trouvent sous formes monomériques (en conformation « fermée ») ou sous forme de dimères inactifs. Ce sont les parties juxtamembranaires (JM segments, en vert et violet sur le schéma) qui empêchent l'activation des domaines kinases en les positionnant dos-à-dos et en bloquant l'interface de dimérisation (juxtamembrane latch). **(B)** La liaison du ligand induit la dimérisation des récepteurs, entraînant des changements conformationnels se répercutant dans les domaines kinases : les segments juxtamembranaires forment un dimère d'hélices anti-parallèles (JM-A dimer) stabilisant les kinases en un dimère asymétrique, avec une kinase « activatrice » et une kinase « receveuse ». **(C)** La trans-phosphorylation des domaines kinases précède celle des queues C-terminales des récepteurs (schématisées par des colliers de perles). Les quatre récepteurs HER peuvent servir de kinase « activatrice » alors que seuls EGFR, HER2 et HER4 peuvent être des kinases « receveuses » (HER3 ne peut fonctionner comme telle du fait de sa différence de séquence à l'interface N-terminale) **(D)** Les tyrosines phosphorylées des queues C-terminales servent alors de site de « docking » pour les protéines de signalisation sous-jacentes, comme les protéines adaptatrices Grb2 ou Shc. (schémas adaptés d'après Zhang et al., 2006 et Jura et al., 2009)

Cependant, ce modèle d'activation est plus complexe et fortement dépendant des propriétés structurales des quatre récepteurs HER. Par exemple, HER3 ne peut pas être kinase « receveuse » (nous le verrons plus loin) et selon les hétérodimères, l'activité kinase de « l'activateur » n'est pas nécessaire. En effet, Macdonald-Obermann a observé que les hétérodimères EGFR-WT/HER2-KD sont phosphorylés sur les deux domaines kinases (indiquant que l'activité kinase de HER2 n'est pas indispensable pour pouvoir servir de substrat à la kinase EGFR) alors que l'hétérodimère EGFR-KD/HER2-WT n'est pas phosphorylé. Cela implique une possible hiérarchie entre les kinases HER concernant les positions « activatrice-receveuse ». Cette hiérarchie a été démontrée par Ward et Leahy en étudiant les phosphorylations des différents hétérodimères HER ainsi que des constructions chimériques des récepteurs (par ex, ECD de l'EGFR fusionné au TM + ICD de HER2). Bien que ces constructions chimériques pourraient favoriser une certaine conformation des kinases et donc présenter une vue biaisée de la réalité biologique, les auteurs ont ainsi déterminé une hiérarchie entre les kinases HER. Dans un hétérodimère, l'EGFR possède la plus forte

propension à servir de kinase receveuse, suivi par HER2 puis HER4 (**Figure 9**) (Ward and Leahy, 2015). Malheureusement, les auteurs n'ont pas réussi à exprimer et étudier HER3 dans leur modèle, mais l'étude des séquences en AA de HER3 au niveau des interfaces N-terminale et C-terminale des domaines kinases suggèrent que ce récepteur a évolué pour servir principalement de kinase « acceptrice ».

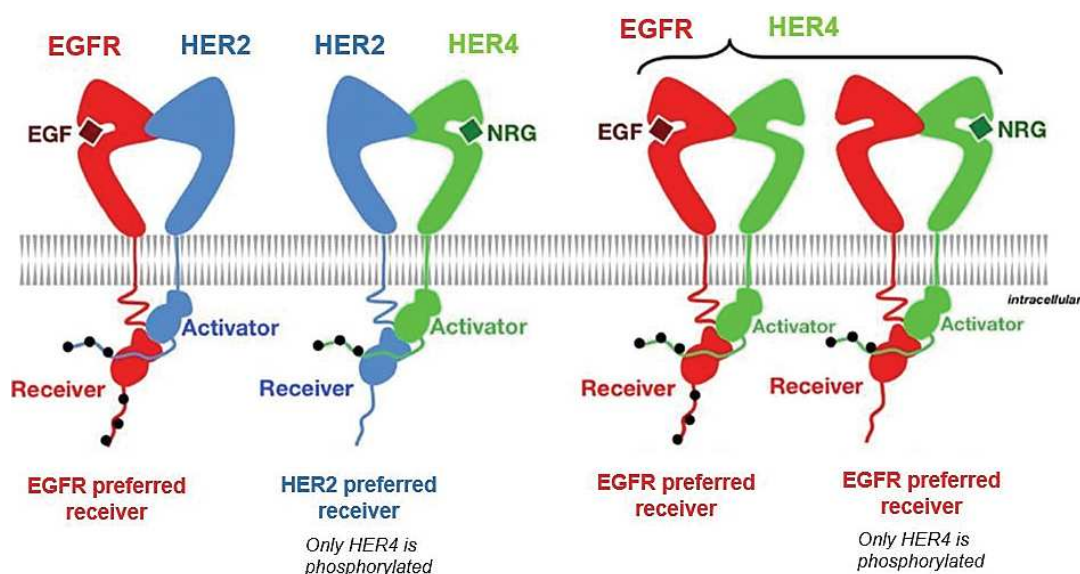


Figure 9 : Préférence des kinases HER pour les positions activatrices ou receveuses

Représentation schématique des positions prises par les kinases EGFR, HER2 et HER4 dans un hétérodimère. La kinase de l'EGFR adopte une position receveuse dominante dans tous les hétérodimères mais cela n'implique pas toujours l'activation du récepteur (cf. dimère EGFR/HER4 en liaison avec la NRG, où seul HER4 est phosphorylé). La kinase de HER2 adopte soit une position d'activatrice lorsqu'elle est liée à EGFR, soit une position de receveuse lorsqu'elle est liée à HER4. La kinase de HER4 est le plus souvent dans une position activatrice par rapport aux autres kinases HER, sauf bien sûr dans le cas des homodimères HER4 où elle est aussi receveuse. La kinase HER3, non représentée, serait probablement une kinase uniquement activatrice. Hiérarchiquement, les kinases peuvent être classées dans l'ordre suivant : EGFR > HER2 > HER4 > HER3 (adapté d'après Ward et Leahy, 2015).

In fine, tous ces arrangements conformationnels permettent au récepteur fixant le ligand de dicter la signalisation du dimère et les voies activées par celui-ci. Il faut cependant prendre en compte que le partenaire hétérodimérique va fortement influencer la signalisation, comme par exemple dans le cas d'un dimère EGFR/HER4 (schématisé dans la figure précédente). Lorsque le dimère est lié à l'EGF, les deux récepteurs sont phosphorylés, ce qui n'est pas le cas dans le même dimère lié à la NRG. Les réponses cellulaires seront de ce fait différentes.

Prise dans son ensemble, la structure d'un récepteur HER peut donc être considérée, conceptuellement, comme une succession d'engrenages qui doivent tourner dans un certain ordre pour aboutir à l'activation du récepteur. Cette richesse et cette complexité structurale ouvrent la voie à un ciblage plus précis de ces récepteurs : un grain de sable dans un des engrenages pourra complètement modifier le sens et la direction de la signalisation du

récepteur. Alors que cette approche, avec la découverte de ligands agonistes biaisés, a été largement démontrée et utilisée pour cibler les GPCR (Wooten et al., 2016), l'application de ces concepts à la pharmacologie des RTK n'en est qu'à ses balbutiements (Changeux and Christopoulos, 2016). Les différentes stratégies de ciblage des récepteurs ainsi que des exemples illustrant ces mécanismes d'action particuliers feront l'objet de parties dédiées.

Les récepteurs HER activés peuvent donc entraîner un large panel de signalisations, qui sont dépendantes de (1) la nature du ligand, (2) du récepteur « *ligandé* », et (3) du partenaire de dimérisation.

D - Principales voies de signalisations des récepteurs HER

Comme récapitulé dans le **Tableau 1**, une multitude de ligands peut activer les récepteurs HER, dont les grandes voies de signalisations peuvent entraîner apoptose, migration, survie, prolifération, adhésion ou encore différenciation (Yarden and Slivkowski, 2001). Ces ligands, les différents dimères qu'ils peuvent engendrer, mais surtout les interconnexions entre les différentes voies rendent la signalisation des récepteurs HER très complexe à disséquer (**Figure 10**).

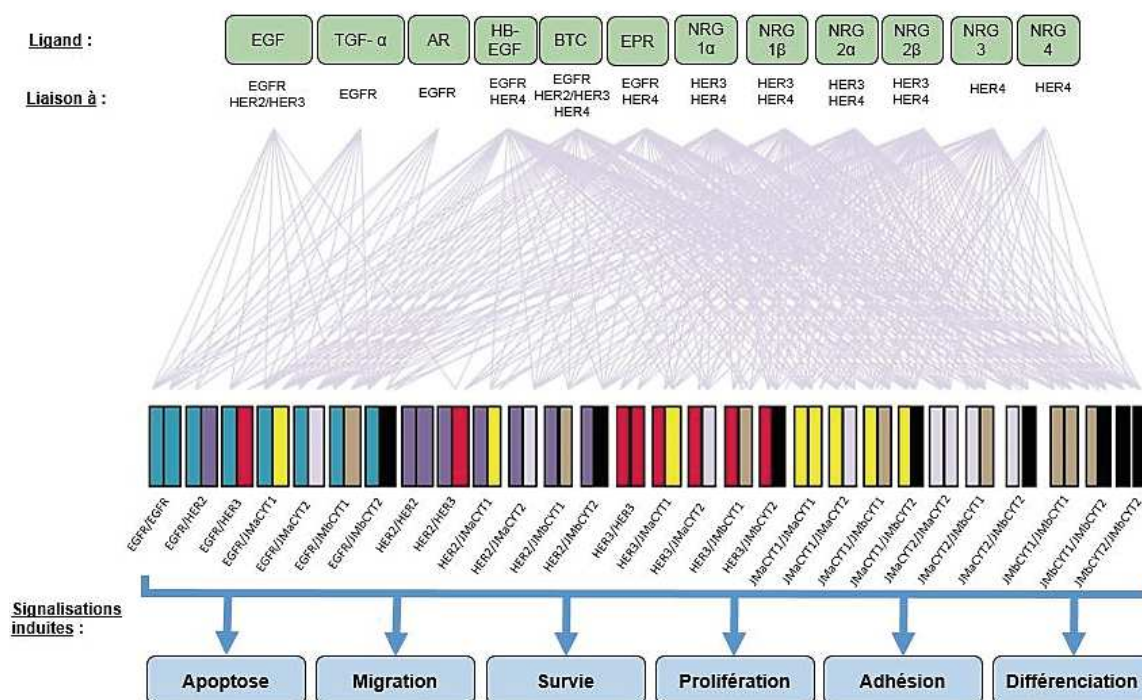


Figure 10 : Vue d'ensemble de la signalisation HER

Représentation schématique des différents ligands, des dimères possibles et des grandes voies de signalisations résultants de l'activation des récepteurs HER. Ne sont pas représentées ici les interactions avec les autres classes de récepteurs comme les GPCR, qui peuvent participer à ces signalisations (adapté d'après Gullick, 2001).

Même s'il y a maintenant des études suggérant que les récepteurs HER peuvent dimériser avec d'autres RTK tels que MET ou AXL (Kennedy et al., 2016), voire avec des GPCR, ce qui complexifie encore la vue d'ensemble, on peut dégager les principales cascades de signalisations engendrées par les dimères HER :

1. Voie PI3K/AKT

La signalisation PI3K/AKT est, avec celle des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), une des grandes voies de signalisation activée par les récepteurs de la famille HER. Elle induit majoritairement des signaux de survie, prolifération et différenciation, *via* l'activation de la sérine/thréonine kinase AKT (aussi appelée PKB pour « *Protein Kinase B* »). Il existe trois classes de PI3Ks (*Phosphoinositide 3-Kinase*) qui diffèrent dans leur structure et dans leur spécificité : la classe I est divisée en deux sous-classes et c'est la classe IA qui est activée par les RTK (la classe IB est exclusivement régulée par les GPCR). Les fonctions médiées par la classe II sont peu étudiées et la classe III régule le trafic membranaire ainsi que le métabolisme par la voie mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*).

AKT est le point central de cette signalisation qui débute par le recrutement de la sous-unité régulatrice p85 sur les tyrosines phosphorylées du récepteur. Cette liaison de la p85 permet à son tour le recrutement de la sous-unité catalytique p110, formant le complexe PI3K. La p110 ainsi activée convertit alors le *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (PtdIns(4,5)P₂ ou PIP₂) enchâssé dans la membrane plasmique en *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate* (PtdIns(3,4,5)P₃ ou PIP₃), second messager impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Ce PIP₃ peut alors servir de site d'ancrage pour des protéines possédant un domaine PH (*Pleckstrin Homology*) comme AKT. Deux phosphorylations sont nécessaires pour l'activation complète d'AKT, dont celle sur la Sérine 473. Cette phosphorylation peut être induite par plusieurs protéines comme PKC β2 (*Protein Kinase C β2*), DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) mais surtout par le complexe mTOR-ricor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), aussi appelé mTORC2 (Sarbasov et al., 2005).

La protéine AKT ainsi phosphorylée peut alors interagir avec un large panel de substrats cytosoliques (plus d'une centaine ont été identifiés), régulant de nombreuses voies (**Figure 11**) :

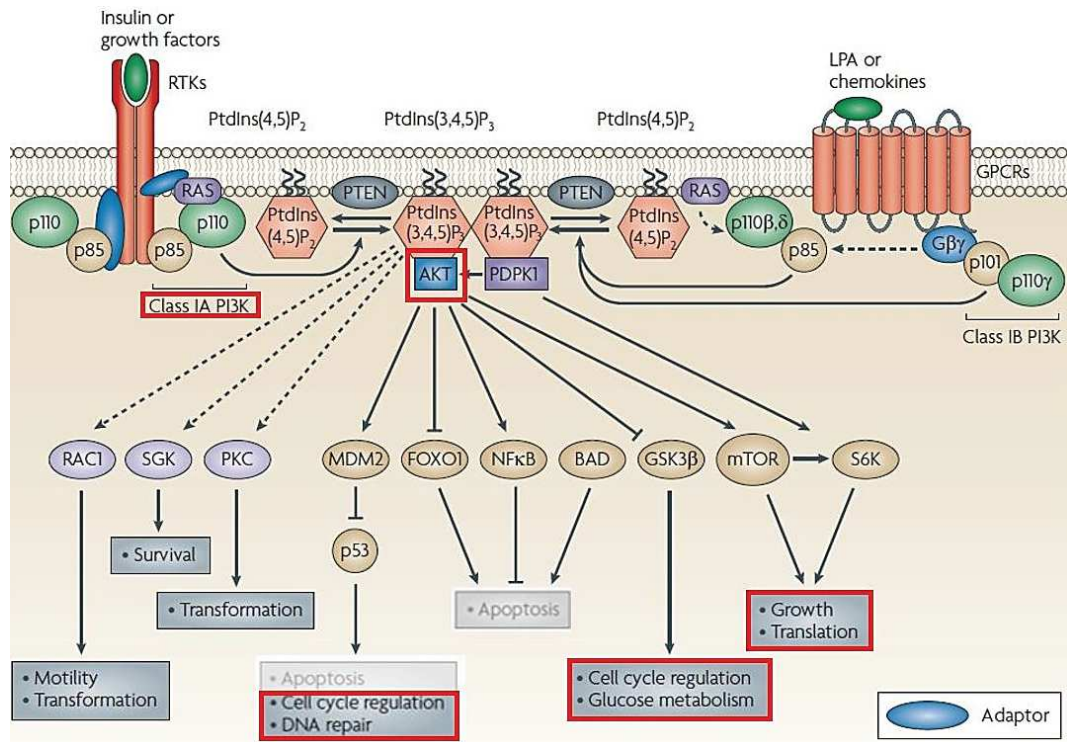


Figure 11 : Voie de signalisation PI3K/AKT et ses principaux effecteurs

La voie de signalisation PI3K/AKT est la principale voie activée par les récepteurs HER, médiant des signaux conduisant à la prolifération et à la survie des cellules. AKT est la protéine kinase centrale de la signalisation, régulant de nombreuses protéines sous-jacentes, principalement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, l'inhibition de l'apoptose, le contrôle du métabolisme ou la croissance cellulaire (Liu et al., 2009).

Parmi ses nombreux substrats, nous pouvons citer les principaux comme la protéine p53, présentée comme étant « le gardien du génome » et qui joue un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'induction de l'apoptose. Elle est principalement contrôlée par MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) qui régule négativement son activité en induisant sa dégradation par le protéasome. AKT induit la phosphorylation de MDM2 en Sérine 186, ce qui d'une part permet à MDM2 d'induire la dégradation de p53 (Ogawara et al., 2002), et en Sérine 166, ce qui induit la translocation de MDM2 au noyau pour réprimer l'activité transcriptionnelle de p53 (Mayo and Donner, 2001).

Les facteurs de transcription de la sous-famille FoxO (*Forkhead box Other*) partagent des fonctions similaires à p53 en contrôlant des gènes suppresseurs de tumeur. Leur adressage au noyau conduit à un arrêt du cycle cellulaire en induisant la transcription de p21 et p27 et la répression de cycline D. En phosphorylant directement les facteurs FoxOs, AKT induit leur séquestration dans le cytosol par les protéines 14-3-3, empêchant leur translocation nucléaire et leur activation (Zhang et al., 2011). NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*) est un autre facteur de transcription majeur impliqué dans l'induction de signaux de survie. En contrôlant ses inhibiteurs, AKT permet la signalisation de NF-κB au noyau et la transcription de facteurs anti-apoptotiques comme les protéines IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) (Baldwin, 2001).

La protéine AKT peut aussi promouvoir la survie en agissant directement sur des modulateurs clés de la signalisation apoptotique. La phosphorylation de BAD en Sérine 136 par AKT induit sa séquestration dans le cytosol par les protéines 14-3-3, ce qui bloque l'induction de l'apoptose. AKT peut aussi phosphoryler directement BAX en Sérine 184, empêchant sa translocation du cytosol à la mitochondrie et son oligomérisation avec BAK.

AKT régule le cycle cellulaire en phosphorylant p21^{Waf1/Cip1} et p27^{Kip1}, ce qui lève leur activité inhibitrice et permet la progression du cycle cellulaire. Une autre voie contrôlée par AKT est la réparation de l'ADN : AKT phosphorylé en Sérine 473 colocalise avec DNA-PK aux niveaux des cassures doubles brins, et interagit avec les protéines de réparation de l'ADN comme Chk1, TopBP1, Rad51 ou BRCA1 (Xu et al., 2012). La présence d'AKT au noyau est aussi nécessaire pour phosphoryler *acinus*, un facteur qui empêche la condensation de la chromatine (Martelli et al., 2012).

Une voie majeure indissociable de la voie PI3K/AKT est la voie mTOR, composée de deux complexes mTOR-raptor (mTORC1) et mTOR-riCTOR (mTORC2). Les facteurs de croissance de la famille HER activent directement le complexe mTORC2, fortement lié à AKT. Ainsi, ce complexe métabolique mTORC2 peut immédiatement répondre à la demande énergétique et intégrer la signalisation HER dans le contrôle du métabolisme. AKT peut induire la translocation à la membrane plasmique du transporteur de glucose GLUT4 et la synthèse de glycogène, par l'inhibition de GSK3 β . Le complexe mTORC1 régule la croissance cellulaire et le métabolisme en activant la synthèse protéique par l'intermédiaire de p70^{S6Kinase}, une voie modulée par les récepteurs HER. Ces derniers jouent un rôle encore plus profond dans le contrôle du métabolisme. De nombreuses études suggèrent que les récepteurs eux-mêmes peuvent signaler et se retrouver dans des compartiments spécifiques tels que les mitochondries, et moduler pour certains directement le métabolisme. C'est le cas d'EGFR, de HER2 et probablement de HER3 même si cela n'a pas été démontré pour ce dernier. HER2 a été décrit comme possédant une séquence de localisation à la mitochondrie lui permettant, dépendamment de son activité kinase, d'y être adressé suite à son activation. Dans les cellules cancéreuses, il y reprogrammerait alors le métabolisme énergétique, l'orientant vers la voie glycolytique et permettant la survie en milieu hypoxique notamment. Dans cette étude, les auteurs démontrent aussi que cette relocalisation se produit plus fortement sous l'action du trastuzumab, mettant à jour un possible mécanisme de résistance à cet anticorps (Ding et al., 2012).

Etant donné que cette localisation spécifique à la mitochondrie semble dépendante de l'activité kinase du récepteur, on peut émettre l'hypothèse que c'est un jeu spécifique de phosphorylations du récepteur qui est responsable de cela. On pourrait donc concevoir un ciblage thérapeutique de ces récepteurs de manière à « biaiser » leur signalisation. Mais certaines questions se posent alors : un « biais » dans la signalisation d'un RTK peut-il se

répercuter en un « biais » de relocalisation de ce même RTK ? Ces deux événements, s'ils sont possibles, peuvent-ils être indépendants ?

En utilisant un outil de prédiction de séquences de localisation mitochondriale (Fukasawa et al., 2015) et en alignant les séquences protéiques des quatre récepteurs HER, il apparaît que tous peuvent se retrouver à la mitochondrie. Les récepteurs HER possèdent une séquence de reconnaissance par le transporteur mitochondrial TOM20 et un site MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*), responsable du clivage des protéines mitochondriales. Ces observations prédisent un rôle crucial des récepteurs HER dans le contrôle et la modulation de la survie cellulaire. HER4 en est un parfait exemple : sa localisation à la mitochondrie a été décrite dans un contexte de mort cellulaire, mais il est probable qu'il soit aussi impliqué dans la modulation du métabolisme.

La voie PI3K/AKT/mTOR est une signalisation robuste, associée à la survie et la croissance cellulaire, fortement activée et dépendante des récepteurs HER. Mais les quatre récepteurs de la famille ne sont pas dépendants et impliqués de la même façon dans cette signalisation. Par exemple, HER3 possède de nombreux sites de liaison de la PI3K, faisant de lui le principal activateur d'AKT, alors que l'EGFR n'en possède pas (**Figure 12**). A l'inverse, ce dernier possède de nombreux sites de liaisons de protéines adaptatrices de la voie MAPK, l'autre grande voie de signalisation activée par les récepteurs HER.

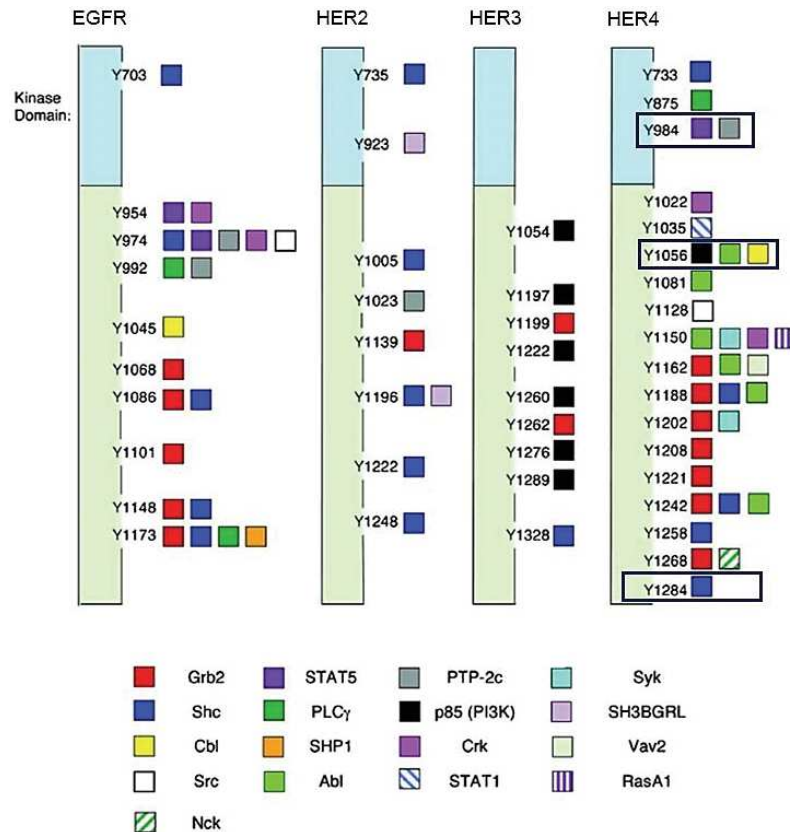


Figure 12 : Principaux sites de phosphorylation des récepteurs HER et leurs sites de docking associés

Les tyrosines phosphorylées des quatre récepteurs servent de sites d'ancrage à de nombreux effecteurs de diverses signalisations. Les récepteurs EGFR et HER2 activent principalement la voie MAPK (via Grb2 et Shc) alors que HER3 peut activer fortement la voie PI3K/AKT grâce à ses nombreux sites de liaison de la p85. Le récepteur HER4, grâce à ses nombreux sites de phosphorylation, est le récepteur pouvant recruter les effecteurs les plus variés. On notera que la tyrosine 984 de HER4 peut recruter STAT5 alors que la tyrosine 1056, uniquement présente dans CYT1, est un site de liaison de p85 et Cbl. Ces points cruciaux seront développés dans le chapitre consacré à HER4. L'hétérodimérisation des récepteurs permet de multiplier les voies de signalisation (ex : le dimère HER2/HER3 peut fortement activer les voies MAPK via HER2 et PI3K/AKT via HER3) (adapté d'après Roskoski, 2014).

2. Voie Ras/MAPK

Alors que la voie PI3K/AKT est principalement une voie de survie cellulaire, la voie MAPK induit surtout des signaux de prolifération et de croissance. Elle régule aussi de nombreux autres processus cellulaires fondamentaux comme la différenciation, la migration et l'apoptose. Cette voie a été hautement conservée au cours de l'évolution. C'est une cascade de signalisation comprenant trois « modules » de protéines kinases, s'activant de manière séquentielle par phosphorylation : une MAPKKK (*MAPK Kinase Kinase*; ex : Raf) phosphoryle une MAPKK (*MAPK Kinase*; ex : MEK) qui phosphoryle à son tour une MAPK (ex : ERK). Selon ce triptyque, il n'y a pas une mais plusieurs voies MAPK. Les derniers substrats de ces voies sont des protéines cytosoliques ou nucléaires, des facteurs de transcription, qui peuvent être activés ou réprimés. Les trois principales voies MAPK (parmi les six qui ont été caractérisées) sont les voies ERK1/2, JNK et p38 (**Figure 13**) :

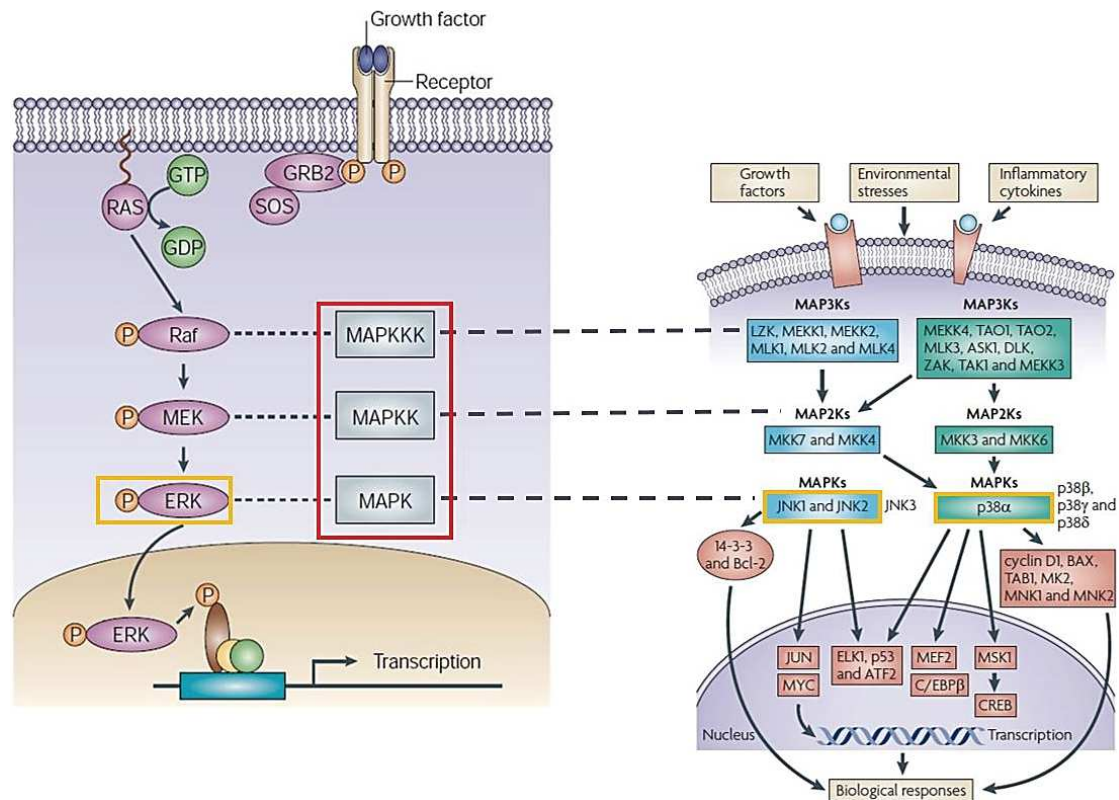


Figure 13 : Voies ERK, JNK et p38, principales voies MAPK activées par les récepteurs HER

Les voies MAPK sont toutes activées selon le même schéma : une MAPKKK phosphoryle une MAPKK qui phosphoryle à son tour une MAPK effectrice. La voie ERK1/2, activée par des facteurs de croissance, est une voie principale de prolifération. Les voies JNK et p38 sont activées suite à des stress environnementaux, génotoxiques, des cytokines pro-inflammatoires mais aussi par certains facteurs de croissance. Ces deux dernières engendrent des signalisations complexes, impliquées dans des réponses oncogéniques ou suppresseurs de tumeur (adapté d'après Kim and Bar-Sagi, 2004 et Wagner and Nebreda, 2009).

La plus étudiée est la voie Ras/Raf/MEK/ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*) utilisée en exemple plus haut. Elle commence lorsque la protéine Ras inactivement liée au GDP (*Guanosine DiPhosphate*) passe, grâce au facteur d'échange SOS1 (*Son of Sevenless*), en conformation active liée au GTP (*Guanosine TriPhosphate*). Ras peut alors activer Raf (la première MAPKKK) mais aussi la voie PI3K/AKT, illustrant l'interconnexion des deux voies, qui se produit à de nombreux niveaux. Cela entraîne l'activation de MEK1/2 qui phosphoryle à son tour ERK1/2, en Thréonine 202 et Tyrosine 204 pour ERK1, et en Thréonine 173 et Tyrosine 185 pour ERK2. Ces phosphorylations induisent la translocation de ERK1/2 au noyau et l'activation de facteurs de transcription tels que CREB (*C-AMP Response Element Binding*) ou NF-κB (Dhillon et al., 2007).

Alors que la voie ERK1/2 induit majoritairement des signaux de prolifération, les voies JNK et p38 sont des voies MAPK généralement anti-prolifératives et pro-apoptotiques. Elles répondent à des stress environnementaux (inflammation, déprivation en facteurs de croissance, cytokines, radiations UV, stress pharmacologiques tels que chimio et radiothérapie). Ces voies appartiennent à la cascade des SAPK (*Stress-Activated Protein*

Kinase) et bien que dépendant du contexte cellulaire, elles peuvent aussi contribuer à la tumorigenèse.

La voie JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) module des réponses dépendantes du stimulus et de la durée de l'activation de la voie. Alors qu'une activation transitoire promeut la survie cellulaire, son activation prolongée a été décrite comme induisant l'apoptose dépendante du TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*). JNK peut phosphoryler de nombreux substrats cytoplasmiques comme BAX et BAD mais aussi migrer au noyau et réguler l'activité transcriptionnelle. Au niveau nucléaire, la principale cible de JNK est *c-Jun*, un facteur formant avec *c-Fos* le complexe de transcription AP1 et améliorant l'activité de ce dernier. JNK régule aussi d'autres facteurs, comme STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), p53 et des régulateurs du cycle cellulaire. Comme présenté, JNK module à la fois des réponses prolifératives et anti-tumorales. Ces signalisations ainsi que la dizaine d'isoformes de JNK existantes rendent la voie complexe à étudier, avec de nombreuses questions restant ouvertes (Wagner and Nebreda, 2009).

Enfin, p38 est la dernière grande voie MAPK activée par les récepteurs HER. Comme JNK, la voie p38 peut entraîner des signaux prolifératifs ou apoptotiques. Ses quatre isoformes (α , β , γ et δ) migrent au noyau pour induire la transcription de gènes cibles. Les effets induits par p38 vont de l'activation de p53 et de la régulation négative du cycle cellulaire, à la régulation de l'autophagie et de la dormance. Cet état de mise en « sommeil » des cellules tumorales, où la voie JNK est *down-régulée*, est potentiellement impliqué dans les phénomènes de résistance mais encore mal compris à l'heure actuelle (Ranganathan et al., 2006). La voie p38 peut aussi mener à l'inhibition de GSK3 β , comme le fait la voie PI3K/AKT.

L'inhibition de GSK3 β par AKT mais aussi par la voie p38 est un exemple de l'interconnexion des voies PI3K/AKT et MAPK. Une forte activation de la voie ERK1/2 peut mener à l'activation de mTORC1, et Ras-GTP peut lier et activer allostériquement la PI3K. A l'inverse, l'inhibition de mTORC1 conduit à l'activation de la voie ERK1/2 de façon PI3K dépendante. Cet exemple illustre les nombreux ponts entre les différentes voies. Dans la cascade MAPK, les voies JNK et p38 partagent de nombreux régulateurs. Ils peuvent notamment synergiser pour activer AP1, comme p38 α peut parfois activer *c-Jun* et *c-Fos*. Les deux voies sont régulatrices l'une de l'autre : si l'inhibition pharmacologique de p38 augmente fortement l'activation de JNK, de la même façon l'inhibition de JNK augmente la phosphorylation de p38 (Wagner and Nebreda, 2009). La voie JNK a aussi été décrite comme une boucle de régulation négative de la voie PI3K/AKT, renforçant l'interconnexion entre toutes les voies (Mendoza et al., 2011). Ces boucles de régulation, essentielles pour éviter tout emballement du système, sont souvent dérégulées dans de nombreux cancers. De nombreuses mutations de protéines clés de ces voies, comme la mutation PI3KCA ou des mutations de BRaf, mènent à une prolifération cellulaire incontrôlée. Cette prolifération est souvent renforcée par l'hyperactivation des récepteurs HER.

3. Régulation de la signalisation

a. Régulation des voies PI3K/AKT et MAPK

Comme les voies PI3K/AKT et MAPK impactent fortement le devenir de la cellule, il est essentiel qu'elles soient régulées afin d'éviter une signalisation incontrôlée. De manière générale, elles le sont par des boucles de rétro-contrôles négatifs qui fonctionnent selon le schéma suivant : la voie de signalisation activée va induire en plus de ses éléments cibles l'expression d'inhibiteurs régulant cette même voie, afin de garantir une réponse adaptée au stimulus.

La voie PI3K/AKT possède un régulateur principal non inductible, présent à la membrane : le suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*). Son rôle est de reconvertir en PIP2 le second messenger PIP3 généré dès l'activation de la voie (**Figure 11**). Cette phosphatase lipidique est souvent inactive dans de nombreuses tumeurs (par mutation ou délétion), ce qui conduit à l'activation constante de la PI3K et à une prolifération incontrôlée. Cet effet peut être amplifié par d'autres mutations sur des protéines cibles en aval de la voie, comme l'inactivation de p53, protéine mutée dans environ 50% des cancers. Les autres boucles de rétro-contrôle se trouvent au cœur de la signalisation : par exemple, l'activation de mTORC1 diminue par rétro-contrôle l'activité de PI3K et AKT. Le rétro-contrôle s'effectue aussi entre les voies, où AKT activé phosphoryle des sites inhibiteurs de Raf, bloquant l'activation de la voie MAPK.

Le principal régulateur de la voie MAPK, *Sprouty*, est inductible : l'activation de la voie ERK1/2 induit en plus de ses gènes cibles l'expression de *Sprouty*. A la membrane, ce dernier bloque l'interaction entre l'adaptateur Grb2 et SOS et empêche l'activation de Ras. D'autres protéines induites, comme les MAPK phosphatases, sont chargées de déphosphoryler ERK. Au niveau rétro-contrôle, ERK activé va aussi phosphoryler et inhiber ses propres protéines de la cascade comme SOS, Raf et MEK1 (Kim and Bar-Sagi, 2004). *Sprouty* a aussi été décrit comme pouvant séquestrer Cbl, une ubiquitine-ligase responsable de la dégradation d'EGFR, illustrant ici son rôle dans une boucle de rétro-contrôle positif de la signalisation (Kolch, 2005). Les voies JNK et p38 sont principalement régulées par des DUSPs (*Dual Specificity Phosphatases*). Ce sont des phosphatases cytosoliques constitutives ou inductibles et pouvant déphosphoryler les Tyrosine, Sérine et Thréonine des protéines impliquées dans la voie. Cependant, les plus grands régulateurs de ces voies de signalisation restent les récepteurs qui les activent.

b. Régulation de l'activation des récepteurs HER

Intrinsèquement liée à la régulation de la signalisation cellulaire, l'internalisation (*down-regulation*) des récepteurs HER est le rétro-contrôle négatif majeur permettant de moduler

l'intensité et la durée de la signalisation. Ce mécanisme utilise la voie de l'endocytose et peut se produire de manière contrôlée (mécanisme ligand-dépendant) ou spontanée (mécanisme ligand-indépendant). Ce mécanisme est assez bien caractérisé en ce qui concerne le récepteur EGFR. C'est pourquoi les mécanismes qui vont être décrits ci-dessous, validés avec ce modèle, sont pour la plupart communs aux autres récepteurs de la famille. Cependant, certains mécanismes plus subtils et qui sont encore mal compris peuvent être liés aux particularités de chaque récepteur.

L'internalisation des récepteurs HER est la première étape dans la modulation de la signalisation. Elle conduit soit au recyclage du récepteur à la membrane soit à sa dégradation (par voie lysosomale ou par le protéasome) (**Figure 14**).

L'internalisation spontanée, indépendante du ligand, peut être considérée comme un mécanisme de prévention visant à limiter l'auto-activation des récepteurs ainsi que des stimulations qui seraient non désirées. Elle conduit à un perpétuel recyclage du récepteur à la membrane, ce qui assure une signalisation contrôlée dans l'espace et dans le temps. La durée de ce recyclage est dépendante de chaque récepteur et de son niveau d'expression. Il a par exemple été décrit que pour des cellules exprimant des niveaux faibles à modérés d'EGFR (moins de 200000 récepteurs/cellule), ces derniers étaient recyclés en 6-10h, contre 24h pour des cellules surexprimant EGFR (environ 2 à 3 millions de récepteurs/cellule). Les taux de recyclage des autres récepteurs, bien qu'estimés dans des systèmes de surexpression artificielle ne prévalant peut-être pas tout à fait de la réalité biologique, indiquent pour HER2 et HER4 un temps de recyclage équivalent à EGFR (autour de 6h) alors que le recyclage de HER3 est très rapide (environ 2h30) (Sorkin and Goh, 2009).

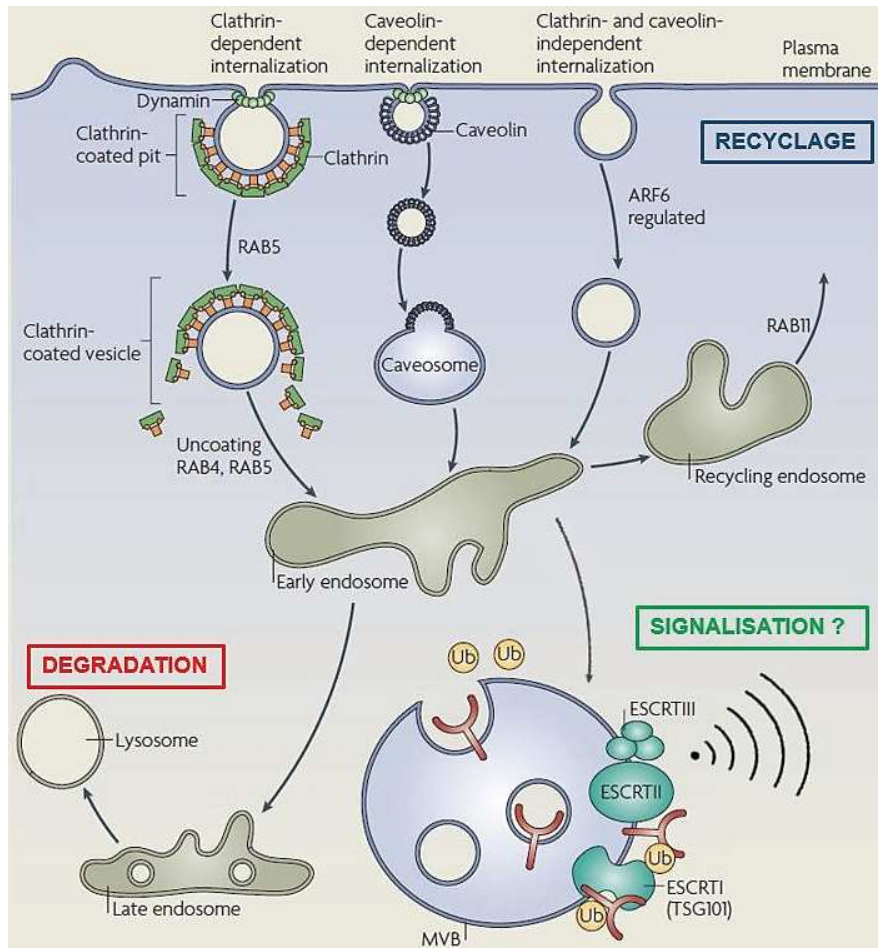


Figure 14 : Voies de dégradation/recyclage (/signalisation) des récepteurs HER

Le processus de recyclage/dégradation des récepteurs HER est essentiel à la régulation de leur signalisation. Il existe 2 mécanismes principaux d'internalisation, un dépendant de puits à clathrine, l'autre indépendant. Le récepteur internalisé se retrouve dans des endosomes pour être recyclé à la membrane ou dégradé par la voie lysosomale. Le destin du récepteur est dépendant de nombreux facteurs, comme son état de phosphorylation et d'ubiquitinylation, ainsi que les protéines adaptatrices qui y sont liées. Le récepteur peut aussi être envoyé dans des vésicules MVB, où la machinerie ESCRT pourrait participer à l'induction d'une nouvelle signalisation (adapté d'après Gould and Lippincott-Schwartz, 2009).

A la différence de l'internalisation spontanée, l'internalisation induite par le ligand modifie profondément la signalisation et le devenir du récepteur endocyté. Alors qu'on a longtemps pensé que cette signalisation s'arrêtait avec l'internalisation, de nombreuses études ont démontré que le récepteur continuait à signaler dans les endosomes, jusqu'à ce qu'il soit recyclé à la membrane ou dégradé. Cette endocytose est même nécessaire pour activer certaines voies de signalisation, comme l'ont décrit Goh *et al.* En mutant le récepteur EGFR en diverses positions, les auteurs (qui ont mis en évidence quatre événements indispensables à son internalisation : ubiquitinylation ; liaison de protéines adaptatrices AP-2 et Grb2 ; acétylation de certaines lysines en queue C-terminale) ont démontré que l'internalisation d'EGFR était requise pour l'activation de la voie PI3K/AKT mais pas pour celle de la voie MAPK (Goh *et al.*, 2010).

Il existe deux principales voies d'internalisation des récepteurs HER : une voie d'endocytose dépendante des puits à clathrine et une indépendante. Les phosphorylations du récepteur, suite à son activation par le ligand, permettent le recrutement de protéines adaptatrices qui interagissent avec la clathrine, comme la protéine cargo AP-2 (*Adaptor Protein complex-2*). Cela engage le récepteur dans cette voie d'endocytose clathrine-dépendante. Même si cette dernière est la voie majeure d'internalisation des RTK et aussi la plus rapide, elle devient vite saturée avec l'augmentation du nombre de récepteurs activés. L'endocytose passe alors par la voie clathrine-indépendante, beaucoup plus lente (Goh and Sorkin, 2013). D'autres adaptateurs entrent en jeu comme Grb2, qui peut recruter l'E3 Ubiquitine-ligase Cbl et ubiquitinyler le récepteur. Une fois dans les endosomes, selon les degrés d'ubiquitinylation, les récepteurs seront soit recyclés à la membrane soit dégradés. Généralement, les récepteurs faiblement ubiquitinylés et activés sont recyclés, à l'inverse de ceux poly-ubiquitinylés qui sont envoyés à la dégradation. Les motifs d'ubiquitinylation sont alors reconnus et pris en charge par la machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) dans des corps appelés MVB (*MultiVesicular Bodies*), avant l'envoi dans les lysosomes (Bakker et al., 2017).

4. Vers une signalisation biaisée

A la croisée des chemins se trouvent donc les MVB. Alors que les deux directions que peuvent emprunter les récepteurs HER (dégradation *versus* recyclage) sont bien décrites dans la littérature, il est tentant de proposer les endosomes comme une « troisième voie » de signalisation, comme de nombreuses études le suggèrent (Gould and Lippincott-Schwartz, 2009). Dans ce cas, ces endosomes particuliers, les MVB, possèdent toutes les caractéristiques d'une plateforme de signalisation à part entière. En effet, le « lien » avec le milieu extracellulaire est en partie conservé puisque les récepteurs endocytés sont encore en conformation active avec leurs phosphorylations et protéines adaptatrices recrutées (Schenck et al., 2008). La machinerie ESCRT, qui peut recruter de nombreux effecteurs aux rôles très variés, est le complexe idéal pouvant faire le lien entre signal extracellulaire et signalisation spécifique. Par exemple, il a été décrit que la protéine BRUCE migre *via* les endosomes à la périphérie cellulaire lors de la cytokinèse, où BRUCE lie la machinerie ESCRT avec la fonction d'abscission (Pohl and Jentsch, 2008).

Comme présenté tout au long de cette introduction, les récepteurs HER sont, par leur degré de complexité mais surtout par leur flexibilité et les nombreux partenaires qu'ils peuvent recruter, des candidats à la signalisation biaisée. Ils partagent les mêmes régulateurs que les GPCR comme les β -arrestines, qui sont aussi des plateformes de signalisation (Hupfeld and Olefsky, 2007). De plus, les multiples trafics subcellulaires qu'offrent les plateformes endosomales confortent l'idée qu'une signalisation biaisée des récepteurs HER est

théoriquement possible. Ce dernier aspect peut s'appuyer sur l'étude de Deribe et ses collaborateurs. Grâce à un criblage en double-hybride, les auteurs ont identifié HDAC6 (*Histone DeAcetylase 6*) et l'ont décrit comme régulateur du trafic de l'EGFR le long des microtubules, trafic nécessitant la présence d'EGFR au moins dans les endosomes tardifs (Deribe et al., 2009). Même si l'étude ne décrit pas les protéines impliquées dans ce trafic, il est probable que la machinerie ESCRT entre en jeu (Piper and Lehner, 2011) du fait du rôle de l'E3 Ubiquitine ligase Cbl dans l'internalisation d'EGFR.

Plus intéressant encore, une équipe travaillant sur Notch (donc le mécanisme d'activation est similaire à celui de HER4) a montré que, lors de la division cellulaire chez la drosophile, Notch induisait une signalisation biaisée vers une seule des deux cellules filles, avec un clivage de NICD (*Notch IntraCellular Domain*) contrôlé dans l'espace et le temps (Coumailleau et al., 2009). L'exemple de Notch semble indiquer que le clivage de certains récepteurs dans les endosomes n'est pas un frein au biais de la signalisation. Par analogie avec Notch, on peut légitimement penser qu'il est aussi possible d'induire une signalisation biaisée *via* le récepteur HER4.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a montré une modulation sélective de la signalisation ou du trafic des récepteurs HER, à l'aide de petites molécules ou d'anticorps.

E - EGFR/HER2/HER3 : Implication dans la tumorigenèse et localisations subcellulaires associées

Ces trois récepteurs sont depuis de très nombreuses années très bien étudiés et caractérisés. La littérature les concernant est extrêmement dense. De plus, leur implication dans le développement des cancers et la résistance aux traitements n'est plus à démontrer. C'est dans un souci de clarté, et pour ne rien omettre, que leur description sera volontairement très brève. Certains aspects, pouvant nous aider à comprendre et à proposer de nouvelles stratégies de ciblage thérapeutique, seront abordés.

Les récepteurs HER sont essentiels au développement de l'organisme (embryogenèse, organogène, homéostasie). Pouvant induire de nombreux signaux de prolifération et de survie, il n'est pas étonnant de les voir surexprimés dans de nombreux cancers et associés à des facteurs de mauvais pronostic.

1. Le récepteur EGFR

a. Expression tumorale et signalisation

Le récepteur EGFR a été décrit comme surexprimé ou amplifié, à différents niveaux, dans une grande variété de cancers. Cela fait de lui une cible thérapeutique pour des cancers

comme ceux de la tête et du cou, du poumon NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*), du colon ou encore du pancréas. EGFR est aussi exprimé dans certaines tumeurs du cerveau comme les gliomes (**Tableau 2**).

Sr. No	Tumor type	Tumor overexpressing EGFR (%)
1.	Head and neck	80–100
2.	Breast	14–91
3.	Renal	50–90
4.	Non-small cell lung	40–80
5.	Colon	22–75
6.	Ovarian	35–70
7.	Glioma	40–63
8.	Pancreatic	30–50
9.	Bladder	31–48

Tableau 2 : Expression tumorale du récepteur EGFR

Le récepteur EGFR est surexprimé ou amplifié dans de nombreux cancers, en proportions variées (d'après Yewale et al., 2013).

Le récepteur EGFR possède plusieurs isoformes produites par épissage alternatif. L'isoforme la plus connue et la plus étudiée est le récepteur transmembranaire de 170 kDa (EGFRv1). Les autres isoformes EGFRv2, v3 et v4, sont composées uniquement de l'ECD du récepteur (60, 80 et 110 kDa respectivement). Elles sont produites soit par épissage alternatif soit par clivage protéolytique du récepteur. Ces isoformes sont solubles et sont retrouvées dans les tissus sains et tumoraux. Les rôles de ces isoformes sont très peu connus, mais il semblerait qu'elles servent de régulateurs négatifs de la signalisation d'EGFR. En entrant en compétition avec le récepteur pour la liaison de ses ligands ou en dimérisant avec ce dernier, elles pourraient induire une « impasse » de signalisation due à l'absence de leur domaine kinase (Guillaudeau et al., 2012). Au niveau tumoral, ces isoformes pourraient être impliquées dans la résistance aux anticorps anti-EGFR.

En effet, même si le développement d'anticorps thérapeutiques contre l'EGFR, destinés à bloquer le récepteur et sa signalisation (dont le premier exemple est le cetuximab, un anticorps chimérique d'isotype IgG1), a révolutionné le traitement du cancer, ces thérapies se heurtent maintenant aux résistances acquises après ces traitements. Un de ces mécanismes de résistance pourrait impliquer les isoformes sécrétées d'EGFR, qui pourraient entrer en compétition avec les anticorps et diminuer leur efficacité (Wilken et al., 2013).

De plus, de nombreux mutants oncogéniques du récepteur ont été décrits. Les principaux sont le mutant constitutivement actif EGFRvIII (délétion d'une partie de l'ECD d'EGFR) et la mutation T790M, acquise après traitements aux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant EGFR.

Les signalisations induites par EGFR sont variées car le récepteur peut lier de nombreux ligands : l'EGF, l'EPG (*Epigen*), le TGF- α (*Transforming Growth Factor α*), l'AR (*Amphiregulin*), la BTC (β -cellulin), l'HB-EGF (*Heparin-Binding EGF like Growth Factor*) et l'EPR (*Epiregulin*), les trois derniers étant aussi des ligands de HER4.

L'EGF, le TGF- α , la BTC et l'HB-EGF sont des ligands de haute affinité avec un K_d apparent de l'ordre de 0,1 à 1 nM alors que l'EPG, l'EPR et l'AR sont des ligands d'affinité 10 à 100 fois plus faible. Ces différences d'affinités ne rendent pas compte de la puissance des ligands à signaler car il a été récemment démontré que même si l'EPG et l'EPR induisaient une plus faible et plus courte dimérisation d'EGFR que l'EGF, leurs signalisations étaient beaucoup plus soutenues que celle de l'EGF (Freed et al., 2017).

Dans cette dernière étude, les auteurs décrivent l'EPG et l'EPR comme étant des agonistes biaisés de l'EGFR, dont les conformations du récepteur qu'ils induisent sont responsables des différentes signalisations et effets biologiques observés *in vitro*. Cette notion avait déjà été introduite par Macdonald-Obermann et Pike. Dans leur étude, les auteures décrivent l'AR comme un agoniste partiel d'EGFR, sur la base de la phosphorylation du récepteur et de sa capacité à induire une dimérisation robuste et soutenue par rapport aux autres ligands (Macdonald-Obermann and Pike, 2014). Parmi toutes les hypothèses envisagées par les auteures à l'époque, celle impliquant une conformation dimérique spécifiquement induite par l'AR est la plus plausible, puisqu'elle est cohérente avec le modèle d'activation décrit plus tard par Freed. De plus, ce modèle s'intègre parfaitement avec le concept de la coopérativité négative décrite pour l'EGFR, où sur un dimère l'EGF peut se lier avec 10 fois moins d'affinité sur un second site si le premier est déjà occupé par le ligand (Alvarado et al., 2010).

Ces observations renforcent l'idée que ce sont les conformations structurales du récepteur qui sont importantes pour la signalisation, et non les différences d'affinités. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour un ciblage modulateur d'EGFR et des récepteurs HER dans leur ensemble, à l'aide de ligands ou d'anticorps allostériques.

b. Localisations subcellulaires d'EGFR

La signalisation EGFR active principalement les voies MAPK et PI3K/AKT. Outre ces signalisations, ces dernières années ont vu un nombre croissant d'études décrire différentes localisations subcellulaires des récepteurs. Voici les deux principales et leurs caractéristiques, en lien avec différents aspects de la signalisation :

Une des localisations majeures des récepteurs HER est le noyau. Cette localisation est très claire pour le récepteur HER4 *via* son domaine intracellulaire 4ICD, qui sera décrit dans un chapitre dédié, mais plus controversée en ce qui concerne les autres récepteurs. Pourtant,

de nombreuses études ont fait état de la présence des récepteurs complets (non clivés) au noyau et de leur rôle de co-activateur de la transcription.

Lin et ses collaborateurs ont ainsi montré que, après stimulation par l'EGF, le récepteur EGFR migrait au noyau et induisait la prolifération cellulaire probablement *via* son activité de co-activateur transcriptionnel de la cycline D1 (Lin et al., 2001). Cette translocation peut aussi être induite lors de stress comme les radiations UV, et est dépendante de certaines phosphorylations du récepteur (Xu et al., 2009). Ces observations suggèrent un lien entre trafic endosomal et localisation subcellulaire. La translocation d'EGFR au noyau est aussi un mécanisme de résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies.

Après traitement au cisplatine, il a été montré que la translocation nucléaire d'EGFR était nécessaire pour l'induction de la résistance et la réparation des dommages à l'ADN (Hsu et al., 2009). Les mutants d'EGFR peuvent aussi migrer au noyau, ce mécanisme étant associé à un mauvais pronostic et à la progression tumorale (Wang and Hung, 2012). Il n'est pas certain que ce trafic au noyau soit direct, puisque Liao et Carpenter ont montré que ce trafic d'EGFR passait par l'envoi du récepteur au réticulum endoplasmique, pour y subir ensuite une rétro-translocation dans le cytosol *via* le translocon Sec61 (Liao and Carpenter, 2007).

L'autre localisation subcellulaire majeure d'EGFR se situe au niveau de la mitochondrie. Dans cet organe médiateur de survie ou de mort cellulaire, l'EGFR y est adressé suite à une stimulation par l'EGF, induisant la survie cellulaire par son interaction avec l'enzyme COX-II (*CycloOxygenase II*) (Demory et al., 2009). Cette localisation implique le réseau de microtubules, important dans le transport endosomal et qui a aussi été décrit comme modulé par l'EGFR dans l'étude de Deribe *et al.* Il est tentant de penser que des interactions spécifiques au niveau des endosomes sont à l'origine du trafic d'EGFR à la mitochondrie. La translocation d'EGFR à la mitochondrie a aussi été décrite comme jouant un rôle dans la formation des métastases dans le cancer du poumon NSCLC. Dans ce cancer, l'EGFR mitochondrial régule le métabolisme énergétique et peut entraîner la fission mitochondriale pour remodeler la cellule et permettre l'invasion (Che et al., 2015). En accord avec la fonction première de la mitochondrie qui est de réguler le métabolisme, la présence d'EGFR dans ce compartiment peut aussi être associée à la régulation du métabolisme énergétique. Yue *et al.* ont montré une augmentation de l'EGFR mitochondrial lorsque la voie mTOR est inhibée, et une diminution lorsqu'on inhibe l'autophagie (Yue et al., 2008). La relocalisation mitochondriale d'EGFR et de ses variants peut aussi être impliquée dans les mécanismes de résistance, après traitement avec un inducteur de l'apoptose comme la staurosporine ou des inhibiteurs d'EGFR (Cao et al., 2011).

Cependant, la mitochondrie est aussi un médiateur de mort cellulaire. Alors que les études décrivent un rôle pro-tumoral de l'EGFR mitochondrial, quelques observations

intéressantes pourraient laisser entrevoir un rôle de l'EGFR mitochondrial dans l'induction de la mort cellulaire. L'EGF (à forte concentration et sur des cellules surexprimant le récepteur) a été décrit comme induisant la mort cellulaire *via* l'activation de la voie p38 et la diminution de la voie ERK1/2. De manière intéressante, les effets du cetuximab ou de l'inhibiteur de tyrosine kinase gefitinib en combinaison avec l'EGF réduisent la capacité de l'EGF à induire la mort cellulaire (Song et al., 2009). Paradoxalement, un effet potentiellement suppresseur de tumeur d'EGFR a été décrit dans un modèle *in vivo*, où son inhibition accélère le développement tumoral (Dubé et al., 2012).

Le mécanisme d'action de la mort cellulaire induite par l'EGF serait principalement caspase-indépendant, avec une translocation de BAX à la mitochondrie induisant la dépolarisation mitochondriale mais pas le relargage du cytochrome c (Tikhomirov and Carpenter, 2005). Ce mécanisme d'action semble en partie similaire à celui de HER4, qui est aussi retrouvé à la mitochondrie et induit l'apoptose via son interaction avec BAK. Par contre, la présence de HER4 à la mitochondrie induit le relargage du cytochrome c (Naresh et al., 2006).

L'EGFR présent à l'état basal dans la mitochondrie rend difficile l'élucidation du mécanisme de l'induction de l'apoptose par l'EGF. On peut se demander si l'apoptose est induite par l'EGFR mitochondrial dont la translocation augmente sous stimulation d'EGF, ou si l'EGF induit la translocation de l'EGFR hors de la mitochondrie, entraînant la mort cellulaire (Yao et al., 2010). Les effets versatiles de l'EGF sur le destin de la cellule sont un exemple de la complexité des récepteurs HER et de leurs réseaux, dont de nombreuses subtilités restent probablement encore à découvrir.

2. Le récepteur HER2

Découvert quelques années après l'EGFR, le récepteur HER2 est très vite devenu, du fait de ses particularités, une cible thérapeutique majeure pour le traitement des cancers.

a. Expression tumorale et signalisation

Même si l'on peut trouver dans la littérature une expression très variable et très hétérogène du récepteur HER2 dans de nombreux cancers, il est principalement surexprimé dans le cancer du sein, de la vessie et le cancer gastrique. Environ 20% de ces cancers surexpriment HER2, faisant de son ciblage la première ligne de traitement pour ces derniers. Certaines études à grande échelle tendent à diminuer ces estimations. Cela souligne l'importance d'une uniformisation des techniques de détection et de la stratification des patients afin d'éviter l'échec d'une thérapie anti-HER2 (**Tableau 3**).

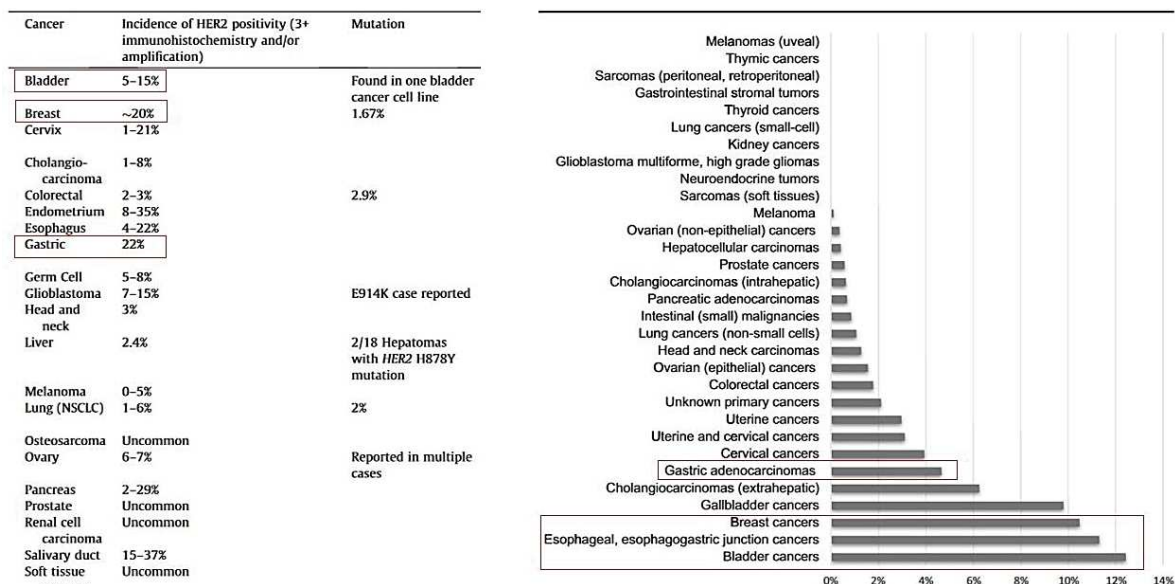


Tableau 3 : Expression tumorale du récepteur HER2

Surexpression du récepteur HER2 dans différents types de cancers, évaluée par immunohistochimie. (Gauche) Les trois principaux cancers surexprimant HER2 sont les cancers de la vessie, du sein et le cancer gastrique. Certains cancers ne surexpriment pas le récepteur (mélanome), d'autres présentent une expression hétérogène (pancréas) (adapté d'après Yan et al., 2014). (Droite) Une étude sur un très grand nombre de patients diminue de moitié le pourcentage de tumeurs du sein surexprimant HER2, soulignant l'importance de l'uniformisation des critères de sélection pour les patients pouvant bénéficier de thérapies anti-HER2 (adapté d'après Yan et al., 2015a).

Comme pour EGFR, un épissage alternatif du gène HER2 conduit à plusieurs isoformes du récepteur dont la principale est le récepteur transmembranaire de 185 kDa. Cinq autres isoformes ont été décrites, résultant de cet épissage alternatif ou d'un clivage protéolytique du récepteur. Deux isoformes de 100 et 68 kDa, issues de l'épissage alternatif et sécrétées dans le milieu extracellulaire, ont été décrites comme des auto-inhibiteurs de la signalisation HER2. L'isoforme de 68 kDa est composée des sous-domaines I et II de l'ECD du récepteur. Elle peut s'associer au récepteur transmembranaire, perturber la formation des dimères HER2 et diminuer la phosphorylation du récepteur, conduisant à une diminution de prolifération. Etant donné ses fonctions et le fait qu'on la retrouve dans les tissus sains et très faiblement dans les tissus tumoraux, cette isoforme est probablement un auto-inhibiteur de la signalisation HER2 (Doherty et al., 1999). Le rôle de l'isoforme de 100 kDa, composée de l'ECD complet du récepteur, a été décrit comme inhibiteur de HER2 (Aigner et al., 2001). Cette isoforme peut aussi s'accumuler après transcription dans la région péri-nucléaire et a été proposée comme régulateur de l'activité intracellulaire du récepteur. Cependant, certaines observations ne vont pas dans ce sens puisque cette isoforme a aussi été décrite comme pouvant jouer un rôle dans la résistance aux anticorps anti-HER2 (Scott et al., 1993). De plus, on la retrouve fortement exprimée dans les tumeurs surexprimant HER2. Cette observation est à priori contre-intuitive vis-à-vis de son activité inhibitrice supposée. De manière similaire à EGFR, cette isoforme sécrétée pourrait contribuer à la résistance en liant les anticorps anti-HER2 dans le milieu extracellulaire, inhibant l'action de ces derniers sur le récepteur

transmembranaire. Enfin, cette isoforme pourrait être libérée suite au clivage protéolytique de HER2, dans un mécanisme similaire à celui de HER4.

Certaines isoformes de HER2 appelées p95, seulement composées du domaine C-terminal du récepteur, peuvent être générées par clivage protéolytique du récepteur, probablement par ADAM10. Ce clivage pourrait d'abord libérer l'ECD du récepteur dans le milieu extracellulaire et laisser les isoformes p95 enchâssées dans la membrane plasmique. Il existe trois isoformes p95 dont une résulte du clivage. Les deux autres, 611-CTF (100 à 115 kDa) et 678-CTF (90 à 95 kDa), sont issues de l'épissage alternatif. Parmi elles, l'isoforme 611-CTF est la plus oncogénique et associée à un très mauvais pronostic. Elle peut former des homodimères constitutifs de HER2 et contrôler l'expression de gènes impliqués dans la formation de métastases (Pedersen et al., 2009). Cette isoforme 611-CTF pourrait aussi très bien s'associer aux autres membres de la famille HER pour amplifier la tumorigénèse. Enfin, une dernière isoforme, Δ 16HER2, a été décrite comme fortement oncogénique en formant elle aussi des dimères constitutifs de HER2 (Castiglioni et al., 2006).

Comme pour EGFR, les anticorps monoclonaux ciblant HER2 (comme le trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé d'isotype IgG1) ont révolutionné le traitement des cancers, notamment celui du cancer du sein. Le trastuzumab se lie au sous-domaine IV du récepteur, bloque l'activation et empêche le clivage de ce dernier. Cependant, de nombreuses résistances apparaissent (de Melo Gagliato et al., 2016), principalement dues aux isoformes présentées plus haut mais aussi au fait que les récepteurs HER forment un réseau, où bloquer un récepteur entraîne la surexpression d'un autre membre de la famille (Narayan et al., 2009).

Le récepteur HER2 a la particularité d'être déjà en conformation « ouverte » à la membrane et donc prêt à la dimérisation, ce qui en fait le régulateur oncogénique majeur du réseau HER (Kong et al., 2008). Sa conformation explique aussi pourquoi il est le seul membre de la famille à ne pas pouvoir lier de ligand. Malgré cela, la signalisation *via* HER2 est très puissante, notamment quand il s'associe à HER3. Le dimère HER2-HER3 tire parti des spécificités de chaque récepteur : le récepteur HER3 peut lier différentes NRG et possède de nombreux sites de liaison de la PI3K, qui peuvent être activés grâce à la dimérisation avec HER2.

b. Localisations subcellulaires de HER2

Le récepteur HER2 est décrit dans quelques études comme pouvant migrer au noyau et induire la transcription de gènes cibles. Wang *et al* ont montré, comme pour l'EGFR, que le récepteur HER2 retrouvé au noyau pouvait aussi induire l'expression de l'enzyme COX-II, participant à la progression tumorale (Wang et al., 2004). Son mécanisme de translocation nucléaire a été partiellement mis à jour : après internalisation et sortie des endosomes, le récepteur HER2 peut interagir avec l'importine β 1, un complexe chargé d'adresser les

protéines au noyau, et passer par les pores nucléaires (Giri et al., 2005). Le mécanisme précis n'est pas connu mais il pourrait faire intervenir le transport rétrograde des protéines du réticulum endoplasmique vers le cytosol puis vers le noyau, appelé INTERNET (*INtegral Trafficking from the ER to the Nuclear Envelope Transport*) (Elizalde et al., 2016). Dans une autre étude, HER2 a été décrit comme interagissant avec le récepteur à la progestérone et STAT3 dans un complexe activant le promoteur de la cycline D1 (Béguelin et al., 2010), ces translocations faisant intervenir certaines phosphorylations du récepteur.

De manière intéressante, Li *et al* ont montré que HER2 pouvait s'associer à la β -actine dans le cytoplasme et le noyau, cette observation établissant un autre lien entre cytosquelette et trafic intracellulaire. Dans le noyau, HER2 s'associe alors avec l'ARN polymérase I pour induire la transcription de l'ARN ribosomal et la synthèse protéique, menant à la croissance cellulaire (Li et al., 2011).

Enfin, HER2 a été décrit comme étant le récepteur HER le plus important dans le contrôle des checkpoints G2/M du cycle cellulaire. Dans les cellules MCF7 après irradiation, tous les récepteurs de la famille HER sont phosphorylés mais seule l'inhibition de HER2 phosphorylé diminue l'activation de la voie ATM/ATR et l'arrêt du cycle en G2/M (Yan et al., 2015b). Comme il a été décrit que la translocation nucléaire d'EGFR était nécessaire à la réparation des dommages à l'ADN induits par le cisplatine, on peut envisager la translocation nucléaire de HER2 pour induire la réparation de l'ADN en réponse à l'irradiation.

La présence du récepteur HER2 à la mitochondrie est bien moins documentée. Seule l'étude de Ding *et al* décrit HER2 comme présent à la mitochondrie dans toutes les cellules pour réguler le métabolisme énergétique, mais aussi pour le reprogrammer dans les cellules cancéreuses, où cette localisation mitochondriale augmente après traitement par le trastuzumab (Ding et al., 2012).

Enfin, Strohecker *et al* ont démontré que le récepteur HER2, après stimulation avec un peptide TRAIL recombinant, est clivé par plusieurs caspases en deux fragments de 47 et 25 kDa qui sont relocalisés à la mitochondrie. Ces fragments induisent le relargage du cytochrome c et la mort cellulaire. La mise en évidence d'un domaine BH3 dans les fragments clivés de HER2 (Strohecker et al., 2008), ainsi que la caractérisation d'un domaine BH3-only dans la partie C-terminale de HER4 (Naresh et al., 2006), laissent à penser que tous les membres de la famille HER pourraient, dans certaines conditions, jouer un rôle pro-apoptotique. A l'heure actuelle, de tels domaines n'ont pas été mis en évidence pour EGFR et HER3.

3. Le récepteur HER3

Mis en évidence en 1989 (Kraus et al., 1989), le récepteur HER3 a très longtemps été considéré comme élément mineur en oncologie du fait de sa très faible activité kinase.

a. Expression tumorale et signalisation

Le rôle de HER3 dans l'oncogenèse a été revisité avec la mise en évidence de son implication dans la résistance aux traitements. Cette résistance est en lien avec le rôle majeur des hétérodimères HER2/HER3 dans la signalisation oncogénique (Liu et al., 2007). Sa surexpression a été décrite dans de nombreux cancers (**Tableau 4**) même si la densité de récepteurs HER3 sur la cellule (d'environ 10000 à 100000 récepteurs/cellule) est beaucoup plus faible que pour EGFR ou HER2 (500000 à 1-2 millions de récepteurs/cellule).

Tumor type (Reference)	HER3 overexpression, %
Pancreatic	41.3%
Breast	43.0%
Colorectal	69.7%
Gastric	59.0%
Melanoma	approximately 65.0%
Ovary	53.4%
Head and Neck	8.8%
Cervix	55.5%

Tableau 4 : Expression tumorale du récepteur HER3

Surexpression du récepteur HER3 dans différents types de cancers, évaluée par immunohistochimie (adapté d'après Ocana et al., 2013). Cette surexpression est généralement associée à un mauvais pronostic.

Comme pour les autres récepteurs de la famille, il existe plusieurs isoformes de HER3 mais celles-ci sont majoritairement sécrétées dans le milieu extracellulaire et ne restent pas à la membrane. Ce sont des isoformes de 20, 45, 50, 76 et 85 kDa et composées de tout ou parties de l'ECD du récepteur. Seule l'isoforme p85, la seule constituée de l'ECD complet du récepteur, a été étudiée et décrite comme un puissant régulateur négatif de la signalisation médiée par la NRG, puisqu'elle peut se lier au ligand et diminuer ainsi l'activation de tous les autres récepteurs de la famille (Lee et al., 2001). Le rôle des autres isoformes sécrétées n'est pas connu. Une dernière isoforme fait exception et est composée uniquement de l'ICD du récepteur. Cette isoforme, ne résultant pas d'un clivage et provenant probablement de l'épissage alternatif, est retrouvée au noyau (Andrique et al., 2012).

Le récepteur HER3 est capable d'hétérodimériser et d'induire la transactivation des kinases malgré son domaine déficient que l'on qualifie de « pseudo-kinase » (Shi et al., 2010). Comme évoqué plus haut et en partie lié à la surexpression de HER2, le récepteur HER3 s'associe et signale principalement via les hétérodimères HER2/HER3. Cela active fortement les voies MAPK et PI3K/AKT grâce à ses nombreux sites de liaison de la p85 (**Figure 12**). Cette association préférentielle est facilitée par les particularités structurales de l'ECD et du TM de HER3 et ont été décrits grâce à des constructions chimériques, même si l'utilisation de ces constructions artificielles peut être sujet à caution.

Bien que la NRG soit incapable d'induire l'homodimérisation de HER3 à la membrane, celle-ci peut provoquer une signalisation si HER2 est exprimé en même temps. Cela suggère une capacité à hétérodimériser plus importante que celle des autres récepteurs (Berger et al., 2004). Cette observation est renforcée par le fait qu'à la différence des trois autres récepteurs HER, le domaine transmembranaire de HER3 ne possède qu'un seul motif consensus GXXXG au lieu de deux, rendant l'homodimérisation instable. En absence de ligand, les récepteurs HER3 forment spontanément des oligomères et la liaison de la NRG perturbe et désorganise ces derniers (Landgraf and Eisenberg, 2000). Possédant deux interfaces répondant différemment à la NRG, l'état oligomérique servirait d'état transitoire pour l'activation des récepteurs HER3, leur permettant d'être « préparés » à l'activation. Placés dans une conformation semblable à celle « ouverte » en absence de NRG, la liaison de cette dernière déstabilise suffisamment les oligomères pour permettre l'hétérodimérisation immédiate avec un partenaire, le plus souvent HER2 grâce à sa conformation naturellement « ouverte » (Kani et al., 2005).

Les NRG sont une grande famille de protéines codées par quatre gènes : les NRG1, NRG2, NRG3 et NRG4. Un épissage alternatif au niveau de ces gènes conduit à la formation de nombreuses isoformes, dont la plus connue et la plus étudiée est la NRG1 β 1. Les NRG1 et 2 sont les ligands du récepteur HER3, alors que toutes les NRG peuvent lier HER4. L'axe NRG-HER3-HER4 est très important pour le développement et l'homéostasie du système nerveux central et du cœur en particulier, et la dérégulation de cet axe est à l'origine de nombreuses pathologies dans ces organes.

De manière générale, la faible voire l'absence d'expression du récepteur HER4 au niveau tumoral laisse le récepteur HER3 comme principal récepteur de la signalisation induite par la NRG. Cela fait de l'axe NRG-HER3 une voie de prolifération majeure pour les cellules cancéreuses (Sheng et al., 2010), aussi impliqué dans les phénomènes de résistance (Xia et al., 2013) et la formation de métastases (Momeny et al., 2015).

Les recherches actuelles sur la famille HER se consacrent maintenant quasi-exclusivement à ce récepteur (Malm et al., 2016), avec la mise au point d'anticorps monoclonaux, bispécifiques ciblant les hétérodimères HER2/HER3 (Geuijen et al., 2018) ou

encore des combinaisons d'anticorps anti-EGFR, anti-HER2 et anti-HER3. En effet, il semble judicieux de les cibler ensemble puisque le réseau HER est interconnecté et que les compensations sont fréquentes entre récepteurs (Garrett et al., 2011).

b. Localisations subcellulaires de HER3

A l'heure actuelle, il existe très peu d'études sur les localisations subcellulaires du récepteur HER3. Le récepteur complet mais aussi ses isoformes sont retrouvés au niveau du noyau. Après stimulation par la NRG (mais aussi dans des conditions qui miment le microenvironnement tumoral comme l'hypoxie), le récepteur HER3 peut migrer au noyau grâce à l'importine $\beta 1$ pour agir comme co-activateur transcriptionnel.

HER3 a ainsi été décrit comme pouvant activer STAT3 et STAT5 pour induire la prolifération, mais pas la cycline D1 comme c'est le cas pour EGFR et HER2 (Reif et al., 2016). Toutefois, le promoteur de la cycline D1 peut être activé par une isoforme de HER3 de 80 kDa, composée uniquement de l'ICD du récepteur (Andrique et al., 2012). En fait, la première étude décrivant HER3 au noyau a aussi décrit la NRG comme induisant l'exportation nucléaire du récepteur complet (Offterdinger et al., 2002), ce qui n'est pas en accord avec l'étude de Reif et al. Cependant, il est possible que la durée de stimulation à la NRG et la présence de plusieurs isoformes du récepteur déterminent le temps de résidence nucléaire de HER3, expliquant ces résultats contradictoires. Par ailleurs le rôle du récepteur HER4, qui peut lui aussi lier les NRG, n'est pas pris en compte dans ces études.

La localisation nucléaire de HER3 est associée à un facteur de mauvais pronostic. L'analyse par immunohistochimie, sur des échantillons de cancer de la prostate, de l'expression nucléaire de HER3 a montré qu'elle était faible dans les tissus sains et hyperplasiques bénins mais beaucoup plus importante dans les tissus tumoraux (Koumakpayi et al., 2006). De manière surprenante, la même équipe a corrélé l'expression nucléaire de HER3 avec un plus faible risque de récurrence de cancer de la prostate après prostatectomie totale (Koumakpayi et al., 2007). Ces observations à première vue contradictoires appellent à des études supplémentaires pour comprendre la signalisation de HER3 au noyau et mettre en évidence ses partenaires, ses possibles interactions avec les autres membres de la famille ainsi que de nouveaux mécanismes pouvant expliquer ces translocations (Koumakpayi et al., 2011).

Enfin, l'axe NRG-HER3 étant important pour le système nerveux central, un variant de 50 kDa, dont la transcription est induite par la NRG, a été localisé au noyau. Ce variant régule l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans la myélinisation par les cellules de Schwann (Adilakshmi et al., 2011).

Contrairement à EGFR, HER2 et HER4, il n'a pas été mis en évidence, à ce jour, de localisation mitochondriale du récepteur HER3.

II : Le(s) récepteur(s) HER4

Alors que les récepteurs EGFR, HER2 et HER3 sont très bien étudiés et sont maintenant des cibles solidement établies en oncologie, le rôle du récepteur HER4 est encore sujet à controverse dans ce domaine. Comparativement aux trois autres récepteurs, sa plus faible expression tumorale et sa biologie complexe en font pour l'instant une cible délaissée (Paatero and Elenius, 2008). Toutefois, les nombreuses spécificités biologiques de HER4 laissent entrevoir des perspectives intéressantes quant à l'intérêt thérapeutique de son ciblage.

A- ERBB4 : un gène pour quatre récepteurs

Le gène codant pour le récepteur HER4, dernier récepteur de la famille HER à avoir été découvert (Plowman et al., 1993a), est un gène de 1,16 Mb (mégabases) possédant 28 exons et situé sur le chromosome 2 en position q34. Contrairement aux trois autres gènes ERBB qui, après épissage alternatif, conduisent à l'expression d'une seule isoforme transmembranaire majeure (EGFR, HER2 et HER3), le gène ERBB4 produit après cet épissage quatre récepteurs transmembranaires. Ces récepteurs sont appelés JMa/CYT1, JMa/CYT2, JMb/CYT1 et JMb/CYT2 faisant respectivement 1308, 1292, 1298 et 1282 AA. Cet épissage alternatif de l'ARNm de HER4 se reflète au niveau protéique par des différences dans l'ECD et l'ICD de chaque isoforme.

Au niveau de l'ECD, les isoformes diffèrent dans leur partie juxtamembranaire (JM pour *JuxtaMembrane*) et sont caractérisées par la présence de l'exon 16 codant 23 AA (isoformes JMa) ou la présence de l'exon 15 codant 13 AA (isoformes JMb) (Elenius et al., 1997). Au niveau de l'ICD du récepteur, les isoformes diffèrent dans leur partie cytoplasmique (CYT pour *CYToplasmic*) et c'est la présence de l'exon 26 (codant 16 AA) qui caractérise CYT1 ou son absence qui caractérise CYT2 (Elenius et al., 1999).

De manière générale, les deux isoformes JMa et JMb sont co-exprimées dans les tissus mais avec une prévalence des isoformes JMa par rapport aux isoformes JMb (70% *versus* 30%). Il y a cependant des spécificités d'expression selon les organes, où il a été décrit que le cœur exprimait seulement les isoformes JMb alors que les reins expriment seulement les isoformes JMa (Elenius et al., 1997). Enfin, deux autres isoformes JM, qui ont été mises

en évidence chez de jeunes enfants atteints de médulloblastomes, sont parfois exprimées mais en faible quantité par rapport aux deux principales JMa et JMb. Elles résultent soit de l'absence des exons 15 et 16 (isoformes JMc) soit de la présence des deux exons (isoformes JMd) (Gilbertson et al., 2001) (**Figure 15**).

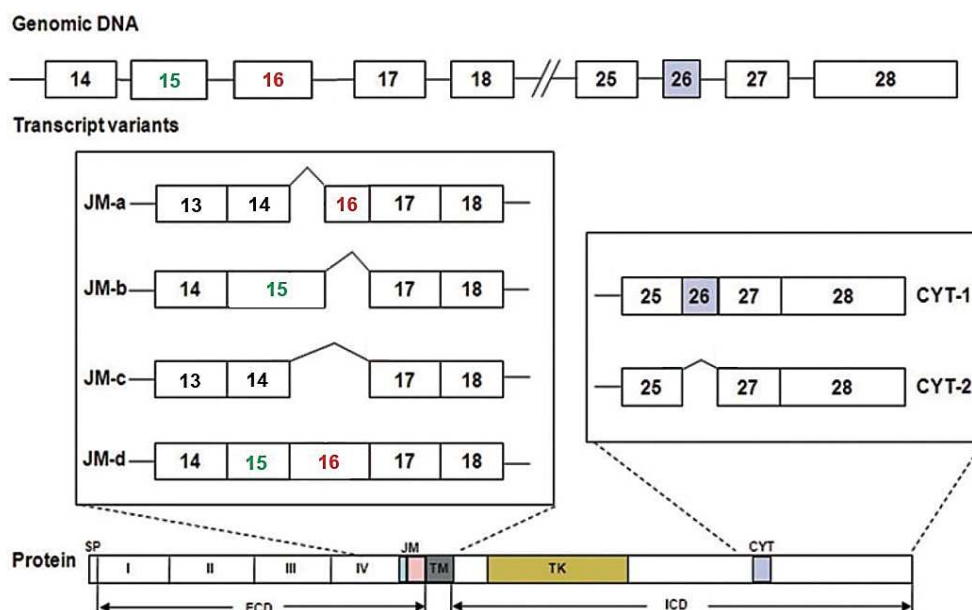


Figure 15 : Schéma de l'épissage alternatif conduisant aux différentes isoformes de HER4

Au moins 8 isoformes transmembranaires peuvent être générées par l'épissage alternatif de l'ARNm du récepteur HER4, résultant de l'excision ou non des exons 15 et/ou 16 pour leur partie extracellulaire, et de l'excision ou non de l'exon 26 pour leur partie intracellulaire. Les isoformes JMa/CYT1, JMa/CYT2, JMb/CYT1 et JMb/CYT2 sont les plus exprimées et les plus étudiées alors que les isoformes JMc/CYT1, JMc/CYT2, JMd/CYT1 et JMd/CYT2 sont plus rares. Les rôles de ces isoformes JMc et JMd ne sont pas connus (modifié d'après Zeng et al., 2009b).

Les isoformes CYT1 et CYT2 étant toujours exprimées en même temps quel que soit le tissu, on ne retrouve donc pas de cellules exprimant seulement une isoforme de HER4. Cette observation complique l'étude de la signalisation isoforme-dépendante de HER4 sur des cellules exprimant naturellement le récepteur et rend obligatoire le passage à des modèles artificiels de surexpression des isoformes.

Cet épissage alternatif conduisant à au moins quatre isoformes transmembranaires fonctionnelles rend le récepteur HER4 unique parmi la famille HER, avec un mécanisme d'action particulier selon les isoformes, puisque chaque isoforme JM et CYT possède des caractéristiques qui leurs sont propres.

B- Spécificités, mécanismes d'activation et signalisations des isoformes de HER4

1. Les isoformes JM : to be RIPPed or not to be

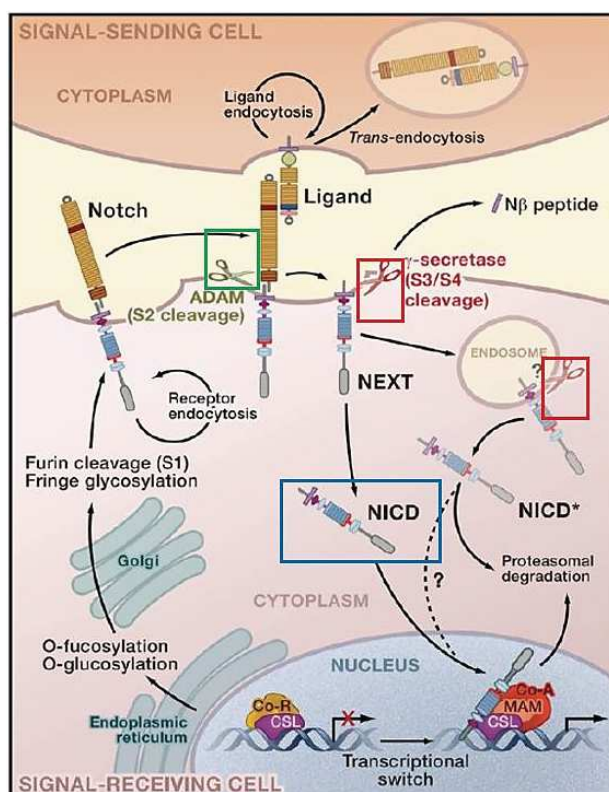
a. Un mécanisme en deux-étapes commun à d'autres récepteurs et RTK

Initialement identifié comme un mécanisme d'action « exotique » de certains récepteurs, dont Notch en est l'exemple le plus célèbre, le mécanisme d'action appelé RIP (*Regulated Intramembrane Proteolysis*) est en fait un mécanisme partagé par de nombreux RTK (Merilahti et al., 2017) et permettant une signalisation directe au noyau :

Suite à l'activation du récepteur, le plus souvent par la liaison du ligand, une métalloprotéase membranaire (MMP pour *Matrix MetalloProteinase*) de la famille des ADAM clive le récepteur une première fois dans sa région juxtamembranaire, libérant l'ECD du récepteur dans le milieu extracellulaire. Ce premier clivage extracellulaire permet l'exposition d'un second site de clivage, celui-ci intracellulaire et médiée par le complexe gamma-sécrétase. Ce second clivage libère l'ICD du récepteur dans le cytosol, qui peut alors induire la signalisation jusqu'au noyau pour moduler l'activité de gènes cibles (**Figure 16**).

Figure 16 : La voie Notch, exemple du mécanisme d'activation RIP

La voie Notch est l'exemple le plus connu du mécanisme de RIP. Le récepteur Notch est activé par une cellule voisine qui expose à sa surface le ligand de Notch (signal-sending cell). Suite à cette activation, le récepteur de la cellule « receveuse » (signal-receiving cell) est clivé en extracellulaire par une ADAM (en vert sur le schéma), ce qui entraîne un changement conformationnel de Notch clivé (NEXT, Notch EXtracellular Truncation fragment) puis son clivage intracellulaire par le complexe γ -sécrétase (en rouge sur le schéma). La partie NCID (Notch ICD) libérée dans le cytosol (en bleu sur le schéma) peut alors signaler jusqu'au noyau et induire la transcription de gènes cibles. A noter que le clivage par le complexe γ -sécrétase peut se faire directement à la membrane ou dans les endosomes, mais les mécanismes orientant cette décision ne sont pas connus (d'après Kopan and Ilagan, 2009).



Le récepteur Notch est le plus connu et le plus étudié des récepteurs subissant le RIP. Ce récepteur est impliqué dans le développement et l'homéostasie chez les métazoaires, et sa dérégulation est notamment impliquée dans les cancers. Comme HER4 chez l'homme, Notch possède quatre isoformes qui diffèrent en taille dans leur partie extra et intracellulaire. Le récepteur Notch est activé de manière paracrine par une cellule voisine exprimant à sa surface le ligand de Notch. C'est le contact cellule-cellule qui va activer le récepteur et induire le premier clivage extracellulaire par l'enzyme TACE (*Tumor necrosis factor-Alpha Converting Enzyme*). Egalement appelée ADAM17, cette enzyme est une métalloprotéase membranaire faisant partie de la famille ADAMs. Ce clivage crée un intermédiaire du récepteur Notch servant de substrat membranaire au complexe gamma-sécrétase. Ce complexe est composé de quatre sous-unités dont la *presenilin-1* (une aspartyl-protéase) est la seule possédant l'activité catalytique nécessaire au complexe. Une fois le second clivage réalisé du côté intracellulaire par la gamma-sécrétase, le fragment libéré NICD (*Notch ICD*) peut signaler jusqu'au noyau et contrôler la transcription de gènes cibles (Kopan and Ilgan, 2009).

D'autres protéines ont été décrites comme subissant un clivage intramembranaire comme SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), une protéine impliquée dans la régulation de la synthèse du cholestérol et dont le processus protéolytique est contrôlé par un mécanisme de rétro-contrôle, ou encore l'APP (*Amyloid Precursor Protein*) impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Cette protéine peut subir un premier clivage par les enzymes α -sécrétase et β -sécrétase (aussi appelée BACE) puis un second par la γ -sécrétase. La libération de peptides A β issus de ces deux clivages successifs et leur agrégation sont en partie responsables du développement de la maladie d'Alzheimer (Morohashi and Tomita, 2013).

De nombreux autres RTK ont été récemment mis en évidence comme subissant le RIP, comme AXL ou encore MET (**Figure 17**). Par un criblage à grande échelle sur la majorité des RTK pouvant être activés par le PMA (*Phorbol-myristate acetate* : un composé équivalent au TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) qui déclenche *in vitro* le clivage de l'ECD du récepteur), Merilahti *et al* ont décrit AXL comme étant clivé par la γ -sécrétase et libérant un fragment C-terminal d'AXL (Merilahti *et al.*, 2017). Le rôle de ce fragment et ses possibles localisations subcellulaires ne sont pas connus. Le récepteur MET a aussi été décrit comme subissant le RIP et des auteurs ont montré que la dégradation protéasomale de l'ICD libéré contribuait à atténuer la croissance cellulaire, indépendamment de la signalisation du récepteur (Foveau *et al.*, 2009).

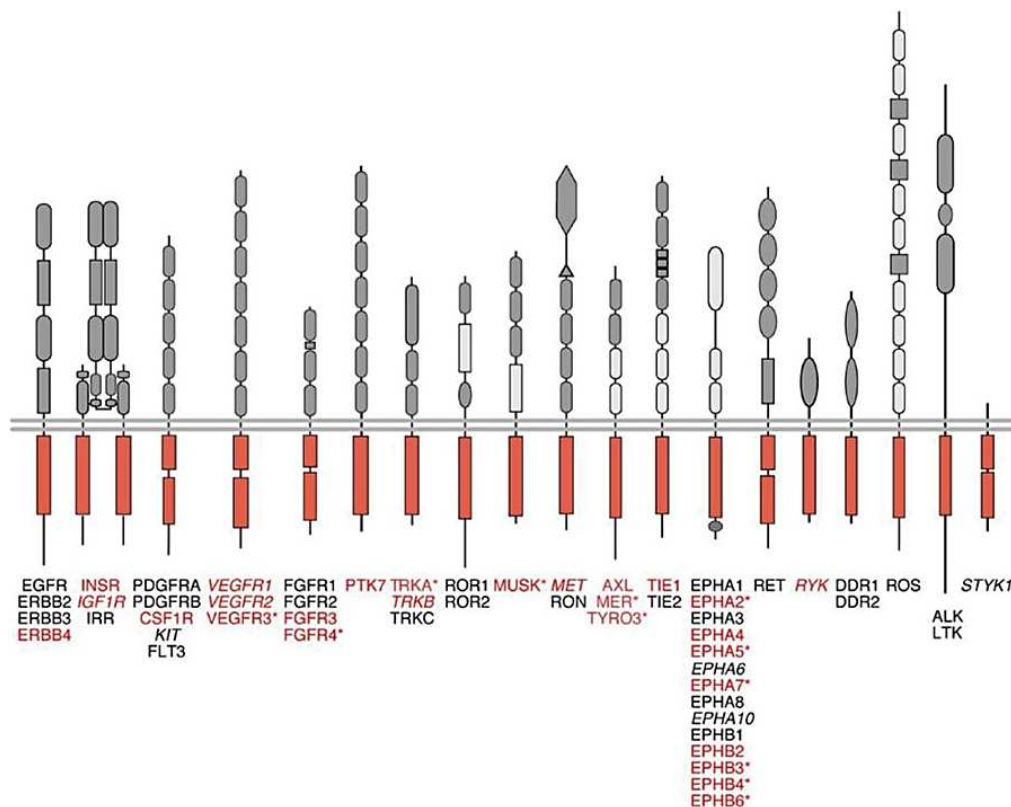


Figure 17 : De nombreux RTK concernés par le RIP

Les récepteurs pouvant être clivés par le complexe gamma-sécrétase sont indiqués en rouge. Environ la moitié des récepteurs de la super-famille des RTK peuvent subir le RIP, puisque ce clivage intracellulaire par la gamma-sécrétase n'est en théorie possible que s'il y a eu au préalable un clivage en extracellulaire par une protéase de type ADAM. Le récepteur HER4 est le seul récepteur HER à posséder ce mécanisme d'action complet (d'après Merilahti et al., 2017).

Les inhibiteurs d'ADAM et de γ -sécrétase, apparus comme une alternative aux anticorps et petites molécules pour bloquer l'activation des récepteurs, se sont révélés peu concluants en essais cliniques pour les premiers. Les seconds se heurtent aussi à des phénomènes de résistance puisque les cellules cancéreuses peuvent augmenter *via* des voies alternatives la production de MMP pour contrecarrer cette inhibition (Miller et al., 2017). De plus, le clivage de ces récepteurs étant probablement aussi impliqué dans le rétro-contrôle négatif de leur activation, bloquer les voies de signalisation de ces derniers peut diminuer leur clivage mais augmenter la production des RTK à la surface dans un mécanisme compensatoire, et donc la signalisation oncogénique (Miller et al., 2016).

Le RIP, mécanisme commun à de nombreux RTK, permet la diversification de la signalisation et un certain contrôle de cette dernière *via* une signalisation dirigée directement au noyau. Alors que le RIP est la voie canonique du récepteur Notch, le récepteur HER4 peut signaler *via* le RIP mais aussi *via* la signalisation « classique » des RTK....

b. Ligands du récepteur HER4 et initiation du RIP

Comme les deux autres membres EGFR et HER3, le récepteur HER4, de masse moléculaire d'environ 180 kDa, adopte une conformation « fermée » en absence de ligand (Bouyain et al., 2005). La liaison de ce dernier déclenche l'homo ou l'hétérodimérisation conduisant à l'activation du récepteur. Le récepteur HER4 peut lier de nombreux ligands, qu'ils soient partagés avec EGFR (BTC, HB-EGF et EPR), HER3 (NRG1 et NRG2) ou exclusifs à HER4 (NRG3 et NRG4). Toutes les isoformes de HER4 ayant une quasi-totale homologie dans leur ECD, avec seulement quelques AA qui diffèrent dans la région juxtamembranaire, on peut supposer que chacun des ligands de HER4 peut lier chacune des isoformes du récepteur, même si aucune étude n'a été entreprise pour le démontrer. Grâce à la signalisation « classique » des RTK, et avec les capacités qu'ont les isoformes JMa à signaler *via* 4ICD, le récepteur HER4 se place comme le récepteur de la famille HER pouvant engendrer les signalisations les plus variées (**Tableau 1, page 32**).

Les principaux ligands du récepteur HER4 sont les NRG. Les NRG jouent un rôle essentiel dans le développement du cœur, du cerveau et du sein, organes et tissus où les récepteurs HER3 et HER4 sont exprimés. Toutes les isoformes des NRG peuvent être différenciées selon trois critères : leur domaine *EGF-like* (α ou β), suffisant pour activer les récepteurs HER ; leur type de domaine N-terminal (I, II ou III) et si elles sont sécrétées sous forme de précurseurs transmembranaires ou pas. Les précurseurs sont clivés par des MMP et peuvent activer les récepteurs HER de manière paracrine, autocrine ou juxtacrine. Comme pour les récepteurs, une dérégulation de la signalisation des NRG peut mener à de nombreuses pathologies (Falls, 2003). Dans la suite de cette thèse, tant dans la description de HER4 que dans les résultats présentés, nous nous intéressons principalement à la NRG1 β 1.

La NRG1 β 1 a été décrite comme ligand de HER4 suite à la découverte du récepteur et induisant la phosphorylation de ce dernier (Plowman et al., 1993b). Même si ce ligand peut aussi lier HER3, la NRG1 β 1 présente une plus forte affinité pour HER4 comparé à HER3 (1,5 nM *versus* 11 nM), mesuré dans des cellules COS-7 surexprimant les deux récepteurs (Tzahar et al., 1994). Cette observation est appuyée par l'étude de Feroz *et al*, montrant que la NRG1 β 1, de même que la BTC, phosphoryle HER4 de manière égale, même si HER2 et HER3 sont co-exprimés (Feroz et al., 2002). En produisant des NRG2 α , NRG2 β , NRG3 et NRG4 recombinantes, Hobbs *et al* ont démontré que les NRG3 et NRG4 sont des ligands exclusifs à HER4. Par contre, les isoformes de la NRG2 entraînent différents profils de phosphorylation *via* HER4, où la NRG2 β est un puissant agoniste alors que la NRG2 α ne phosphoryle que très faiblement le récepteur (Hobbs et al., 2002).

Ces observations indiquent, dans un contexte de ciblage d'un récepteur afin de moduler une signalisation, que des différences minimales au niveau des paratopes peuvent se

répercuter sur le récepteur et sa signalisation, puisque les effets opposés des deux isoformes de la NRG2 sont dus à quelques résidus différents dans la partie C-terminale du ligand (Hobbs et al., 2004).

Les effets biologiques de la NRG sur le récepteur HER4 sont assez ambigus. Il a été décrit que la NRG2 β induisait une reprise du cycle cellulaire sur des cellules T-47D via l'activation des voies AKT et MAPK (Fiddes et al., 1998) mais aussi de la cytotoxicité dépendante de l'expression de HER4 (Siegall et al., 1995). Les effets versatiles de la NRG *via* HER4 et les différentes hypothèses pouvant expliquer ces observations seront décrits plus tard.

Outre l'effet direct de la NRG sur la phosphorylation et les voies de signalisation du récepteur HER4, la liaison du ligand induit l'initiation du RIP. Sur différentes lignées cancéreuses exprimant HER4, la NRG induit une augmentation du fragment de 80 kDa de HER4, associée à la phosphorylation du récepteur. De la même manière qu'avec le TPA, ce fragment disparaît lorsqu'on traite les cellules avec un inhibiteur de MMP. En inhibant la voie endosomale, les auteurs suggèrent l'implication d'une protéase intracellulaire, posant les bases du mécanisme RIP dépendant de la NRG (Zhou and Carpenter, 2000).

c. 1^{ère} étape : un clivage extracellulaire de HER4

Ce qui différencie les isoformes JMa et JMb est la présence d'un site de clivage protéolytique dans la séquence JMa, qui rend ces isoformes sensibles au clivage par l'enzyme TACE (Rio et al., 2000). L'absence de ce site dans les isoformes JMb rend ces dernières résistantes à la protéolyse. Les isoformes JMa peuvent donc induire la signalisation en partie *via* le RIP alors que les isoformes JMb se comportent comme des RTK « classiques » (**Figure 18A**).

Ce clivage se produit dans la partie juxtamembranaire des isoformes HER4 JMa entre les résidus Histidine 651 et Sérine 652, 8 AA environ en amont du domaine transmembranaire (Cheng et al., 2003). Il libère la partie extracellulaire du récepteur, d'une masse moléculaire d'environ 120 kDa, et laisse une partie encore enchâssée à la membrane, d'environ 80 kDa appelée m80.

L'ECD libéré pourrait, comme pour les autres membres HER, jouer un rôle de régulateur négatif de la signalisation HER4, mais aussi de protéine de signalisation à part entière, comme dans le Système Nerveux Central (SNC) où l'ECD de HER4 induit la migration des cellules neuronales (Pascal et al., 2014). Ce clivage extracellulaire peut être déclenché *via* l'activation de la PKC qui serait un précurseur à l'activation de TACE (Vecchi et al., 1996). Vecchi et Carpenter ont montré qu'environ 10% des récepteurs HER4 étaient basalement protéolysés par heure, sur un modèle de cellules NIH3T3 surexprimant 1 million de récepteurs

HER4/cellule (Vecchi and Carpenter, 1997). Un aspect intéressant rapporté par Goth *et al* indique que HER4 est le seul, parmi tous les récepteurs pouvant être clivé par les ADAM, à voir son clivage amélioré par la O-glycosylation du récepteur. Cela permet le clivage du récepteur par d'autres isoformes ADAM telle que l'ADAM10 (Goth et al., 2015) (**Figure 18B**).

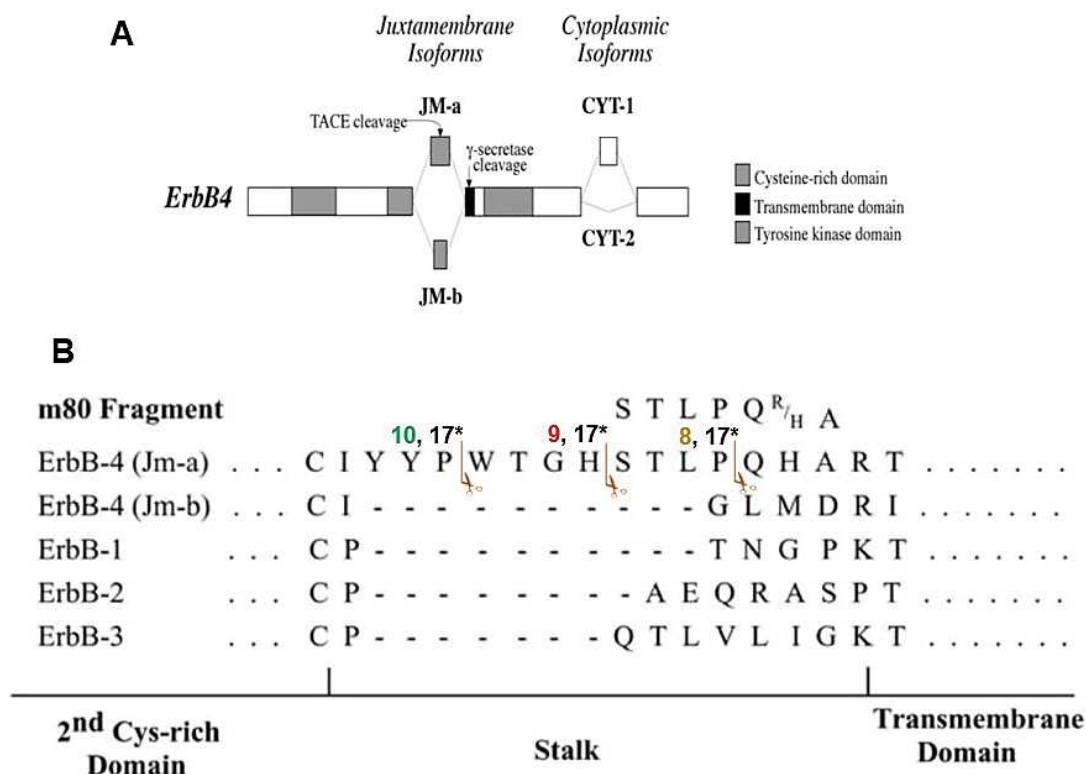


Figure 18 : Les isoformes JMa et JMb, différences structurales et conséquence sur le clivage

(A) Les isoformes JMa possèdent un site de clivage par TACE, apporté par l'exon 16 lors de l'épissage alternatif, absent dans JMb. Ce 1^{er} clivage par TACE est nécessaire au second, médié par le complexe γ-sécrétase. Ces deux clivages successifs permettent aux isoformes JMa (CYT1 et CYT2) de libérer 4ICD dans le cytosol, pouvant alors signaler au noyau et dans d'autres compartiments. (B) Alignement des séquences protéiques des domaines transmembranaires des récepteurs HER. Les isoformes JMa sont les seules à pouvoir être clivées, en plusieurs endroits par TACE (ADAM17) et il a été rapporté que l'O-glycosylation de HER4 permettait au récepteur d'être clivé par d'autres isoformes d'ADAM telles que les ADAM 8, 9 et 10 (adapté d'après Goth et al., 2015; Sundvall et al., 2008). * Les différentes ADAM pouvant cliver HER4 sont indiquées par leur numéro

d. 2^{ème} étape : un clivage intracellulaire de HER4

Le fragment m80, enchâssé dans la membrane plasmique suite à l'action de TACE, est ensuite clivé au niveau intracellulaire par le complexe γ-sécrétase. Cela libère la partie intracellulaire du récepteur (4ICD pour *HER4 IntraCellular Domain*) dans le cytosol, qui peut ensuite faire la navette jusqu'au noyau pour induire la transcription de gènes cibles (**Figure 19**). Il a été démontré que la NRG induisait une diminution d'environ 70% du nombre de cellules T-47D et que cette diminution était complètement bloquée en présence d'inhibiteur de γ-sécrétase, suggérant une contribution de 4ICD dans la mort cellulaire induite par la NRG (Ni et al., 2001).

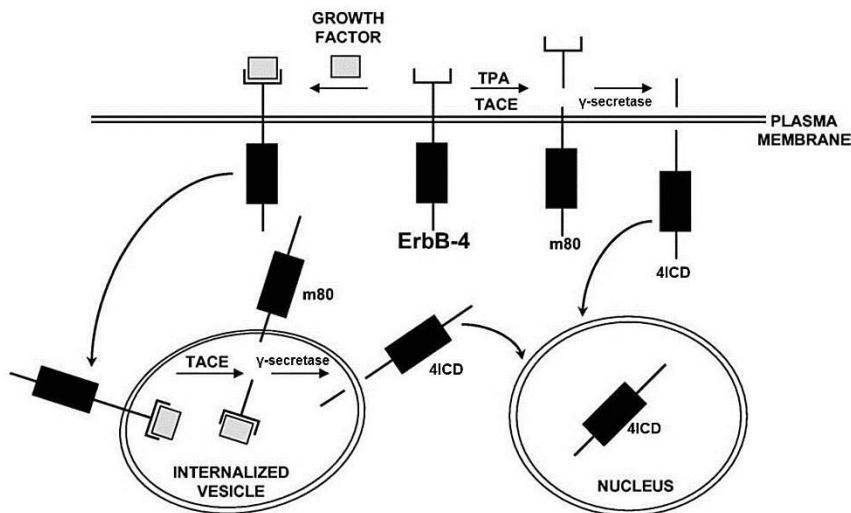


Figure 19 : RIP des isoformes JMa du récepteur HER4 et signalisation majeure de 4ICD

Seules les isoformes JMa subissent le RIP. Après clivage par l'enzyme TACE et le complexe γ -secretase, la partie intracellulaire du récepteur HER4 (4ICD) est libérée dans le cytosol et peut signaler jusqu'au noyau pour induire la transcription de gènes cibles. Le récepteur peut être clivé soit directement à la membrane plasmique soit après internalisation au niveau des endosomes. Les mécanismes dictant ces choix ne sont pas connus (adapté d'après Carpenter, 2003).

Il semblerait que la partie C-terminale du récepteur soit indispensable au RIP puisqu'il a été décrit que celle-ci, qui comporte un motif PDZ d'interaction protéine-protéine, interagit avec la presenilin-1, qui présente aussi un motif PDZ. La mutation de ce domaine abolit le clivage de m80 par le complexe γ -sécrétase (Ni et al., 2003). Un mutant transmembranaire V673I du récepteur HER4, pouvant toujours signaler *via* les voies AKT et MAPK mais étant incapable d'être clivé (cette Valine étant critique pour l'activité γ -sécrétase), confirme le RIP comme indispensable à la libération de 4ICD. Le RIP est aussi essentiel à la mise en place des fonctions de 4ICD au noyau en tant que co-activateur transcriptionnel et dans d'autres compartiments comme la mitochondrie, en tant qu'inducteur de mort cellulaire (Vidal et al., 2005).

e. 3^{ème} étape : signalisation de 4ICD au noyau

Une fois libéré dans le cytosol, 4ICD prend majoritairement la direction du noyau où il peut agir comme co-activateur transcriptionnel. Ainsi, 4ICD peut s'accumuler dans la région périnucléaire et, grâce à sa séquence NLS (*Nuclear Localization Signal*) jouer le rôle de chaperon moléculaire pour l'entrée de STAT5A dans le noyau, stimulant le promoteur de la β -caséine (Williams et al., 2004). L'activité de 4ICD au noyau est finement régulée puisqu'il a été montré que 4ICD était SUMOylé par PIAS3 (*Protein Inhibitor of Activated STAT3*), ce qui avait pour effet de réguler la transcription (Sundvall et al., 2012). Dans une autre étude, Haskins *et al* montrent que la NRG stimule l'activité du co-activateur transcriptionnel YAP lorsque celui-ci se lie à 4ICD sur son motif PPxY. Cela peut être en accélérant la translocation

nucléaire de YAP grâce à 4ICD, ou en faisant entrer 4ICD en compétition avec les protéines de la voie Hippo pour la liaison à YAP (Haskins et al., 2014). 4ICD a aussi été décrit comme co-activateur de nombreuses autres protéines comme les récepteurs aux œstrogènes ERα (Zhu et al., 2006) et à la progestérone PgR (Rokicki et al., 2010). C'est aussi un co-répresseur transcriptionnel, par exemple dans les astrocytes où il peut réguler l'expression génique en se liant au complexe TAB2-N-CoR (Sardi et al., 2006). Enfin, le fait que 4ICD possède une activité kinase intacte et peut se retrouver sous forme de dimère dans le cytosol suggère que ce fragment pourrait avoir de nombreuses autres fonctions encore sous-estimées (Linggi et al., 2006).

Il est important d'intégrer durant tout le processus du RIP la composante CYT des isoformes JMa. Les effets au niveau du noyau et sur la signalisation peuvent être différents selon que 4ICD provienne de l'isoforme clivée JMa/CYT1 ou JMa/CYT2. Malheureusement, de nombreuses études n'ont pas pris et ne prennent toujours pas en compte les différences d'isoformes lorsqu'elles étudient la localisation et les effets de 4ICD, au noyau ou dans d'autres compartiments...

2. Les isoformes CYT : quelques acides aminés qui font la différence

Au-delà des capacités qu'ont les isoformes JMa et JMb à signaler ou non *via* le fragment 4ICD soluble, les différences apportées par l'exon 26 codant pour les 16 AA supplémentaires de CYT1 entraînent de grandes conséquences sur la signalisation et les propriétés de 4ICD-CYT1 *versus* 4ICD-CYT2 (**Figure 20**).

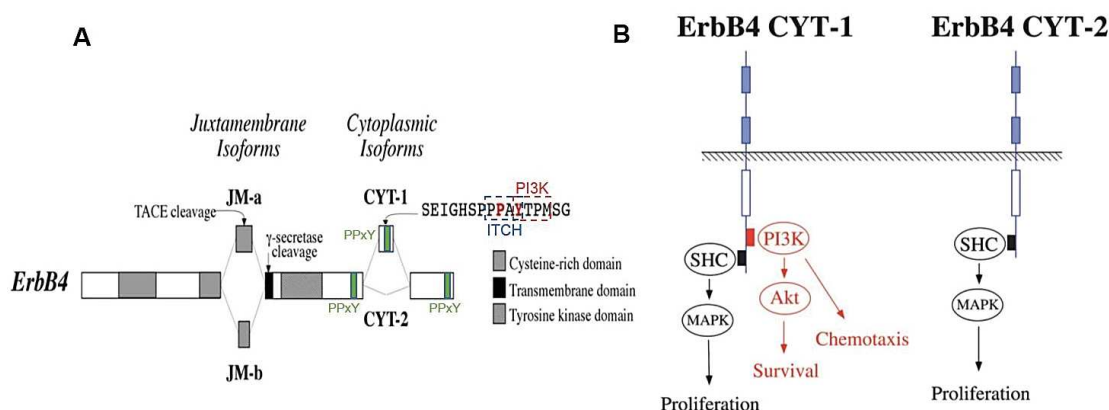


Figure 20 : Les différences CYT1-CYT2 et leurs conséquences sur la signalisation

(A) L'exon 26, s'il est conservé lors de l'épissage, introduit dans les isoformes JMa et JMb 16 AA supplémentaires dans la partie ICD du récepteur. Dans cette séquence se trouve un motif PPxY permettant de lier les protéines à domaine WW telles que ITCH ou encore le suppresseur de tumeur WWOX. Cette séquence porte à trois le nombre de domaines WW de CYT1 contre seulement deux pour CYT2. Le motif YTPM dans CYT1 permet de lier la PI3K, ce que ne permet pas CYT2. La tyrosine 1056 (en rouge), à cheval entre ces deux motifs, est donc seulement retrouvée dans CYT1. **(B)** La présence de CYT1 permet aux isoformes JMa/CYT1 et JMb/CYT1 d'activer la voie PI3K en plus de la voie MAPK, induisant de nombreuses voies de signalisation supplémentaires par rapport à JMa/CYT2 et JMb/CYT2 (modifié d'après Sundvall et al., 2008 ; Junttila et al., 2000).

La principale différence entre les isoformes CYT1 et CYT2 est leur capacité à activer la voie PI3K/AKT. En effet, lorsque les isoformes CYT ont été isolées, CYT1 a été décrit comme possédant 16 AA supplémentaires par rapport à CYT2 et un site de liaison de la sous-unité p85 de la PI3K. Ainsi, lors de la stimulation des isoformes JMb/CYT1 et JMb/CYT2 par la NRG1 β , seule l'isoforme JMb/CYT1 peut activer la voie PI3K (Elenius et al., 1999). Malheureusement, et c'est le cas dans de nombreuses études, il ne semble pas toujours y avoir de logique quant à l'utilisation de certaines isoformes de HER4 par rapport aux autres. Dans l'étude d'Elenius par exemple, il aurait été intéressant de connaître le comportement des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 sur l'activation de la voie PI3K. De plus, certains auteurs utilisent parfois des modèles murins, comme des cellules NIH3T3, pour surexprimer et étudier l'effet des isoformes humaines. Même si ces modèles sont intéressants pour l'étude de récepteurs complexes comme HER4, il faut garder à l'esprit que les interactions moléculaires entre protéines murines et humaines peuvent fournir un biais dans l'interprétation des résultats, surtout lorsqu'on étudie des protéines qui possèdent de très petites différences structurales comme 4ICD-CYT1 et 4ICD-CYT2.

Dans une étude du même groupe, sur le même modèle que précédemment, les auteurs ont démontré que la NRG1 β induisait la prolifération des cellules JMb/CYT2 et dans une moindre mesure celle des cellules JMb/CYT1, avec une absence de mort cellulaire. Les deux isoformes peuvent activer la voie ERK1/2 avec une activation plus soutenue par CYT2. Enfin, l'isoforme JMb/CYT1 après stimulation par la NRG1 β entraîne la survie cellulaire *via* l'activation d'AKT et la migration des cellules, propriétés dont les cellules JMb/CYT2 sont dépourvues (Kainulainen et al., 2000).

La présence de motifs PPxY dans 4ICD permet de lier des protéines à domaine WW. Alors que toutes les isoformes de HER4 peuvent lier l'E3 ubiquitine-ligase ITCH grâce à au moins deux motifs PPxY, ce qui induit leur ubiquitinylation et l'envoi au protéasome (Omerovic et al., 2007), la présence d'un motif PPxY supplémentaire dans CYT1 pourrait permettre une régulation différentielle de cette isoforme. En effet, il a été décrit que l'E3 ubiquitine-ligase Cbl induisait la poly-ubiquitinylation de CYT1 et CYT2 en K48 pour conduire à la dégradation alors que ITCH entraîne en plus la poly-ubiquitinylation de CYT1 en K63, un motif ubiquitine important pour le trafic endosomal (Meijer et al., 2013).

3. Les combinaisons JM-CYT : un bon gros schmilblick !

a. CYT1 : vers la suppression de tumeur ?

L'étude de Meijer fournit peut être un début de réponse pouvant expliquer pourquoi CYT1 est associé à l'inhibition de la croissance cellulaire alors que CYT2 est associé à un phénotype prolifératif.

Dans des cellules de cancer du sein, Muraoka-Cook *et al* ont montré *in vitro* et *in vivo* que CYT1 était impliqué dans l'inhibition de croissance et la différenciation précoce des cellules alors que CYT2 était impliqué dans la prolifération, avec une augmentation de la voie β -caténine et de l'expression de cycline D1 (Muraoka-Cook *et al.*, 2009). Dans la lignée de cancer du sein SUM44, la NRG induit une inhibition de croissance médiée par 4ICD au noyau, puisqu'un inhibiteur de γ -sécrétase abolit cette inhibition, de même que l'absence de domaine kinase du récepteur (Feng *et al.*, 2007). Cet effet inhibiteur pourrait être dû à la liaison de WWOX sur HER4. WWOX (*WW domain-containing OXidoreductase*) est un suppresseur de tumeur souvent supprimé ou altéré dans de nombreux cancers et interagissant avec p73, un membre de la famille p53. En entrant en compétition avec YAP pour la liaison de HER4, WWOX pourrait faire basculer la signalisation de 4ICD vers l'inhibition de prolifération (Aqeilan *et al.*, 2005). Il est cependant impossible de déterminer si une isoforme est responsable de cette liaison puisqu'il a été décrit que CYT1 et CYT2 liaient WWOX avec des affinités comparables malgré la présence d'un motif supplémentaire PPxY dans CYT1 (Schuchardt *et al.*, 2013).

Ce motif de CYT1 pourrait être nécessaire à l'activité suppresseur de tumeur de HER4. Zeng *et al* ont montré que CYT1 interagit avec l'E3 ubiquitine-ligase Nedd4 dans des cellules MDCK pour être rapidement dégradé au protéasome. Les auteurs suggèrent que la présence de la tyrosine 1056 entraînerait moins de translocation de CYT1 au noyau, et l'absence de ce motif tyrosine 1056 permettrait à CYT2 d'y migrer plus efficacement (Zeng *et al.*, 2009a). Dans ce cas, le blocage de la translocation nucléaire de CYT1 pourrait expliquer ses effets anti-prolifératifs comparé à CYT2. Cette hypothèse et l'association de cette Y1056 avec un effet suppresseur de tumeur semble à priori contre-intuitive, puisque cette tyrosine a été associée au recrutement de la PI3K et l'activation d'AKT. Cependant, certaines études indiquent que les sous-unités p85 pourraient aussi être suppresseur de tumeur (Luo *et al.*, 2005).

Une autre E3 ubiquitine-ligase, WWP1, peut lier grâce à ce motif PPxY supplémentaire plus fortement CYT1 que CYT2, résultant en une dégradation plus rapide de CYT1 que CYT2 (Feng *et al.*, 2009). Cette observation laisse à penser que si c'est effectivement CYT1 qui est responsable de l'inhibition de croissance, cette fonction doit être finement régulée, notamment à travers sa dégradation.

Cependant, une question demeure, qui est de savoir où se localiserait CYT1 et son potentiel effet suppresseur de tumeur, s'il n'est pas localisé au noyau et avant dégradation. Une réponse a été apportée par l'étude de Naresh *et al*, indiquant que 4ICD est porteur d'un domaine BH3-only caractéristique des protéines pro-apoptotiques. En stimulant des cellules T-47D avec la NRG, les auteurs ont mis en évidence une translocation de 4ICD dans la mitochondrie, induisant l'oligomérisation de BAK et le relargage du cytochrome c, conduisant *in fine* à l'apoptose des cellules cancéreuses (Naresh *et al.*, 2006). Bien que les cellules T-47D expriment aussi HER3 et que l'on ne sache pas qu'elle est l'isoforme de HER4 impliquée,

cette étude met clairement en évidence une fonction suppresseur de tumeur pour 4ICD et la NRG.

Dans des cellules de cancer du sein, la NRG entraînerait *via* HER4 l'augmentation de BRCA1 (*BR*east *C*Ancer *t*ype 1 *s*usceptibility *p*rotein), un suppresseur de tumeur muté dans une large proportion de cancers du sein et de l'ovaire à composante héréditaire, et qui joue un rôle dans la réparation de l'ADN. Cette augmentation impliquerait la voie JNK et se traduirait par un arrêt des cellules en G2/M (Muraoka-Cook et al., 2006a). Cet arrêt du cycle semble aussi médié par 4ICD, qui a été proposé comme protéine *checkpoint* du cycle cellulaire dans les cellules mammaires. Strunk *et al* ont décrit une séquence D-box (*cyclin B-like*) dans 4ICD. Cette séquence permettrait à 4ICD d'être dégradé durant la mitose par l'APC (*Anaphase Promoting Complex*), permettant ainsi la progression dans le cycle cellulaire. La mutation de cette séquence améliore la stabilité de 4ICD et résulte en une meilleure inhibition de la croissance par un arrêt accru en G2/M, dans les mêmes modèles que précédemment (Strunk et al., 2007). Il est possible que 4ICD et BRCA1 agissent de concert pour arrêter le cycle cellulaire après une stimulation par la NRG.

Enfin, un dernier aspect propre à CYT1 concerne la tyrosine 1056, comprise entre les motifs PPxY (liant les domaines WW) et YTPM (liant la sous-unité p85 de la PI3K). En utilisant plusieurs mutants de l'isoforme JMa/CYT1 et avec des mutations sur chaque tyrosine du récepteur, une équipe a démontré que le mutant constitutivement actif Q646C inhibait la formation de colonies. L'activité kinase du récepteur ainsi que la phosphorylation de cette Y1056 sont toutes deux nécessaires à cette activité suppresseur de tumeur de HER4 (Pitfield et al., 2006) (Gallo et al., 2006).

Sur la base de ces observations, on peut imaginer que cette mutation Q646C induit une conformation spécifique du récepteur dans laquelle la tyrosine 1056 se retrouve phosphorylée et recrute un partenaire activant la voie suppresseur de tumeur du récepteur. D'autres hypothèses peuvent être émises, comme la phosphorylation de la tyrosine 1056 qui régulerait négativement la liaison de YAP sur CYT1 et donc sa transactivation au noyau (Omerovic et al., 2004).

Bien qu'il existe de nombreuses évidences que 4ICD possède un potentiel de suppression de tumeur, l'isoforme CYT1 n'a pas été formellement identifiée comme étant responsable de cela. De nombreuses discordances existent encore sur sa fonction puisque CYT1, au même titre que CYT2, a aussi été décrit comme un oncogène. Dans le cancer de l'ovaire, CYT1 peut promouvoir la croissance de cellules cancéreuses *in vitro* et son expression au niveau clinique est associée à une faible survie globale des patientes (Paatero et al., 2013) (**Figure 21**).

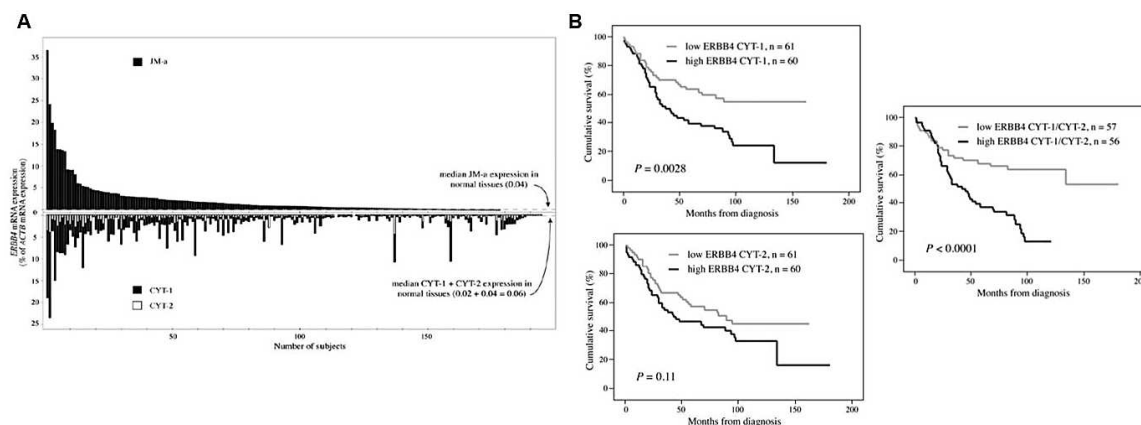


Figure 21 : Mauvais pronostic de l'expression de CYT1 dans le cancer de l'ovaire

(A) Analyse de l'expression des isoformes JMa, JMb, CYT1 et CYT2 par RT-qPCR sur une cohorte de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Toutes les patientes expriment l'isoforme JMa avec un ratio CYT1/CYT2 plutôt élevé alors que l'isoforme JMb est quasiment indétectable. **(B)** Courbes de survie en fonction de l'expression des isoformes CYT1 et CYT2. Plus encore que CYT2, l'expression de CYT1 est associée à un mauvais pronostic, surtout mis en évidence lorsque l'on compare les ratios CYT1/CYT2 (d'après Paatero et al., 2013).

b. CYT2 : vers la progression tumorale ?

La plupart des études présentent l'isoforme CYT2 comme étant oncogénique. Même si les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 sont surexprimées chez des patientes atteintes de cancer du sein, le groupe d'Elenius a mis en évidence une phosphorylation constitutive et un clivage basal de JMa/CYT2 se produisant de manière ligand-indépendante, associé à un potentiel plus oncogénique que les autres isoformes (Määttä et al., 2006). De façon intéressante, l'étude montre aussi que, après stimulation par la NRG, les cellules exprimant les isoformes JMa/CYT1 et JMb/CYT2 voient leur viabilité cellulaire diminuer. Cette étude, suggérant que des stratégies visant à cibler spécifiquement cette isoforme JMa/CYT2 pourraient générer de meilleurs candidats médicaments que celles ciblant HER4 indépendamment des isoformes, ouvre la voie à une stratégie de ciblage « isoforme-spécifique » de HER4.

Quand CYT1 et CYT2 sont transfectées dans des cellules COS-7, il apparaît que la translocation nucléaire de CYT2 est plus efficace que celle de CYT1. Cette même différence étant retrouvée dans les cellules MCF-7 exprimant naturellement les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Cette translocation plus efficace est associée à la plus forte activité kinase de CYT2 et se répercute au niveau nucléaire puisque CYT2 est un activateur transcriptionnel plus puissant que CYT1 (Sundvall et al., 2007).

Cette relocalisation plus importante de CYT2 est renforcée par le fait que cette isoforme est plus stable que CYT1. Il a été montré que CYT1 était très vite internalisé et dégradé après stimulation à la NRG (grâce à la liaison d'ITCH sur son motif PPxY), alors que CYT2 l'est beaucoup plus tardivement. En effet, la majorité de CYT1 se retrouve dans les endosomes et

est spontanément dégradé au bout de 4h alors que les niveaux de CYT2 restent très élevés même après 6h (Sundvall et al., 2008).

Le fait que CYT2 soit moins sujet à l'endocytose peut contribuer à la tumorigenèse en renforçant la signalisation des autres récepteurs de la famille, comme l'ont décrit Kiuchi *et al.* En surexprimant le récepteur EGFR et les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans des cellules MCF-7 et en étudiant la dimérisation par FRET, les auteurs ont démontré que l'isoforme JMa/CYT2 avait la plus forte propension à s'associer avec EGFR et à le maintenir à la membrane. Cette association est possible avec l'isoforme entière avant clivage ou avec le fragment m80 de CYT2.

Au niveau mécanistique, la liaison de CYT2 à EGFR pourrait séquestrer Cbl et l'empêcher d'interagir avec EGFR. Cette association se répercute sur le pouvoir migratoire des cellules puisque des cellules MCF-7 surexprimant EGFR et m80 de CYT2 ont un pouvoir migratoire supérieur aux cellules exprimant l'EGFR seul, après stimulation par l'EGF ou l'HB-EGF (Kiuchi et al., 2014). Les auteurs présentent cette capacité migratoire comme étant EGFR dépendante, puisque la seule surexpression de m80 CYT2 ne suffit pas à entraîner la migration des cellules. Cependant, il aurait été intéressant de surexprimer l'isoforme entière afin de déterminer son rôle dans la migration, puisque le fragment m80 ne peut pas lier les ligands de HER4.

Le pouvoir oncogénique de CYT2 a aussi été décrit dans d'autres types de tumeurs. Dans le cancer colorectal, la perte du suppresseur de tumeur APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) est un évènement facilitant la transition des adénomes du colon en carcinomes. La voie KITENIN (*Kai1 c-terminal Interacting TETraspaNIN*) est une voie oncogénique contribuant à cette tumorigenèse. En tentant d'identifier le facteur en lien avec KITENIN et responsable de l'activation d'AP-1 induite par l'EGF dans des cellules Caco2 surexprimant KITENIN, Bae *et al* ont d'abord mis en évidence HER4 comme étant responsable de la synergie d'AP-1 avec KITENIN après stimulation par l'EGF. C'est la présence de HER4 qui permet l'augmentation de *c-Jun*, conférant un pouvoir invasif aux cellules cancéreuses ainsi qu'une capacité de résistance vis-à-vis de thérapies anti-EGFR comme le cetuximab (Bae et al., 2014). Plus particulièrement, ce sont les isoformes JMa/CYT2 et JMb/CYT2 qui induisent l'activation d'AP-1. Ces deux isoformes sont retrouvées *in vivo* au niveau d'adénomes intestinaux, et leur expression est corrélée avec celle de KITENIN, faisant de l'axe KITENIN-HER4 CYT2 un évènement majeur de la progression tumorale (Bae et al., 2016) (**Figure 22**).

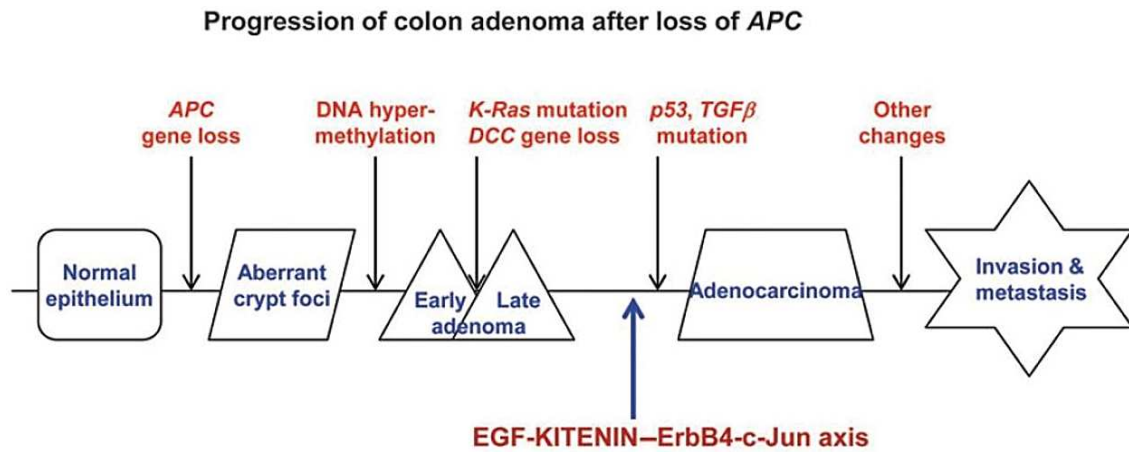


Figure 22 : L'axe KITENIN-HER4 CYT2 durant la progression tumorale dans le cancer colorectal

La perte du suppresseur de tumeur APC est un événement majeur dans la progression du cancer colorectal, et les isoformes CYT2 participent à la tumorigenèse en activant un axe EGF-KITENIN-HER4 (d'après Bae et al., 2016).

La littérature importante concernant ces différentes isoformes de HER4 nous permet d'avoir une idée assez générale sur leur rôle, où CYT1 se détache comme une isoforme avec une composante plutôt suppresseur de tumeur alors que CYT2 serait une isoforme proliférative.

c. Les isoformes « full-length » HER4 : un niveau de complexité supplémentaire !

Au niveau tumoral, les effets majeurs de la signalisation HER4 sont dus aux isoformes JMa, en premier lieu parce que les isoformes JMb sont très peu exprimées. Cette différence d'expression JMa/JMb pourrait être expliquée, d'un point de vue évolutif, par le fait que les isoformes JMa ont été sélectionnées au cours de la tumorigenèse pour leur capacité à subir le RIP, qui leur confère une signalisation robuste dirigée au noyau. Cette dernière serait plus facilement « contrôlable » par la cellule que de « simples » RTK dont la signalisation débutant à la membrane se réalise avec de nombreux intermédiaires jusqu'au noyau (**Figure 23**).

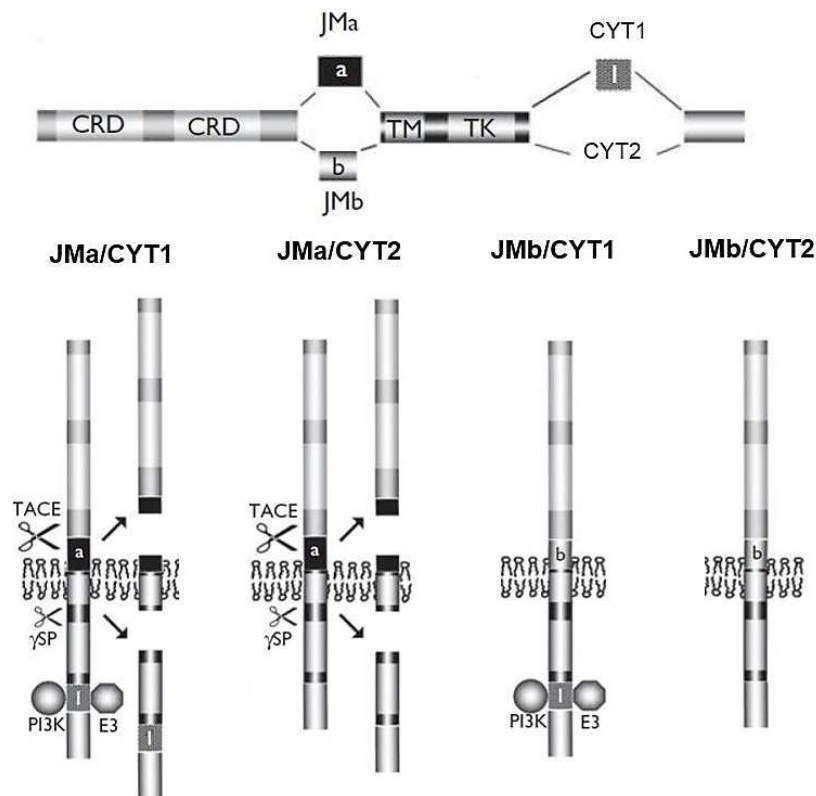


Figure 23 : Mécanisme d'action général des quatre isoformes de HER4

Les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 sont les deux isoformes les plus exprimées dans les cancers, probablement parce qu'elles peuvent engendrer les signalisations les plus variées. Au contraire des isoformes JMb/CYT1 et JMb/CYT2, dont ce schéma illustre leur degré moindre de complexité, associé à une signalisation plus classique (adapté d'après Fregnan et al., 2014).

Une approche assez intéressante par Wali *et al* récapitule bien ces effets : les auteurs ont montré dans des cellules mammaires non transformées MCF10A ou cancéreuses T-47D que, après stimulation par la NRG1, les cellules exprimant uniquement JMa/CYT1 proliféraient moins vite que les cellules contrôles, au contraire de celles exprimant uniquement JMa/CYT2 qui montraient une croissance plus rapide (Wali et al., 2014a).

Au-delà de ces effets, qui confirment la tendance qu'ont ces deux isoformes à moduler la croissance cellulaire dans des directions opposées, les auteurs ont analysé les profils transcriptionnels de cellules MCF10A stimulées ou non par la NRG1 et exprimant soit les isoformes « *full-length* » (JMa/CYT1 ou JMa/CYT2) soit seulement 4ICD-CYT1 ou -CYT2. Les résultats globaux montrent que le récepteur HER4 interagit avec énormément de voies de signalisation.

Si on compare les isoformes « *full-length* » non stimulées, 61 et 143 gènes sont significativement altérés par l'expression respective de JMa/CYT1 et JMa/CYT2, avec 52 gènes communs aux deux. Après stimulation par la NRG1, 37 gènes sont modifiés par JMa/CYT1 et 57 par JMa/CYT2, avec 24 gènes communs aux deux. De façon intéressante, beaucoup plus de gènes sont modifiés par l'expression de l'isoforme « *full-length* » JMa/CYT2

alors que c'est l'inverse lorsque l'on exprime seulement 4ICD-CYT1 ou -CYT2 : 482 gènes sont modifiés par CYT1 et 168 par CYT2. Ces différences rendent probablement compte des fonctions plus élargies conférées par les 16 AA supplémentaires de CYT1, qui peuvent conduire à des signalisations variées. Parmi tous ces gènes, il est intéressant de retrouver le gène codant pour BIK (*Bcl2-Interacting Killer*), un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 et très lié à la mitochondrie, comme cible de CYT1, alors que CYT2 régule des voies impliquées dans le cycle cellulaire et les dommages à l'ADN (Wali et al., 2014a).

Il faut cependant noter que la signalisation par les deux isoformes reste encore ambiguë. Il ressort de cette analyse que CYT1 peut exclusivement réguler des gènes liés à l'EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*), impliquant potentiellement l'isoforme dans la formation de métastases. Dans des cellules T-47D où JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont été réintroduits, la stimulation par la NRG1 conduit à l'expression du suppresseur de tumeur p63 pour les 2 isoformes, décrivant ici une activité suppresseur de tumeur pour CYT2 également. Cette dernière observation, suggérant que l'expression d'une seule isoforme du récepteur HER4 pourrait avoir un effet délétère sur les cellules, est peut-être un début de réponse au fait que l'on retrouve toujours au moins les deux isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 co-exprimées dans les cellules. L'interaction entre les deux isoformes pourrait induire une signalisation de survie.

Cette ambiguïté dans la signalisation CYT1-CYT2 se retrouve à la croisée d'une autre voie importante, la voie p53-MDM2. Alors que CYT2 semble être une isoforme proliférative, Arasada *et al* ont montré que la NRG induisait, sur des cellules ZR75-1 et de manière HER4-dépendante, la phosphorylation et l'ubiquitinylation de MDM2. Les auteurs ont confirmé cet effet sur des cellules COS-7 exprimant 4ICD-CYT2 puis dans un modèle de cellules H1299 modifiées (avec une expression inductible de p53), où son expression augmente les niveaux de p53 et p21 (Arasada and Carpenter, 2005). Même si les auteurs n'ont pas étudié l'effet de CYT1, cette étude démontre un effet potentiel suppresseur de tumeur pour CYT2.

A contrario, et même si ici encore on n'a aucune idée des isoformes impliquées, Gerarduzzi *et al* ont démontré que, après stimulation de la lignée MCF-7 par la NRG1, HER4 stabilisait le complexe MDM2-MDMX pour réprimer l'activité de p53 (Gerarduzzi et al., 2016). Enfin, CYT1 et CYT2 ont été tous les deux décrits comme pouvant interagir avec Kap1, un co-répresseur transcriptionnel impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN. Dans des cellules de cancer du sein BT-474 et T-47D, Kap1 et HER4 interagissent ensemble grâce à MDM2, et Kap1 induit la répression de l'activité transcriptionnelle de HER4 (Gilmore-Hebert et al., 2010). Comme MDM2 semble ici jouer un rôle d'adaptateur moléculaire, il reste à déterminer l'implication de MDM2 dans les signalisations oncogéniques et suppresseurs de tumeur de HER4.

La dernière étude de Wali peut donc servir de base pour disséquer la signalisation isoforme-dépendante de HER4, où il serait notamment intéressant d'étudier les gènes modifiés par l'isoforme JMa/CYT1 après stimulation par la NRG1, en se focalisant sur ceux pouvant induire la mort cellulaire.

Enfin, cette analyse a permis de découvrir des voies peut-être insoupçonnées et régulées par HER4. Le même groupe a ainsi mis en évidence l'interaction de CYT1 et CYT2 avec des gènes contrôlant le métabolisme énergétique. Indépendant des isoformes, la NRG1 *via* HER4 activerait SREBP-2 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-2*) et la voie du mévalonate pour augmenter la biosynthèse du cholestérol (Haskins et al., 2015). Toujours en lien avec le métabolisme, HER4 a été décrit comme étant *up-régulé* par de forts taux de glucose et activant la voie mTOR/S6K, dans un modèle de diabète associé aux maladies neurodégénératives. Malheureusement, nous n'avons aucune idée sur les isoformes impliquées (Nie et al., 2018).

En conclusion, il reste de manière générale très difficile d'établir avec certitude les rôles de chaque isoforme « *full-length* » JMa/CYT1, JMa/CYT2, JMb/CYT1 et JMb/CYT2, d'autant plus que de nombreuses interactions et activités biologiques semblent être tissu-dépendantes.

4. Le cas particulier de la NRG sur HER4 : effets oncogéniques et suppresseurs de tumeur

Comme présenté un peu plus haut, les NRG sont les ligands majeurs du récepteur HER4. Ces facteurs de croissance sont vitaux pour le fonctionnement du cœur et du cerveau en particulier (**Figure 24**), et une dérégulation de ces axes peut mener à de nombreuses pathologies.

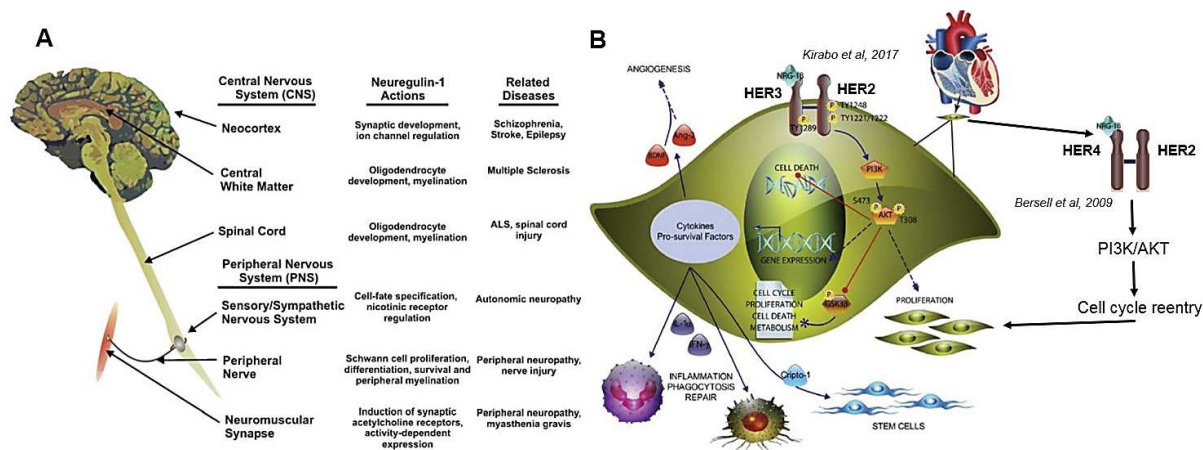


Figure 24 : La NRG1, essentielle à l'homéostasie neuronale et cardiaque

(A) La NRG1 est impliquée dans de nombreuses fonctions neuronales et des dérégulations de l'axe NRG1-HER4 en particulier sont responsables de nombreuses pathologies **(B)** Au niveau cardiaque, l'axe NRG1-HER4-HER2 est nécessaire à la prolifération des cardiomyocytes et promeut la régénération du myocarde (modifié d'après Esper et al., 2006 ; Kirabo et al., 2017 ; Bersell et al., 2009)

Dans les cancers, il est maintenant bien admis que la NRG1 joue un rôle pro-tumoral depuis la découverte de son implication dans la formation des hétérodimères de signalisation HER2/HER3. Cet axe NRG1-HER2-HER3 étant clairement identifié, de nombreuses thérapies visant à perturber ce dernier sont maintenant élaborées (Mota et al., 2017).

Alors que l'on pourrait penser que la NRG1 joue ce même rôle pro-prolifératif sur HER4, de nombreuses évidences indiquent que ce ligand peut dans certaines conditions induire une inhibition de prolifération *via* ce récepteur. Ces effets opposés, probablement médiés par les différentes isoformes du récepteur HER4, ajoutent une complexité supplémentaire à l'élucidation du rôle du récepteur HER4 dans l'oncogenèse.

a. L'axe NRG-HER4 : une signalisation oncogénique

Comme pour HER3, le récepteur HER4 a été décrit comme induisant de la prolifération après stimulation par la NRG. Dans des cellules HeLa de cancer du col de l'utérus où les récepteurs HER2 et HER4 sont majoritairement exprimés, la NRG1 recombinante induit la prolifération des cellules de manière dose-dépendante. HER4 active les voies ERK1/2, la phosphorylation de SRF et l'expression de *c-Fos* (Eto et al., 2010). Dans une série d'échantillons de patientes atteintes de cancer de l'ovaire, la NRG1 a été décrite comme étant exprimée dans environ 75% des tumeurs (expression déterminée par IHC) et significativement corrélée à celle de HER4, suggérant un axe NRG1-HER4 prolifératif dont CYT1 pourrait avoir une influence, comme démontré dans l'étude de Paatero. La prolifération induite par la NRG1 a été confirmée sur plusieurs lignées cancéreuses ovariennes et associée à la présence de HER4 (Gilmour et al., 2002).

D'autres stratégies ont été utilisées pour démontrer un effet pro-prolifératif de la NRG1 sur HER4. En utilisant un système de ribozyme pour dégrader l'ARNm du récepteur HER4, Tang *et al* ont démontré que HER4 était nécessaire à l'activité proliférative de la NRG1 dans des cellules de cancer du sein T-47D (Tang et al., 1998). Okazaki *et al* ont démontré que la NRG1 augmentait la formation de colonies dans des cellules de cancer du sein MCF-7 (Okazaki et al., 2016). Enfin, il a été démontré que l'expression de HER4 et de la NRG1 était augmentée chez des patients atteints de cancer du poumon NSCLC et rechutant après chimiothérapie. Cet axe est impliqué dans la résistance aux traitements. Dans ce cadre, un anticorps anti-NRG1 améliore la durée de la réponse aux chimiothérapies et la combinaison de la gemcitabine avec un anticorps anti-HER4 semble empêcher les rechutes (Hegde et al., 2013).

La NRG1 peut effectivement induire prolifération et survie *via* HER4. Comme l'ont décrit Goldshmit *et al* dans un modèle de cellules de rat surexprimant HER4, où la NRG1 protège les cellules de l'apoptose induite par l'H₂O₂ en activant la voie AKT (Goldshmit et al., 2001), ainsi qu'Elenius en démontrant que ce sont les isoformes CYT1 qui peuvent directement activer cette voie.

Toutefois, de nombreuses études décrivent un effet suppresseur de tumeur de la NRG1 lorsqu'elle se lie au récepteur HER4. Ainsi, l'étude de Määttä *et al* a montré que la NRG1 induisait un effet anti-prolifératif sur les cellules exprimant les isoformes JMa/CYT1 et JMb/CYT2 (Määttä et al., 2006).

b. L'axe NRG-HER4 : une signalisation suppresseur de tumeur

Etant donné le rôle important de HER4 lors du développement embryonnaire ou lors de la formation de la glande mammaire (Jones, 2008), en induisant un processus apoptotique, il est possible qu'une ou plusieurs des isoformes de HER4 possède une capacité de suppression de tumeur. Cette hypothèse pourrait alors expliquer pourquoi, alors que tous les récepteurs HER sont surexprimés lors de la progression tumorale, seule l'expression de HER4 semble perdue au cours de cette dernière.

Les premières études décrivant une inhibition de croissance après stimulation par la NRG datent de 1998. Furger *et al* ont montré que la lignée COV434 de cancer de la granulosa, exprimant fortement HER4, était sensible à l'action cytotoxique de la NRG1β2 fusionnée à une toxine, alors que cette dernière n'avait aucun effet sur des cellules n'exprimant pas HER4 (Furger et al., 1998).

L'étude la plus intéressante démontrant cet effet est celle de Das *et al* datant de 2010. Les auteurs ont ainsi découvert, par pyroséquençage, que le promoteur de HER4 était hyperméthylé dans les lignées de cancer du sein triple-négatif (TNBC) n'exprimant pas HER4.

Ce n'est pas le cas dans des lignées de cancer du sein exprimant HER4 comme les T-47D, avec une très forte corrélation entre les taux de méthylation et d'expression de HER4. Dans le cancer du sein, une hyperméthylation aberrante des îlots CpG sur les promoteurs des gènes est un mécanisme courant de l'inactivation de gènes suppresseur de tumeur. Après avoir traité des cellules BT20 (TNBC) avec un agent déméthylant pour induire la réexpression de HER4, les auteurs ont montré que l'ajout de NRG1 sur ces cellules induisait plus de 30% de mort cellulaire à 48h. Cet effet est HER4-dépendant puisqu'un siRNA dirigé contre le récepteur abolit cet effet (Das et al., 2010). La corrélation au niveau clinique entre hyperméthylation du récepteur et diminution de la survie des patientes atteintes de cancer du sein fournit une preuve supplémentaire quant à l'effet suppresseur de tumeur de HER4.

De plus, le fait que le gène de la NRG1 soit lui aussi fréquemment méthylé dans les cancers suggère un effet suppresseur de tumeur pour ce ligand, de la même manière que pour HER4. Chua *et al* ont analysé la méthylation du gène de la NRG1 dans une série de lignées de cancer du sein et ont décrit une très forte corrélation de la méthylation de la NRG1 avec l'absence de transcrits. Dans des lignées cancéreuses exprimant la NRG1, des siRNA dirigés contre cette dernière augmentent la prolifération cellulaire, suggérant le gène de la NRG1 comme un gène candidat à la suppression de tumeur (Chua et al., 2009).

Une observation très intéressante peut être faite à ce stade. Le fait que les lignées T-47D ou BT-474 qui expriment le récepteur HER4, montrent une forte méthylation du gène de la NRG1 va dans le sens d'un effet suppresseur de tumeur de la NRG1 sur HER4. En effet, il n'est pas « concevable » pour les cellules tumorales d'exprimer le récepteur suppresseur de tumeur HER4 et son ligand en même temps. Il serait intéressant d'étudier l'expression de HER4 dans des tumeurs n'exprimant pas la NRG1, et inversement. De plus, cette observation pourrait être prise en compte lors de la recherche de biomarqueurs relatifs à HER4 chez les patients ou pour sélectionner ceux qui pourraient bénéficier d'une éventuelle thérapie à base d'anticorps anti-HER4.

La NRG1 n'est pas le seul candidat à la suppression de tumeur. En lien avec l'observation faite plus haut, l'expression de la NRG4 et son récepteur HER4 a été décrite comme étant diminuée dans le cancer gastrique, sur une cohorte de 38 patients dont les échantillons ont été analysés par RT-qPCR et IHC (Nielsen et al., 2014a). En comparant les niveaux d'expression des récepteurs HER et de leurs ligands entre les tissus tumoraux et les tissus sains adjacents, les auteurs ont mis en évidence une diminution d'expression significative du récepteur HER4, alors que les niveaux d'expression d'EGFR, HER2 et HER3 varient très peu. Cette diminution de HER4, associée à la diminution de l'expression de la NRG4, confirme d'une part cette tendance à la suppression de tumeur médiée par la NRG mais introduit aussi ce ligand comme un nouvel acteur de cette signalisation.

Comme pour la NRG1, une activité pro-apoptotique de la NRG4 a été mise en évidence, ce qui pourrait expliquer sa *down-régulation* ainsi que celle de HER4 dans les cancers. Observant que l'expression de HER4 était induite dans un contexte inflammatoire pour y jouer un rôle protecteur et que la NRG4 pouvait participer à cette protection, Michael Schumacher a formulé l'hypothèse que l'axe NRG4-HER4, en induisant l'apoptose des macrophages pro-inflammatoires, était un mécanisme de terminaison de la réponse inflammatoire garantissant l'homéostasie tissulaire (Schumacher et al., 2017). Les auteurs démontrent ainsi dans cette étude que des facteurs pro-inflammatoires comme l'IFN γ (interféron- γ) induisent sélectivement l'expression de HER4 dans des macrophages M1 dits « pro-inflammatoires » par rapport aux macrophages M2 dits « anti-inflammatoires » où son expression est diminuée par l'IL-4 (interleukine-4). Cette expression dans les macrophages M1, associée à une stimulation par la NRG4 conduit à l'apoptose de ces derniers, comme l'indiquent le clivage de la caspase-3 et le marquage Annexin-V/IP. Dans ce modèle, les auteurs démontrent qu'après stimulation par la NRG4, 4ICD est relocalisé à la mitochondrie et induit une dépolarisation mitochondriale, ce qui suggère un relargage du cytochrome c qui serait responsable de la mort caspase-dépendante observée.

De manière intéressante, Schumacher et Naresh ont décrit cette relocalisation de 4ICD à la mitochondrie avec différents ligands de HER4. L'effet de ces deux ligands, bien qu'appartenant à la même famille des NRG mais induisant une même relocalisation de 4ICD, suggère qu'il serait possible d'induire cette même localisation avec d'autres ligands du récepteur comme des anticorps. Ces hypothèses et les moyens pour y parvenir seront décrits dans la partie « Résultats » de cette thèse.

De plus, l'observation par Hei *et al* d'une expression concomitante de la NRG1 et de HER4 positivement corrélée au degré d'apoptose neuronale, dans un modèle d'ischémie induite dans l'hippocampe (Hei et al., 2018), joue en faveur d'une action pro-apoptotique de la NRG par son récepteur HER4.

S'il semble maintenant bien établi que la NRG peut induire de la mort cellulaire, ses mécanismes d'action ne sont cependant pas bien élucidés. En effet, la NRG n'a pas été uniquement décrite comme pouvant induire de la mort *via* HER4 (même si ce serait le contributeur majeur) puisque certaines études indiquent que la mort cellulaire induite par la NRG serait dépendante des niveaux d'expression de HER2. Les voies de signalisation sont aussi mal définies puisque ces morts cellulaires induites pourraient faire intervenir les voies p38 MAPK, JNK ou encore mTOR/S6K (Le et al., 2002). Enfin, il est préférable de parler de types de morts cellulaires et non pas uniquement d'apoptose car de nombreuses observations suggèrent l'implication de mécanismes caspases-indépendants, la NRG1 pouvant par exemple engendrer de la mort cellulaire autophagique (Schmukler et al., 2012).

C - Expressions physiologique et tumorale du récepteur HER4

1. Expression physiologique

Le récepteur HER4 est absolument essentiel au développement et à l'homéostasie de nombreux systèmes (systèmes gastro-intestinal, reproductif, nerveux, endocrinien) et organes (cerveau, cœur, poumons, reins, peau). L'expression de HER4 est la plus forte dans le système nerveux, les testicules, les reins et les glandes salivaires. L'expression du récepteur est légèrement plus faible dans le cœur, le sein et les poumons mais néanmoins indispensable à leur fonctionnement (**Figure 25**) :

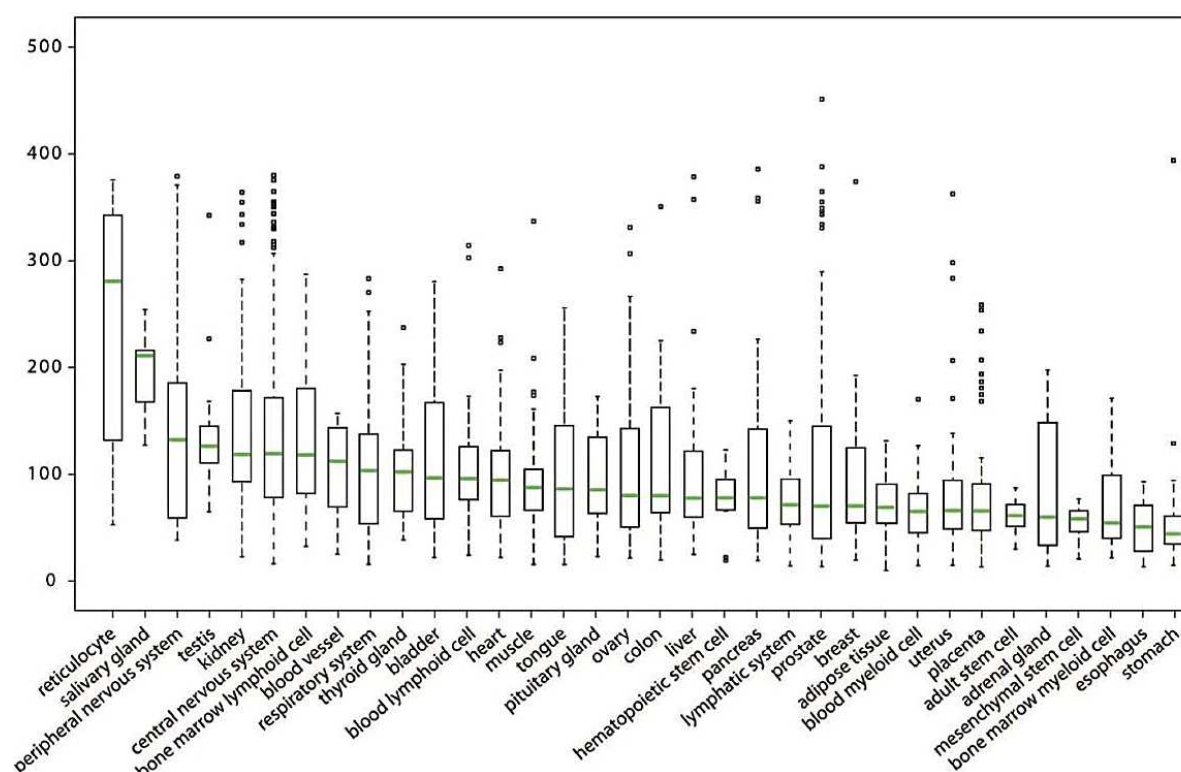


Figure 25 : Expression physiologique du récepteur HER4 dans différents organes

Analyse *in silico* de l'expression de l'ARNm de HER4 dans différents organes et tissus sains. La majorité des tissus du corps humains expriment le récepteur HER4, essentiel au développement et fonctions du cœur et du système nerveux en particulier (d'après Veikkolainen et al., 2011).

Des souris KO pour le récepteur HER4 présentent des défauts de migration des cellules neuronales et meurent au 11^{ème} jour embryonnaire de malformations cardiaques. Ces défauts dans la migration cellulaire induisent à terme une architecture neuronale aberrante et l'absence de HER4 conduit à des défauts de formation de la glande mammaire (Tidcombe et al., 2003).

Lors du développement neuronal, toutes les isoformes de HER4 sont exprimées par les cellules progénitrices et possèdent la capacité de lier la NRG1 transmembranaire

présentée par les cellules voisines (Fregnan et al., 2014). Cela suggère que toutes les isoformes ont une capacité migratoire dans cet environnement, puisque c'est le récepteur HER4 qui est responsable de l'architecture neuronale (Anton et al., 2004). Associée à cette régulation spatiale, HER4 régule aussi de manière temporelle le réseau neuronal.

Ce récepteur peut induire, grâce à 4ICD, la répression transcriptionnelle de gènes impliqués dans le développement des astrocytes, contrôlant ainsi précisément le développement du cerveau (Sardi et al., 2006). De manière intéressante, l'ECD du récepteur HER4 a aussi été décrit comme pouvant jouer un rôle dans la migration et l'homéostasie neuronale en induisant la régénération des fibres nerveuses (Gambarotta et al., 2015). Ces observations indiquent que l'ECD et l'ICD du récepteur HER4 sont importants pour garantir le bon fonctionnement du cerveau.

Ainsi, il n'est pas étonnant de retrouver le récepteur HER4 impliqué dans de nombreuses pathologies neuronales comme Alzheimer, où HER4 a été décrit comme colocalisé avec BAX dans les neurones apoptotiques (suggérant que l'apoptose dans cette pathologie pourrait être induite par 4ICD à la mitochondrie) (Woo et al., 2010), la schizophrénie où la NRG1 diminuerait l'activation des récepteurs NMDA *via* HER4 (Hahn et al., 2006) ou encore dans la SLA (Sclérose Latérale Amyotrophique, aussi appelée maladie de Charcot) où une mutation germinale de son gène serait en cause. Son expression dans ces pathologies peut ouvrir des perspectives thérapeutiques intéressantes, puisqu'il a par exemple été décrit une augmentation de l'expression de HER4 dans les neurones dopaminergiques de patients décédés de la maladie de Parkinson (Depboylu et al., 2012).

Le second organe extrêmement dépendant du récepteur HER4 pour son développement et sa régulation est le cœur. Co-exprimé avec HER2, qui est lui aussi indispensable au fonctionnement cardiaque notamment lors de la formation des ventricules, l'axe NRG-HER4 sur le cœur induit l'activation de la voie p38 MAPK et du facteur de transcription GATA4, résultant en la formation des cardiomyocytes. un KO du récepteur HER4 entraîne la perte de ces derniers (Ramachandra et al., 2016). De la même manière que dans le cerveau au niveau physiologique, la liaison de la NRG1 sur HER4 entraîne des effets bénéfiques sur la régénération.

En effet, la NRG1 en se fixant sur les hétérodimères HER2/HER4 stimule la réentrée dans le cycle cellulaire et la division de cardiomyocytes différenciés, HER4 contrôlant toujours la prolifération de ces derniers (Bersell et al., 2009). Contrairement au cerveau, seules les isoformes JMb sont exprimées dans le cœur, avec une plus forte expression de CYT1 par rapport à CYT2 (**Figure 26**). Dans cet organe, la signalisation est assurée par ces isoformes « *full-length* » non clivables, qui peuvent migrer entièrement au noyau (Icli et al., 2012).

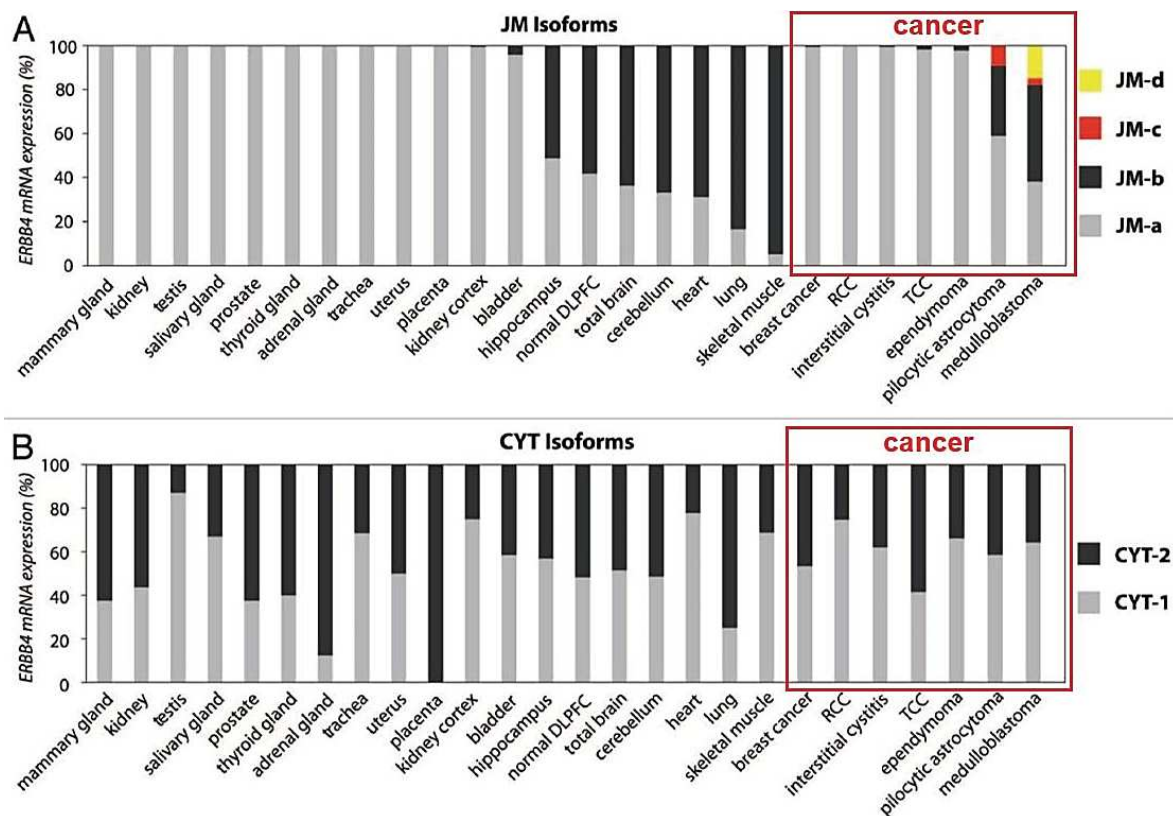


Figure 26 : Expression physiologique des isoformes JM et CYT dans les différents tissus

(A) La majorité des tissus exprime seulement les isoformes clivables JMa. Le cœur, les poumons et les muscles squelettiques expriment quasi-exclusivement les isoformes non clivables JMb. Les isoformes JMc et JMd, très rarement exprimées, sont surtout retrouvées dans les tumeurs du cerveau. **(B)** L'expression des isoformes CYT1 et CYT2 est globalement assez homogène dans tous les tissus, avec là encore quelques exceptions puisque les testicules et le cœur expriment majoritairement CYT1 alors que le placenta exprime exclusivement CYT2 (adapté d'après Veikkolainen et al., 2011).

Au niveau thérapeutique, se servir de l'axe NRG1-HER4 pourrait être intéressant et envisageable pour traiter les accidents cardiaques. Des conditions de stress oxydatif, souvent associées à ce type de pathologies, peuvent induire l'activation de HER4 par la NRG1, activer la voie PI3K/AKT et inhiber la dépolarisation mitochondriale, résultant en la survie des cardiomyocytes (Kuramochi et al., 2004) (Jie et al., 2012).

Le récepteur HER4 est le récepteur le plus important pour assurer le développement et les fonctions de la glande mammaire tout au long de la vie, notamment au cours de la grossesse où il est en partie responsable de la mise en place de la lactation. Dans ce tissu, seules les isoformes clivables JMa sont présentes, permettant une signalisation de 4ICD au noyau et l'induction de gènes nécessaires à cette adaptation (Williams et al., 2004). La mise en place de la lactation nécessite un remodelage de la glande mammaire, puisqu'il lui faut alors assurer une fonction de production du lait et de son acheminement jusqu'au mamelon. Certaines cellules vont acquérir cette capacité de production et d'autres vont devoir être réorganisées pour assurer ce transport. Ces fonctions sont médiées par le récepteur HER4. Des perturbations dans cette signalisation se traduisent dès le 12^{ème} jour de la lactation par

des défauts dans le développement lobulo-alvéolaire et dans l'expression des protéines de lactosérum comme la β -caséine (Jones, 2008). Cette signalisation est induite par la NRG1, peut-être médiée par CYT1 et CYT2 (Muraoka-Cook et al., 2006b) mais agit aussi de concert avec celle de la prolactine pour induire l'expression de gènes médiés par STAT5A (Muraoka-Cook et al., 2008). Enfin, une apoptose physiologique est déclenchée après le sevrage, marquant le début de l'involution de la glande mammaire. Cette apoptose, permettant au sein de retrouver plus ou moins sa structure initiale, implique aussi très probablement le récepteur HER4, fournissant un argument fort dans l'hypothèse d'une fonction suppresseur de tumeur activable par HER4. Cette fonction si elle est activée pourrait potentiellement être une faille dans les mécanismes de survie des cellules cancéreuses, pouvant expliquer pourquoi l'expression du récepteur HER4 semble être perdu au cours de la progression tumorale (Figure 27).

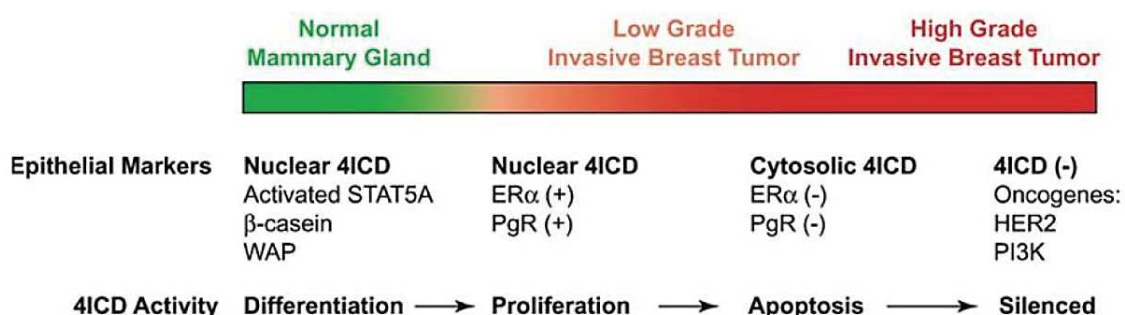


Figure 27 : Perte progressive du récepteur HER4 au cours de la progression tumorale

Expression et activité de 4ICD dans la glande mammaire et au cours de la progression tumorale du cancer du sein. L'hypothèse d'une fonction suppresseur de tumeur pour 4ICD pourrait expliquer la perte d'expression de HER4 au cours du temps, suggérant d'un point de vue thérapeutique un ciblage du récepteur HER4 dès les premiers stades du cancer (d'après Jones, 2008).

L'expression de HER4 dans ces trois tissus (neuronale, cardiaque et mammaire) est primordial pour leur développement, mais le récepteur HER4 est aussi exprimé et nécessaire à d'autres organes, comme dans les testicules où il contrôle l'organisation des tubes séminifères et la maturation des cellules de Sertoli (Naillat et al., 2014), sur l'embryon dont il permet l'adhésion à l'endomètre (Chobotova et al., 2002), au niveau rénal où il est responsable de la formation et de la polarisation des tubules rénaux (Veikkolainen et al., 2012), ou encore au niveau des poumons où l'axe NRG-HER4 est nécessaire à la production de surfactant (Liu et al., 2010).

Etant donné le rôle important du récepteur HER4 au niveau physiologique, dont quelques exemples viennent d'être présentés, il n'est pas étonnant de retrouver ce récepteur surexprimé et impliqué dans de nombreux cancers. De manière intéressante et à titre d'exemple, dans un modèle de souris transgéniques exprimant JMa/CYT1 ou JMa/CYT2, Wali

et al/ ont étudié le rôle de ces isoformes sur le développement mammaire et ont décrit une fonction inhibitrice plus prononcée pour CYT1 que pour CYT2 au cours du développement. Cependant, une expression soutenue de cette isoforme JMa/CYT1 dans le temps conduit à la formation de lésions néoplasiques (Wali et al., 2014b). Ces observations suggèrent un contrôle temporel bien défini de la fonction suppressive de CYT1 au cours du développement. Des défauts de ce contrôle associés à d'autres événements lors de l'oncogenèse pourraient « switcher » les fonctions de cette isoforme, la faisant passer d'une isoforme suppresseur de tumeur à une isoforme oncogénique comme JMa/CYT2.

2. Expression tumorale

De manière globale, alors qu'EGFR, HER2 et HER3 sont largement exprimés au niveau tumoral, l'expression de HER4 est relativement faible. Bien entendu, ces niveaux d'expression dépendent du type de cancer, puisque l'expression de HER4 au niveau tumoral est quasi-systématique dans les cancers issus de tissus où le récepteur joue un rôle majeur comme le cerveau, le sein ou le poumon (**Tableau 5**). HER4 a été décrit comme un « *driver* » oncogénique dans certains cancers comme le mélanome ou le cancer du poumon.

La principale explication à cette plus faible expression est que si ces trois premiers récepteurs sont décrits comme des oncogènes stricts dont l'expression tumorale est corrélée à un mauvais pronostic, la signification de l'expression de HER4 dans les cancers est très différente de celle des trois autres récepteurs (**Figure 28**).

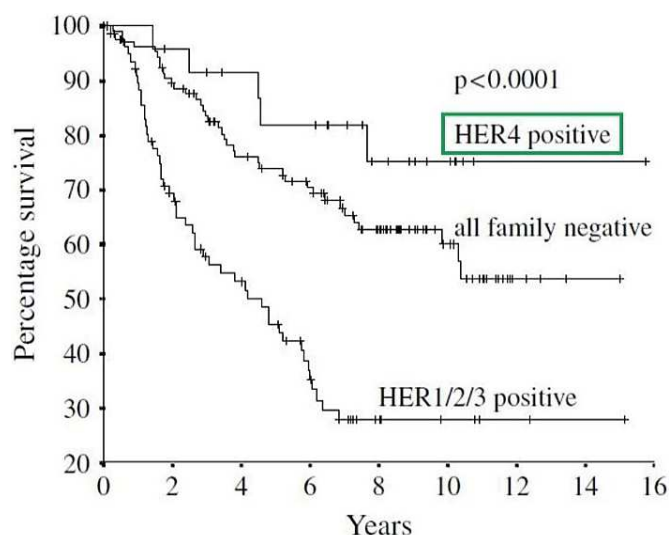


Figure 28 : Kaplan-Meier représentatif de l'expression de HER1/2/3 versus HER4 sur la survie

220 échantillons de patientes atteintes de cancer du sein ont été analysés par IHC pour l'expression des quatre récepteurs HER. Ce Kaplan-Meier est représentatif de ce que l'on peut retrouver généralement au niveau tumoral, à savoir que l'expression de HER4 est souvent associée à un meilleur pronostic (d'après Witton et al., 2003).

Cancer	n	Method	Ab	ErbB4 expression	Association with ErbB4 expression	Ref.
Breast						
ErbB2-negative	171	IHC		19% moderate or strong		[70]
	268	RT-PCR	–		Increased DFS	[73]
	278	FISH/IHC	83B10	37% overexpression	Tendency for decreased OS	[74]
ER+	89	IHC	RB-9045	Overexpression in 17% tamoxifene-sensitive, 9% in tamoxifene-resistant	Loss of ErbB4 independent marker of tamoxifene resistance	[78]
	402	IHC	HFR-1, HA.77.16		Decreased survival when ErbB4 nuclear	[137]
DCIS	129	IHC	sc-283	63% in nonrecurred, 36% in recurred DCIS	Nonrecurrence and ER+	[69]
	458/62	IHC/RT-PCR	HFR-1	IHC: strong 46%, weak 34%; RT-PCR: 19% JM-a overexpression	Decreased survival when ErbB4 nuclear vs membrane-associated	[11]
Invasive	1513	IHC	HFR-1	45% strong, 34% weak	Increased DFS	[67]
	130	RT-PCR	–	30% overexpression, 25% downregulation	ER+ and decreased RFS	[81]
	220	IHC	HA.77.16	12% overexpression	ER+ and increased survival	[77]
LN+	66	IHC	HFR-1	92% cytoplasmic, 85% nuclear	Decreased survival when ErbB4 in cytoplasm	[82]
	100	IHC/RT-PCR	sc-283	82%	Increased DFS in ErbB2+ tumors	[76]
	365	RT-PCR	–		Increased RFS and OS	[138]
Invasive	178	IHC	HFR-1/sc-283	18% high, 7% low, 49% nuclear	Low grade when ErbB4 nuclear	[75]
	127	IHC	HFR-1	58% cytoplasmic, 41% membranous, 25% nuclear	Differentiated phenotype	[71]
	47	RT-PCR	–		ER+ and EGFR	[72]
	94	IHC	sc-283	50%	ER+, PgR+, ErbB2	[68]
Brain						
Meningioma		RT-PCR	–	Downregulation		[92]
MB/PA		RT-PCR	–	JM-a isoform upregulated in MB and PA		[12]
Glioblastoma	21	IHC		100%		[91]
MB	26	IHC/RT-PCR	sc-283	IHC: 42% overexpression, nuclear RT-PCR: upregulation of CYT-1	CYT-1:CYT-2 ratio associates with more aggressive disease	[93]
Ependymoma	121	IHC/RT-PCR	sc-283	IHC: 100% coexpressed with ErbB2 RT-PCR: overexpression of JM-a	Coexpression with ErbB2 associates with enhanced proliferation	[90]
MB	65	IHC	sc-283	54% coexpression with ErbB2	Decreased survival	[89]
Colorectal						
Primary and metastatic	64	IHC	RB-9045	81% in both primary and metastatic tumors		[13]
Stage II/III	109	IHC	RB-9045	11% membranous, 19% cytoplasmic	Membranous ErbB4 staining associates with recurrence	[96]
Colon/metastatic LN	127/47	IHC	sc-283	37%/27% overexpression		[139]
	106	IHC	HFR-1	19% membranous, 30% cytoplasmic	LN+	[95]
	125	IHC	sc-283	18% +, 4% ++ immunoreactivity	Coexpression with ErbB2 in late stage associates with decreased OS	[94]
Ab: Antibody; DCIS: Ductal carcinoma in situ; DFS: Disease-free survival; ER: Estrogen receptor; FISH: Fluorescence in situ hybridization; HNSCC: Head and neck; IHC: Immunohistochemistry; LN: Lymph node; MB: Medulloblastoma; n: Number of patients; NSCLC: Non-small-cell lung cancer; OS: Overall survival; PgR: Progesterone receptor; PA: Pilocytic astrocytoma; RFS: Relapse-free survival; RT: Reverse transcription.						

Tableau 5 : Expression tumorale du récepteur HER4

Le récepteur HER4 est exprimé à différents niveaux dans de nombreux cancers, et plus particulièrement dans les cancers du cerveau, du poumon et du sein (d'après Hollmén and Elenius, 2010).

Cancer	n	Method	Ab	ErbB4 expression	Association with ErbB4 expression	Ref.
Squamous cell carcinoma						
Esophageal	61	IHC	sc-283	84% cytoplasmic and membranous, 61% nuclear	Increased survival; reduced survival when ErbB4 nuclear	[15]
Dysplastic/ HNSCC (oral)	23/26	IHC	HFR-1	30%/26% nuclear		[140]
HNSCC	38	IHC	sc-283	26% strong, 50% weak	Nuclear ErbB4 immunoreactivity independent of overexpression and differentiation	[97]
HNSCC (oral)	111	IHC	sc-283	14% high, 36% intermediate	Metastasis and decreased survival	[98]
Cervix	56	IHC	sc-283	68% overexpression, coexpression with EGFR		[141]
Ovarian						
Benign/ malignant	200	ELISA/ RT-PCR	—	Overexpression in malignant disease, coexpression with ErbB2 and ErbB3		[105]
	53	IHC/ RT-PCR	HFR-1/ HA.77.16	93%/89% with the two antibodies RT-PCR: both JM-a and JM-b		[107]
Endometrial						
	106	IHC			No associations with grade or stage	[106]
	45	IHC/ RT-PCR	HFR-1	Overexpression of both protein and mRNA		[142]
	41	IHC	HFR-1	15% overexpression		[108]
Bladder						
	248	IHC	RB-9045	Downregulation	Nonpapillary histology, high grade, invasiveness and decreased survival	[99]
	73	RT-PCR	—	Downregulation		[143]
	88	RT-PCR	-	63% high expression	Increased survival in tumors coexpressing EGFR or ErbB2	[100]
	245	IHC	sc-283	30%	No significant associations	[144]
Lung						
Carcinoid	31	IHC	sc-283	100% moderate-to-intense staining		[14]
NSCLC	40	IHC		50%	No significant associations	[145]
NSCLC	20	IHC	sc-283	25%	Resistance to chemotherapy	[102]
Thyroid						
	205	IHC	HFR-1	73%, decreased compared with benign	Small tumor size	[101]
Prostate						
	50	IHC		Overexpression 60% of which cytoplasmic 38%, nuclear 34%	No significant associations	[109]
Sarcoma						
Bone	21	IHC	sc-283	48%	Poor histologic response and short DFS	[103]
Soft-tissue	29	IHC	sc-283	Overexpression	Upregulation of ErbB4 associates with response to chemotherapy and short DFS	[104]
Ab: Antibody; DCIS: Ductal carcinoma in situ; DFS: Disease-free survival; ER: Estrogen receptor; FISH: Fluorescence in situ hybridization; HNSCC: Head and neck; IHC: Immunohistochemistry; LN: Lymph node; MB: Medulloblastoma; n: Number of patients; NSCLC: Non-small-cell lung cancer; OS: Overall survival; PgR: Progesterone receptor; PA: Pilocytic astrocytoma; RFS: Relapse-free survival; RT: Reverse transcription.						

(Suite du tableau précédent)

A la vue de ce profil général, le récepteur HER4 ne peut pas être considéré comme un oncogène mais paradoxalement pas comme un suppresseur de tumeur non plus, puisqu'il a été démontré *in vivo* que la présence ou non du récepteur HER4 n'influait pas le développement de tumeurs induites par HER2 (Jackson-Fisher et al., 2006). Le fait que l'activité kinase de HER2 soit requise pour l'induction de la prolifération par le récepteur HER4 (Mill et al., 2011) mais, qu'en même temps, l'expression de HER4 réduise l'effet oncogénique de HER2 au niveau clinique entretient le flou concernant le véritable rôle de ce récepteur (Suo et al., 2002).

De nombreuses études sont contradictoires à ce sujet. Ainsi la surexpression des MMP, fortement impliquées dans l'invasion et la formation de métastases dans le cancer du sein, induit la tumorigénèse en solubilisant l'HB-EGF et en augmentant l'expression de HER4 (Lynch et al., 2007). Par contre, l'expression de HER4 est corrélée à une meilleure réponse chez des patientes traitées par trastuzumab dans le cancer du sein métastatique (Sassen et al., 2009).

Si de nombreuses études associent l'expression de HER4 à une meilleure survie des patients, d'autres études observent un effet opposé. Cette dichotomie est surtout très présente dans le cancer du sein, où le rôle de HER4 paraît le plus difficile à interpréter (**Figure 29**).

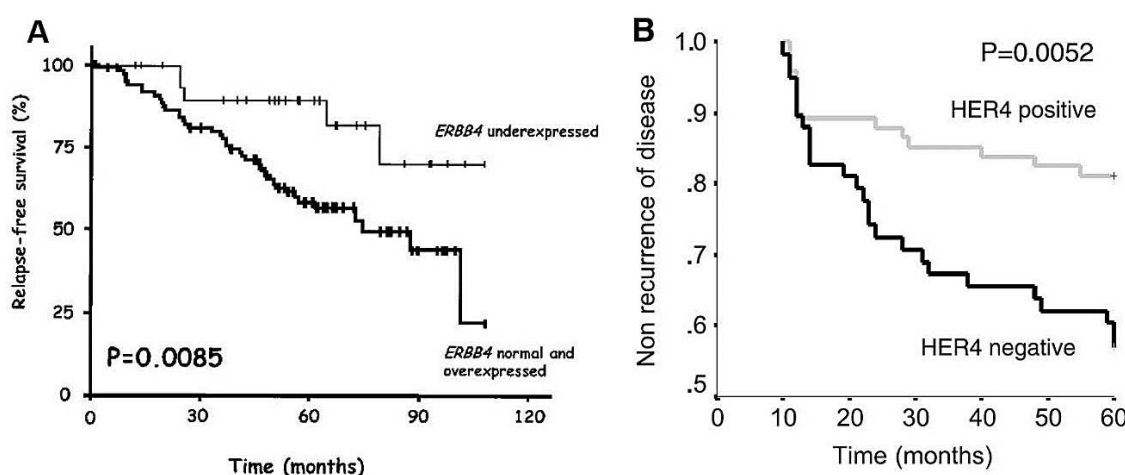


Figure 29 : Effets opposés de l'expression de HER4 sur la survie sans récurrence dans le cancer du sein

Exemple représentatif de la dichotomie de l'expression de HER4 sur la survie de patientes atteintes de cancer du sein. **(A)** Expression mesurée par RT-qPCR sur 130 échantillons de patientes atteintes de cancer du sein. La présence de HER4 est associée à un mauvais pronostic et à une plus forte rechute (Bièche et al., 2003) **(B)** Expression mesurée par IHC sur 39 échantillons de patientes atteintes de cancer du sein. La présence de HER4 est associée à une meilleure survie sans récurrence et « protège » de l'effet oncogénique de HER2 (Barnes et al., 2005).

Ces résultats contradictoires sont dus au fait que ces études présentent l'expression du récepteur HER4 indépendamment de ses isoformes, avec des amorces de PCR amplifiant une partie commune à toutes les isoformes ou des anticorps pour l'IHC reconnaissant un

épitope commun à ces dernières. Les différentes isoformes du récepteur HER4 peuvent induire une multitude de signalisations allant de la prolifération à l'apoptose, et la localisation subcellulaire de 4ICD est cruciale pour ces réponses.

Il est indispensable de pouvoir associer l'expression de ces différentes isoformes à un pronostic clinique. Malheureusement, comme il n'existe à l'heure actuelle aucun anticorps permettant de différencier les isoformes entre elles, l'expression de HER4 révélée par IHC ne peut fournir qu'une information sur son expression globale à la membrane ou au noyau. Concernant l'expression au niveau ARNm, des amorces PCR amplifiant spécifiquement les isoformes JMa, JMb, CYT1 et CYT2 ont été dessinées pour étudier les différentes isoformes, permettant de faire le lien entre leur expression et le pronostic clinique.

Junttila *et al* ont analysé l'expression membranaire et nucléaire de HER4 sur des échantillons de patientes atteintes de cancers du sein positifs ou négatifs pour l'expression du récepteur aux œstrogènes. Ils ont décrit une expression des isoformes clivables JMa associée à la présence du récepteur aux œstrogènes, un fort grade de différenciation et un plus mauvais pronostic pour ces patientes si 4ICD est retrouvé au noyau (Junttila et al., 2005).

Ce récepteur aux œstrogènes est surexprimé dans plus de 70% des cancers du sein et son activité contribue fortement à la progression tumorale. Dans la lignée MCF-7, 4ICD a été décrit comme un co-activateur obligatoire d'environ 40% des gènes sous le contrôle du récepteur aux œstrogènes. La majeure partie inclut des gènes contribuant à la progression du cycle cellulaire et la prolifération (Han and Jones, 2014). Cette forte contribution se traduit au niveau clinique par l'implication de 4ICD dans la mort cellulaire induite par le Tamoxifène, une drogue bloquant l'action du récepteur aux œstrogènes au niveau nucléaire (Naresh et al., 2008). La relation entre HER4 et le récepteur aux œstrogènes est donc très forte. Dans les cancers du sein ER+/HER2-, une dominance de l'isoforme CYT2 associée à une expression nucléaire de 4ICD sont plutôt des facteurs de meilleur pronostic (Fujiwara et al., 2014).

Sur 923 échantillons de cancer du sein invasif analysés par IHC, Thor martèle que l'expression de 4ICD au niveau cytosolique est associée à un meilleur pronostic. Chez ces patientes, 4ICD est majoritairement détecté dans le cytosol par rapport au noyau, avec une petite proportion de patientes exprimant 4ICD dans les deux compartiments. Cette expression cytosolique de 4ICD est positivement associée à l'apoptose tumorale, l'effet positif sur la survie étant probablement dû aux fonctions apoptotiques de 4ICD *via* la mitochondrie (Thor et al., 2009).

Dans le cancer du sein triple-négatif, l'expression de HER4 a aussi été corrélée à une meilleure survie des patientes, sur une cohorte de 76 échantillons de patientes analysée par RT-qPCR (Machleidt et al., 2013). Le ratio des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ne semble pas avoir d'incidence sur ce pronostic. Toutefois, lorsque le stade du cancer est plus avancé, HER4 devient un facteur de plus mauvais pronostic, associé aussi à un plus fort taux de

rechute (Kim et al., 2016). Ces observations peuvent supporter l'hypothèse d'une dérégulation du ratio et des fonctions des isoformes de HER4 au cours du développement tumoral, suggérant que l'expression de HER4 peut être bénéfique dès les premiers stades du cancer. Il serait donc intéressant d'étudier la proportion des isoformes de HER4 en fonction des stades tumoraux et de corrélérer cela à la survie pour vérifier cette hypothèse.

Enfin, une méta-analyse regroupant 26 études sur un total de plus de 8000 patientes atteintes de cancer du sein confirme l'effet bénéfique de l'expression de HER4 sur la survie sans rechute, tous sous-types de cancers du sein confondus. HER4 est même un facteur pronostic favorable pour la survie globale chez les patientes non-TNBC (Wang et al., 2016).

Le récepteur HER4 est aussi surexprimé dans les cancers ovariens, mais seulement lorsque ceux-ci sont bien établis, puisque l'expression de HER4 est très faible dans les tumeurs bénignes ou les tissus sains. Cela a été démontré par l'analyse de 207 échantillons tumoraux par RT-qPCR et IHC (Steffensen et al., 2008). Au niveau des isoformes, Gilmour et al ont montré une expression majoritaire de JM_a et une très faible expression de JM_d, avec toujours une expression quasi-équivalente de CYT1 et CYT2. Cette expression a été confirmée sur des lignées cancéreuses ovariennes *in vitro* mais les auteurs ne retrouvent pas l'expression des isoformes JM_b (Gilmour et al., 2001). Dans une autre étude, HER4 a été décrit comme exprimé dans 98% des tumeurs ovariennes (Davies et al., 2014). Comme dans le cancer du sein, son expression est corrélée à de meilleures survies sans progression et survie globale (Pejovic et al., 2009).

Dans le cancer colorectal, une analyse immunohistochimique sur 155 échantillons de patients a décrit une expression de HER4 dans 21% des cas avec un pronostic plutôt sombre pour ces patients (Mitsui et al., 2014). Une autre étude sur 64 échantillons a décrit une expression du récepteur dans 81% des cas (Ljuslinder et al., 2009), établissant le récepteur HER4 comme une potentielle cible thérapeutique dans ce type de cancer.

Dans le cancer gastrique, l'expression de HER4 a été étudiée par IHC sur plus de 500 échantillons de patients et a été visualisée dans 55% des cas, même si les courbes de survie en lien avec son expression ne sont pas significatives (Yun et al., 2018). Plus particulièrement, dans le sous-type de tumeurs digestives GIST (*GastroIntestinal Stromal Tumors*) le récepteur HER4 est exprimé dans environ 50% des cas, associé à un très mauvais pronostic (Zhao et al., 2014). L'expression de HER4 dans le cancer gastrique pourrait induire l'EMT puisqu'il a été démontré que le miR-551b, un miRNA *down-régulé* dans les cancers gastriques, supprime l'EMT en régulant directement la traduction du récepteur HER4 (Song et al., 2017).

Cette capacité de HER4 à induire l'EMT et la dissémination des cellules cancéreuses semble se retrouver aussi au niveau du cancer du poumon, où HER4 y apparaît comme étant un « *driver* » oncogénique. Dans le sous-type NSCLC, le miR-193a-3p est diminué et cette absence d'expression est significativement associée à la présence de métastases. La

surexpression de ce miRNA abolit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses en ciblant HER4 et S6K2, une protéine ribosomale impliquée dans la voie mTOR (Yu et al., 2015). Le récepteur HER4 semble être au cœur de la signalisation tumorale dans ce cancer.

Il a été décrit qu'un modèle de souris avec la mutation KRAS^{G12D} et déficientes en Mig-6, un régulateur de la voie HER *down-régulé* dans le cancer du poumon, développaient des tumeurs grâce à l'activation de la signalisation médiée par HER4 (Liu et al., 2017a). Dans ce cancer, le récepteur HER4 coopère avec d'autres oncogènes comme Notch (dont il partage le même mécanisme d'action RIP) pour activer des signaux de prolifération et de blocage de l'apoptose (Ma et al., 2017). Ces observations confirment que l'expression de HER4 dans le cancer du poumon est de très mauvais pronostic, comme le démontre une étude sur 100 échantillons de patients par RT-qPCR (Masroor et al., 2016).

Le récepteur HER4 est aussi exprimé dans de nombreux autres cancers, comme le cancer du pancréas. Il y est retrouvé dans 65% des cas et son expression est corrélée à un meilleur pronostic de survie (Li et al., 2016) de même que dans le cancer du larynx (Bussu et al., 2012). Dans le cancer de la vessie, il est exprimé dans 42% des cas et son isoforme JMa/CYT2 est associée à une meilleure survie seulement si le récepteur aux œstrogènes n'est pas exprimé (Munk et al., 2013). Dans le médulloblastome, sa signalisation est régulée par *Hedgehog* et les ratios CYT1/CYT2 (Ferretti et al., 2006). Très récemment, une équipe a décrit HER4 comme étant surexprimé avec Src dans un sous-groupe de ce cancer, faisant de ce récepteur une cible thérapeutique pour ce cancer de mauvais pronostic (Forget et al., 2018).

Cependant, HER4 n'est pas retrouvé dans le cancer rénal (Thomasson et al., 2012), peut-être parce que sa signalisation pourrait être liée à la suppression de tumeur dans cet organe comme cela a été décrit dans les carcinomes hépatocellulaires. Des souris KO pour l'expression du récepteur HER4 dans le foie développent une inflammation avec une plus forte propension à former des tumeurs. Ces observations se répercutent au niveau clinique puisque le récepteur HER4 est *down-régulé* chez les patients atteints d'hépatocarcinome. Les patients présentant le moins d'expression de HER4 ont un plus mauvais pronostic de survie (Liu et al., 2017b). Il aurait été très intéressant de connaître l'expression et le rôle des différentes isoformes dans ce modèle suppresseur de tumeur.

D'autres études ont montré une transcription aberrante de HER4 dans un sous-type de lymphome (Scarfò et al., 2016), des mutations activatrices de HER4 chez 20% de patients atteints de mélanome (Settleman, 2009) et une expression de HER4 corrélée à celle de HER2 et à un très bon pronostic pour des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus après radiothérapie (Lee et al., 2005).

a. Mutations du récepteur HER4

En comparaison d'EGFR et HER2, les mutations dans le récepteur HER4 sont beaucoup moins étudiées mais aussi beaucoup moins fréquentes (**Figure 30A**). Seulement un très faible pourcentage de tumeurs présente des mutations du récepteur, à part dans le cancer du poumon et dans le mélanome où le récepteur HER4 semble jouer un rôle oncogénique majeur (**Figure 30B**).

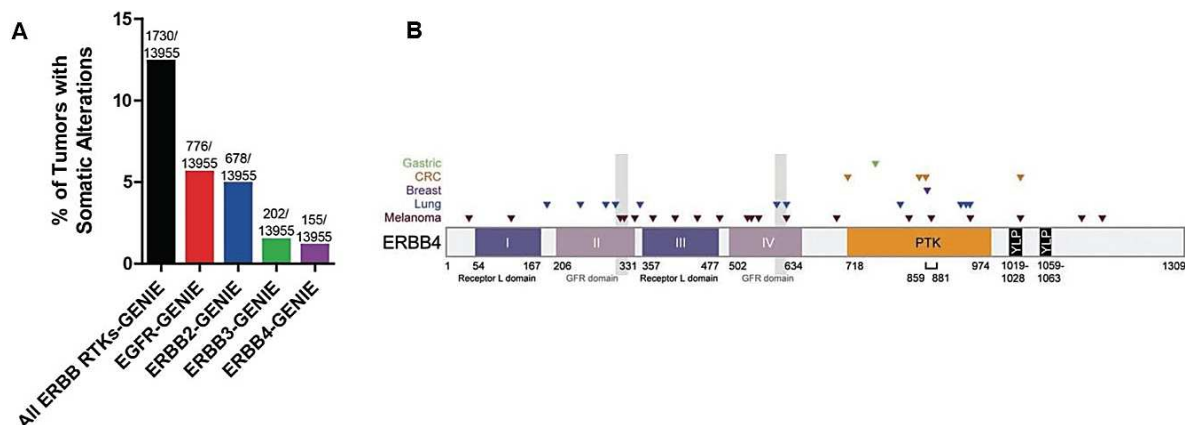


Figure 30 : Mutations du récepteur HER4 dans différents cancers

(A) Fréquence des mutations somatiques des récepteurs HER dans les cancers, sur un échantillon de 13955 tumeurs présentant des données mutationnelles pour les quatre gènes. Le récepteur HER4 est le récepteur présentant le moins de mutations (Mishra et al., 2017). **(B)** Les différentes mutations retrouvées au niveau du récepteur HER4. Les mutations les plus nombreuses sont retrouvées dans le cancer du poumon et le mélanome où le récepteur HER4 semble y jouer un rôle important. A noter que des amplifications du nombre de copies de HER4 sont très rares (Rudloff and Samuels, 2010).

Sur une cohorte de 79 patients atteints de mélanome, 24 mutations somatiques de HER4 ont été identifiées chez 19% de ces patients, suggérant une forte implication de ce récepteur dans ce cancer. 14 de ces mutations sont retrouvées tout au long de l'ECD alors que seulement 3 mutations se trouvent dans le domaine kinase du récepteur. Certaines de ces mutations sont associées à des mutations de BRAF ou NRAS. De nombreux mutants induisent une autophosphorylation du récepteur associée à une activation d'AKT lorsqu'ils sont exprimés *in vitro* dans des cellules de mélanome (Prickett et al., 2009).

Dans le cancer du poumon NSCLC, Kurppa et al ont caractérisé 9 mutations dont deux se situent dans l'ECD et deux dans le domaine kinase. Ces mutants sont fortement oncogéniques puisqu'ils augmentent la phosphorylation basale et NRG1-dépendante du récepteur HER4, son clivage pour libérer 4ICD ainsi que l'activation de HER2 en présence de NRG1 (Kurppa et al., 2016).

Quelques mutations dans les cancers du sein, le cancer colorectal, le cancer de la tête et du cou ou le cancer gastrique sont potentiellement oncogéniques mais retrouvées en très faible proportion (Kurppa et al., 2014). D'autres études sont nécessaires pour déterminer la

signification de ces mutations et il serait aussi intéressant de connaître leur impact sur la stabilité de 4ICD et sa localisation au noyau.

b. Implication de HER4 dans la résistance aux traitements

Comme les trois autres récepteurs de la famille, le récepteur HER4 est impliqué dans les phénomènes de résistance aux traitements. Il a été décrit une augmentation des récepteurs HER3 et HER4 dans des lignées de cancer du sein après traitement par fulvestrant, un antagoniste compétitif du récepteur aux œstrogènes. L'augmentation de HER4 est associée à une augmentation de sa phosphorylation et à l'activation de la voie ERK1/2, fournissant ainsi aux cellules tumorales une voie de prolifération alternative au blocage par le fulvestrant (Hutcheson et al., 2011). L'augmentation de l'expression de HER4 après traitement se produit surtout dans des lignées surexprimant HER2, impliquant ce récepteur comme un potentiel médiateur de la résistance aux thérapies anti-HER2. En fait, après traitement par le trastuzumab, l'expression de HER4 et le clivage de 4ICD sont augmentés, conduisant ce dernier au noyau pour induire la prolifération tumorale, favorisant ainsi la résistance acquise au trastuzumab (Mohd Nafi et al., 2014).

HER4 est aussi impliqué dans la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase. Toujours dans le cancer du sein, Canfield *et al* ont démontré à l'aide de siRNA que seule l'extinction de HER4 conduisait à l'apoptose de cellules HER2+ résistantes au lapatinib (Canfield et al., 2015), impliquant peut-être le même mécanisme que celui décrit précédemment. Cette corrélation avec HER2 n'est pas limitée au cancer du sein puisqu'il a été décrit dans le cancer gastrique un mécanisme de résistance semblable induit par la localisation de HER4 au noyau (Arienti et al., 2016).

Miller *et al* ont démontré que les inhibiteurs de MEK empêchaient l'autorégulation naturelle des RTK par leur clivage protéolytique, ce qui conduisait de manière inattendue à une diminution des ECD des récepteurs dans le plasma et à l'augmentation de récepteurs non clivés à la surface membranaire. En prenant l'exemple d'AXL, les auteurs ont montré que ces inhibiteurs induisaient l'augmentation à la membrane de protéines régulant l'activité des ADAM, ce qui avait pour effet d'empêcher le clivage du RTK mais conduisait à l'activation de voies alternatives comme JNK, impliquée dans la résistance (Miller et al., 2016).

Il a été démontré dans le neuroblastome que HER4 conférait aux cellules une résistance à la chimiothérapie. Dans ce cancer où l'expression de HER4 est de mauvais pronostic, les cellules cultivées *in vitro* ont tendance à s'agréger spontanément et à former des microsphères tumorales. La formation de ces sphères s'accompagne de l'augmentation de l'expression de HER4. En régulant le cycle cellulaire de ces cellules, 4ICD induit la résistance des cellules tumorales à des drogues telles que le cisplatine (Hua et al., 2012).

Enfin, HER4 semble jouer un rôle dans la formation de métastases. La dissémination tumorale nécessite l'induction de plusieurs événements, comme la suppression de l'anoïkis (une mort cellulaire programmée) et l'acquisition de capacités migratoires. Le récepteur HER4 est impliqué dans ces deux événements, puisque HER4 peut supprimer l'anoïkis en interagissant avec l'E-cadhérine (Kang et al., 2007) et induire la migration des cellules en interagissant avec FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Mendoza-Naranjo et al., 2013).

D - Les stratégies de ciblage du récepteur HER4

Le récepteur HER4 reste encore une cible délaissée en oncologie, compte tenu de sa plus faible expression au niveau tumoral, de l'ambiguïté de son impact sur le pronostic clinique et de son mode d'action complexe.

Les efforts actuels se consacrent au blocage du récepteur HER3 et de la NRG1 à l'aide d'anticorps, et une revue publiée récemment sur l'axe NRG-HER3-HER4 et son potentiel thérapeutique illustre très bien cette pensée. Dans cette dernière, les auteurs présentent une dizaine d'anticorps anti-HER3 en essais cliniques, répartis sur 5 pages, alors qu'il n'est accordé que 4 lignes à un anticorps anti-HER4 (Mota et al., 2017).

Cependant, des efforts sont menés actuellement pour proposer un ciblage thérapeutique du récepteur HER4.

1. Inhibiteurs de tyrosine kinase et autres stratégies

Comme pour les anticorps thérapeutiques, les inhibiteurs de tyrosine kinase ont révolutionné la prise en charge et le traitement du cancer, et de nombreux inhibiteurs ciblent maintenant les récepteurs HER. En se fixant de manière réversible ou non au niveau des sites catalytiques des domaines kinases des récepteurs HER, ils empêchent la fixation de l'ATP et l'activation des kinases, menant à l'inactivité des récepteurs et à la diminution de la signalisation tumorale. La plupart de ces inhibiteurs ciblent les kinases d'EGFR et HER2, certains de manière relativement spécifique comme l'erlotinib et le gefitinib pour EGFR, mais il n'existe pas d'inhibiteur sélectif de la kinase de HER4.

Le seul moyen à l'heure actuelle d'atteindre HER4 avec ces inhibiteurs est d'utiliser des inhibiteurs « *pan-HER* » comme le lapatinib ou le neratinib, un inhibiteur en essai clinique de phase 3 se liant de manière irréversible aux kinases d'EGFR, HER2 et HER4. La découverte de nouveaux composés inhibiteurs de HER4 de façon sélective pourrait être une approche intéressante dans le traitement du cancer, notamment à l'aide d'approches *in silico* (Sahu et al., 2017).

Cependant, ces inhibiteurs entraînent de nombreux effets secondaires toxiques car leur spécificité n'est jamais parfaite. De plus, comme nous l'avons vu jusqu'ici, le ciblage de HER4 est rendu difficile par sa biologie complexe, et nous devons prendre en compte les isoformes de HER4 et leurs différentes fonctions pour proposer un ciblage pertinent de ce récepteur.

En appréhendant cela, une approche originale a été décrite par Nielsen *et al.* En se basant sur l'hypothèse que l'isoforme CYT1 était beaucoup plus oncogénique que CYT2, les auteurs ont développé un oligonucléotide de *15-mer* pouvant se lier au pré-ARNm de HER4, au début de la séquence codante pour l'exon 26 spécifique à CYT1. Cette liaison empêche la machinerie de l'épissage alternatif de se fixer et excise l'exon 26, conduisant à l'expression de CYT2 uniquement. En transfectant cet oligonucléotide dans des cellules MCF-7 et T-47D, les auteurs ont ainsi montré que ce *15-mer* inhibait la prolifération cellulaire en diminuant fortement la phosphorylation d'AKT, et ralentissait aussi la progression tumorale *in vivo* (Nielsen et al., 2013). Cet outil moléculaire pourrait être très intéressant pour étudier les fonctions des isoformes sans passer par leur surexpression à l'aide de plasmides. Malheureusement il semble difficile de pouvoir obtenir un oligonucléotide spécifique de CYT2 sans affecter CYT1.

Selon un mode d'action similaire, des ribozymes ciblant l'ARNm du récepteur HER4 ont été créés, leur transfection dans des cellules T-47D abolissant la prolifération induite par la NRG (Tang et al., 1998). Ces stratégies de ciblage du récepteur HER4 à l'aide d'outils moléculaires semblent intéressantes pour étudier son impact sur la signalisation mais peuvent difficilement être envisagées comme thérapies.

Enfin, une étude a utilisé l'ECD du récepteur HER4 fusionné à la partie Fc d'une IgG pour créer une protéine de fusion dans le but de séquestrer les ligands de HER4 et ainsi d'inhiber sa signalisation ligand-dépendante, mais l'effet sur l'inhibition de prolifération a été décrit comme modeste *in vivo* (Koziolek et al., 2012).

L'étude de Nielsen, même si l'effet sur la croissance tumorale est assez modeste, pose les bases d'une approche de ciblage isoforme-spécifique du récepteur HER4. Cette approche est la clé d'un ciblage thérapeutique efficace de ce récepteur, et les anticorps monoclonaux sont une façon d'y parvenir.

2. Anticorps monoclonaux anti-HER4

Comme pour EGFR, HER2 et HER3, des anticorps ciblant HER4 ont été produits dans le but de bloquer la signalisation du récepteur et ainsi inhiber la prolifération tumorale. Les principaux anticorps sont le mAb72 (aussi dénommé Mab3 ou H72.8 ou Ab72 selon les publications) développé par l'équipe de Y.Yarden (Weizmann Institute, Israël) et le mAb1479 développé par Elenius (Turku University, Finlande).

Pionnier dans le développement d'anticorps anti-HER4, le groupe de Yosef Yarden a produit des anticorps anti-HER4 en immunisant des souris avec l'ECD du récepteur fusionné à un Fc. Certains anticorps sont capables de phosphoryler le récepteur HER4, comme le mAb77 (aussi dénommé Mab1 ou H4.77.16 ou Ab77 selon les publications), s'avérant être alors des agonistes ou au moins des modulateurs allostériques positifs. D'autres sont antagonistes (ou modulateurs allostériques négatifs) comme le mAb72 capable de bloquer la phosphorylation induite par la NRG1 (Chen et al., 1996; Starr et al., 2006). De façon intéressante, le mAb77 conduit à la dégradation très rapide du récepteur, ce qui n'est pas le cas pour le mAb72. Le mAb36, diminuant la phosphorylation du récepteur et entraînant légèrement sa *down-régulation* induit *in vitro* la différenciation de cellules cancéreuses MCF-7 après 4 jours de traitement (Chen et al., 1996).

Sur la base de ce travail, le groupe a étudié l'expression de HER4 dans le cancer de la prostate et a testé le candidat mAb72 *in vivo*. Les auteurs ont décrit une prolifération dépendante du récepteur HER4 de cellules PC-3, DU-145 et C1-1 et une diminution significative de la prolifération de ces cellules après 72h de traitement par 30 µg/ml d'anticorps mAb72. Dans un modèle de souris xénotreffées avec un clone de la lignée C1-1 surexprimant HER4, un traitement avec le mAb72 induit à 28 jours une inhibition significative de la croissance tumorale, avec la présence de cellules apoptotiques dans les coupes de tumeurs (Ben-Yosef et al., 2007). Toujours dans le même modèle, l'association de cet anticorps avec la radiothérapie a été évaluée et si l'anticorps seul inhibe la prolifération cellulaire d'environ 30% à 72h de traitement, l'association radiothérapie + anticorps ne semble pas augmenter cet effet (Vexler et al., 2008).

Au niveau mécanistique, l'anticorps mAb77 ne semble pas interférer avec la liaison de la NRG1, à l'inverse du mAb72. Ce dernier est le plus efficace pour inhiber la prolifération de la lignée H661 et induire l'apoptose dans un modèle de cellules de cancer du poumon surexprimant HER4 (Starr et al., 2006). Le fait que le mAb72 empêche la liaison de la NRG1 suggère que cet anticorps est un antagoniste alors que le mAb77 se comporte plutôt comme un modulateur allostérique, puisqu'il ne gêne pas la liaison de la NRG1 et augmente même la phosphorylation de HER4 en présence du ligand (Chen et al., 1996). A la vue de ces résultats intéressants *in vitro* et *in vivo* concernant le mAb72, il est étonnant que l'étude de cet anticorps ne soit pas allée plus loin.

Un autre groupe pionnier dans l'étude du récepteur HER4 est le groupe de Klaus Elenius, qui a développé le mAb1479, un anticorps anti-HER4 antagoniste dont la caractérisation est allée jusqu'à la cristallographie. En tenant compte des capacités de certaines des isoformes de HER4 à subir le RIP et en faisant l'hypothèse qu'il faut inhiber l'activation des isoformes JMa pour un ciblage efficace de HER4, Hollmén *et al* ont étudié 29 anticorps monoclonaux anti-HER4 pour leur capacité à reconnaître uniquement les isoformes

JMa, dans un modèle de cellules COS-7 surexprimant JMa/CYT2 ou JMb/CYT2 (Hollmén et al., 2009).

Le mAb1479 reconnaît le récepteur HER4 dans sa conformation native et est spécifique des isoformes JMa, comme démontré par le marquage positif de l'anticorps par immunofluorescence sur des coupes de tissu rénal (exprimant uniquement les isoformes JMa). Le marquage est négatif sur des coupes de tissu cardiaque (exprimant uniquement les isoformes JMb). Cet anticorps bloque la phosphorylation de la tyrosine 1284 de HER4 induite par la NRG1 sur des cellules MCF-7 ainsi que le clivage de l'ECD du récepteur après stimulation au PMA sur des cellules COS-7 surexprimant JMa/CYT2. L'anticorps induit l'internalisation du récepteur HER4 indépendamment de son activité kinase ainsi que son ubiquitinylation, conduisant à la dégradation rapide (dès 2h) du récepteur. Le mAb1479, par son mécanisme de blocage du RIP des isoformes JMa (**Figure 31A**), diminue *in vitro* la prolifération des cellules cancéreuses du sein T-47D et MCF7.

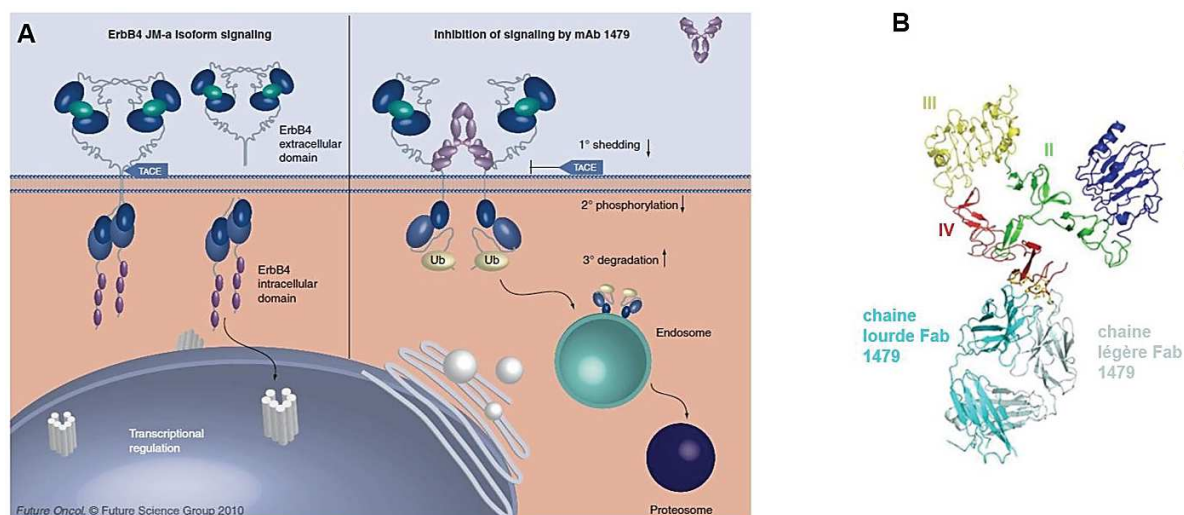


Figure 31 : Mécanisme d'action et épétope du mAb1479

(A) Mécanisme d'action de l'anticorps monoclonal anti-HER4 mAb1479. L'anticorps empêche le clivage des isoformes JMa en se fixant au niveau du site de clivage par TACE, bloque la phosphorylation du récepteur, entraîne sa down-régulation et sa dégradation par le protéasome (d'après Hollmén and Elenius, 2010). (B) Cristallographie du récepteur HER4 en complexe avec le Fab1479. Les sous-domaines du récepteur HER4 sont représentés par différentes couleurs, l'épétope du mAb1479 se situe dans le sous-domaine IV dans une zone spécifique de JMa et assez proche du site de clivage par TACE pour l'inhiber.

Ces résultats intéressants ont conduit à une étude *in vivo* de l'effet de l'anticorps ainsi qu'à l'analyse sur 243 échantillons de patientes atteintes de cancer du sein du clivage de l'ECD du récepteur, grâce à la mise en place d'un test ELISA. Ce test, qui pourrait être un test compagnon pour identifier les patientes bénéficiant d'un traitement avec cet anticorps, révèle que l'ECD du récepteur HER4 est détecté dans environ la moitié des échantillons tumoraux. Cette expression n'est pas corrélée à une expression nucléaire de HER4.

Cela suggère peut-être une meilleure survie de ces patientes, renforcé par l'observation que parmi ces 243 patientes, un très petit nombre a rechuté (trois) ou est décédé (cinq) durant la période de suivi. Par contre, l'expression de l'ECD du récepteur est corrélée à un statut pré-ménopause, et cette observation est expliquée par le fait que l'œstradiol induit le clivage de l'ECD de HER4 en augmentant l'activité de TACE. Enfin, le mAb1479 est capable d'inhiber *in vivo* la croissance tumorale de cellules T-47D xénogreffées, ainsi que le clivage du récepteur. La cristallographie du Fab1479 en complexe avec le récepteur ECD HER4 a été obtenue, l'épitope de l'anticorps étant identifié dans la zone de clivage de l'enzyme TACE (Hollmén et al., 2012) (**Figure 31B**). La société Genentech, en collaboration avec K. Elenius, a déposé 2 brevets incluant mAb1479 (WO 02/18444; WO 2010/068437).

Ces deux anticorps antagonistes, mAb72 et mAb1479, sont les principaux anticorps anti-HER4 à avoir été caractérisés et à avoir été jusqu'en étude pré-clinique dans le cadre de thérapies anti-cancéreuses.

A titre d'information, des anticorps anti-HER4 ont été produits par les compagnies Bristol Myers Squibb (1998 ; US 5,811,098), GamaMabs Pharma (WO2015/159253) et Roche (WO2014/072305) mais n'ont pas été valorisés en terme de publication.

Un dernier groupe a obtenu des anticorps anti-HER4 et en a décrit un comme étant probablement antagoniste, puisqu'il inhibe la phosphorylation de la tyrosine 1284 de HER4 induite par la NRG1 sur la lignée T-47D. Cet anticorps inhibe aussi la formation de colonies en présence de NRG1 dans un modèle de cellules MCF-7 cultivées en trois dimensions (Okazaki et al., 2016).

Enfin, le développement d'anticorps anti-HER4 pourrait être bénéfique pour le traitement de pathologies autres que le cancer, comme dans les maladies neurologiques où l'axe NRG1-HER4 est très impliqué et souvent dérégulé. Ainsi, dans un modèle de schizophrénie, un groupe de Genentech a décrit des altérations du comportement de souris traitées avec des anticorps anti-NRG1 mais pas avec des anticorps anti-HER4 antagonistes (Dominguez et al., 2018).

En conclusion, si le ciblage de HER4 au niveau clinique semble pertinent dans les cancers où le récepteur a été décrit comme clairement oncogénique, il peut être remis en question dans les cancers où son expression est souvent présentée comme bénéfique pour la survie des patients (Hollmén and Elenius, 2010).

Des études *in vitro* plus approfondies sur les différentes isoformes et leurs signalisations respectives sont clairement nécessaires pour mieux appréhender le rôle de HER4 au niveau tumoral. Les études au niveau clinique sont aussi importantes pour identifier les déterminants moléculaires qui rendent l'expression de HER4 bénéfique ou non chez les

patients atteints de cancer. Ces données pourront permettre de consolider les résultats obtenus avec des anticorps anti-HER4, pour pouvoir les inclure à terme dans l'arsenal thérapeutique de lutte contre le cancer (Wheeler et al., 2008).

III : Modulation de la signalisation par les anticorps monoclonaux

La recherche et l'ingénierie des anticorps monoclonaux ont considérablement évolué depuis l'approbation en 1986 du 1^{er} anticorps monoclonal par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour la prévention du rejet de greffe. En oncologie, le développement du trastuzumab (anti-HER2), du cetuximab (anti-EGFR) ou encore du rituximab (anti-CD20) ont considérablement allongé la survie des patients et véritablement contribué à l'explosion de la recherche sur les anticorps monoclonaux. Depuis, le nombre d'anticorps arrivant en phase d'essais cliniques ne cesse de grandir. Ces derniers prennent de plus en plus de place dans l'arsenal thérapeutique de lutte contre le cancer ou d'autres pathologies (Kaplan and Reichert, 2018).

A - Les anticorps monoclonaux : structure et fonctions

1. Différentes structures et formats d'anticorps

a. Structure générale des anticorps

Les anticorps, aussi appelés Immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines constituées de deux chaînes lourdes (H pour *Heavy*) de 50 kDa (environ 450 AA) et deux chaînes légères (L pour *Light*) de 25 kDa (environ 220 AA), maintenues ensemble par des ponts disulfures intra- et interchaînes. Les chaînes lourdes sont composées de trois (voire quatre) domaines constants notés C_{H1}, C_{H2} et C_{H3} (voire C_{H4}) et d'un domaine variable V_H. Les chaînes légères sont composées d'un domaine constant C_L et d'un domaine variable V_L. Dans cette structure de 150 kDa, la région charnière (*Hinge*) sépare le Fab (*Fragment antibody binding*) du Fc (*Fragment crystalline*). Les domaines variables V_H et V_L de chaque chaîne contiennent trois régions hypervariables appelées CDRs (*Complementary Determining Regions*), de 5 à 15 AA chacune et formant des boucles entre les régions *framework*. Ce sont ces domaines qui déterminent la spécificité à l'antigène, l'association V_H-V_L formant le paratope de l'anticorps reconnaissant l'épitope de l'antigène (**Figure 32**).

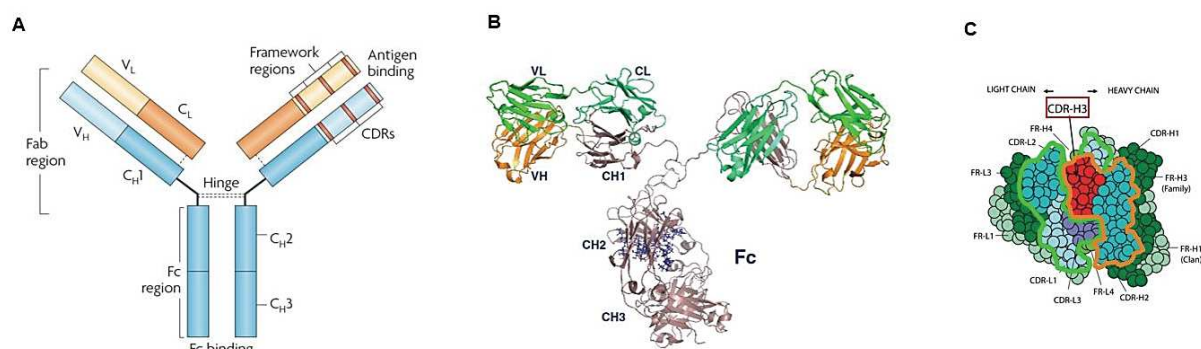


Figure 32 : Structure d'un anticorps de format IgG1

(A) Représentation schématique de la structure d'un anticorps au format IgG1. La région charnière sépare la région variable Fab de la région constante Fc. Les parties variables V_H et V_L , contenant les CDRs, sont responsables de la liaison à l'antigène (d'après Hansel et al., 2010). **(B)** Représentation structurelle de l'anticorps, chaque domaine de l'anticorps est formé de feuillets β anti-parallèles sur 2 plans (structure en « sandwich »). Le domaine C_H2 du Fc possède des sites de glycosylation (d'après Chiu and Gilliland, 2016). **(C)** Représentation du paratope : les trois CDRs du V_L (vert) s'associent intimement avec les trois CDRs du V_H (orange) pour former le site de liaison à l'antigène. Le CDR3 du V_H est le contributeur majeur de la structure du paratope (modifié d'après Schroeder and Cavacini, 2010).

b. Les différentes classes et formats d'anticorps

Il existe plusieurs classes d'anticorps, possédant des propriétés et caractéristiques qui leurs sont propres. Alors que les chaînes légères des anticorps peuvent être seulement de deux types, κ (*kappa*) ou λ (*lambda*), il existe cinq types de chaîne lourde, permettant de classer les différentes immunoglobulines. Ainsi, les chaînes γ (*gamma*), μ (*mu*), α (*alpha*), δ (*delta*) et ϵ (*epsilon*) définissent respectivement les classes IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Certaines classes sont divisées en sous-classes, comme celle des IgG qui en comporte quatre (IgG1 à IgG4) et celle des IgA qui en comporte deux (IgA1 et IgA2).

Les anticorps de format IgG sont majoritairement retrouvés dans le plasma, à hauteur d'environ 75%, et sont présents sous forme de monomères. Parmi eux, les IgG1 sont les plus abondantes (environ 67%), loin devant les IgG2 (22%) et les IgG3 (7%) et IgG4 (4%). Ces anticorps sont impliqués dans la réponse secondaire et la neutralisation de toxines et virus. De manière générale, les IgG1 et IgG2 sont induites en réponses à des antigènes protéiques alors que les IgG3 et IgG4 sont associées à des réponses contre des antigènes contenant des polysaccharides.

Les autres classes d'anticorps sont retrouvées en assez faible proportion dans le plasma. Les IgM sont associées à la réponse primaire, avec une masse moléculaire d'environ 900 kDa due à leur structure pentamérique. Cette structure confère à l'IgM dix sites de liaison à l'antigène, et la forte avidité engendrée par ces sites permet à cette classe d'être très efficace dans l'opsonisation des antigènes. Les IgA peuvent, quant à elles, se retrouver sous forme de dimère et jouent un rôle crucial dans la protection des muqueuses. Cette sous-classe compose

50% des protéines présentes dans le *colostrum*. Les IgD sont retrouvées en très faible pourcentage dans le plasma, notamment en raison de leur faible demi-vie. Leurs rôles ne sont pas bien définis. Enfin, les IgE sont elles aussi retrouvées en infime quantité et sont associées aux réponses allergiques et parasitaires (Schroeder and Cavacini, 2010).

La sous-classe des anticorps IgG1 est le format le plus utilisé lors du développement d'anticorps thérapeutiques ciblant la tumeur. C'est aussi le format des anticorps anti-HER4 que nous avons produits (**Figure 33**).

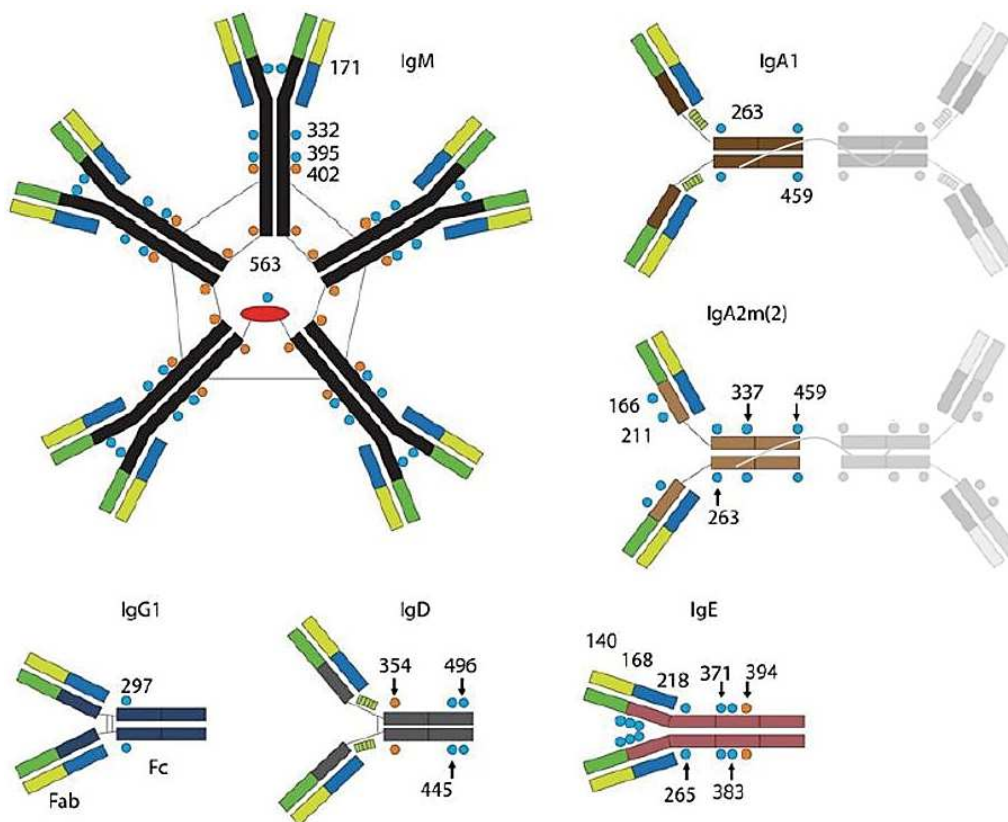


Figure 33 : Les différentes classes d'anticorps

Structure des cinq classes d'anticorps. Les IgG1 possèdent la structure la plus « simple » parmi les Ig. Les IgM sont les plus gros complexes alors que les IgA peuvent se retrouver sous forme de dimères. Dans ce cas, les dimères sont reliés entre eux par une chaîne J, la même chaîne structurant les IgM. Globalement, les anticorps sont des molécules très flexibles bien que des différences de flexibilité des régions Fab existent entre les différentes classes. Les sites de N-glycosylation sont représentés par des points bleus. D'autres sites porteurs de glycanes sont représentés en orange et en jaune (modifié d'après Schroeder and Cavacini, 2010).

Ce format est le plus « simple » parmi toutes les classes, permettant une production d'anticorps assez facilement. De plus, ce format est celui qui réunit les meilleures propriétés pour une utilisation thérapeutique anti-tumorale, telle qu'une longue demi-vie, associée au recrutement de facteurs de la réponse immunitaire *via* son fragment Fc.

Si, dans le cadre du traitement du cancer, il est intéressant de tirer parti de toutes les fonctionnalités des anticorps, le format « entier » de ces derniers peut dans certains cas être

réduisant l'activité recherchée. Par exemple, la longue demi-vie des anticorps induite par le fragment Fc entraîne un faible contraste en imagerie, de même que la taille de l'anticorps limite sa pénétration au sein de la tumeur. De plus, le traitement de certaines pathologies ne nécessite pas cette portion Fc, dans le cas d'une injection locale par exemple, d'un traitement de courte durée ou si l'on désire seulement bloquer une activité sans activer les fonctions effectrices. C'est dans cette optique de sélectivité que de nombreux formats d'anticorps ont été développés (**Figure 34**).

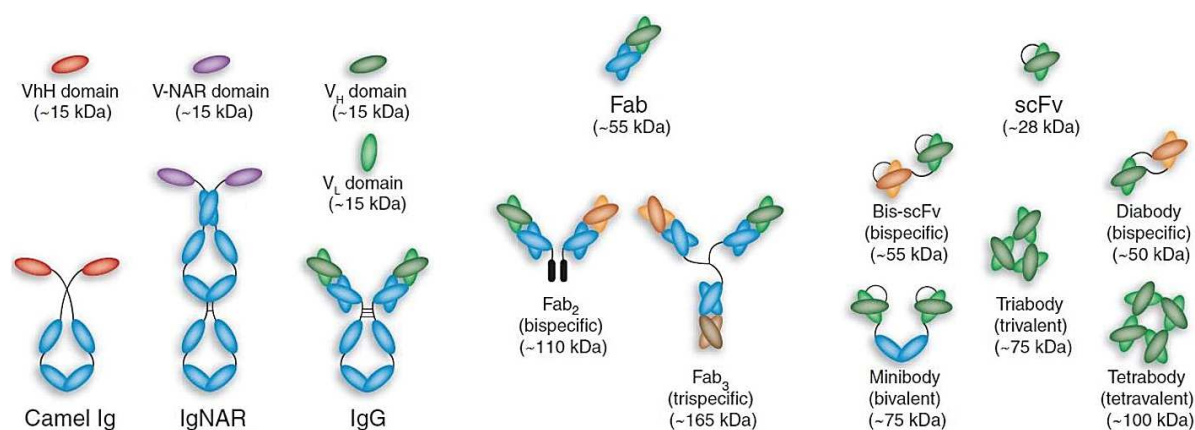


Figure 34 : Les différents formats d'anticorps existants

De nombreux formats d'anticorps existent à l'heure actuelle. Les plus petits sont appelés nanobodies, composés des domaines VHH d'anticorps retrouvés chez les camélidés (Camel Ig) ou des domaines V-NAR d'anticorps retrouvés chez le requin (IgNAR). Les anticorps bispécifiques (Fab_2 bispécifique) qui peuvent reconnaître deux antigènes, ne sont pas représentés avec leur partie Fc, mais le développement d'anticorps sous ce format est grandissant. Une troisième génération d'anticorps est actuellement mise au point, permettant de lier simultanément trois antigènes (Fab_3 trispécifique) (d'après Holliger and Hudson, 2005).

Parmi tous ces formats, le fragment Fv composé des domaines V_H et V_L est le plus petit fragment capable de fixer l'antigène en conservant les mêmes propriétés de reconnaissance de l'antigène que l'anticorps complet dont il serait issu. La très faible stabilité de ce fragment Fv limitant fortement son utilisation, l'ajout d'un peptide de liaison entre les deux domaines permet d'augmenter fortement cette stabilité et de conduire au scFv (*single chain Fragment variable*). Ce fragment scFv, monovalent, facilement manipulable et rapide à produire est au centre de la technique de *phage display*.

Ces petits fragments tels que les scFv ou les nanobodies présentent une très bonne pénétration dans les tissus (van de Water et al., 2012), ce qui en fait de bons candidats pour l'imagerie. Mais ils sont surtout très intéressants pour atteindre des sites cryptiques au niveau des récepteurs, ou pour activer sélectivement certaines voies de signalisation. Ce mécanisme de biais de la signalisation est maintenant très bien décrit pour les GPCR où leurs ligands peuvent induire des signalisations partielles en modulant les conformations du récepteur (Wacker et al., 2017). L'usage de petites molécules de 15 kDa, tels que les nanobodies sur un

récepteur, permet d'atteindre des zones et des poches d'activation spécifiques et inaccessibles en théorie par de plus grosses molécules tels que les anticorps (Nevoltris et al., 2015) (Scholler et al., 2017).

Cependant, les nanobodies sont difficilement transposables en clinique en raison de leur faible demi-vie dans l'organisme, puisque les reins retiennent tout composé d'un poids moléculaire inférieur à 50 kDa. Actuellement, les formats d'anticorps bispécifiques ciblant deux antigènes sont parmi les formats les plus développés et beaucoup sont retrouvés en phases cliniques.

c. Ingénierie et sélection des anticorps

Il existe principalement deux manières d'obtenir des anticorps monoclonaux. La première consiste en une approche *in vivo* par la technique d'hybridomes, la seconde en une approche *in vitro* principalement par *phage display* à l'aide de banques naturelles, synthétiques ou semi-synthétiques.

Décrite pour la première fois en 1975, la technique des hybridomes permet d'obtenir des anticorps monoclonaux après l'immunisation de souris par l'antigène cible. Les lymphocytes B sont récupérés et une fusion entre une cellule de myélome et un clone de lymphocyte B est réalisée. Cette fusion conduit à l'obtention d'un hybridome sécrétant de façon continu un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène ayant servi à l'immunisation. **(Figure 35A).**

La seconde technique, développée à partir des années 1990, est une approche *in vitro* de criblage et de sélection de fragments d'anticorps dirigés contre une protéine d'intérêt. Cette technique, beaucoup plus rapide que la première et ne nécessitant pas l'utilisation d'animaux, est aussi beaucoup plus flexible dans la mesure où les fragments d'anticorps sont facilement amplifiables et manipulables, ce qui permet la mise en place de stratégies de sélection innovantes.

C'est maintenant une technique très largement utilisée par les laboratoires pour le développement d'anticorps monoclonaux. La technique repose sur l'utilisation de banques de phages filamenteux exprimant chacun un fragment d'anticorps (scFv, Fab ou VHH) à leur surface.

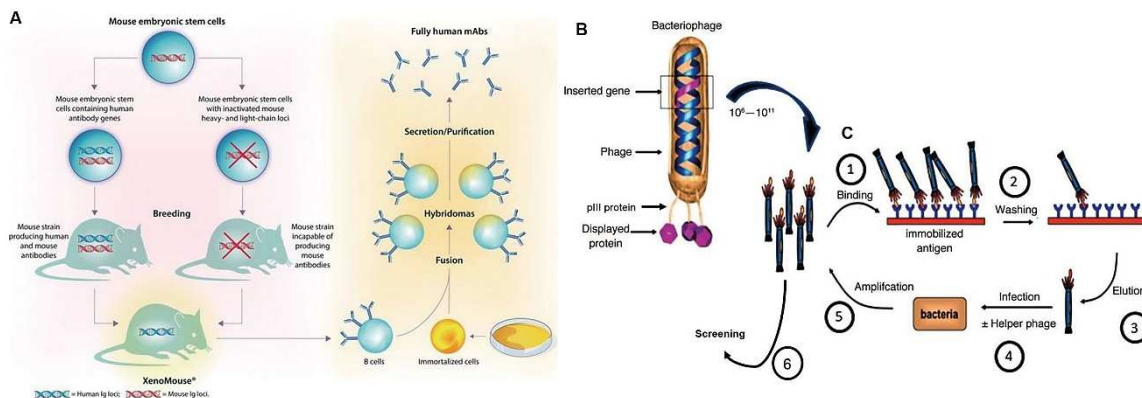


Figure 35 : Les méthodes de sélection des anticorps : hybridomes et phage display

(A) Production d'anticorps par hybridomes. (d'après Foltz et al., 2013). **(B et C)** Sélection d'anticorps par phage display. **(B)** Structure générale d'un bactériophage. Le plus souvent, des vecteurs modifiés appelés phagemides sont utilisés pour les sélections en phage display. Ces vecteurs rassemblent les propriétés d'infection des phages et les propriétés d'un plasmide. Le phagemide ne code que pour la protéine pIII et la protéine d'intérêt (le fragment d'anticorps) et se comporte comme un plasmide après infection d'une bactérie. **(C)** Etapes d'un tour de sélection par phage display : (1) la banque de phages est incubée sur la cible. (2) les phages non spécifiques sont éliminés par lavages. (3) les phages spécifiques de la cible sont élués. (4-5) les phages élués sont amplifiés dans des bactéries. Si des phagemides sont utilisés, les éléments nécessaires à la réplication du phagemide dans la bactérie sont apportés par le phage Helper. Cette étape est appelée le « phage rescue ». Le pool de phages obtenu après amplification est utilisé pour un autre tour de sélection, et 2 à 3 tours de sélection supplémentaires sont opérés pour enrichir la population en phages spécifiques de la cible. (6) le criblage des fragments d'anticorps est effectué par ELISA ou d'autres méthodes afin de sélectionner les clones candidats pour la liaison ou l'activité recherchée (adapté d'après Nixon et al., 2014).

Cette expression est permise grâce à la protéine de surface pIII du phage, qui assure le lien génotype-phénotype (**Figure 35B**). C'est ce lien qui permet de retrouver les séquences des CDRs des scFv/Fab/VHH sélectionnés pour ensuite les introduire dans n'importe quel format souhaité. C'est une des deux propriétés faisant la force de cette technique, la seconde étant la banque utilisée. En effet, ce sont les caractéristiques des banques de phages qui sont déterminantes pour l'efficacité de la sélection d'anticorps. La nature de ces banques (synthétiques, naïves ou immunes), leur taille et leur diversité sont des éléments cruciaux pour la réussite de la sélection. Les banques synthétiques présentent moins de limites que les banques naturelles car elles ont été optimisées sur de nombreux aspects (par exemple la diversité) et sont de plus grande taille (jusqu'à 10^{11} clones), ces deux aspects permettant la sélection d'anticorps ayant des propriétés uniques.

Les sélections peuvent se faire sur protéines solubles ou sur cellules selon les besoins, les disponibilités en antigène ou les objectifs à atteindre (développement d'antagonistes, agonistes, ou modulateurs allostériques). Globalement, trois à quatre tours de sélection de phages sont réalisés avant de cribler les phages sélectionnés pour les propriétés recherchées. Un tour de sélection (« *biopanning* ») se déroule en quatre étapes (**Figure 35C**) :

- incubation de la banque de phages sur la cible : certains fragments d'anticorps se lient spécifiquement à la cible avec une forte affinité, ces fragments représentant une petite fraction de la banque initiale.

- lavages pour éliminer l'excès de fragments non liés et ceux liés avec une faible affinité.
- élution des phages liés : cette élution peut se faire dans différentes conditions (milieux acides ou alcalins, détergents, trypsine, etc...) mais ne doit affecter ni les fragments d'anticorps ni le pouvoir infectant des phages.

- amplification des phages élués : elle est réalisée en utilisant une souche bactérienne adéquate et permet d'enrichir la banque avec les phages préalablement élués. Cet enrichissement permet d'utiliser ce nouveau *pool* de phages pour le tour de sélection suivant.

Un enrichissement significatif en phages spécifiques de la cible est généralement obtenu après trois à quatre tours de sélection. Une autre souche bactérienne est alors utilisée pour la production soluble des fragments d'anticorps, qui seront criblés pour les propriétés recherchées. Le plus souvent, le criblage est réalisé par cytométrie en flux ou ELISA. Une fois les candidats sélectionnés, des étapes d'ingénierie moléculaire sont nécessaires (séquençage des clones, reformatage) avant la production en cellules eucaryotes de petits lots d'anticorps (Nixon et al., 2014).

Cette méthode permet d'élaborer des stratégies de sélection et de criblages originales, permettant par exemple l'obtention d'anticorps modulateurs allostériques, si la sélection est faite en présence de ligand du récepteur (Yea et al., 2015). C'est cette technique de *phage display* que nous avons utilisé pour le criblage et la sélection de nos anticorps anti-HER4.

Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est le passage obligatoire par une étape de reformatage de l'anticorps, dans le cas où l'on voudrait obtenir une IgG1 par exemple. Cette étape peut dans certains cas aussi entraîner la perte ou la modification des propriétés de liaison à la cible puisque l'on passe d'un format scFv monovalent à un format IgG1 bivalent pouvant créer un nouvel encombrement stérique.

La grande flexibilité du CDR3 du V_H pourrait nous permettre de mieux appréhender cet encombrement et les interactions allostériques, car il a été démontré qu'il était possible d'obtenir des anticorps comportant un site de régulation allostérique à partir de prédictions (Khersonsky and Fleishman, 2017). Cela indique que l'anticorps et sa cible peuvent apporter chacun leur contribution dans la conformation finale du récepteur, cette dernière déterminant la signalisation. Cet aspect de l'ingénierie des anticorps prendra peut-être une grande place à l'avenir mais de plus amples recherches et validations sur des modèles sont nécessaires avant cela. Cette approche pourrait peut-être s'intégrer dans les stratégies de criblage par *phage display*.

2. Mécanismes d'action des anticorps : un effet « kiss-cool »

Comparé aux petites molécules, les anticorps ont l'avantage de pouvoir exercer leurs fonctions par leur partie variable V_H/V_L au sein du Fab pour moduler directement l'activité de

l'antigène, mais aussi par leur partie Fc qui permet de recruter les fonctions effectrices du système immunitaire. Toutes les classes et sous-classes d'anticorps ne peuvent pas toutes recruter les mêmes types d'effecteurs, aussi la description des mécanismes suivants concernera les anticorps IgG1, qui est le format de nombreux anticorps utilisés en thérapeutique.

a. Mécanismes Fab-dépendant : l'effet « kiss »

La première fonction des anticorps est médiée par la liaison à sa cible. Cette interaction *paratope de l'anticorps/épitope de l'antigène* est très spécifique et on utilise souvent le concept de « clé/serrure » pour définir cette interaction, comme pour un ligand avec son récepteur. Cette interaction fait intervenir des forces non covalentes telles que les liaisons hydrogènes, hydrophobes, des forces électrostatiques et des liaisons de van der Waals. Le CDR3 du V_H dicte en partie cette liaison puisqu'il est au plus proche de l'épitope et est donc le contributeur majeur aux interactions (**Figure 32C**). Les anticorps peuvent se fixer avec différentes affinités sur un récepteur, l'affinité résultant de la somme des interactions des forces d'attraction et de répulsion entre l'anticorps et sa cible. De plus, une composante d'avidité rentre aussi en jeu concernant les anticorps. L'avidité est en quelque sorte la force totale de la liaison d'un anticorps, qui résulte de la synergie de liaison de ses deux paratopes.

Les anticorps peuvent avoir plusieurs fonctions une fois liés à leur cible (**Figure 36A**). Notamment, ils peuvent neutraliser la fixation du ligand sur son récepteur et indirectement bloquer l'activation de ce dernier, comme dans le cas des anticorps anti-ligand, avec l'exemple d'un anticorps anti-HB-EGF induisant la diminution de la prolifération tumorale en inhibant la phosphorylation des récepteurs EGFR et HER4 (Sato et al., 2012) ou l'anticorps anti-VEGF bevacizumab. Ils peuvent induire directement une action antagoniste sur leur cible pour bloquer l'activation des récepteurs. Ainsi, le cetuximab se lie à EGFR et empêche la liaison de l'EGF, le trastuzumab bloque le clivage de HER2 (Cho et al., 2003) et son activation en dégradant le récepteur, et le pertuzumab bloque la dimérisation de HER2 en se liant au domaine II du récepteur (Capelan et al., 2013). D'autres anticorps, tels que l'ipilimumab ou le nivolumab ciblant respectivement CTLA-4 ou PD1, empêchent l'activation de *checkpoints* immunitaires inhibiteurs de la réponse immunitaire.

Enfin, les anticorps peuvent avoir une action agoniste sur leur cible et agir comme un ligand en activant les voies de signalisation du récepteur. La potentialisation de la signalisation par des anticorps agonistes pour induire un effet anti-tumoral a été proposée dès 1994 (Vitetta and Uhr, 1994), mais est maintenant surtout développée pour réactiver le système immunitaire. Ainsi des anticorps agonistes stimulant des molécules co-activatrices des lymphocytes tels que les CD27, CD40 ou encore OX40 (Mayes et al., 2018) sont en cours de développement. Malgré cela, le potentiel de certains récepteurs n'est pas totalement exploité et probablement

sous-estimé, certains de ces derniers servant juste de cible pour la liaison de l'anticorps et l'induction d'une réponse anti-tumorale par l'intermédiaire du fragment Fc (Foyil and Bartlett, 2010).

b. Mécanismes Fc-dépendant : l'effet « cool »

En parallèle de l'effet direct des anticorps sur l'activité de l'antigène, les anticorps peuvent induire des effets biologiques *via* leur fragment Fc et le recrutement d'effecteurs du système immunitaire, ce qui a pour effet de potentialiser l'action anti-tumorale de l'anticorps. Ces effets Fc-dépendant sont l'induction de l'ADCC (*Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity*), de l'ADCP (*Antibody Dependant Cell-mediated Phagocytosis*) et de la CDC (*Complement Dependant Cytotoxicity*) (**Figure 36B**).

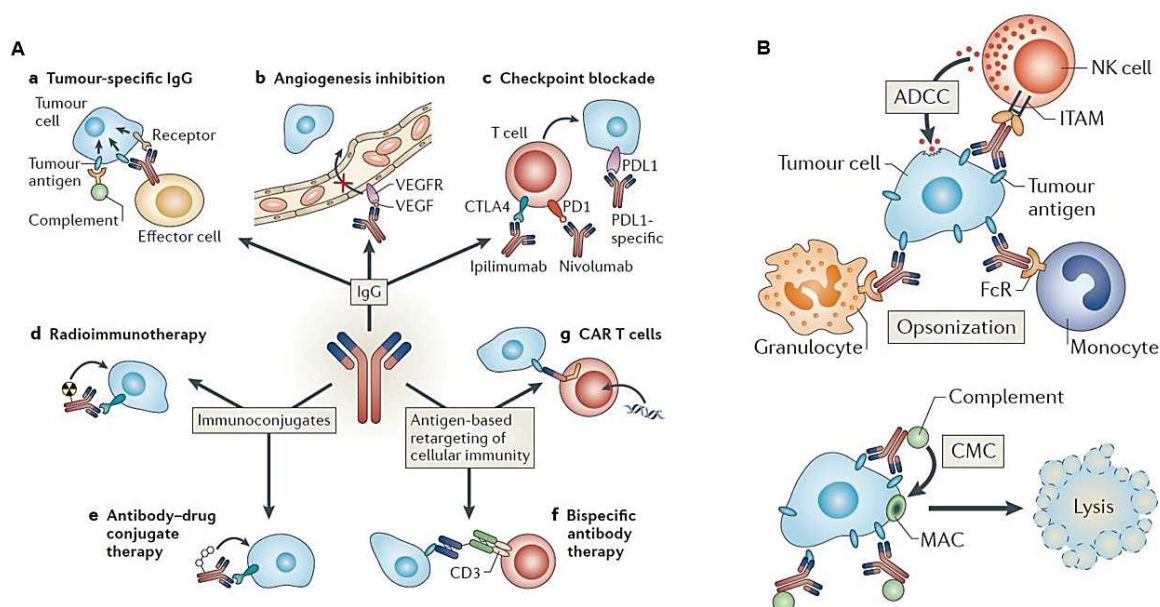


Figure 36 : Les effets Fab et Fc-dépendants des anticorps

(A) Les effets des anticorps médiés par leur partie Fab. Les anticorps peuvent servir juste à cibler la tumeur pour y amener le système immunitaire (a, g et f) mais dans la majorité des cas, les anticorps sont développés pour bloquer l'action des récepteurs, soit indirectement comme l'anticorps anti-VEGF bévacizumab (b) soit directement comme l'ipilimumab qui inhibe le signal inhibiteur déclenché par CTLA-4 (c). Des drogues ou des radioéléments peuvent être conjugués aux anticorps pour améliorer cet effet (d et e). **(B)** Les effets des anticorps médiés par leur partie Fc. Le fragment Fc peut activer l'ADCC, l'ADCP ou la CDC, des phénomènes induits par les cellules immunitaires menant à la lyse de la cellule tumorale (d'après Weiner, 2015).

Dans l'ADCC, l'anticorps effectue un pontage entre la cellule tumorale et la cellule effectrice. Ce pontage est créé par la fixation de l'anticorps à la cellule tumorale *via* son paratope et par sa fixation aux récepteurs FcγR *via* sa partie Fc. Ces récepteurs sont présents sur les cellules NK (*Natural Killer*), les monocytes/macrophages et les granulocytes. Cette double fixation entraîne l'activation et le relargage par la cellule immunitaire de perforines et granzymes conduisant à la lyse de la cellule tumorale. Le mécanisme d'ADCP est un peu

semblable et se produit lorsque les cellules tumorales sont recouvertes d'anticorps, entraînant la phagocytose par les macrophages. Le dernier mécanisme pouvant être induit par le fragment Fc est la CDC, après fixation de l'anticorps sur la cellule tumorale et recrutement des fractions du complément (dont le C1q). Cette cascade conduit à la destruction de la cellule tumorale par formation de pores dans la membrane. Mais ce mécanisme implique une certaine conformation de cette partie Fc pour le recrutement du C1q, ce qui fait que tous les anticorps ne sont pas capables d'induire la CDC.

Enfin, un effet médié par le fragment Fc est impliqué indirectement dans la potentialisation de l'action de l'anticorps. C'est sa fixation au récepteur FcRn (*neonatal Fc Receptor*). Le récepteur FcRn a d'abord été décrit comme étant responsable de la transcytose des Ig, leur faisant ainsi passer la barrière materno-fœtale, mais son rôle est surtout de contrôler la biodistribution des anticorps dans l'organisme ainsi que leur recyclage. En fixant de manière pH-dépendante les anticorps par leur fragment Fc dans les endosomes, le FcRn les recycle jusqu'à la membrane pour les libérer à nouveau dans la circulation (Magdelaine-Beuzelin et al., 2009). Ce phénomène continu est responsable de la longue demi-vie des anticorps dans la circulation, qui est d'environ 21 jours, et permet dans certains contextes thérapeutiques de pouvoir diminuer les injections sans perdre l'efficacité du traitement.

B - La modulation de la signalisation par les anticorps : au-delà d'un simple effet « on/off »

1. L'exemple des GPCR et leurs ligands biaisés

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Ils régulent de nombreux processus physiologiques et forment à eux seuls la plus grande classe de récepteurs membranaires, avec plus de 800 membres. C'est en partie pour cela que ces récepteurs sont énormément étudiés et sont la cible de la majorité des drogues actuellement sur le marché.

Suite à la liaison du ligand, ces récepteurs signalisent classiquement par deux voies principales : la voie de la protéine G et la voie des β -arrestines. La voie de la protéine G est la principale voie activatrice du récepteur, bien que les β -arrestines soient aussi des plateformes de signalisation récemment mises en évidence (Lefkowitz et al., 2006).

A l'état inactif, la voie de la protéine G est formée d'un complexe de trois sous-unités α et β/γ . La liaison du ligand entraîne un changement conformationnel du récepteur et la dissociation des sous-unités α d'un côté et β/γ de l'autre, induisant chacune leur propre signalisation. C'est la nature de la sous-unité de la protéine G α (G α_s , G $\alpha_{i/o}$, G $\alpha_{q/11}$, G $\alpha_{12/13}$) qui détermine la signalisation cellulaire, le médiateur principal de cette signalisation étant l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) (Lappano and Maggiolini, 2011). De l'autre côté de la

voie, les β -arrestines recrutées au niveau du récepteur suite à son activation sont principalement chargées de le désensibiliser en induisant son internalisation, dans un mécanisme de rétro-contrôle.

La découverte de ligands biaisés de ces GPCR a révolutionné la notion d'activation de ces récepteurs, en démontrant leur flexibilité dans l'adoption de multiples conformations structurales et en reliant ces conformations spécifiques à des signalisations précises. Cela ouvre d'énormes perspectives quant au développement de molécules permettant de moduler une signalisation, quel que soit le type de récepteur (Changeux and Christopoulos, 2017).

Pendant de longues années, le ciblage thérapeutique de récepteurs membranaires était développé selon un mode binaire, ou l'on cherchait à cibler le site orthostérique du récepteur (le site de liaison du ligand endogène) pour activer ou inhiber ce dernier, à l'aide d'agonistes ou d'antagonistes. Il a depuis été découvert que certains ligands pouvaient, en se fixant sur un site allostérique du récepteur (un autre site que celui de liaison du ligand endogène) et en coopérant ou pas avec le ligand endogène, moduler l'activité du récepteur de multiples façons (Wootten et al., 2013). En effet, en plus des ligands agonistes et antagonistes ont été découverts des ligands allostériques modulateurs et des ligands biaisés.

Les ligands allostériques peuvent, en se liant sur le récepteur, moduler la liaison du ligand endogène (en augmentant ou diminuant son affinité pour le récepteur) et potentialiser ou non son action en augmentant la signalisation (modulateurs allostériques positifs) ou en la diminuant (modulateurs allostériques négatifs). Les ligands biaisés introduisent une notion supplémentaire de sélection : une signalisation biaisée peut être définie comme la modulation sélective d'une voie de signalisation, induite par un ligand ou un anticorps. En se fixant sur son récepteur, un ligand biaisé peut activer certaines voies de signalisation au détriment d'autres (**Figure 37**).

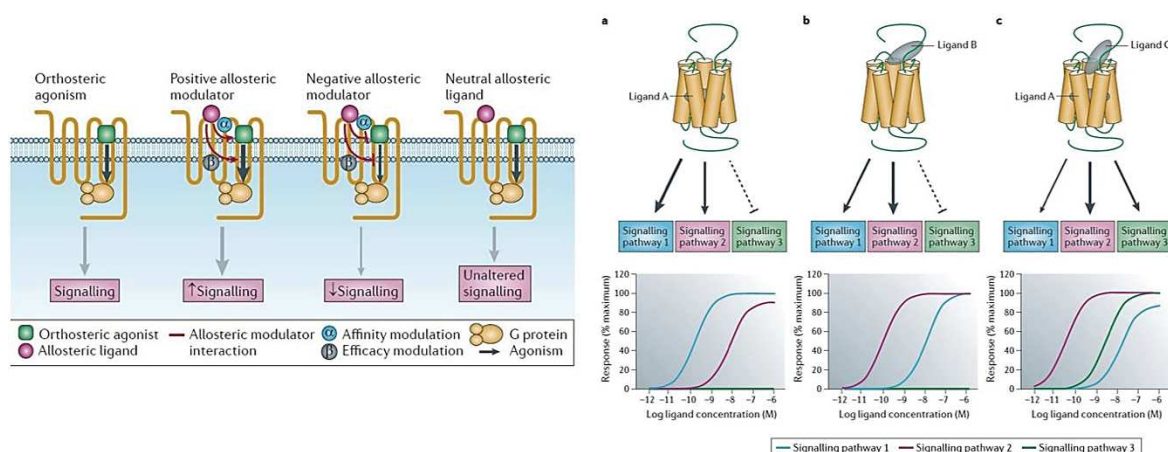


Figure 37 : Mécanismes d'action des ligands biaisés et modulateurs allostériques

Vue d'ensemble des différents types de ligands des GPCR et de leur mécanisme d'action. Les modulateurs allostériques se fixent sur des sites distants de celui du ligand endogène et modulent positivement ou négativement sa liaison et son activité. Les ligands biaisés peuvent induire sélectivement différentes voies de signalisation (a, b), voire complètement modifier la signalisation d'un premier ligand fixé sur le récepteur (c). Les antagonistes et agonistes inverses ne sont pas représentés (d'après Wootten et al., 2013).

Par exemple, des ligands « *G-protein biased* » peuvent activer la voie de la protéine G sans activer celle des β -arrestines et inversement pour les ligands « *β -arrestin biased* » (Roth et al., 2017).

Toutes ces signalisations sont permises par des changements conformationnels du récepteur qui sont induits par la liaison du ou des ligands (Wootten et al., 2016). Ces changements se répercutent au niveau intracellulaire par le recrutement sélectif de certaines protéines adaptatrices qui peuvent elles aussi subir des changements conformationnels pour adapter la signalisation. C'est notamment le cas des β -arrestines, qui sont sélectivement recrutées par le récepteur à l'angiotensine suite à la liaison d'un ligand biaisé et qui peuvent adopter différentes conformations actives pour signaler, comme démontré par BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) (Shukla et al., 2008). L'observation que ce recrutement est indépendant de la phosphorylation du récepteur permet d'imager son fonctionnement selon un mode « mécanique » avec des « engrenages », comme nous l'évoquions précédemment pour le mécanisme d'activation des récepteurs HER.

Mais cette activation « mécanique » n'est probablement qu'une partie du mécanisme d'activation d'un récepteur membranaire. Les phosphorylations induites sur ce dernier pourraient aussi contribuer à conformer spécifiquement les protéines de signalisation sous-jacentes pour la liaison aux récepteurs (Arencibia et al., 2013), comme il a été démontré avec l'ubiquitine ligase MDM2 pouvant réguler le trafic et la signalisation des β -arrestines (Shenoy et al., 2009). D'ailleurs, le fait qu'une protéine comme MDM2 (interagissant déjà fortement avec les récepteurs HER) régule aussi la signalisation des GPCR laisse à penser que les RTK pourraient aussi se comporter de la même manière en termes de signalisation biaisée. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'interaction RTK-GPCR est assez importante au niveau tumoral (Lappano and Maggiolini, 2011) et que les arrestines sont impliquées dans de nombreuses voies (Lefkowitz et al., 2006).

Globalement, la découverte de ces nouveaux ligands a engendré un changement de paradigme quant au ciblage de tous les récepteurs membranaires et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques, notamment pour le traitement des cancers. Concernant le ciblage des RTK, il est possible de développer des anticorps modulateurs ayant des capacités de biais de la signalisation à côté d'anticorps purement antagonistes.

2. Différents types de modulation par les anticorps monoclonaux

Le développement d'anticorps monoclonaux pour moduler l'activité des GPCR a naturellement été l'application directe de ces travaux sur les ligands biaisés (Webb et al., 2013) (**Figure 38**).

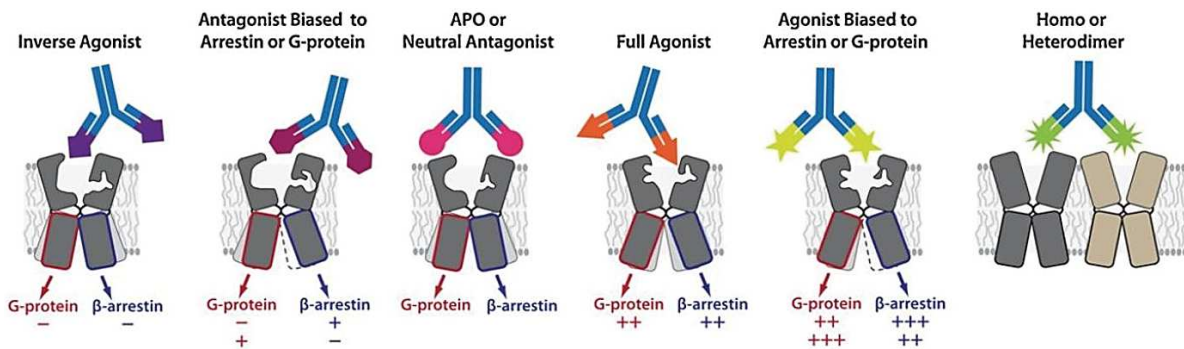


Figure 38 : Potentiels mécanismes d'action des anticorps modulateurs

Mécanismes d'action possibles des anticorps de nouvelle génération. De la même manière que les ligands biaisés, des anticorps ayant des propriétés de modulation allostérique ou de ligands biaisés peuvent être développés. Ce mécanisme existe concernant les GPCR mais peut probablement s'appliquer à tous les autres types de récepteurs membranaires (d'après Webb et al., 2013).

Même si de nombreux anticorps ciblant les GPCR sont principalement neutralisants (Herr, 2012), d'autres anticorps anti-GPCR présentent des propriétés de ligands biaisés. Ainsi, Hino *et al* ont décrit un anticorps se comportant comme un agoniste inverse sur le récepteur à l'adénosine A_{2A} et l'ont cristallisé avec le récepteur. Bien que cet anticorps reconnaisse la partie intracellulaire du récepteur, ils ont démontré que le CDR3 du V_H était capable d'aller se loger profondément au cœur du récepteur, le réarrangement structural induit par l'anticorps empêchant la liaison de ligands agonistes (Hino et al., 2012). Mukund *et al* ont décrit l'inhibition de l'activité du récepteur au glucagon par un anticorps modulateur allostérique qui se fixe sur l'ECD du récepteur en dehors du site de liaison du glucagon. L'anticorps, en se fixant sur ce site allostérique n'empêche pas la liaison du glucagon mais inhibe l'activation du récepteur, probablement en modifiant sa conformation en aval du site de liaison du ligand (Mukund et al., 2013).

Ces notions d'agonistes partiels et de modulateurs de la signalisation ont été très récemment étendues aux autres types de récepteurs membranaires comme les RTK (De Smet et al., 2014). Dans la famille HER, certains ligands, comme l'EPR et l'EPG, se comportent comme des agonistes partiels ou biaisés d'EGFR (Freed et al., 2017). Des effets biologiques opposés, comme la prolifération ou l'apoptose, peuvent être induits par une certaine orientation des domaines variables de bispécifiques ciblant un même récepteur (Gu et al., 2014). Toutes ces observations sont des preuves qu'un ciblage « orienté » de ces récepteurs HER est possible (Riese, 2011). De même, l'ingénierie d'un ligand agoniste partiel du récepteur c-Kit démontre un effet de biais sur la signalisation du récepteur (Ho et al., 2017).

Il existe maintenant quelques exemples de modulation allostérique de RTK à l'aide d'anticorps monoclonaux, et un des seuls impliquant la famille HER a été décrit dans notre équipe, où il a été montré que la NRG1 améliorait la liaison de l'anticorps anti-HER3 9F7-F11 (Le Clorennec et al., 2017).

La taille de l'anticorps n'est pas un facteur limitant pour induire une signalisation précise. Ainsi Yea *et al* ont démontré, grâce à une méthode de sélection d'anticorps originale, basée sur l'induction d'un certain phénotype, qu'un anticorps ciblant la chaîne α de l'intégrine était capable d'induire la différenciation de cellules souches en cellules dendritiques (Yea et al., 2013). Un récepteur transmembranaire est même assez gros pour être sujet à la modulation allostérique par deux anticorps différents, comme l'ont démontré Chacko *et al* sur le récepteur CD31, où la liaison d'un anticorps améliore celle du second, résultant en une amélioration de l'effet thérapeutique (Chacko et al., 2012).

Parmi les RTK, des cibles majeures dans certaines pathologies pourraient bénéficier de ces nouveaux anticorps aux mécanismes d'action particuliers. C'est le cas de la famille des récepteurs à l'insuline pour le traitement du diabète. Cette famille est composée du récepteur à l'insuline à proprement parler (INSR) et du récepteur IGF-1R. En se fixant sur son récepteur, l'insuline induit l'activation des voies PI3K/AKT, responsable de la glucorégulation en induisant la translocation membranaire de GLUT4 et le stockage du glucose, et de la voie ERK1/2. Pour contrôler cette pathologie, l'insuline recombinante est injectée au patient mais avec les effets secondaires que peuvent engendrer une activation totale et soutenue du récepteur, provoquant l'hypoglycémie.

La modulation sélective à l'aide d'anticorps pourrait permettre d'activer uniquement la fonction glucorégulatrice du récepteur à l'insuline sans engendrer ces effets secondaires. Dans cette optique, un groupe a sélectionné des scFv par *phage display* après criblage sur des cellules exprimant le récepteur INSR pré-stimulé avec de l'insuline. L'anticorps humain XMetA, au format IgG2a, se lie à l'INSR sur un site allostérique, indépendamment de la liaison de l'insuline. Il a une action d'agoniste partiel puisqu'il n'induit une phosphorylation maximale du récepteur qu'à hauteur de 20% de ce que fait l'insuline. XMetA induit l'absorption de glucose par les cellules mais pas leur croissance. XMetA est capable de phosphoryler AKT mais pas ERK1/2, cet effet étant rendu possible par son action d'agoniste partiel sur une signalisation qui est déjà naturellement plus sensible à l'activation d'AKT par l'insuline (Bedinger et al., 2015). XMetA réduit le taux de glucose dans le sang de souris diabétiques et améliore les marqueurs métaboliques du diabète sans induire d'hypoglycémie (Bhaskar et al., 2012). Cet anticorps modulateur allostérique a été licencié très récemment à la compagnie Novo Nordisk pour le traitement du diabète. Un anticorps modulateur allostérique négatif XMetD n'inhibe pas la liaison de l'insuline à son récepteur mais bloque son activation. Cet anticorps, XMetD, corrige l'hypoglycémie sévère induite dans un modèle murin reproduisant une hyper-insulinémie congénitale (Patel et al., 2018).

Dans le sarcome d'Ewing, le récepteur IGF-1R est une cible de l'anticorps antagoniste fugitumumab, qui a été stoppé en essai clinique de phase III. Cet échec s'explique par le fait que l'anticorps en se liant sur le récepteur induit son internalisation. L'internalisation de l'IGF-1R par le fugitumumab est régulée par la β -arrestine 1, qui induit à la fois la dégradation du

récepteur mais aussi active la voie ERK1/2. Ainsi les auteurs ont redéfini cet anticorps en tant qu'agoniste biaisé de la voie β -arrestine 1 plutôt qu'antagoniste. Dès lors, grâce au potentiel des anticorps modulateurs, on peut imaginer un meilleur ciblage du récepteur à l'IGF-1R avec un anticorps bloquant l'activation de la voie de la β -arrestine (Zheng et al., 2012). Ces résultats redéfinissent certaines notions comme l'antagonisme, puisqu'en fait un anticorps antagoniste induisant l'internalisation du récepteur est quelque part un agoniste de cette voie.

Enfin, la partie Fc, très flexible, des anticorps permet d'envisager une modulation allostérique des fonctions effectrices des anticorps. Ainsi la liaison du fragment Fab à l'antigène modifie la conformation du fragment Fc (Yang et al., 2017). Certaines modifications conformationnelles pourraient être plus favorables que d'autres au recrutement d'effecteurs tel que le C1q, puisqu'il a été démontré que les domaines C_H2, C_H3 et C_H4 des IgE et de l'omalizumab pouvaient adopter de multiples conformations (Davies et al., 2017). Ces effets expliqueraient la perte de la liaison à l'antigène lors du reformatage de scFv en IgG par exemple, et ces aspects propres aux anticorps ajoutent un degré de complexité supplémentaire à un mécanisme déjà difficile à appréhender.

Ces études ainsi que toutes celles précédentes confortent l'idée que tout est une question de réarrangement structural, et un des challenges à venir pour permettre un criblage efficace d'anticorps thérapeutiques biaisants sera d'arriver à compiler et associer ces données structurales à la signalisation cellulaire pour pouvoir les intégrer à des méthodes de criblages comme le *phage display* (Reiter et al., 2012).

OBJECTIFS DE LA THESE ET HYPOTHESES DE TRAVAIL



Les récepteurs EGFR, HER2 et HER3 sont très largement impliqués dans l'oncogenèse. Leur surexpression dans de nombreux cancers ainsi que leurs rôles majeurs dans la prolifération tumorale en ont fait des cibles de choix pour le développement d'anticorps thérapeutiques en oncologie. Les *success-stories* de l'Erbix[®] et de l'Herceptin[®], deux anticorps bloquant respectivement l'activation d'EGFR et HER2 ont validé le développement d'anticorps antagonistes pour cibler efficacement les récepteurs HER.

Le récepteur HER3 n'a pas échappé à la règle dès lors que sa forte implication dans la signalisation tumorale et les résistances aux traitements a été mise en évidence, et il faut espérer que des anticorps anti-HER3 antagonistes connaîtront le même succès clinique que les anticorps cités précédemment.

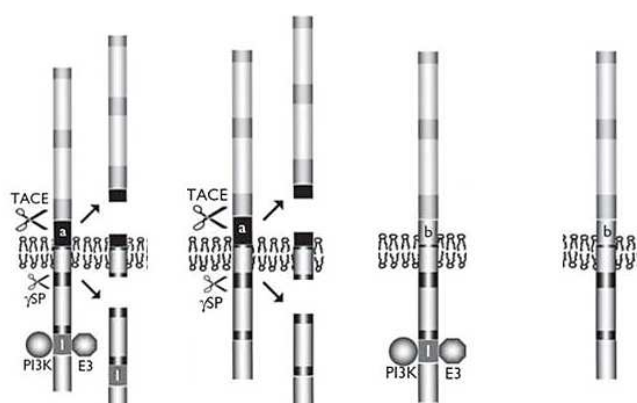
Le récepteur HER4 reste très peu étudié dans un monde où la famille HER est fortement associée au cancer. Son implication controversée dans la cancérogenèse, son expression tumorale plus faible que celle des autres récepteurs et surtout sa biologie complexe font actuellement du récepteur HER4 une cible délaissée en oncologie.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté à étudier les différentes isoformes du récepteur HER4 afin de proposer un ciblage thérapeutique de ce récepteur pour le traitement des cancers.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les patients qui expriment le récepteur HER4 présentent une meilleure survie et une évolution de la maladie plus favorable que ceux qui ne l'expriment pas.

Cette seule observation indique qu'un ciblage du récepteur HER4 avec des anticorps antagonistes pourrait s'avérer contre-productif. Le blocage de l'activité du récepteur et donc de son potentiel suppresseur de tumeur pourrait expliquer pourquoi les anticorps thérapeutiques anti-HER4 développés jusqu'à présent se sont avérés plutôt décevants lors des études précliniques.

Afin de proposer un ciblage pertinent du récepteur HER4, il est d'abord nécessaire d'étudier l'expression et la signalisation de ses isoformes pour identifier celles responsables de cet effet suppresseur de tumeur. Pour cela, j'ai d'abord étudié les données de la littérature concernant les isoformes de HER4 et leurs signalisations induites par leur principal ligand, la NRG1. Les principaux points de cette analyse bibliographique sont compilés dans le **Tableau 6**.



isoformes	JMa/CYT1	JMa/CYT2	JMb/CYT1	JMb/CYT2
Clivage extracellulaire	✓	✓	✗	✗
Clivage intracellulaire	✓	✓	✗	✗
Dégradation	✓ +++	✓ +	✓ +++	✓ +
Mort cellulaire	✓	✗	✗	✓
Prolifération	✓ +	✓ +++	✓ +	✓
Survie	✓	✓	✓	✗
Croissance cellulaire	✗	✓	✗	✓
Différenciation	✓	✗	✓	✗
Signalisations	PI3K MAPK	✗ MAPK	PI3K MAPK	✗ MAPK
Effet NRG1	inhibition croissance	prolifération	survie	inhibition croissance

Tableau 6 : Principaux rôles des quatre isoformes du récepteur HER4

L'analyse bibliographique des signalisations des isoformes du récepteur HER4 suggère que l'isoforme JMa/CYT1 est critique pour l'effet suppresseur de tumeur alors que l'isoforme JMa/CYT2 est une isoforme pro-tumorale. Le rôle de 4ICD est crucial pour l'induction de ces signalisations opposées.

D'après ce tableau, nous avons émis deux hypothèses :

1. Le récepteur HER4 possède un fort potentiel suppresseur de tumeur qui peut être activé sous certaines conditions par son ligand NRG1 (Das et al., 2010).
2. L'isoforme JMa/CYT1 pourrait porter cette activité suppresseur de tumeur en étant responsable de l'envoi de 4ICD à la mitochondrie pour induire l'apoptose (Naresh et al., 2006).

Ces hypothèses sont le fil conducteur des résultats de cette thèse et ont servi de base de travail pour notre étude.

MATERIELS ET METHODES



Etude de l'expression/signalisation du récepteur HER4

Culture cellulaire

Toutes les lignées utilisées ont été cultivées selon les recommandations de l'ATCC, en milieu RPMI, DMEM ou Leibovitz's supplémenté en sérum de vœu fœtal (10% final) et antibiotiques. Les lignées NIH3T3 transfectées P1H4 et P2H4 ont été cultivées en présence de 10 µg/ml de puromycine et d'hygromycine. Les lignées NIH3T3 transfectées P1 et P2 ont été cultivées en présence de 10 µg/ml de puromycine. Les lignées transduites stables HCC1395 et BT549 ont été cultivées en présence de 10 µg/ml de blasticidine (JMa/CYT1) ou 10 µg/ml de puromycine (JMa/CYT2). Tous les réactifs de culture cellulaire proviennent de Gibco (ThermoFisher). Les cellules ont été régulièrement testées pour l'absence de mycoplasmes (kit *MycoAlert*, Lonza).

Traitements par les anticorps +/- NRG1

Les cellules ont étéensemencées puis incubées pendant au moins 24h à 37°C avant toute manipulation supplémentaire (sauf mention). Toutes les cellules ont été traitées, selon les besoins de l'expérience, avec 20 µg/ml d'anticorps en absence ou en présence de 30 ng/ml de NRG1 pendant différents temps. Tous les traitements sur les cellules BT549 transfectées ont été effectués en milieu DMEM 1% SVF. Les cellules ont été traitées après 14h de *starvation*. Tous les traitements sur les lignées cancéreuses exprimant naturellement HER4 ont été effectués en milieu 10% SVF sans étape de *starvation*. Tous les traitements impliquant l'usage de NRG1 ont été effectués en milieu 1% SVF après 14h de *starvation*.

Analyse de l'expression des récepteurs HER4 par cytométrie en flux

Après trypsination et lavages, 300000 cellules ont été incubées pendant 1h30 à 4°C avec 10 µg/ml d'anticorps cetuximab (Merck), trastuzumab (Roche), sc-53279 (Santa Cruz) et H4.77.16 (ThermoFisher) ciblant respectivement les récepteurs EGFR, HER2, HER3 et HER4. Après lavages et incubation de l'anticorps secondaire approprié pendant 1h à 4°C à l'obscurité (réf. F9512, Sigma ; réf. 12-506, Millipore), les cellules ont été analysées au cytomètre Gallios. Selon les cas, les contrôles négatifs utilisés étaient des anticorps de même isotype (rituximab et ipilimumab) ou l'anticorps secondaire seul.

Analyse des isoformes du récepteur HER4 par RT-PCR et RT-qPCR

L'ARN de 1 millions de cellules a été extrait à l'aide du kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) selon le protocole du fabricant. 1 µg d'ARN a ensuite été rétrotranscrit à l'aide du kit *SuperScript III Reverse Transcriptase* (ThermoFisher) selon le protocole du fabricant. Les expériences de PCR pour amplifier les isoformes « *full-length* » de HER4 ont été réalisées avec 2,5 µl de *cDNA* issu de la rétrotranscription, 10 µM des couples d'amorces d'intérêt (**Tableau 7**) et le kit *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* (ThermoFisher). Les conditions de PCR sont les suivantes : 10 min de pré-incubation à 95°C ; 40 cycles de PCR : 60 secs à 95°C, 90 secs à 56,9°C, 90 secs à 72°C ; 5 min à 72°C. 15 µl du produit de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1% et visualisés sous lumière UV.

Les expériences de RT-qPCR pour amplifier les isoformes JMa, JMb, CYT1 et CYT2 dans les lignées tumorales ont été réalisées avec le kit *SYBR Premix Ex Taq* (réf. RR420L, Takara) selon le protocole du fabricant. L'ARN a été isolé et rétrotranscrit selon le protocole décrit précédemment. Les résultats ont été normalisés avec le gène HPRT.

Isoforme amplifiée	Amorce Sens	Amorce anti-sens
JMa	GGCATTCCACTTTACCACA	AGAGCCCACCAATTACTCCA
JMb	CAAGTATTGAAGACTGCATCGG	TGACCAGAATGAAGAGCCCA
CYT1	ACTTGGTCCCTCAGGCTTTC	GGGCTGTGTCCAATTTCACT
CYT2	TCCCTCAGGCTTTCAACATC	CGGTATACAACTGGTTCCTATTTCGAGTCAATTC
JMa/CYT1	GGCATTCCACTTTACCACA	GGGCTGTGTCCAATTTCACT
JMa/CYT2	GGCATTCCACTTTACCACA	CGGTATACAACTGGTTCCTATTTCGAGTCAATTC
JMb/CYT1	CAAGTATTGAAGACTGCATCGG	GGGCTGTGTCCAATTTCACT
JMb/CYT2	CAAGTATTGAAGACTGCATCGG	CGGTATACAACTGGTTCCTATTTCGAGTCAATTC
HPRT	TGACCAGTCAACAGGGGACA	ATCCAACACTTCGTGGGGTC

Tableau 7 : Amorces utilisées pour l'amplification des isoformes de HER4 par PCR

Les amorces ont été dessinées pour amplifier spécifiquement toutes les isoformes de HER4. Différents couples de ces amorces ont été utilisés afin d'amplifier les isoformes « *full-length* » du récepteur (voir Figure 41).

Extinction sélective des isoformes de HER4 par siRNA

300000 cellules C-33A ont étéensemencées en plaque 6 puits. Après 24h d'adhérence, les cellules ont été transfectées avec 100 nM de siRNA commerciaux non spécifiques, ciblant HER4 (SMARTpool SR301445, OriGene) ou ses isoformes (**Tableau 8**) à l'aide d'un volume d'INTERFERin (réf. 409-10, Polyplus) recommandé par le fabricant pour la transfection en plaque 6 puits. L'expression de HER4 a été visualisée après 96h de transfection par WB et PCR.

Isoforme ciblée	Séquence siRNA
HER4 total	SMARTpool SR301445
siRNA JMa/CYT1	AGCCCUCCUCCUGCCUACdTdT
siRNA JMa/CYT2	UCGAAUAGGAACCAGUUUdTdT

Tableau 8 : Séquences des siRNA utilisés pour éteindre HER4 et ses isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2

Le SMARTpool provenant d'OriGene est un mix de 3 siRNA différents ciblant le récepteur HER4 dans des zones communes à toutes les isoformes. Un contrôle siRNA « scramble » est inclus dans le kit. A partir des séquences d'ARNm des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2, nous avons dessinés des siRNA ciblant chacune des isoformes. Les siRNA ont été synthétisés par la société Dharmacon.

Génération de lignées stables exprimant les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 de HER4

Les lignées ont été générées par transduction lentivirale. Les plasmides lentiviraux codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont été créés à partir de plasmides pDONR221 grâce au système de clonage Gateway. Brièvement, l'insert JMa/CYT1 a été généré par PCR à partir du plasmide pCMV-HER4 disponible au laboratoire et avec des amorces contenant des séquences attB (**Tableau 9**). Après migration sur gel d'agarose 1%, le produit PCR a été récupéré puis purifié à l'aide du kit *Wizard SV Gel Clean Up System* (Promega). Le produit purifié a été inséré dans un vecteur donneur pDONR221 à l'aide du kit *Gateway BP Clonase II Enzyme Mix* (ThermoFisher) selon les recommandations du fabricant. Le plasmide pDONR221 JMa/CYT2 a été acheté chez ThermoFisher. Les plasmides pDONR221 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont été insérés respectivement dans les vecteurs pLenti 6.3/V5-DEST (ThermoFisher) et pLenti CMV Puro DEST (Addgene) à l'aide du kit *Gateway LR Clonase II Enzyme Mix* (ThermoFisher). Les constructions ont été vérifiées par séquençage.

Les lentivirus codant pour les deux isoformes ont été récupérés après transfection transitoire de cellules HEK293T. Brièvement, 2 millions de cellules HEK293T ont étéensemencées puis transfectées 24h et 48h post-ensemencement. Les cellules ont été transfectées avec 25 µg de PEI (Polyéthylèneimine Linear, Polysciences) et le plasmide codant pour chaque isoforme, et deux plasmides « *packaging* » contenant les gènes *env*, *gag* et *pol*. Après 72h de transfection, le surnageant de HEK293T contenant les virus a été récupéré, filtré puis congelé à -80°C.

Les cellules BT549 et HCC1395 (TNBC) ont été infectées avec ces virus pendant 12h en présence de 4,8 µg/ml de polybrène. 48h après l'infection, 10 µg/ml d'antibiotiques de sélection (blastidine ou puromycine) ont été ajoutés dans le milieu. Après environ une semaine de sélection, les cellules contrôles non infectées étaient mortes et seules quelques cellules transduites JMa/CYT1 et JMa/CYT2 semblaient viables. Les cellules ont été

analysées par FACS pour l'expression des récepteur EGFR, HER2, HER3 et HER4 dès qu'un nombre de cellules suffisant a été obtenu pour mener l'expérience.

Amorces Gateway	Séquences
HER4 <i>Forward</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGCCACCATGAAGCCGGCGAC AGGACTTT
HER4 <i>Reverse</i> (avec codon stop)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACACCACAGTATTCCGGTGT CT
HER4 <i>Reverse</i> (sans codon stop)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACCACAGTATTCCGGTGTCTG TA

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour la création des plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2

Les amorces HER4 Forward et HER4 Reverse (avec codon stop) ont été utilisées pour amplifier l'isoforme JMa/CYT1. Le produit amplifié est l'isoforme JMa/CYT1 complète flanquée à ses extrémités des séquences attB permettant le sous-clonage dans un vecteur donneur par le système Gateway. L'amorce HER4 Reverse (sans codon stop) peut être utilisée pour amplifier l'isoforme et lui ajouter n'importe quelle étiquette d'intérêt (GFP, Flag...)

Création de plasmides pour l'expression transitoire des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 de HER4

Les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont été créés à partir des plasmides pDONR221 précédemment cités, grâce au système de clonage Gateway. Les plasmides pDONR211 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont été insérés dans un vecteur pEZY3 (Addgene) à l'aide du kit *Gateway LR Clonase II Enzyme Mix* (ThermoFisher). Les constructions ont été vérifiées par séquençage. Le plasmide vide pEZY3 a été utilisé dans toutes les expériences comme contrôle (MOCK).

Afin de garantir une certaine homogénéité des conditions expérimentales et de limiter les biais de transfection, toutes les expériences sur les cellules BT549 transfectées et traitées avec les anticorps ou la NRG1 (hormis fractionnement subcellulaire) ont été menées selon le même schéma :

Pour chaque transfection, les cellules BT549 ont étéensemencées en boîte de culture de diamètre 150 mm. 24h après ensemencement, les cellules ont été transfectées avec 30 µg de PEI (Polyethylenimine Linear réf. 23966, Polysciences) et le plasmide d'intérêt, en milieu DMEM 10% SVF. 5h après transfection, ce milieu DMEM 10% SVF a été remplacé par du milieu DMEM 1% SVF et les cellules incubées *overnight* à 37°C. Le lendemain, les cellules provenant du même *pool* de transfection ont étéensemencées en DMEM 10% SVF, en plaque 6 puits ou 12 puits selon les besoins de l'expérience. Après 10h d'adhérence, le milieu DMEM 10% SVF a été remplacé par du milieu DMEM 1% SVF et les cellules incubées *overnight* à 37°C. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec les composés d'intérêt en DMEM 1% SVF, pour différents temps. Ce protocole d'ensemencement permet de limiter au maximum

les différences de transfection entre les différents puits. L'expression des isoformes de HER4 est visiblement stable jusqu'à au moins 48h post-traitement.

Etude de la signalisation par Western Blot

Après traitement, les cellules ont été lavées deux fois en PBS froid puis directement lysées dans du tampon Laemmli bouillant (60 mM TRIS pH 6.8, 10% glycérol (v/v), 1% SDS (v/v)) à l'aide d'un grattoir à cellules. Les échantillons ont été placés au bain-marie à 95°C pendant 10 min puis la concentration en protéines a été déterminée par dosage au Nanodrop 2000 (ThermoFisher). Après addition de bleu de bromophénol, 20 ou 50 µg de protéines ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7,5 à 15% selon la taille des protéines étudiées) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Après transfert des échantillons sur membrane PVDF (*Amersham*, GE Healthcare) et saturation en TBS-T-Lait 5% (Tris Buffer Saline + Tween 0,1% + lait 5%), la membrane a été incubée *overnight* à 4°C avec les anticorps d'intérêt dilués en TBS-T-BSA 2% (**Tableau 10**) :

Après incubation d'1h à température ambiante avec les anticorps secondaires correspondants (réf. A0545, Sigma ; réf. 115-036-072, Jackson ImmunoResearch) et lavages en TBS-T 0,1%, les membranes ont été révélées à l'ECL Ultra (*Western Lightning Ultra*, Perkin Elmer) ou au West Femto (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, ThermoFisher) et acquises sur G:BOX (Pxi 4, Syngene). Les résultats ont été analysés avec le logiciel ImageJ (NIH). Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

Anticorps	Fournisseur	Référence
AIF	Cell Signaling	#5318
α -tubulin	Cell Signaling	#3873 (DM1A)
pAKT	Cell Signaling	#4060
BAK	Abcam	ab32371 (Y164)
BAX	Santa Cruz	sc-7480
β -actin	Cell Signaling	#3700
cleaved caspase 3	Cell Signaling	#9664
cleaved PARP	Abcam	ab32064 (E51)
cytochrome c	BD Biosciences	556433
GAPDH	Cell Signaling	#5174
HER4/4ICD	Abcam	ab32375 (E200)
pHER4 Y984	Cell Signaling	#3790
pHER4 Y1056	Bioss Antibodies	bs-13094R
pHER4 Y1284	Cell Signaling	#4757
phospho Histone H2AX	Merck Millipore	05-636 (clone JBW301)
pMAPK p38	Cell Signaling	#4511
p21	Cell Signaling	#2947
p27	Cell Signaling	#3686
p53	Cell Signaling	#2527
pSAPK/JNK	Cell Signaling	#4668
TFAM	Cell Signaling	#8076
TIM23	BD Biosciences	611223
VDAC1	Merck Millipore	MABN504

Tableau 10 : Anticorps primaires utilisés en WB

Tous les anticorps ont été dilués en TBS-T-BSA 2% et utilisés à la concentration recommandée par le fournisseur. Les anticorps ont été incubés sous agitation et sur la nuit à 4°C.

Analyse de l'apoptose et du cycle cellulaire par cytométrie en flux

L'apoptose a été évaluée à l'aide du kit *Annexin A5-FITC/7-ADD* (Beckman Coulter) selon le protocole du fabricant. Brièvement, 300000 cellules/puits ont étéensemencées en plaque 6 puits. Les cellules ont été traitées à environ 60% de confluence. 14h avant l'arrêt du traitement, les cellules utilisées comme contrôle positif ont été traitées avec 300 nM de staurosporine. Le lendemain, après récolte du surnageant cellulaire et trypsination, le culot cellulaire contenant 500000 cellules a été dilué dans 100 μ l de tampon fourni avec le kit et marqué avec 10 μ l d'annexine-FITC et 20 μ l de 7-AAD. Après 15 min d'incubation sur glace et à l'obscurité, les résultats ont été acquis au cytomètre Gallios dans 500 μ l de tampon fourni avec le kit. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel *Kaluza Analysis* (Beckman Coulter).

Le cycle cellulaire a été étudié après marquage à l'Iodure de Propidium (IP) et traitement à la RNase A. 300000 cellules/puits ont étéensemencées en plaque 6 puits. Les cellules ont été traitées à environ 60% de confluence. Après récolte du surnageant cellulaire et trypsination, le culot cellulaire contenant 500000 cellules a été dilué dans 500 μ l d'éthanol 75% et incubé 20 min sur glace. Après lavage en PBS et centrifugation, le culot cellulaire a été dilué dans 700 μ l de tampon de marquage (40 μ g/ml IP (réf. P4170, Sigma) et 100 μ g/ml

RNase A (réf. 19101, Qiagen) en PBS). Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, les résultats ont été acquis au cytomètre Gallios. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel *Kaluza Analysis* (Beckman Coulter).

Mesure des niveaux d'ATP et du relargage d'Adénylate Kinase par bioluminescence

Pour ces mesures, les cellules ont étéensemencées (5000 cellules/puits) et traitées (100 µl/puits) en plaque 96 puits. 24h après ensemencement, les cellules ont été *starvées* pendant 14h puis traitées avec 30 ng/ml de NRG1 en milieu 1% SVF ou traitées sans *starvation* avec 20 µg/ml d'anticorps en milieu 10% SVF.

La mesure des niveaux d'ATP a été effectuée après 5 jours de traitement avec le kit *Vialight plus* (réf. LT07-221, Lonza) selon le protocole du fabricant. La plaque a été incubée pendant 5 min à température ambiante et 50 µl de *Cell Lysis Reagent* ont été ajoutés à chaque puits. Après 10 min de lyse à température ambiante, 100 µl du lysat cellulaire ont été transférés dans une plaque 96 puits blanche à fond blanc (Greiner) et 100 µl de substrat *AMR plus* ajoutés à chaque puits. Après 2 min d'incubation, les résultats de bioluminescences ont été acquis au PHERAstar FS (BMG LABTECH).

La mesure de l'Adénylate Kinase dans le milieu de culture a été effectuée après 5 jours de traitement à l'aide du kit *Toxilight bioassay kit* (réf. LT07-217, Lonza). Le principe est basé sur la détection dans le milieu de culture de l'enzyme Adénylate Kinase présente dans le cytosol et les mitochondries. Cette enzyme est libérée dans le milieu lorsque les cellules sont endommagées ou lorsque la membrane plasmique est rompue. La plaque a été incubée pendant 5 min à température ambiante et 20 µl de surnageant de culture ont été transférés dans une plaque 96 puits blanche à fond blanc (Greiner). 100 µl d'*AK Detection Reagent* ont été ajoutés à chaque puits et les résultats de bioluminescences ont été acquis au PHERAstar FS après 5 min d'incubation à température ambiante.

Mesure de l'activité mitochondriale par MTS

La mesure de l'activité mitochondriale a été effectuée à l'aide du kit *CellTiter 96 Aqueous One solution Cell Proliferation Assay* (réf. G3581, Promega). Les cellules ont étéensemencées (5000 cellules/puits) et traitées en plaque 96 puits (100 µl/puits). 24h après ensemencement, les cellules ont été *starvées* pendant 14h puis traitées avec 30 ng/ml de NRG1 en milieu 1% SVF. Après 5 jours de traitement, 20 µl de réactif ont été déposés directement dans chaque puits et la plaque a été placée à 37°C. Après 1h à 2h d'incubation, la plaque a été centrifugée et 100 µl de surnageant ont été transférés dans une autre plaque 96 puits pour une lecture à 490 nm à l'aide d'un lecteur *Multiskan* (ThermoFisher).

Mesure des niveaux protéiques par SRB

Les cellules ont étéensemencées (5000 cellules/puits) et traitées en plaque 96 puits (100 µl/puits). 24h après ensemencement, les cellules ont été *starvées* pendant 14h puis traitées avec 30 ng/ml de NRG1 en milieu 1% SVF ou traitées sans *starvation* avec 20 µg/ml d'anticorps en milieu 10% SVF. Après 5 jours de traitement, le surnageant a été retiré et les cellules fixées avec 10% d'acide trichloracétique froid *overnight* à 4°C. Après fixation, les cellules ont été lavées trois fois à l'eau milliQ puis les plaques séchées. 50 µl de SulfoRhodamine B 0,4% (SRB) ont été déposés dans chaque puits et les plaques incubées pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Après trois lavages en acide acétique 1%, 100 µl de TRIS base 10 mM ont été ajoutés et les plaques incubées pendant 5 min à température ambiante sous agitation. L'absorbance a été mesurée à 560 nm à l'aide du lecteur *Multiskan*.

Mesure de la production de ROS

Pour ces expériences, les cellules ont été ensemencées (20000 cellules/puits) et traitées (100 µl/puits) en plaque 96 puits noires à fond transparent (Greiner), dans du milieu de culture sans rouge de phénol. Les cellules ont été *starvées* 24h post-ensemencement. Après 14h de *starvation*, les cellules ont été traitées avec 30 ng/ml de NRG1 ou 20 µg/ml d'anticorps en milieu 1% SVF pendant 24h à 37°C. La production de ROS a été mesurée à l'aide du kit *DCFDA/H2DCFDA Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* (ab113851, Abcam). Le kit est basé sur la détection de la fluorescence émise lorsque le *DCFDA*, une sonde fluorogénique, est métabolisée en composé fluorescent par les ROS. 4h avant la fin du traitement, les cellules utilisées comme contrôle positif ont été traitées avec 100 µM de TBHP (Tert-Butyl HydroPeroxyde), un puissant inducteur de stress oxydatif. 45 min avant la fin du traitement, 50 µM de *DCFDA* ont été ajoutés directement sur les cellules et les plaques replacées à 37°C. Après ces 45 min d'incubation, les plaques ont été directement lues en mode *end point* au PHERAstar FS (Ex/Em = 485/535 nm).

Mesure de la dépolarisation mitochondriale par marquage DiOC6

Le potentiel mitochondrial des cellules BT549 a été mesuré grâce au composé fluorescent *DiOC6 Intracellular Probe* (ab189808, Abcam). Pour ces expériences, les cellules ont été ensemencées (300000 cellules/puits) et traitées en plaque 6 puits. 24h après ensemencement, les cellules ont été *starvées* pendant 14h, puis traitées avec 30 ng/ml de NRG1 ou 20 µg/ml d'anticorps en milieu 1% SVF, pendant 24h à 37°C. Après lavages en PBS et trypsination des cellules, les culots cellulaires ont été dilués dans 500 µl de PBS + 20 nM

de DiOC6. Le contrôle positif de dépolarisation a été obtenu en incubant les cellules dans 500 µl de PBS + 20 nM de DiOC6 + 100 µM de CCCP (2-[2-(3-Chlorophenyl)hydrazinylydene]propanedinitrile) (ab141229, Abcam), un puissant découpleur de la phosphorylation oxydative. Les cellules ont été incubées pendant 20 min à 37°C à l'obscurité. Après incubation, les cellules ont été centrifugées et diluées en PBS chaud. La fluorescence a été directement mesurée au cytomètre Gallios.

Fractionnement subcellulaire

Pour ces expériences, les cellules BT549 ont étéensemencées en boîtes de culture de diamètre 150 mm. Les cellules BT549 ont été transfectées comme indiqué précédemment. Après 24h de transfection (comprenant 12h de *starvation*), les cellules ont été remises en suspension à l'aide d'un grattoir à cellules et concentrées en tube 50 ml à bouchon ventilé (Falcon). Après centrifugation et lavage du culot cellulaires en PBS, les cellules ont été diluées dans 3 ml de milieu DMEM 1% SVF contenant les différents traitements (20 µg/ml d'anticorps et/ou 30 ng/ml de NRG1 (réf. 377-HB-050/CF, R&D Systems)). Les cellules ont été incubées sous rotation douce pendant 6h, 12h, 17h ou 24h à 37°C.

A la fin du traitement, les cellules ont été lavées deux fois en PBS froid, transférées dans un tube 15 ml et centrifugées. Toutes les expériences ont été conduites sur glace. Le culot cellulaire a été dilué dans du tampon de lyse MIB (*Mitochondrial Isolation Buffer : sucrose 200mM, TRIS/MOPS 10 mM, TRIS/EGTA 1 mM, inhibiteurs de protéases (Roche)*) à pH 7,4. La suspension cellulaire a été transférée dans des tubes Nalgène (réf. 3138-0030, ThermoFisher) et immédiatement homogénéisée par Ultraturrax T18 (IKA) pendant 10 à 15 secondes à vitesse 2,5. La lyse de la membrane plasmique a été vérifiée par microscopie. Si besoin, les cellules ont été passées à l'Ultraturrax une seconde fois pour atteindre 90% de lyse cellulaire. 50 µl de lysat ont été conservés comme WCL (*Whole Cell Lysate*). Le lysat restant a été centrifugé à 600g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant contenant les fractions cytosoliques et mitochondriales a été conservé. Le culot cellulaire contenant les noyaux et les cellules non lysées a été lavé avec du tampon MIB et centrifugé une deuxième fois afin de récupérer toutes les fractions cytosoliques et mitochondriales. Après avoir répété cette étape de lavage une troisième fois, les surnageants issus de ces trois lavages ont été regroupés en Falcon 15 ml et centrifugés une dernière fois à 600g pendant 10 min à 4°C, afin d'éliminer les contaminants nucléaires. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 7500g pendant 10 min à 4°C afin d'isoler les mitochondries. Le culot contenant les mitochondries a été dilué dans 50 µl de tampon de lyse et conservé comme « fraction mitochondriale ». Le surnageant contenant la fraction cytosolique a été centrifugé une seconde fois pour éliminer les contaminations mitochondriales et précipité avec 4 volumes d'acétone froid pendant au moins 1h à -20°C.

Après lavages, le culot a été dissous dans 50 µl d'eau milliQ et conservé comme « fraction cytosolique ».

Les concentrations protéiques de toutes les fractions collectées ont été dosées au Nanodrop 2000 (ThermoFisher). Les échantillons ont été dilués dans du tampon Laemmli 2X et chauffés pendant 10 min à 95°C. 50 µg de chaque fraction ont été déposés en WB pour l'analyse de la localisation de HER4/4ICD. La pureté des fractions a été contrôlée par WB avec les anticorps anti-TIM23, VDCA1 ou TFAM (fraction mitochondriale) et anti-tubuline α (fraction cytosolique). La localisation de HER4/4ICD a été étudiée avec l'anticorps E200.

Développement et caractérisation d'anticorps anti-HER4

Criblage d'anticorps anti-HER4 par phage display sur cellules

Les cellules P1H4, P2H4, P1 et P2 ont été utilisées pour cette sélection. Ces cellules sont des cellules NIH3T3 transfectées respectivement avec EGFR/HER4, HER2/HER4, EGFR et HER2. Toutes les étapes sur cellules ont été effectuées à 4°C pour éviter l'internalisation des récepteurs. La banque de phages HUSC1 développée par Pierre Martineau à l'institut mais non publiée, a été utilisée. 3 tours de sélection ont été effectués avant criblage des scFv par FACS et ELISA. Le déroulement d'un tour de sélection est décrit ci-dessous :

Incubation de la banque HUSC1 sur les cellules de contre-sélection : après lavage et trypsination, 10 millions de cellules « négatives » P1 et P2 ont été diluées dans 1 ml de PBS-BSA 2% dans un tube Eppendorf 1,5 ml et incubées sur roue d'agitation pendant 2h à 4°C. Cette étape permet de saturer la surface cellulaire et de limiter les fixations non-spécifiques. Après lavages en PBS-BSA 2%, le culot cellulaire a été dilué avec 50 µl de la banque de phage + 50µl de PBS-BSA 2% et incubé sur roue d'agitation pendant 2h à 4°C. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré. Il contient les phages ne se liant pas aux cellules P1 et P2.

Incubation du surnageant sur les cellules P1H4 et P2H4 préalablement stimulées à la NRG1 : les cellules P1H4 et P2H4 sont cultivées en DMEM 0% SVF 24h avant le début de l'expérience. Après lavage et trypsination, 10 millions de cellules P1H4 et P2H4 ont été stimulées avec 50 ng/ml de NRG1 pendant 15 min à 37°C. Après stimulation, les cellules ont été lavées en PBS froid puis saturées en PBS-BSA 2% pour 2h sur roue d'agitation à 4°C. Après saturation, les cellules ont été directement mises en contact avec le surnageant issu de l'étape précédente.

Elution et amplification des phages : après incubation pendant 4h sur roue d'agitation à 4°C, les cellules ont été lavées 20 fois en PBS. Les phages ont été élués à l'aide de trypsine

TPCK (ThermoFisher) pendant 10 min à température ambiante. Après centrifugation, les phages élués ont été incubés dans 200 µl de pré-culture de bactéries *TG1* pendant 1h à 37°C. Après 1h, quelques µl de cette culture ont été étalés en dilution sur boîtes de Pétri afin d'estimer la diversité de la sélection. La culture restante a été centrifugée 10 min à 3000 rpm et le culot bactérien a été repris dans 500 µl de milieu 2xYT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 2% de glucose. La culture a été placée sur la nuit à 30°C sous agitation (200 rpm).

Le lendemain, un stock glycérol 10% de la culture a été réalisé. 20 µl de cette culture ont été repris dans 2 ml de milieu 2xYT-ampicilline-glucose et incubés pendant 4h à 37°C (180 rpm). Après cette incubation, 20 µl de *phage Helper KM13* ont été ajoutés. Après 1h d'incubation à 37°C (150 rpm), la culture bactérienne a été centrifugée pendant 30 min à 3000 rpm et le culot a été repris dans 500 µl de milieu 2xYT-ampicilline-glucose-kanamycine 25 µg/ml. Cette suspension a été incubée sur la nuit à 30°C (200 rpm).

Le lendemain, les phages ont été précipités au PEG/NaCl. Pour cela, les bactéries ont été centrifugées pendant 30 min à 4°C à 3000 rpm. Après centrifugation, 400 µl de surnageant ont été incubés 1h minimum à 4°C en présence de 100 µl de PEG/NaCl. La suspension a ensuite été centrifugée pendant 30 min à 4°C à 3000 rpm et le surnageant retiré. Cette étape de centrifugation a été reproduite afin de retirer complètement le PEG. Le culot contenant les phages a été repris dans 100 µl de PBS-glycérol 15%. Le nombre de phages a été estimé par dosage au Nanodrop 2000 (ThermoFisher) selon la formule $(A_{296} - A_{320}) \times 10^{13}$.

Tours de sélection n°2 et n°3 : 50 µl de ce stock glycérol ont été conservés à -20°C et les 50 µl restants ont servi pour le tour de sélection suivant. Deux tours de sélection supplémentaires ont été réalisés, selon ce même protocole (hormis l'étape de contre-sélection qui n'a pas été effectuée pour ces tours 2 et 3).

Infection de bactéries HB2151 : à la différence de la souche *TG1* qui nous a servi à amplifier les phages, la souche bactérienne *HB2151* a été utilisée pour la suite du protocole. Dans cette souche, un codon stop est reconnu entre la séquence de fragment d'anticorps et la protéine pIII du phage, permettant la production des scFv solubles. 10 µl de phages élués au troisième tour de sélection ont été incubés avec 200 µl de pré-culture de bactéries *HB2151* pendant 30 min à 37°C. Des dilutions successives de cette culture ont été ensuite réalisées et étalées sur boîtes de Pétri LB-ampicilline-glucose. Après incubation des boîtes sur la nuit à 37°C, 190 clones issus de chaque sélection ont été piqués avec un cure-dent stérile et ensemencés dans 100 µl de milieu 2xYT-ampicilline-glucose 1% en plaque 96 puits.

Criblage des candidats scFv par FACS et ELISA : après incubation des plaques 96 puits pendant 24h à 37°C, des stocks glycérol 10% des plaques ont été réalisés et conservés à -20°C. Le criblage des candidats scFv a été effectué en parallèle par ELISA sur la protéine HER4 recombinante et par FACS sur les cellules utilisées pour la sélection et préalablement ou non stimulées par la NRG1. Afin de produire les scFv solubles, nous avons réalisé une pré-

culture des clones à partir de nos plaques 96 puits. Une induction avec 9 mM d'IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) a été réalisée dès l'atteinte par les bactéries d'une phase de croissance optimale ($DO_{600nm} \pm 0,9$). Après 16h-24h d'incubation à 30°C à 220 rpm, les plaques ont été centrifugées pendant 20 min à 2000 rpm et le surnageant a été récupéré. Ce surnageant contient les candidats scFv solubles et a été utilisé pour les différents criblages. Pour le criblage par ELISA, 1 µg/ml de protéine HER4 humaine recombinante (réf. 1131-ER-050, R&D Systems) a été adsorbé dans les puits. Après incubation du surnageant (contenant les scFv) pendant 2h à température ambiante, l'anticorps secondaire anti-c-Myc (9E10) conjugué HRP (réf. sc-40, Santa Cruz) a été utilisé à 2 µg/ml pour révéler la liaison des scFv. Le criblage par FACS a été effectué en plaque 96 puits (50000 cellules/puits). Le surnageant contenant les scFv a été incubé pendant 3h à 4°C. L'anticorps anti-c-Myc couplé Alexa Fluor 647 (réf. M-047-A64, MBL) a été utilisé à 2 µg/ml pour révéler la liaison des scFv. Les résultats ont été acquis en plaque 96 puits avec le cytomètre Cyan (Cytex). De ces criblages, nous avons sélectionnés une vingtaine de clones pour leurs différents profils de liaison au récepteur HER4. Ces profils ont été vérifiés plusieurs fois par FACS.

Formatage des scFv candidats au format IgG1 : l'ADN plasmidique contenant les séquences des scFv a été récupéré à l'aide du kit *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma) selon le protocole du fabricant. Tous les scFv sélectionnés ont été séquencés pour l'identification de leurs CDRs. Les scFv ont été sous-clonés au format IgG1 humain selon le protocole de clonage *Golden Gate*. Brièvement, les V_H et V_L des scFv ont été amplifiés par PCR (**Tableau 11**) et purifiés à l'aide du kit *PCR clean-up and Gel extraction* (Macherey-Nagel). Les V_H et V_L ont été insérés par PCR dans un vecteur *PEF-recipient-IgG vector* codant pour une IgG1 humaine selon le *framework* du trastuzumab. Tous les plasmides ont été séquencés pour vérification des inserts. Les plasmides codant pour les anticorps au format IgG1 ont été amplifiés en bactéries et des stocks constitués pour production en cellules HEK293T.

Production et purification des anticorps : les anticorps ont été produits par transfection transitoire de cellules HEK293T adhérentes. 60 millions de cellules ont étéensemencées en boîtes de culture 150 mm deux jours avant la transfection. Les cellules ont été transfectées avec 240 µg de PEI et 15 µg de plasmide codant pour les anticorps. 5h après la transfection, le milieu DMEM 10% SVF a été remplacé par du milieu DMEM 0% SVF et les cellules placées à l'incubateur pour 5 jours à 37°C.

Après 5 jours d'incubation, le surnageant des cellules HEK293T, contenant les anticorps sécrétés, a été récupéré. Après deux centrifugations à 4°C pour éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires, le surnageant a été tamponné avec du phosphate de sodium 40 mM pH 8 et passé sur une unité de filtration 0,22 µm (réf. 17959, Merck Millipore). Le surnageant filtré a ensuite été passé sur colonne de protéine A (réf. 10676315, GE Healthcare) à l'aide d'une pompe *Minipuls Evolution* (Gilson) sur toute la nuit à 4°C. Le lendemain et après lavages de la colonne en tampon phosphate, les anticorps ont été élués avec de la glycine 0,1

M pH 2,7. Les anticorps ont été immédiatement tamponnés à l'aide de TRIS 1M pH 9. Les fractions éluées ont été concentrées et dialysées en PBS à l'aide d'*Amicon Ultra 4 50k* (Merck Millipore). Après dosage au Nanodrop 2000 pour estimer la concentration et la pureté des anticorps, ces derniers ont été filtrés et conservés stérilement. Tous les anticorps ont été conservés à 4°C.

Amorces PCR	Séquence
VH_Bbsl.For	GATGAAGACATGTGTGAGGTGCAGCTGGTGG
VH_Bbsl.Rev	GTAGAAGACTAAGGCTGAGGAGACGGTGACCA
VL_Bbsl.For	GAAGAAGACAAGGCACAGTCTGTGCTGACTCAGC
VL_Bbsl.Rev	GTTGAAGACTTTTCTTAGGACGGCCAGCTTG

Tableau 11 : Amorces PCR utilisées pour amplifier les V_H/V_L des scFv candidats

1 ng de plasmide contenant le scFv a servi de matrice pour l'amplification des V_H et V_L par PCR. Après purification, la taille des amplicons ($\pm$ 400 pb) a été vérifiée sous lumière UV après migration sur gel d'agarose 3%.

Etude de la liaison des anticorps au récepteur HER4 par ELISA

Les récepteurs recombinants EGFR humain (réf. 344-ER-050), HER2 humain (réf. 1129-ER-050), HER3 humain (réf. 348-RB-050), HER4 humain (réf. 1131-ER-050) et HER4 murin (réf. 4387-ER-050) proviennent de chez R&D Systems. Pour les tests avec les anticorps au format IgG1, tous les récepteurs ont été adsorbés dans des plaques ELISA *Nunc MaxiSorp* à 250 ng/ml sur la nuit à 4°C. Après 2h de saturation à 37°C en PBS-BSA 2%, les anticorps ont été incubés en dilution en PBS-Tween 0,1% pour 2h à 37°C. Après lavages en PBS-T 0,1% et 1h d'incubation à 37°C avec un anticorps secondaire anti-F(ab')₂ humain couplé HRP et dilué au 1/5000^{ème} (réf. 109-036-006, Jackson ImmunoResearch), 100 µl de *TMB Substrate Solution* (réf. N301, ThermoFisher) ont été déposés dans les puits. Après incubation à l'obscurité pour 30 min-1h, la réaction a été stoppée par ajout d'H₂SO₄ 1M et les plaques lues à 450 nm au lecteur *Multiskan*.

Analyse des épitopes des anticorps sur membrane SPOT

Une membrane « SPOT » a été synthétisée par le laboratoire Sys2Diag sur la base de l'isoforme JMa/CYT1. Afin de déterminer les épitopes de nos anticorps, nous avons fait synthétiser une suite de peptides de 15 AA couvrant la totalité de la séquence HER4, chacun étant décalé de 3 AA par rapport au précédent. La membrane est conservée à -20°C. Pour chaque test, la membrane a d'abord été incubée dans un bain de méthanol pour activation puis lavée 3 fois 10 min à température ambiante en TBS 1X. Après saturation de la membrane en TBS-T-Lait 2% sur la nuit à température ambiante, la membrane a été lavée une fois en TBS-T (10 min à température ambiante) puis incubée avec 1 µg/ml d'anticorps d'intérêt en

TBS-T-Lait 2% pendant 1h30 à 37°C sous agitation. Après un lavage en TBS-T et incubation de l'anticorps secondaire adéquat (anti-humain : réf. A0170, Sigma ou anti-lapin : réf. A0545, Sigma) pendant 1h30 à température ambiante sous agitation, la membrane a été lavée deux fois en TBS-T et révélée à l'ECL (*Western Lightning Ultra*, Perkin Elmer). Les résultats ont été acquis sur G:BOX (Pxi 4, Syngene). Dès la fin de la révélation, la membrane a été immédiatement lavée 3 fois en eau milliQ puis régénérée selon le protocole suivant : 3 lavages de 10 min à température ambiante en tampon *Regen A* (Urée 8M, SDS 1%, β -mercaptoéthanol au 1/1000) avec un pH < 8,5 suivis de 3 lavages de 10 min à température ambiante en tampon *Regen B* (Ethanol, eau distillée et acide acétique glacial) suivis de 3 lavages de 10 min à température ambiante en méthanol. La membrane a été conservée à -20°C si l'expérience n'a pas été reconduite immédiatement.

Analyses statistiques

Tous les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Prism v5.0 (GraphPad). Pour toutes les figures, un test de Student a été appliqué pour comparer deux groupes entre eux, excepté pour la Figure 50A où un test ANOVA a été réalisé. Pour toutes les expériences, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

RESULTATS ET DISCUSSION



IV - La signalisation HER4 au niveau tumoral

A - Expression du récepteur HER4 dans des lignées cancéreuses in vitro

1. Expression membranaire de HER4

Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons, dans un premier temps, évalué l'expression globale du récepteur HER4 (indépendamment de ses isoformes) dans différents types de lignées cancéreuses in vitro. Pour cela, nous avons analysé un large panel de lignées cellulaires par cytométrie en flux (FACS).

Nous avons utilisé l'anticorps anti-HER4 H4.77.16 (ThermoFisher), ciblant la partie extracellulaire du récepteur. L'expression d'EGFR, HER2 et HER3 a aussi été étudiée afin d'avoir une idée du niveau d'expression de HER4 par rapport aux trois autres membres.

La **Figure 39** présente l'expression des récepteurs HER dans trois lignées cancéreuses :

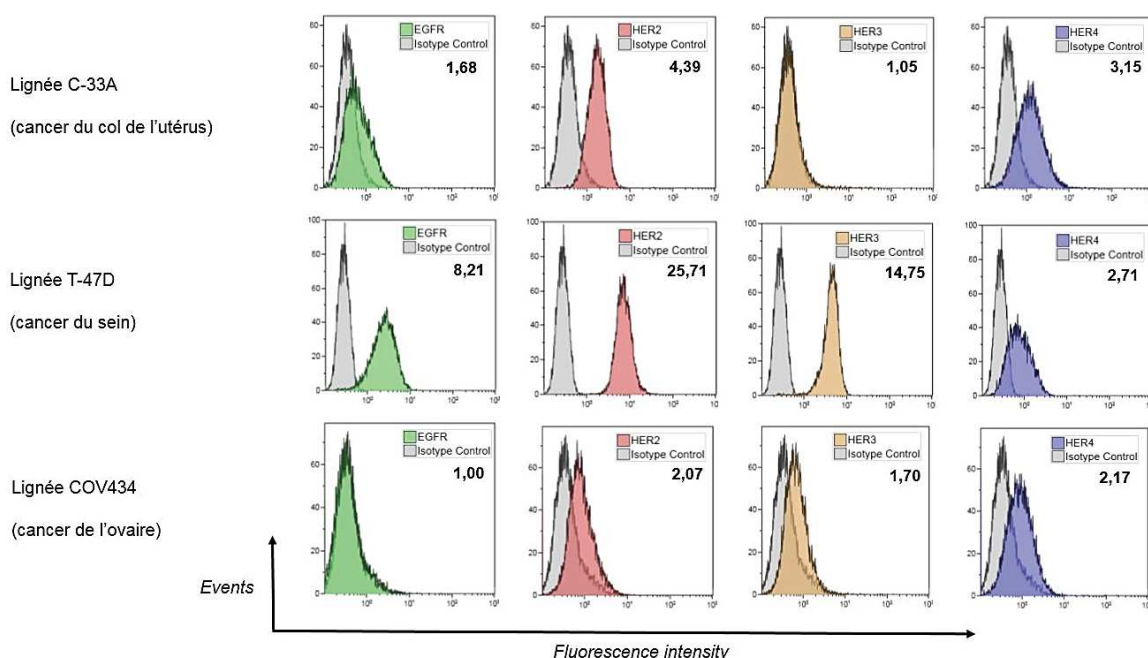


Figure 39 : Profils d'expression des récepteurs HER par cytométrie en flux

Les chiffres sous les légendes indiquent le ratio d'expression pour chaque récepteur (obtenu en divisant la moyenne géométrique de la liaison d'intérêt par la moyenne géométrique de la liaison de l'isotype contrôle). Les niveaux d'expression du récepteur HER4 dépendent surtout du type cellulaire.

La lignée C-33A (cancer du col de l'utérus) présente une expression d'EGFR, HER2 et HER4 mais pas d'expression du récepteur HER3. Ce profil d'expression de HER4 sur la lignée C-33A est représentatif d'une « forte » expression concernant ce récepteur. La lignée T-47D (cancer du sein) présente une expression de tous les récepteurs HER, avec une forte expression de HER2 et HER3. L'expression de HER4 est la plus faible. La lignée COV434 (cancer de l'ovaire) exprime HER2, HER3 et HER4 mais pas EGFR.

Environ une quarantaine de lignées provenant de plusieurs types de cancers a été testée pour l'expression du récepteur HER4, principalement par FACS. Dans certains cas, l'expression a été vérifiée par RT-PCR/qPCR et/ou par Western Blot (WB). Les résultats ont été regroupés dans le **Tableau 7** :

Les résultats indiquent que le récepteur HER4 est souvent le moins exprimé parmi les récepteurs de la famille HER, bien que ces expressions dépendent du type de cancer. Dans la majorité des lignées de cancer de l'ovaire testées, HER4 est plus exprimé que HER3.

L'expression de HER4 est retrouvée dans certaines lignées de cancers de la peau, du poumon, de la prostate ou de cancer colorectal. Parmi les quatre lignées de mélanome testées, une seule (SK-MEL-28) exprime le récepteur HER4.

Conformément à la littérature, le récepteur HER4 est souvent exprimé dans les lignées de cancer de l'ovaire, du col de l'utérus, de l'endomètre mais surtout dans les lignées de cancer du sein.

Alors que la littérature décrit une expression de HER4 au niveau clinique chez les patientes TNBC (Kim et al., 2016), la majorité des lignées de ce sous-type de cancer du sein n'expriment pas le récepteur HER4. Parmi les lignées testées, les seules positives pour l'expression de HER4 sont les lignées HCC1599 et HCC1187. Ces lignées expriment par ailleurs des niveaux relativement faibles de EGFR et HER2. L'expression de HER3 n'a pas été testée dans ces lignées.

Lignées	Type de cancer	Ratios d'expression (FACS)				Expression HER4	
		EGFR	HER2	HER3	HER4	PCR/qPCR	WB
C-33A (col)	utérus	1,68	4,39	1,05	3,15	oui	oui
Ca Ski (col)		<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	non	<i>n.d</i>
HeLa (col)		33,00	6,55	5,16	1,22	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
AN3-CA (endomètre)		3,03	1,71	1,81	1,87	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
COV434	ovaire	1,00	2,07	1,70	2,17	oui	oui
SK-OV-3		<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	1,04	non	<i>n.d</i>
KURAMOCHI		3,00	10,88	1,03	2,26	oui	oui
COV318		13,82	6,18	1,13	3,83	oui	oui
OVCAR-3		6,37	2,77	1,48	2,00	oui	<i>n.d</i>
OVCAR-8		6,62	4,00	3,32	1,04	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
OVSAHO		4,97	9,88	<i>n.d</i>	2,67	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
IGROV-1		13,34	13,15	2,78	3,78	oui	oui
A2058	peau	1,00	10,00	12,00	1,18	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
SK-MEL-5		1,60	2,68	4,18	1,15	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
SK-MEL-28		2,77	3,61	4,60	1,42	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
A431		<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	1,00	oui	<i>n.d</i>
A549	poumon	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	non	<i>n.d</i>
NCI-H661		5,74	4,11	1,48	2,05	oui	oui
T-47D	sein	8,21	25,71	14,75	2,71	oui	oui
MCF7		1,00	12,39	10,40	2,18	oui	oui
ZR-75-1		<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	2,80	oui	oui
BT-474		4,94	12,97	4,66	1,39	oui	<i>n.d</i>
CAMA-1		1,05	24,73	9,94	5,73	oui	<i>n.d</i>
SK-BR-3		<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	1,00	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
MDA-MB-361		5,03	28,14	7,18	1,74	oui	<i>n.d</i>
MDA-MB-453	sein (TNBC ?)	1,61	83,55	<i>n.d</i>	2,31	<i>n.d</i>	oui
MDA-MB-468	sein (TNBC)	117	1,00	<i>n.d</i>	1,08	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
MDA-MB-231		33,45	3,82	1,44	1,39	non	non
MDA-MB-157		11,06	4,55	<i>n.d</i>	1,00	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
HCC1395		20,65	5,00	1,00	1,00	non	non
HCC38		24,34	17,45	6,80	1,07	non	non
HCC1937		15,02	2,82	2,22	1,00	non	<i>non</i>
HCC1187		1,72	2,32	3,08	1,44	<i>n.d</i>	oui
HCC1599		1,72	2,27	<i>n.d</i>	1,41	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
Hs 578T		26,23	4,73	1,07	1,07	oui	non
BT549		14,93	4,22	1,00	1,00	non	non
SUM159		25,78	7,90	1,14	1,02	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
PC-3	prostate	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	1,05	non	<i>n.d</i>
DU 145		<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	1,04	non	<i>n.d</i>
HCT 116	colorectal	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	1,27	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
HT-29		<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	1,00	non	<i>n.d</i>
SW 1990	pancréas	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	oui	<i>n.d</i>
BxPC-3		46,80	5,12	4,26	1,00	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>

Tableau 12 : Expression du récepteur HER4 sur un large panel de lignées cancéreuses

Plusieurs lignées issues de différents types tumoraux ont été analysées principalement pour leur expression de HER4. Le ratio est obtenu en divisant la moyenne géométrique de la liaison d'intérêt par la moyenne géométrique de la liaison de l'isotype contrôle. Les résultats sont indiqués uniquement si les expériences ont été réalisées. Si l'expression n'a pas été vérifiée, il est indiqué *nd* pour non déterminé. Les lignées en orange sont les lignées qui n'expriment pas HER4.

2. Expression différentielle des isoformes du récepteur HER4

La partie extracellulaire de HER4 étant commune à toutes les isoformes, un marquage positif en FACS nous indique l'expression du récepteur mais ne donne aucune information sur les isoformes exprimées.

Nous avons donc dessiné des couples d'amorces PCR amplifiant les différentes parties du récepteur (JMa, JMb, CYT1 et CYT2) et réalisé des expériences de RT-qPCR pour déterminer l'expression de ces isoformes. Ces expériences ont été faites sur un panel de lignées positives en FACS pour l'expression de HER4 (**Figure 40**).

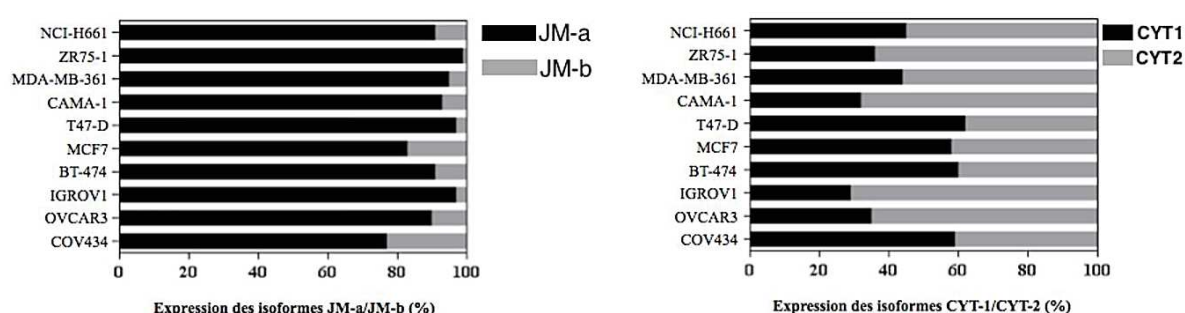


Figure 40 : Expression des isoformes JMa, JMb, CYT1 et CYT2 dans diverses lignées par RT-qPCR

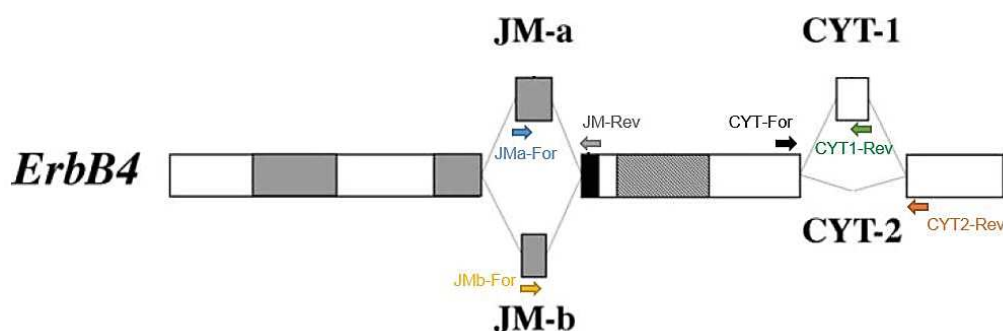
Ces profils d'expression en RT-qPCR sont représentatifs de l'expression des isoformes de HER4 dans les lignées tumorales : les isoformes JMa sont majoritairement exprimées alors que l'on retrouve une expression équivalente de CYT1 et CYT2. En conséquence, les lignées tumorales expriment majoritairement les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression du gène HPRT, dont l'expression est constante entre les lignées testées.

Toutes ces lignées cancéreuses, provenant de différents types cellulaires (poumon, sein, ovaire), expriment majoritairement les isoformes JMa. Les isoformes JMb sont très peu retrouvées, la lignée COV434 de cancer de l'ovaire étant celle qui en exprime le plus (environ 20% des isoformes de HER4). Toutes les lignées expriment les deux isoformes CYT1 et CYT2 mais dans des proportions différentes. Par exemple, la lignée de cancer du sein T-47D exprime environ 60% de CYT1 et 40% de CYT2 alors que la lignée CAMA-1 exprime 70% de CYT2 et 30% de CYT1.

Ces résultats indiquent que les isoformes de HER4 exprimées par les lignées tumorales sont majoritairement JMa/CYT1 et JMa/CYT2.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons ensuite réalisé des expériences de RT-PCR afin d'amplifier les isoformes « full-length » de HER4. L'amplification des isoformes JMb par RT-qPCR, même si celle-ci est beaucoup plus faible que pour JMa, implique que les isoformes CYT1 et CYT2 détectées pourraient être issues des isoformes JMb/CYT1 ou JMb/CYT2. Ces différences d'expression doivent être vérifiées avant d'appréhender la signalisation de HER4.

Nous avons pour cela combiné différentes amorces PCR afin de pouvoir amplifier les quatre principales isoformes de HER4 : JMa/CYT1, JMa/CYT2, JMb/CYT1 et JMb/CYT2. Le schéma de ces associations d'amorces est présenté en **Figure 41**.



Amplification des isoformes par combinaisons d'amorces :

RT-qPCR :

- JMa : JMa-For + JM-Rev
- JMb : JMb-For + JM-Rev
- CYT1 : CYT-For + CYT1-Rev
- CYT2 : CYT-For + CYT2-Rev

RT-PCR :

- JMa/CYT1 : JMa-For + CYT1-Rev
- JMa/CYT2 : JMa-For + CYT2-Rev
- JMb/CYT1 : JMb-For + CYT1-Rev
- JMb/CYT2 : JMb-For + CYT2-Rev

Figure 41 : les différentes combinaisons d'amorces permettant d'amplifier par PCR les isoformes "full-length" de HER4

Les isoformes JMa/CYT1, JMa/CYT2, JMb/CYT1 et JMb/CYT2 sont amplifiables par PCR en combinant les différentes amorces d'intérêt.

La grande taille des amplicons potentiellement générés par l'amplification des isoformes « full-length » de HER4 (plus de 1000 paires de bases) est un facteur limitant pour leur détection en RT-qPCR. Nous avons donc mis au point des conditions de PCR pour permettre l'amplification de fragments de cette longueur. La **Figure 42** présente l'amplification, sur quelques lignées sélectionnées en RT-qPCR, des isoformes « full-length » de HER4 après migration des produits de PCR sur gel d'agarose 1%.

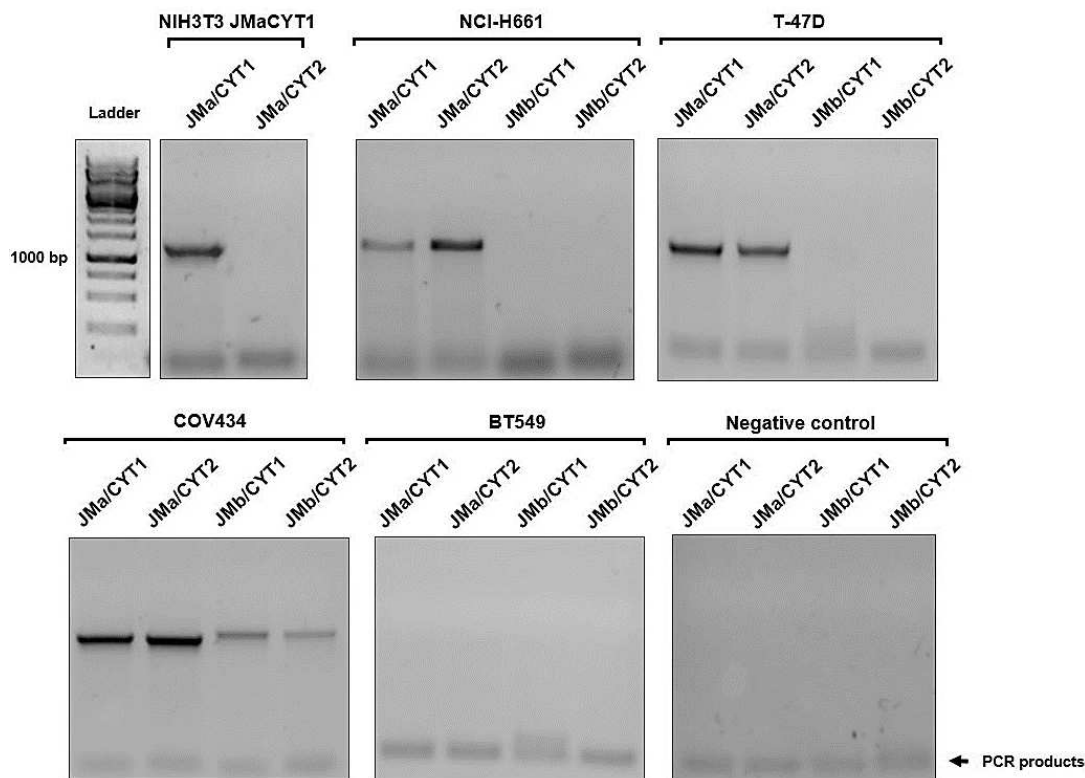


Figure 42 : Visualisation des isoformes "full-length" de HER4 après migration sur gel d'agarose

L'amplification des isoformes de HER4 par RT-PCR confirme que les lignées tumorales expriment principalement les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. La lignée COV434 exprime toutes les isoformes de HER4 alors que la lignée BT549 est négative pour l'expression de ce récepteur. La lignée NIH3T3 transfectée avec JMa/CYT1 est utilisée comme contrôle positif.

Ces résultats de PCR confirment que la majorité des lignées tumorales expriment seulement les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. La lignée NIH3T3 transfectée sélectivement avec l'isoforme JMa/CYT1 était déjà disponible au laboratoire avant mon arrivée et a été utilisée comme contrôle positif de l'amplification.

Les lignées NCI-H661 et T-47D expriment les deux isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 et aucune des isoformes JMb. C'est le cas de la majorité des lignées tumorales de cancer du sein testées comme ZR-75-1, MCF7, BT-474 ou CAMA-1 (résultats non montrés).

La lignée COV434 de cancer de l'ovaire exprime toutes les isoformes de HER4. Cette expression de toutes les isoformes est retrouvée dans les lignées de cancer de l'ovaire testées (COV318, KURAMOCHI, résultats non montrés).

La lignée BT549 (TNBC), négative pour l'expression de HER4 en FACS et WB, n'exprime pas les isoformes de HER4 en PCR, ce qui valide la spécificité de notre approche.

Nous avons maintenant une idée plus précise des isoformes de HER4 exprimées lorsque le récepteur est présent à la membrane plasmique. Comme les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 sont toujours exprimées simultanément, nous ne pouvons pas utiliser de lignées tumorales exprimant naturellement HER4 pour étudier la signalisation spécifique des

isoformes. Dans le cas, par exemple, d'une stimulation à la NRG1, nous ne pourrions pas discriminer l'effet observé dû à JMa/CYT1, à JMa/CYT2 ou à la combinaison des deux isoformes.

3. Sélection de lignées « modèles » pour l'étude de la signalisation

L'idée initiale était de trouver des lignées exprimant une seule isoforme de HER4, idéalement une lignée exprimant JMa/CYT1 et une lignée exprimant JMa/CYT2, afin que notre étude de la signalisation soit la plus proche de la réalité biologique. Malgré le criblage de nombreuses lignées, nous n'avons malheureusement pas découvert de lignées exprimant une seule des isoformes de HER4. Cette observation nous a donc obligé à utiliser des outils de biologie moléculaire pour générer des lignées exprimant une seule isoforme du récepteur HER4.

a. Extinction sélective des isoformes par siRNA

Notre première approche pour générer ces modèles a été d'essayer d'éteindre spécifiquement chaque isoforme à l'aide de siRNA (*small interfering RNA*). Pour cela, nous avons utilisé la lignée C-33A de cancer du col de l'utérus qui n'exprime pas le récepteur HER3. Cette absence de HER3 est indispensable pour l'étude ultérieure de la signalisation induite par la NRG1, puisque la liaison de la NRG1 sur HER3 pourrait biaiser notre étude. Cette absence d'expression a été vérifiée par FACS (**Tableau 12**).

Les seuls siRNA disponibles dans le commerce sont dessinés pour éteindre totalement le récepteur HER4, indépendamment de ses isoformes. Il est en théorie possible d'éteindre spécifiquement les isoformes de HER4 mais la fenêtre pour dessiner de tels siRNA est très petite (**Figure 43A**). En effet, l'isoforme JMa/CYT1 comporte 16 AA de plus que JMa/CYT2 et un siRNA ciblant JMa/CYT1 devrait être dirigé sur cette zone, permettant d'éteindre l'expression de JMa/CYT1 sans modifier celle de JMa/CYT2. Le contraire (éteindre JMa/CYT2 sans toucher à JMa/CYT1) semble plus difficile à faire car les deux exons, qui sont rapprochés lors de l'épissage alternatif pour former JMa/CYT2, sont aussi présents dans JMa/CYT1.

Nous avons dessiné ces siRNA pour tenter d'éteindre sélectivement les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 sur la lignée C-33A. Les résultats présentés en **Figure 43B** indiquent que la transfection d'un *SMARTpool* commercial ciblant HER4 (« total HER4 ») induit la dégradation complète du récepteur HER4 et de sa partie intracellulaire 4ICD après 96h de transfection. La détection de HER4 à 180 kDa et de 4ICD à 80 kDa est possible grâce à l'utilisation d'un anticorps reconnaissant la partie intracellulaire du récepteur (E200 ; Abcam).

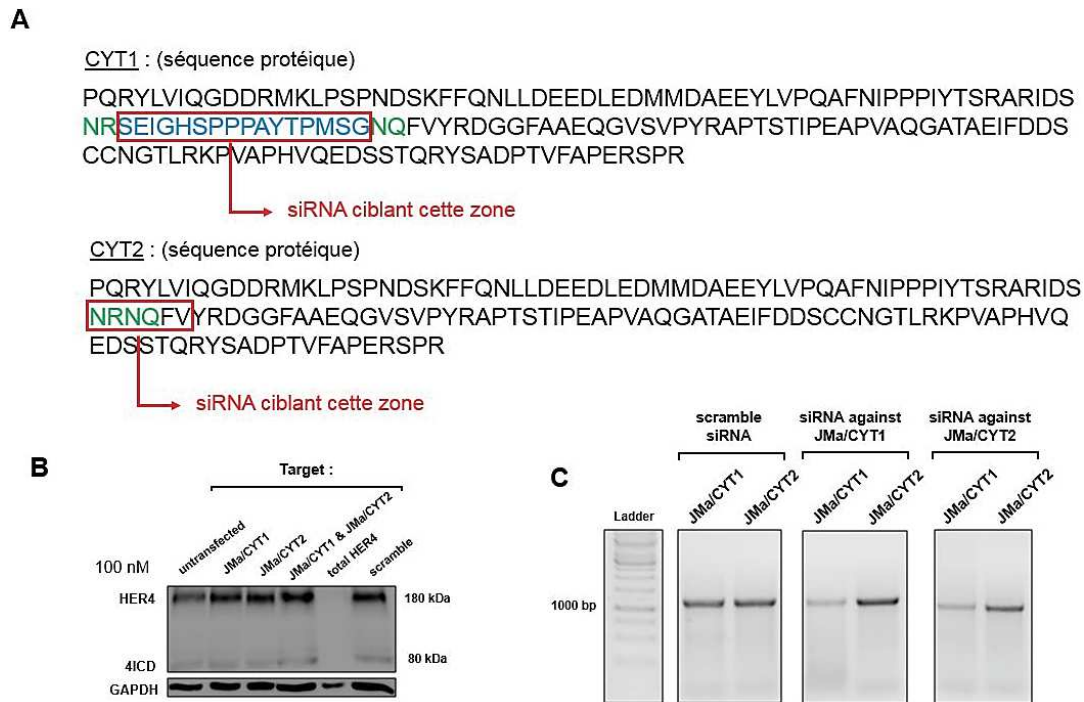


Figure 43 : Extinction de HER4 et de ses isoformes par siRNA

(A) Séquences protéiques des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Les zones encadrées sont les zones ciblées par les siRNA dessinés pour éteindre spécifiquement JMa/CYT1 et JMa/CYT2. De par sa séquence l'isoforme JMa/CYT1 semble la plus facile à éteindre. (B) Western Blot de l'expression de HER4 et 4ICD 96h après transfection des siRNA contre JMa/CYT1, JMa/CYT2, JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ou d'un pool de siRNA pour éteindre totalement HER4. (C) Amplification des isoformes par PCR après 96h de transfection avec les siRNA ciblant JMa/CYT1 et JMa/CYT2.

L'absence d'expression de HER4 induite par le *SMARTpool* à 96h est associée à une mort cellulaire totale (résultats non montrés), indiquant que dans cette lignée C-33A la présence de HER4 est indispensable à la survie des cellules. Contrairement au *SMARTpool* « total HER4 », les siRNA dirigés contre JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ne modifient que très légèrement les niveaux d'expression de HER4 et 4ICD visualisés par WB. Puisqu'il n'existe aucun anticorps anti-HER4 pouvant discriminer les isoformes CYT1 et CYT2 en WB, l'amplification des isoformes « full-length » en PCR est nécessaire pour vérifier ces résultats. Alors que la transfection d'un siRNA « scramble » ne modifie pas l'expression de JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans la lignée C-33A, la transfection du siRNA contre JMa/CYT1 semble diminuer l'expression de cette isoforme, visualisée par PCR. Le siRNA contre JMa/CYT2 semble aussi modifier l'expression de JMa/CYT1, probablement à cause de sa séquence commune à CYT1. Les deux siRNA n'induisent pas la dégradation totale de l'une ou l'autre des isoformes de HER4. (**Figure 43C**).

Ces variations dans les niveaux d'amplification des différentes isoformes par PCR, qui auraient tendance à nous faire penser que le siRNA dirigé contre JMa/CYT1 diminue effectivement l'expression de cette isoforme (**Figure 43C**), ou que la lignée NCI-H661 exprime plus de JMa/CYT2 que de JMa/CYT1 (**Figure 42**), sont à considérer avec attention. En effet,

les conditions de PCR (caractéristiques de chaque amorce, fidélité de la polymérase utilisée, nombre de cycles influençant les niveaux d'amplification) et les faibles différences entre les isoformes ne peuvent pas nous permettre de quantifier de façon absolue les isoformes de HER4 par cette technique. Ces résultats décevants et l'absence d'anticorps spécifique des isoformes CYT1 et CYT2 en WB rendent cette approche par siRNA inefficace.

b. Extinction sélective des isoformes par CRISPR-Cas9

Une autre approche utilisée pour l'extinction de protéines est basée sur l'outil *CRISPR-Cas9*. Cette approche se fait directement au niveau génique et a l'avantage d'être stable, contrairement à l'utilisation de siRNA dont l'effet est limité dans le temps. Nous avons essayé d'éteindre sélectivement les isoformes de HER4 par cette approche mais la spécificité de la séquence de HER4 fait qu'il est impossible d'éteindre JMa/CYT2 sans impacter JMa/CYT1. La seule isoforme pouvant en théorie être supprimée sans modifier l'autre est JMa/CYT1. Nous n'avons pas poursuivi cette voie car il ne nous a pas paru intéressant d'avoir un modèle exprimant JMa/CYT1 sans son pendant JMa/CYT2. Cette technique pourrait être utilisée pour éteindre le gène entier et réintroduire ensuite les isoformes, mais nous ne l'avons pas développée sur la C-33A car l'extinction totale de HER4 mène à la mort cellulaire (**Figure 42B**).

c. Construction de modèles de surexpression stable des isoformes

La modification de l'expression des isoformes dans une lignée exprimant naturellement HER4 apparaissait comme la meilleure stratégie pour étudier la signalisation des isoformes sans trop modifier l'environnement cellulaire. Cette approche s'étant avérée impossible, nous avons tenté de surexprimer les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 de manière stable.

Pour cela, nous avons créé des vecteurs lentiviraux codant pour ces deux isoformes et produit des lentivirus par transfection de cellules HEK293T. Les lignées HCC1395 et BT549 (TNBC), utilisées comme modèles car n'exprimant ni HER3 ni HER4, ont été infectées avec ces virions. Les cellules transduites avec JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont été soumises à une pression de sélection par antibiotiques pendant plusieurs semaines puis analysées par FACS pour l'expression des récepteurs HER.

De manière générale, pour les deux lignées, les cellules transduites avec JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont vu leur prolifération être largement ralentie par l'expression des deux isoformes. La majorité des cellules BT549 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 est morte dès la première semaine de sélection, les quelques cellules adhérentes restantes formant des petits « *clusters* » de cellules. Ces cellules adhérentes n'ont jamais vraiment proliféré, indiquant un état proche de la quiescence (temps de doublement estimé : supérieur à un mois).

Dans ces cellules BT549, la transduction simultanée des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2, mimant ainsi l'expression « naturelle » de HER4, a conduit à la mort de toutes les cellules (résultats non montrés).

Les cellules HCC1395 transduites avec JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont été les seules à proliférer et donc à avoir pu être analysées (**Figure 44**) :

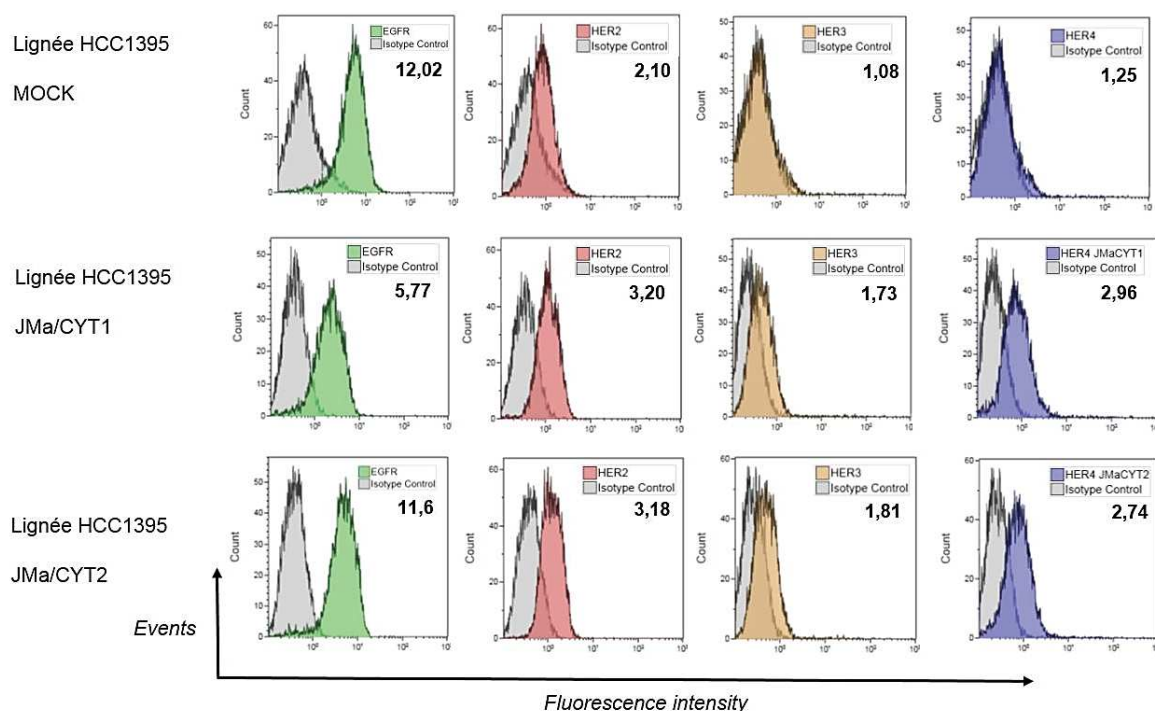


Figure 44 : Expression des isoformes de HER4 par transduction lentivirale

Les lignées HCC1395 et BT549 (TNBC) n'exprimant ni HER3 ni HER4 ont été utilisées comme modèles pour la génération de lignées stables exprimant les deux isoformes principales de HER4. De manière intéressante, la transduction de JMa/CYT1 diminue les niveaux d'EGFR et augmente légèrement ceux de HER2 et HER3 alors que la transduction de JMa/CYT2 augmente seulement ceux de HER2 et HER3. Les cellules BT549 transduites avec JMa/CYT1 ou JMa/CYT2 sont soit mortes soit entrées en état de quiescence et n'ont donc pas pu être analysées.

Alors que les cellules HCC1395 MOCK expriment de forts niveaux d'EGFR, un niveau relativement bas de HER2 et pas d'expression de HER3 et de HER4, la transduction de JMa/CYT1 et JMa/CYT2 modifie les niveaux d'expression des récepteurs HER.

Par rapport à la lignée HCC1395 non transduite, l'expression de HER4 JMa/CYT1 diminue le niveau d'EGFR de moitié, augmente très légèrement l'expression de HER2 et augmente celle de HER3. L'expression de HER4 JMa/CYT2 ne modifie pas le niveau d'EGFR et augmente l'expression de HER2 et de HER3 dans les mêmes proportions que JMa/CYT1.

Cette modulation de l'expression des récepteurs EGFR et HER3 induite par l'expression des isoformes de HER4 était inattendue, et la co-expression de HER3 nous

empêche d'utiliser ces modèles de lignées stables pour étudier la signalisation des isoformes de HER4 après stimulation par la NRG1.

d. Construction de modèles de surexpression transitoire des isoformes

Les difficultés rencontrées pour générer des lignées stables surexprimant les isoformes de HER4 suggèrent un fort potentiel suppresseur de tumeur de ce récepteur. Nous avons pensé que l'expression inattendue du récepteur HER3 était peut-être un mécanisme compensatoire pour limiter les effets anti-prolifératifs des isoformes, et qu'une expression transitoire de ces isoformes HER4 pourrait permettre d'étudier leurs effets précoces sans induire l'expression de ce récepteur.

Nous avons alors construit des vecteurs d'expression transitoire des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Nous avons utilisé la lignée BT549 comme modèle pour la suite de notre étude car elle prolifère plus vite et est plus facilement transfectable que la lignée HCC1395. L'absence d'expression de HER4 sur la lignée BT549 a été vérifiée par RT-PCR, WB et FACS.

La **Figure 45** présente l'expression au cours du temps des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 transfectées dans la lignée BT549.

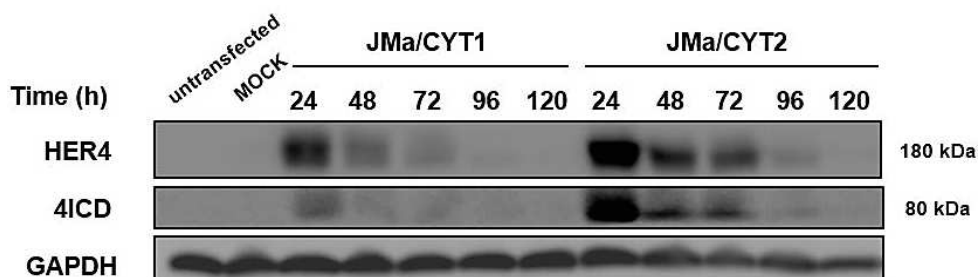


Figure 45 : Expression transitoire des isoformes de HER4

Expression au cours du temps des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans la lignée BT549 après transfection transitoire. L'isoforme JMa/CYT2 est mieux exprimée que JMa/CYT1 et son expression perdure plus longtemps dans le temps. L'expression de 4ICD de JMa/CYT2 est aussi plus stable que celle de JMa/CYT1.

L'expression des isoformes JMa/CYT1, JMa/CYT2 et de leurs parties intracellulaires 4ICD respectives est visible dès 24h post-transfection. L'expression de JMa/CYT2 est plus importante que celle de JMa/CYT1 et perdure plus longtemps dans le temps. Alors que l'expression de HER4/4ICD de JMa/CYT1 est à peine visible à 72h, celle de JMa/CYT2 est encore bien présente.

Le clivage de HER4, entraînant la libération de 4ICD, semble spontané dès 24h pour les deux isoformes, avec un clivage plus important pour 4ICD issu de JMa/CYT2 (4ICD-CYT2).

4ICD issu de JMa/CYT1 (4ICD-CYT1) semble très rapidement dégradé alors que l'expression de 4ICD-CYT2 est plus stable et encore présente à 72h post-transfection. Globalement, l'isoforme JMa/CYT2 est plus stable et perdure plus longtemps que JMa/CYT1.

Les isoformes transfectées dans cette lignée BT549 sont phosphorylables par la NRG1. Une stimulation par 30 ng/ml de ce ligand entraîne la phosphorylation des deux isoformes de HER4 sur leur Tyrosine 1284. Cette phosphorylation est présente dans la partie C-terminale du récepteur dans une zone commune aux deux isoformes. Cependant, les *timings* de phosphorylations sont différents pour les deux isoformes (résultats non montrés). Toutefois, ces résultats indiquent que les isoformes transfectées sont fonctionnelles.

Les deux isoformes sont bien exprimées à la membrane plasmique, comme vérifié par FACS après 24h de transfection (**Figure 46**) :

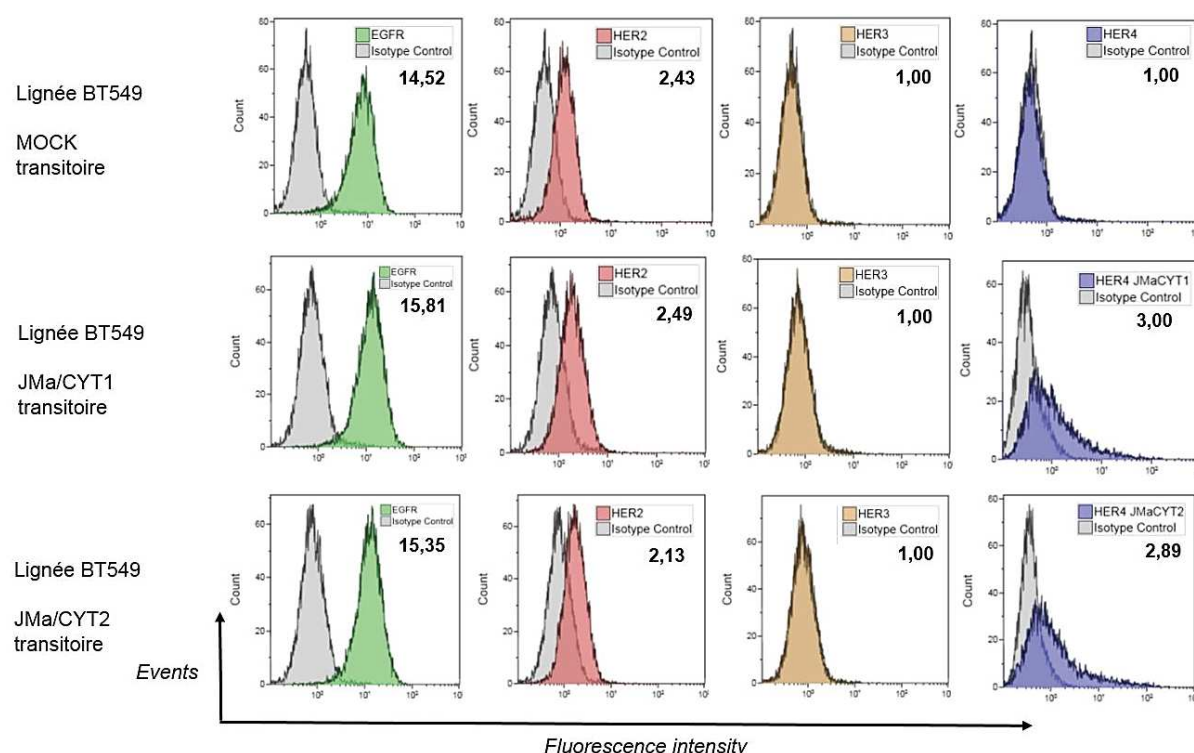


Figure 46 : Expression membranaire des isoformes de HER4 sur un modèle de cellules BT549 transfectées transitoirement

La lignée BT549 utilisée comme modèle n'exprime ni HER3 ni HER4. La transfection transitoire des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ne modifie pas l'expression des récepteurs HER, faisant de ce modèle de transfection transitoire le modèle idéal pour l'étude de la signalisation des isoformes après stimulation par la NRG1.

Alors que les cellules BT549 transfectées avec un vecteur vide (MOCK) n'expriment ni HER3 ni HER4, la transfection transitoire des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 résulte en l'expression membranaire des deux isoformes de HER4 sans modifier les niveaux d'expression des autres récepteurs.

Ces résultats, avec notamment l'absence d'expression membranaire de HER3, valident ce modèle de cellules BT549 transfectées transitoirement comme le modèle idéal pour étudier la signalisation des isoformes de HER4 après stimulation par la NRG1. De plus, les niveaux d'expression comparables des autres récepteurs entre les trois modèles (transfectés MOCK, JMa/CYT1 et JMa/CYT2) limitent les biais qui auraient pu survenir avec des niveaux d'expression différents entre les récepteurs EGFR, HER2 et HER3.

B - Effets biologiques induits par l'axe NRG1 - HER4

1. Induction d'une mort cellulaire par la NRG1...

Nos hypothèses initiales, appuyées par la littérature (Das et al., 2010; Gallo et al., 2006), suggèrent un effet suppresseur de tumeur induit par le récepteur HER4 sous certaines conditions. L'observation que la transduction de ce récepteur induit la mort de cellules BT549 et HCC1395 conforte cette hypothèse. Même si plusieurs transductions et différents lots de virus nous ont donné les mêmes résultats, ces simples observations visuelles ne peuvent être une preuve en soi.

Dans les lignées tumorales exprimant le récepteur, nous pensons que cet effet suppresseur de tumeur est inductible par la NRG1, le principal ligand du récepteur HER4. Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons donc stimulé plusieurs lignées exprimant HER4 avec la NRG1 et étudié plusieurs voies de signalisation. La lignée C-33A est notre lignée modèle car elle n'exprime pas le récepteur HER3 et assez fortement HER4 et ses isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. C'est la lignée sur laquelle nous avons pu mener le plus d'expériences.

Dans la majorité de nos expériences, nous avons maintenu les cellules au minimum 12h dans un milieu de culture contenant 1% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) avant de les stimuler avec 30 ng/ml de NRG1 dans ce même milieu, afin d'éliminer toute production d'autres facteurs de croissance pouvant biaiser les résultats obtenus.

La stimulation des cellules C-33A par 30 ng/ml de NRG1 entraîne la mort des cellules tumorales, l'effet étant important dès 48h de traitement. Comme démontré par WB (**Figure 47A**), la NRG1 induit une augmentation du clivage de PARP au cours du temps, marquant l'induction d'une mort cellulaire pouvant être caspase-dépendante. Le fort clivage de PARP présent en condition non stimulée à 72h peut être le reflet de la mort cellulaire induite par la privation en facteurs de croissance mais pourrait aussi être due à l'augmentation de l'expression de HER4 induite par cette privation, bien visible à 72h. L'augmentation de l'expression de HER4 induite par cette privation (la « *starvation* ») a déjà été décrite dans la littérature (Hua et al., 2012; Wang et al., 2018).

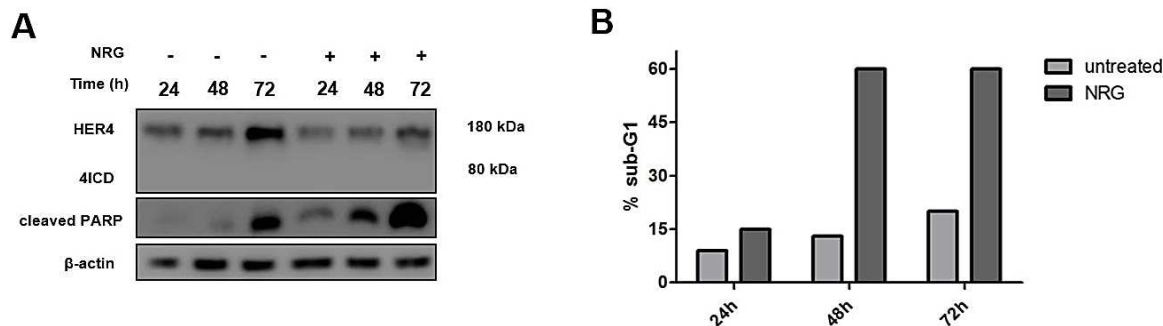


Figure 47 : Induction par la NRG1 d'un mécanisme de mort cellulaire *via* HER4

(A) Western Blot montrant le clivage de PARP induit au cours du temps par la stimulation du récepteur HER4 avec 30 ng/ml de NRG1, sur la lignée C-33A. L'expression de HER4 est induite par la « starvation ». (B) Analyse du cycle cellulaire, dans les mêmes conditions de traitement que dans (A) : la NRG1 induit dès 48h de traitement un très fort pourcentage de cellules en sub-G1, indiquant une fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire.

Si l'expression de HER4 augmente en condition de « starvation », la NRG1 induit dès 24h la diminution de l'expression du récepteur. L'expression de 4ICD n'est visible qu'à partir de 96h, associée à un très fort clivage de PARP dans les deux conditions (résultats non montrés).

L'analyse du cycle cellulaire de cellules C-33A traitées dans ces mêmes conditions confirme l'induction d'une voie de mort cellulaire. Alors que la NRG1 induit à 24h une légère augmentation du nombre de cellules en sub-G1 (9% vs 15%), cette augmentation est drastique à 48h de traitement (13% vs 60%) (**Figure 47B**) et persiste à 72h. Ce fort pourcentage indique une fragmentation de l'ADN mais le mécanisme de mort cellulaire ne semble pas être de l'apoptose, puisqu'un marquage Annexine V/7AAD n'a donné aucun résultat, de 24h à 96h de traitement (**Figure 48**). Cette absence d'apoptose est corrélée à une absence de clivage de la caspase 3 (résultats non montrés).

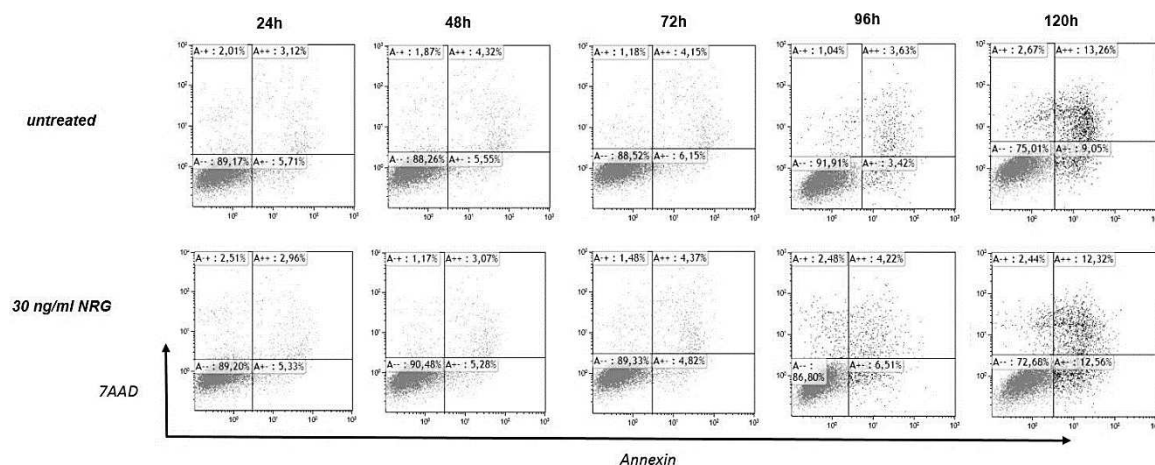


Figure 48 : Marquage Annexine V/7-AAD de cellules C-33A traitées avec la NRG1

La NRG1 n'induit pas l'apoptose des cellules C-33A malgré l'observation du clivage de PARP et d'une forte population de cellules en sub-G1. L'absence d'apoptose a été confirmée par l'absence de clivage de la caspase 3.

La NRG1 à 120h de stimulation induit une augmentation significative des niveaux d'ATP, nécessaire à l'induction de l'apoptose, dans la lignée C-33A (**Figure 49A**). Cependant, l'absence de clivage de la caspase 3 et de marquage positif en Annexine V/7-AAD indique que la voie apoptotique n'est pas la voie principale d'induction de la mort cellulaire par la NRG1.

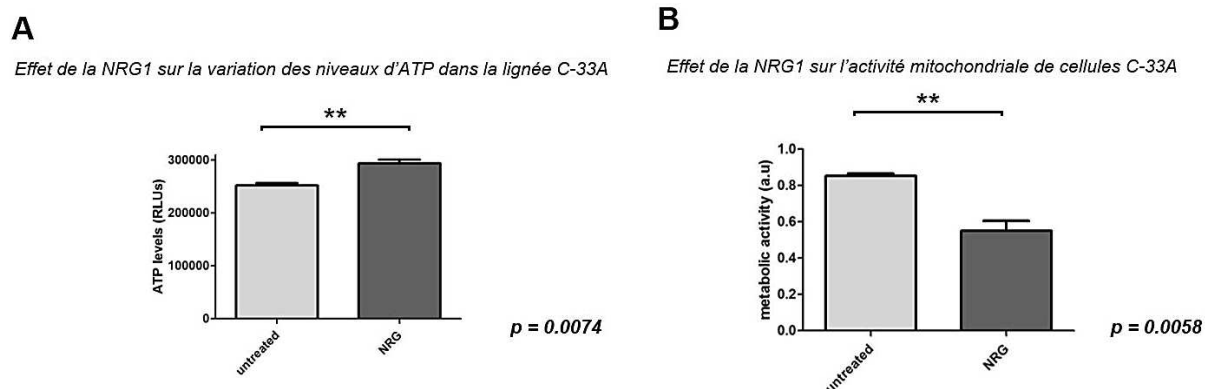


Figure 49 : La NRG1 augmente les niveaux d'ATP et diminue l'activité mitochondriale de cellules C-33A

(A) Mesure des niveaux d'ATP par bioluminescence après 120h de stimulation par 30 ng/ml de NRG1, sur la lignée C-33A. **(B)** Mesure par MTS de l'activité mitochondriale de cellules C-33A stimulées par 30 ng/ml de NRG1 pendant 120h.

Il existe plus d'une dizaine de voies de mort cellulaire pouvant être induites dans une cellule, dont la majorité n'est pas bien étudiée et dont les mécanismes majeurs sont encore inconnus. Certaines morts cellulaires, comme la parthanatos, impliquent la protéine PARP et des effets caspases-indépendants comme la libération d'AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) et la dépolarisation mitochondriale (Andrabi et al., 2008).

Ce mécanisme de mort est peut-être impliqué dans la mort cellulaire induite par la NRG1, puisque nos résultats en MTS décrivent une diminution significative de l'activité mitochondriale des cellules C-33A après 120h de stimulation par la NRG1 (**Figure 49B**). Cette diminution significative de l'activité mitochondriale est aussi visible sur les lignées de cancer du sein T-47D et ZR-75-1 stimulées dans les mêmes conditions (**Figure 50**). Bien que ces cellules expriment le récepteur HER3, nous pouvons légitimement penser que l'effet de la NRG1 est dû à HER4, car la NRG1 a une meilleure affinité pour HER4 que pour HER3, et nous avons montré ce même effet sur la lignée C-33A qui n'exprime pas HER3.

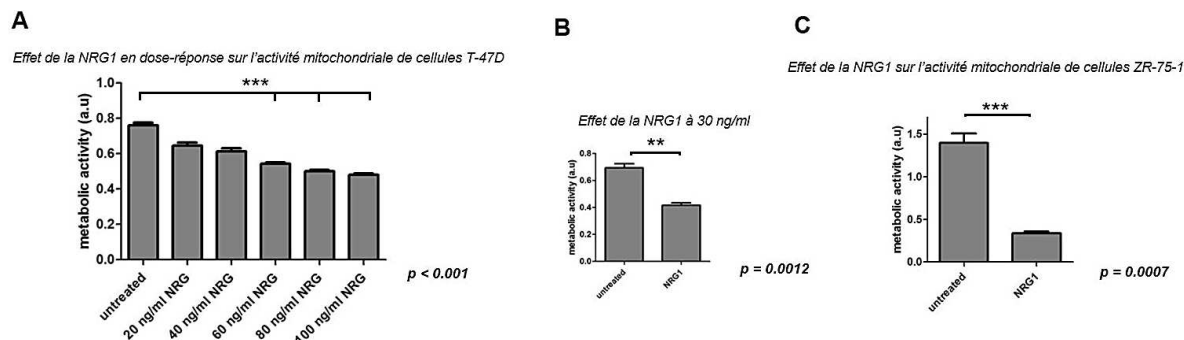


Figure 50 : Effet de la NRG1 sur l'activité mitochondriale de cellules T-47D et ZR-75-1

(A) Effet de la NRG1 en dose-réponse sur l'activité mitochondriale de cellules T-47D, mesurée par MTS. **(B)** Effet à 30 ng/ml de NRG1, concentration utilisée lors du traitement des cellules C-33A. **(C)** Effet de la NRG1 à 30 ng/ml sur l'activité mitochondriale de cellules ZR-75-1, mesurée par MTS. Toutes les mesures ont été faites après 120h de stimulation.

Cette mort cellulaire induite par la NRG1 est visible sur d'autres lignées que la C-33A exprimant HER4, comme les lignées MDA-MB-453 et KURAMOCHI. Elle peut être appréhendée indirectement par un test SRB (SulfoRhodamine B). En se liant aux protéines, ce composé fluorescent permet de quantifier leurs niveaux et donc de déterminer indirectement la prolifération cellulaire. Ainsi, le niveau de protéines est diminué significativement dans les lignées C-33A et MDA-MB-453, stimulées par 30 ng/ml de NRG1 durant 120h. Cela semble être aussi le cas pour la lignée KURAMOCHI même si les résultats ne sont pas significatifs (**Figure 51**).

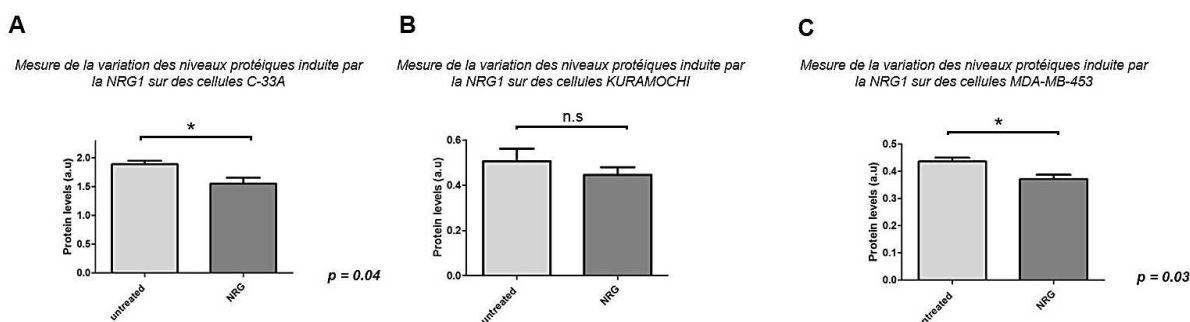


Figure 51 : Mesure indirecte par SRB de la mort cellulaire induite par la NRG1

Effet de la NRG1 sur les niveaux protéiques de cellules C-33A **(A)**, KURAMOCHI **(B)** et MDA-MB-453 **(C)**. Une diminution de la quantité de protéines peut être indirectement associée à la mort cellulaire. Toutes les mesures ont été faites après 120h de stimulation par 30 ng/ml de NRG1.

Il faut cependant rester prudent avec ces mesures indirectes de la mort cellulaire tant que le mécanisme d'action de la NRG1 *via* HER4 n'est pas élucidé. En effet, les lignées C-33A, KURAMOCHI et MDA-MB-453 stimulées avec la NRG1 présentent un phénotype bien différent de celui de lignées COV318 et HCC1187. Alors que la NRG1 induit la mort cellulaire dans tous ces modèles, cela suggère que le mécanisme d'action semble différent selon les

lignées. Les cellules C-33A, après stimulation par la NRG1, changent de morphologie et passent d'un phénotype de cellules rondes et regroupées à des cellules plus étalées et dispersées. Les cellules COV318, après stimulation par la NRG1, changent drastiquement de phénotype : elles adhèrent encore à la matrice mais sont translucides et semblent perforées (**photo Figure 53**). Pourtant, une analyse en WB révèle un clivage de PARP dans les deux lignées et l'absence de caspase 3 clivée (**Figure 52**).

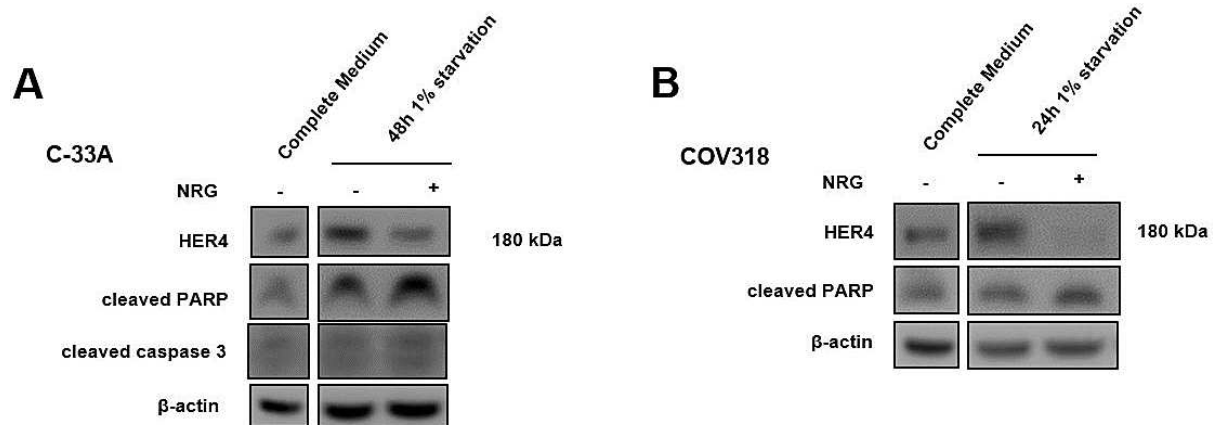


Figure 52 : Clivage de PARP induit par la NRG1 sur les lignées C-33A et COV318

La NRG1 induit le clivage de PARP dans les lignées C-33A (A) et COV318 (B), bien que les phénotypes de ces deux lignées après stimulation par la NRG1 soient totalement différents. Dans les deux modèles, la « starvation » induit l'expression du récepteur HER4 et la stimulation par la NRG1 induit la dégradation du récepteur. De façon inattendue, le clivage de PARP est indépendant du clivage de la caspase 3.

Dans ces lignées et de manière inattendue, les résultats des tests SRB démontrent une augmentation significative des niveaux de protéines induits par la NRG1 sur la lignée HCC1187 et une tendance sur la lignée COV318, alors que la NRG1 induit clairement un phénotype de mort cellulaire qui ressemble à de la nécrose (**Figure 53**).

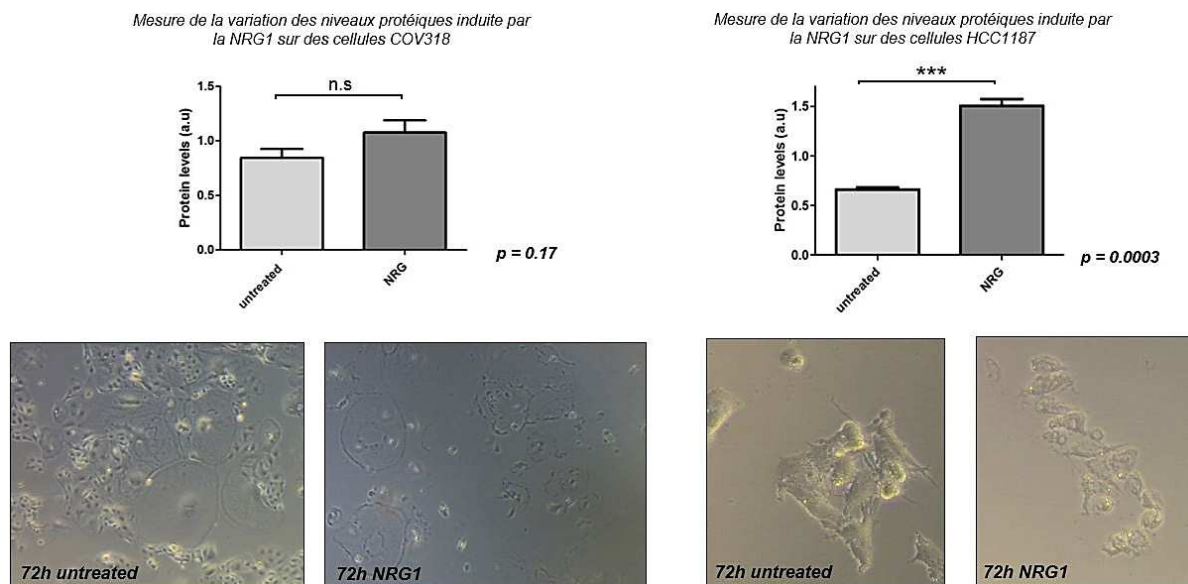


Figure 53 : Le phénotype de mort cellulaire induit par la NRG1 est associé à une augmentation des niveaux protéiques dans les lignées COV318 et HCC1187

La NRG1 induit très clairement une mort cellulaire ressemblant à la nécrose dans les cellules COV318 et HCC1187. De façon inattendue, les tests SRB menés sur ces lignées indiquent une augmentation de la quantité de protéines dans ces cellules après stimulation par la NRG1. Ce phénotype et ces augmentations protéiques révélées par SRB ne sont pas du tout observés sur d'autres lignées dont la mort cellulaire est aussi induite par la NRG1, comme les lignées C-33A ou MDA-MB-453.

Dans ce modèle HCC1187, la NRG1 induit une augmentation significative des niveaux d'ATP et du relargage d'Adénylate Kinase, une enzyme qui lorsqu'elle est dosée dans le milieu extracellulaire est le signe d'une rupture de la membrane plasmique (**Figure 54**). Il est intéressant de noter que l'Adénylate Kinase n'est pas présente dans le milieu de cellules C-33A stimulées par la NRG1 (résultats non montrés). Cela indique que la NRG1 semble induire la mort cellulaire dans différentes lignées par différents mécanismes d'action.

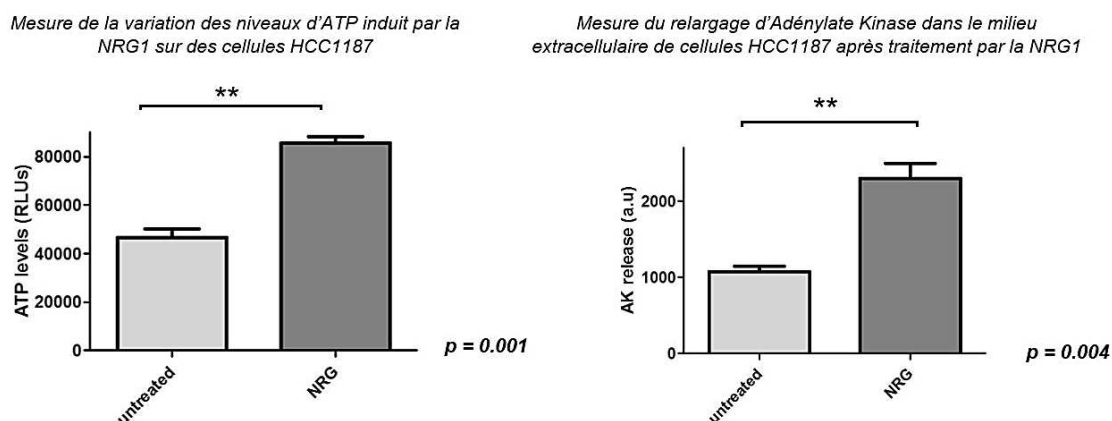


Figure 54 : Mesure des niveaux d'ATP et du relargage d'Adénylate Kinase dans des cellules HCC1187 après stimulation par la NRG1

Le phénotype de mort cellulaire observé sur la lignée HCC1187 après stimulation par la NRG1 est associé à une augmentation significative des niveaux d'ATP, mesurés par bioluminescence. Le dosage de l'enzyme Adénylate Kinase dans le milieu extracellulaire de ces mêmes cellules indique une rupture de la membrane plasmique, ce qui est corrélé avec le phénotype observé.

Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que la NRG1 induit la mort cellulaire sur des cellules exprimant le récepteur HER4, indépendamment de HER3. Les mécanismes exacts de ces morts cellulaires qui semblent non apoptotiques restent à déterminer.

2. ... mort cellulaire dépendante des isoformes de HER4

Afin de déterminer l'isoforme de HER4 responsable de cet effet, nous avons transfecté transitoirement les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans des cellules BT549 et étudié l'effet de leur expression sur le clivage de PARP en absence ou en présence de NRG1. Nous avons étudié si les expressions des protéines suppresseurs de tumeur p53, p21 et p27 étaient différemment modulées par l'expression des deux isoformes, puisque HER4 a été décrit comme interagissant avec ces dernières (Arasada and Carpenter, 2005; Gilmore-Hebert et al., 2010).

a. La NRG1 induit la suppression de tumeur via JMa/CYT1

Pour toutes les expériences, les cellulesensemencées puis traitées proviennent du même lot de cellules transfectées, ceci afin de garantir une certaine homogénéité de transfection. L'expression relativement stable des isoformes au moins jusqu'à 72h post-transfection (**Figure 45A**) nous permet d'étudier des cinétiques de cet ordre.

La **Figure 55** présente les résultats en WB de l'expression de l'isoforme JMa/CYT1 stimulée ou non par 30 ng/ml de NRG1, de 24h à 72h dans les cellules BT549 :

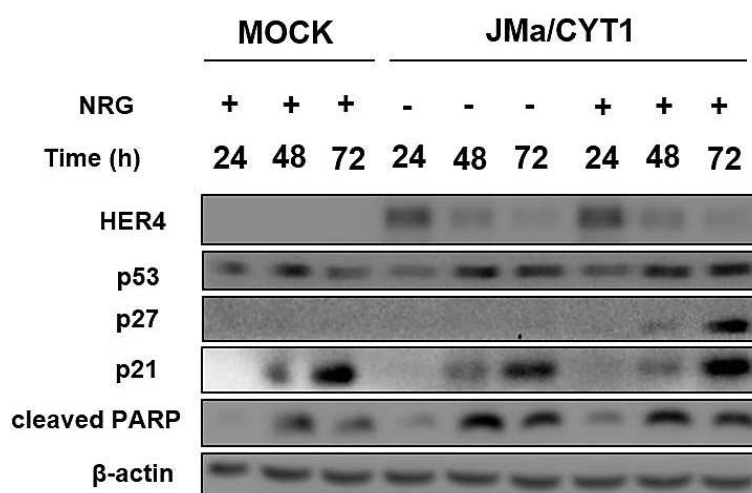


Figure 55 : Expression et effets de l'isoforme JMa/CYT1 dans la lignée BT549 après stimulation ou non par la NRG1

La transfection de l'isoforme JMa/CYT1 dans les cellules BT549 induit le clivage de PARP après 48h d'expression de l'isoforme. L'expression de p53 est induite après 72h d'expression de JMa/CYT1. La stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par la NRG1 induit des effets suppresseurs de tumeurs : expression de p27, p21 et p53 associée à un maintien de ce clivage de PARP.

Les cellules BT549 transfectées avec un plasmide MOCK n'expriment pas le récepteur HER4 et présentent des niveaux basaux de p53, p21 et PARP clivé. L'expression de p27 n'est pas détectable. L'expression seule de HER4 JMa/CYT1, sans stimulation par la NRG1, diminue progressivement au cours du temps et augmente le clivage de PARP à 48h et 72h, indiquant un rôle suppresseur de tumeur pour cette isoforme. A 72h, l'expression de JMa/CYT1 augmente l'expression de p53, diminue faiblement celle de p21, p27 restant indétectable.

La stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par la NRG1 maintient l'expression de p53 à 72h, et augmente fortement les niveaux de p27 et p21. Le clivage de PARP induit par l'expression de JMa/CYT1 est maintenu par la stimulation à la NRG1.

Pour confirmer cet effet suppresseur induit par la NRG1 sur JMa/CYT1, nous avons transfecté cette isoforme dans la lignée C-33A exprimant naturellement JMa/CYT1 et JMa/CYT2, afin de voir si la modification de ce ratio $JMa/CYT1/JMa/CYT2$ par l'expression de cette isoforme pouvait impacter la signalisation induite par la NRG1. La **Figure 56** présente ces résultats sur la lignée C-33A, confirmant ceux obtenus sur la lignée BT549 :

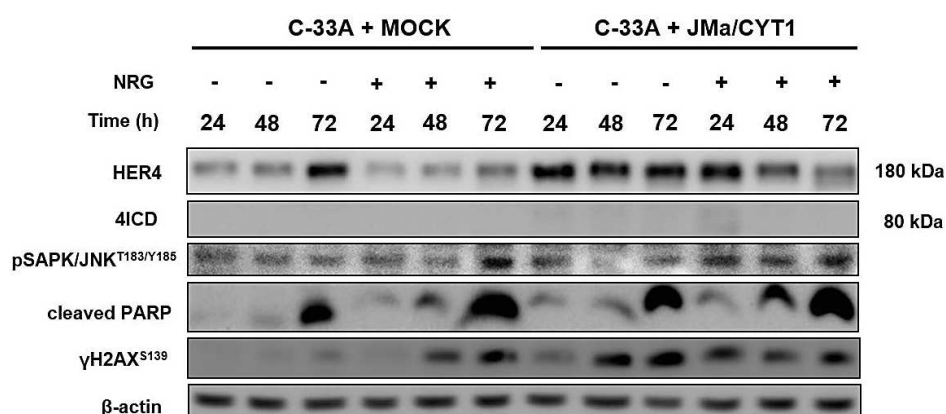


Figure 56 : Surexpression de l'isoforme JMa/CYT1 dans la lignée C-33A et effets de la NRG1

La transfection de l'isoforme JMa/CYT1 dans la lignée C-33A confirme l'effet obtenu sur la lignée BT549 : alors que la NRG1 induit un fort clivage de PARP, la surexpression de JMa/CYT1 et sa stimulation augmente ce clivage dès 48h avec l'induction de dommages à l'ADN. La NRG1, qui induit l'activation de la voie JNK, augmente l'activation de cette voie via l'isoforme JMa/CYT1.

Comme déjà démontré, la stimulation par la NRG1 sur la lignée C-33A HER4+/HER3- induit un fort clivage de PARP à 72h et diminue l'expression de HER4. Cet effet n'est pas affecté par la transfection du plasmide MOCK. Ce clivage de PARP est associé à des dommages à l'ADN, mesuré par l'induction de γH2AX. La NRG1 induit à 72h une augmentation de la phosphorylation de JNK, une voie décrite comme étant activée par la NRG1 (Muraoka-Cook et al., 2006a). L'activation de cette voie, impliquée dans le stress oxydatif et les dommages à l'ADN, pourrait en partie expliquer ces effets observés.

La surexpression de JMa/CYT1 dans les cellules C-33A (C-33A + JMa/CYT1) induit dès 24h le clivage de PARP et la phosphorylation de γ H2AX avec une augmentation pendant toute la durée du traitement (72h). Après stimulation par la NRG1, l'expression de JMa/CYT1 diminue au cours du temps et 4ICD est visible à 24h. La NRG1 augmente la phosphorylation de JNK et augmente le clivage de PARP, avec une induction de γ H2AX apparaissant dès 24h.

Ces résultats sur une lignée exprimant naturellement HER4 confirment l'effet suppresseur de tumeur de la NRG1 sur JMa/CYT1.

b. La NRG1 induit la survie cellulaire via JMa/CYT2

La transfection des cellules BT549 avec l'isoforme HER4 JMa/CYT2 induit des effets opposés à ceux induits par l'expression de HER4 JMa/CYT1 (**Figure 57**) :

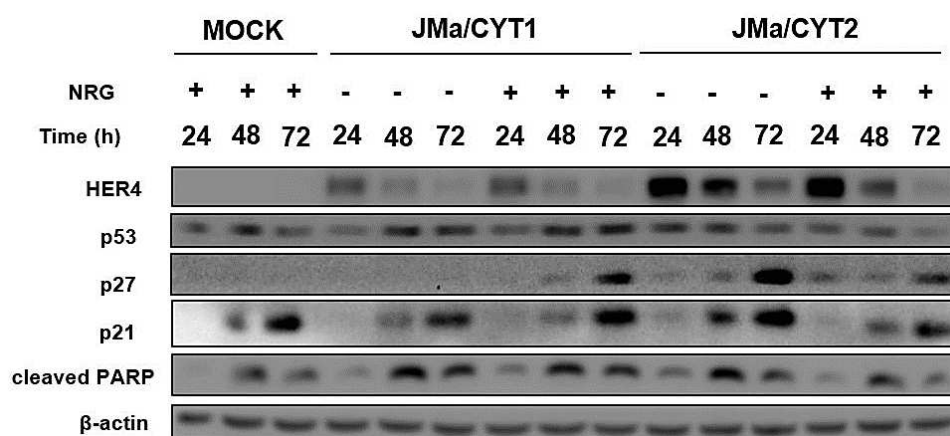


Figure 57 : Expression et effets de l'isoforme JMa/CYT2 dans la lignée BT549 après stimulation ou non par la NRG1

La transfection de l'isoforme JMa/CYT2 dans les cellules BT549 induit aussi le clivage de PARP après 48h d'expression mais contrairement à JMa/CYT1, l'expression de p53 est diminuée après 72h d'expression de l'isoforme JMa/CYT2. La stimulation de l'isoforme JMa/CYT2 par la NRG1 induit des effets contraires à ceux de JMa/CYT1 : diminution de l'expression de p53, p27 et p21 associée à une diminution du clivage de PARP.

De manière générale et dans toutes les lignées testées, l'expression transitoire de JMa/CYT1 et JMa/CYT2 à l'aide de plasmides conduit toujours à une meilleure expression de l'isoforme JMa/CYT2.

L'expression seule de JMa/CYT2, sans stimulation par la NRG1, diminue au cours du temps mais de façon beaucoup moins importante que pour l'isoforme JMa/CYT1. L'expression de JMa/CYT2 diminue le niveau d'expression de p53 après 72h d'expression de l'isoforme. Contrairement à JMa/CYT1, l'expression de p21 et p27 est fortement induite par l'isoforme après 72h. Les effets induits par la NRG1 sur l'isoforme JMa/CYT2 sont totalement opposés à ceux induits sur l'isoforme JMa/CYT1.

Sur JMa/CYT2, la NRG1 induit la dégradation de HER4 dès 48h de stimulation. La NRG1 diminue clairement l'expression de p53 dès 24h et l'expression de p21 et p27 à 48h et 72h. En stimulant l'isoforme JMa/CYT2, la NRG1 diminue le clivage de PARP dès 24h de stimulation.

Pour confirmer cet effet induit par la NRG1 sur JMa/CYT2, nous avons transfecté cette isoforme dans la lignée C-33A afin de modifier le ratio $JMa/CYT1/JMa/CYT2$ en faveur de JMa/CYT2. La **Figure 58** présente ces résultats, qui confirment ceux obtenus sur la lignée BT549 :

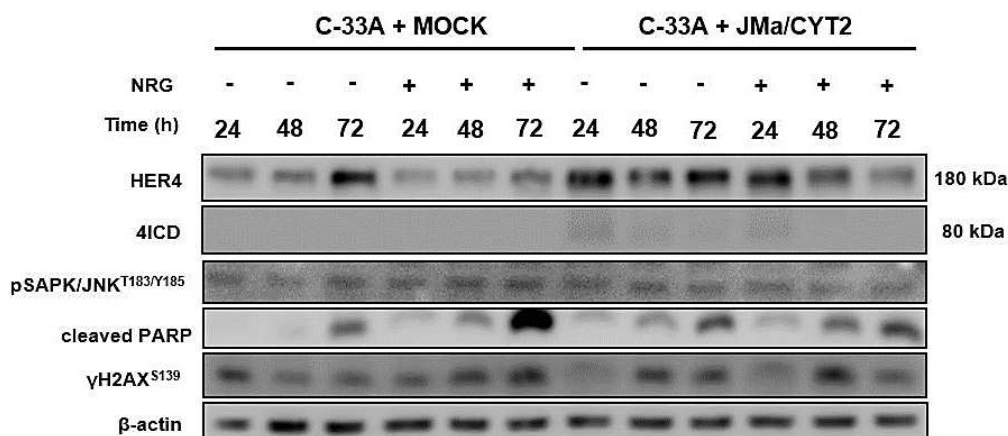


Figure 58 : Surexpression de l'isoforme JMa/CYT2 dans la lignée C-33A et effets de la NRG1

La transfection de l'isoforme JMa/CYT2 dans la lignée C-33A confirme l'effet obtenu sur la lignée BT549 : alors que la NRG1 induit un fort clivage de PARP, la surexpression de JMa/CYT2 et sa stimulation par la NRG1 diminue ce clivage et l'induction de dommages à l'ADN. La NRG1, qui induit l'activation de la voie JNK sur JMa/CYT1, n'induit pas l'activation de cette voie sur JMa/CYT2.

La surexpression de JMa/CYT2 dans les cellules C-33A (C-33A + JMa/CYT2) induit un plus faible clivage de PARP que JMa/CYT1, avec des niveaux de γH2AX légèrement supérieurs à ceux des cellules C-33A + MOCK. Après stimulation par la NRG1, l'expression de JMa/CYT2 diminue au cours du temps et 4ICD est aussi visible à 24h. Contrairement à son effet sur JMa/CYT1, la NRG1 n'induit pas la phosphorylation de JNK, n'augmente pas le clivage de PARP et l'induction de γH2AX, ces deux derniers événements ayant même tendance à diminuer.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que la NRG1 induit une signalisation suppresseur de tumeur *via* l'isoforme JMa/CYT1 et une signalisation de survie *via* JMa/CYT2. L'effet de la NRG1 sur JMa/CYT2 est en faveur d'une signalisation pro-tumorale, même si ces résultats ne permettent pas de l'affirmer avec certitude.

3. Mécanisme d'action des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2

De nombreuses évidences indiquent et suggèrent un rôle de HER4 au niveau de la mitochondrie (Frey et al., 2010; Gerarduzzi et al., 2016). Il a été démontré que 4ICD y était relocalisé pour induire l'apoptose, après stimulation par les NRG1 et NRG4 (Naresh et al., 2006; Schumacher et al., 2017). Afin de déterminer l'isoforme responsable de cette localisation et l'effet de la NRG1 sur le devenir de 4ICD, nous avons transfecté des cellules BT549 avec les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 et réalisé des expériences de fractionnement subcellulaire. Après transfection, nous avons stimulé ou non les cellules avec 30 ng/ml de NRG1 pendant 24h puis isolé les compartiments mitochondriaux et cytosoliques pour rechercher la présence de HER4/4ICD. La **Figure 59** présente ces résultats :

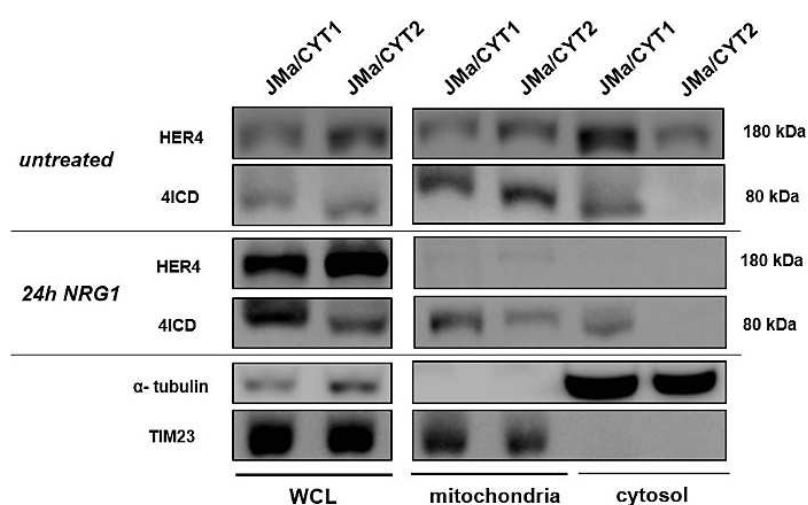


Figure 59 : Fractionnement subcellulaire de cellules BT549 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 stimulées ou non par la NRG1 pendant 24h

Après 24h de stimulation ou non par 30 ng/ml de NRG1, les cellules BT549 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont subi un fractionnement subcellulaire afin d'isoler les mitochondries et le cytosol. La fraction nucléaire a été isolée mais non analysée car contenant des cellules non lysées faussant l'interprétation. La transfection des deux isoformes induit la localisation de HER4 à la mitochondrie. Après stimulation par la NRG1, seul 4ICD issu de JMa/CYT1 reste fortement localisé à la mitochondrie. La tubuline-α et TIM23 sont les contrôles respectifs des fractions cytosoliques et mitochondriales. WCL = Whole Cell Lysate.

24h après la transfection de JMa/CYT1 et JMa/CYT2, 4ICD est visible dans le WCL (*Whole Cell Lysate*) en condition non traité, indiquant un clivage spontané des isoformes. Les deux isoformes à 180 kDa (HER4 « *full-length* ») et 80 kDa (4ICD) sont présentes dans les mitochondries. Les deux isoformes « *full-length* » sont aussi présentes dans le cytosol mais, de façon intéressante, seul 4ICD-CYT1 y est présent.

Après 24h de stimulation par 30 ng/ml de NRG1, seul 4ICD-CYT1 est retrouvé à la mitochondrie et dans le cytosol alors que JMa/CYT2 n'y est quasiment plus. Ce maintien par la NRG1 de l'expression de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie, un organe crucial pour le devenir

de la cellule, suggère l'implication d'une voie mitochondriale dans la mort cellulaire induite par la NRG1 sur JMa/CYT1.

Puisque la NRG1 sur JMa/CYT1 augmente les niveaux de γ H2AX et la phosphorylation de JNK, nous avons mesuré la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) dans les cellules BT549 transfectées avec les deux isoformes de HER4, en absence ou en présence de NRG1.

Comme démontré en **Figure 60A**, l'expression seule des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 induit l'augmentation significative des niveaux de ROS dans les cellules 24h après transfection des isoformes. Cette production est probablement induite par la localisation de 4ICD à la mitochondrie par les deux isoformes en condition « non traité ».

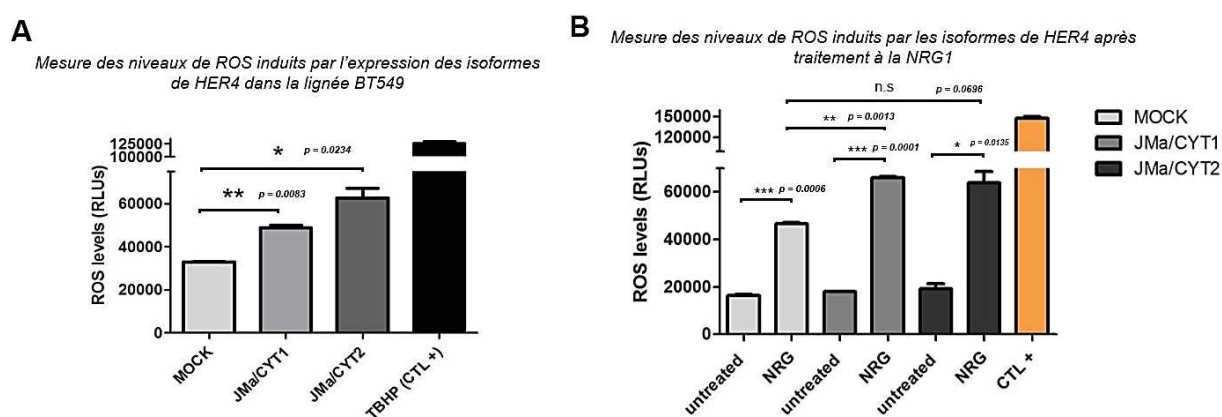


Figure 60 : Mesure de l'induction de ROS dans les cellules BT549 transfectées avec les isoformes de HER4 et stimulées ou non par la NRG1

(A) Mesure des niveaux de ROS induits par l'expression seule des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans les cellules BT549, par bioluminescence. La mesure a été effectuée 24h après transfection. **(B)** Mesure des niveaux de ROS induits par la NRG1 sur JMa/CYT1 et JMa/CYT2, après 24h de stimulation (équivalent à 48h post-transfection). De manière inattendue, la NRG1 induit une augmentation significative de la production de ROS dans la lignée BT549 transfectée MOCK.

La stimulation par 30 ng/ml de NRG1 de l'isoforme JMa/CYT1 pendant 24h conduit à une augmentation significative de la production de ROS. Ce résultat est en lien avec le résultat de fractionnement subcellulaire indiquant un maintien de 4ICD à la mitochondrie par la NRG1. La NRG1 induit aussi une augmentation de la production de ROS par JMa/CYT2. De façon inattendue, la NRG1 induit aussi une production significative des ROS sur la lignée BT549 transfectée MOCK. La différence de production significative entre les conditions « NRG1 sur MOCK » et « NRG1 sur JMa/CYT1 » nous permet de conclure à un effet de la NRG1 sur la production de ROS amplifié par l'isoforme JMa/CYT1 (**Figure 60B**).

Les ROS peuvent être générées au niveau des mitochondries par des changements du potentiel de membrane mitochondrial, nécessaires à la signalisation apoptotique (Gergely et al., 2002). C'est notamment lors de la dépolarisation de la membrane mitochondriale que le

cytochrome c et AIF sont libérés. Afin d'étudier l'effet de l'expression des isoformes de HER4 et de la NRG1 sur la dépolarisation des mitochondries, nous avons marqué les cellules BT549 transfectées JMa/CYT1 et JMa/CYT2 avec une sonde permettant d'estimer cette dépolarisation par FACS.

Le DioC₆ (*3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide*) est une sonde fluorescente lipophile qui s'accumule dans les mitochondries. Sa charge cationique permet de monitorer le potentiel de membrane mitochondrial, puisque la dépolarisation et l'hyperpolarisation de la membrane influencent le trafic et la rétention de la sonde dans l'organite. Ces changements se reflètent respectivement par des diminutions ou augmentations de l'intensité de fluorescence par rapport au contrôle.

Dans nos expériences, nos contrôles sont les cellules BT549 transfectées MOCK, dont le marquage par la sonde nous donne une intensité de fluorescence comparable à celle des cellules BT549 non transfectées. L'expression des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 augmente l'intensité de fluorescence des cellules, indiquant une hyperpolarisation des mitochondries (**Figure 61A**). L'hyperpolarisation des mitochondries pouvant générer des ROS, ces résultats sont en accord avec nos précédentes observations et peuvent expliquer les effets induits par la seule expression des isoformes de HER4.

La stimulation des cellules BT549 transfectées JMa/CYT1 et JMa/CYT2 et stimulées avec 30 ng/ml de NRG1 pendant 24h induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale. En effet, l'intensité de fluorescence des cellules diminue après stimulation par la NRG1, de façon similaire au protonophore contrôle positif CCCP (*2-[2-(3-Chlorophenyl) hydrazinylydene] propanedinitrile*) (**Figure 61B**). Cette dépolarisation semble plus importante sur JMa/CYT1 que sur JMa/CYT2 et est aussi visible dès 6h de stimulation par la NRG1 (résultats non montrés).

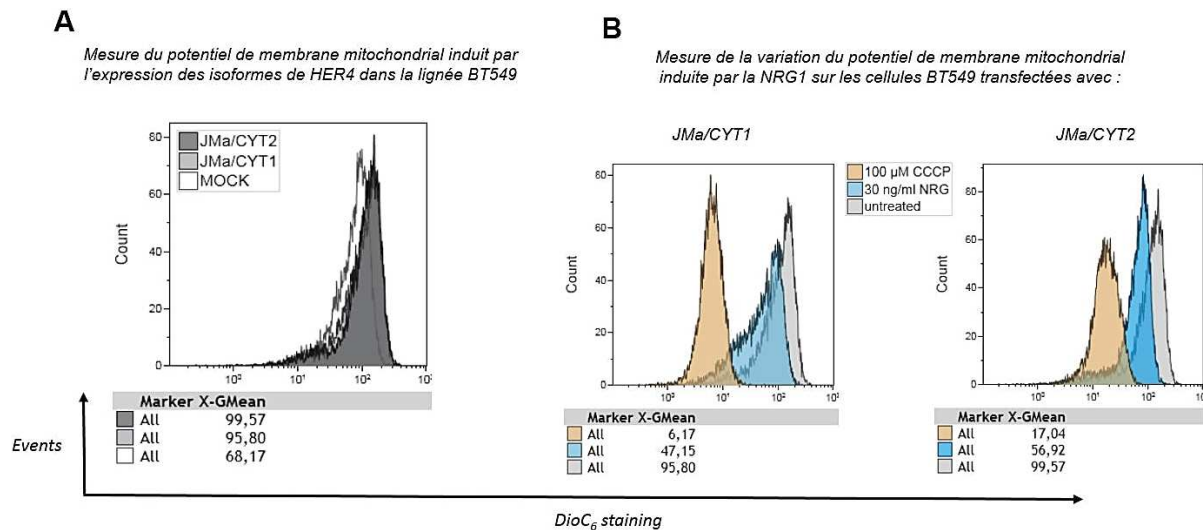


Figure 61 : Mesure des variations du potentiel mitochondrial induites par les isoformes de HER4 et la NRG1

(A) Mesure du potentiel mitochondrial induit par l'expression des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans les cellules BT549. Les cellules sont marquées avec 20 nM de DioC₆ pendant 15 min à l'obscurité avant d'être analysées par FACS. (B) Mesure du potentiel mitochondrial sur ces mêmes cellules après 24h de stimulation par la NRG1. Le protonophore CCCP, utilisé à 100 μM comme contrôle positif de dépolarisation, est co-incubé avec la sonde DioC₆. Les moyennes géométriques sont indiquées, reflétant les niveaux d'hyperpolarisation (A) et dépolarisation (B).

L'exposition des mitochondries à des stress oxydatifs excessifs peut générer des phénomènes comme le RIRR (*ROS-induced ROS release*), un mécanisme impliquant des changements épisodiques de potentiel de membrane, menant à la mort cellulaire (Zorov et al., 2006).

Nous avons démontré que la localisation de HER4 à la mitochondrie induisait l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et la génération de ROS. La NRG1, en induisant la dépolarisation des mitochondries pourrait participer à ce phénomène de RIRR en augmentant la production de ROS par l'isoforme JMa/CYT1. Cette hypothèse, décrivant la NRG1 comme un ligand inducteur de stress oxydatif *via* HER4, est appuyée par nos résultats démontrant l'activation de la voie JNK et l'induction de dommages à l'ADN.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que l'expression du récepteur HER4 et l'activation de son isoforme JMa/CYT1 conduisent à des effets suppresseurs de tumeur.

C - Discussion

Le développement d'anticorps thérapeutiques les plus pertinents pour une cible donnée nécessite avant tout une très bonne connaissance de celle-ci et de son mécanisme d'action. Parmi la famille HER, le ciblage de HER4 est très peu développé car le cas de ce récepteur est particulier et complexe. Ses multiples isoformes et signalisations à première vue

contradictoires nécessitent une étude détaillée des isoformes avant d'envisager une stratégie de ciblage.

Expression tumorale du récepteur HER4

C'est dans ce but que nous avons d'abord étudié l'expression du récepteur HER4 dans différents tissus. Dans les nombreux tissus testés, l'analyse par FACS a révélé que son expression était la plus faible de toute celle des récepteurs HER, en accord avec la littérature (Sassen et al., 2008). Cette faible expression pourrait s'expliquer par les capacités de suppression de tumeur des isoformes de HER4, qui font qu'un faible niveau d'expression du récepteur a peut-être été sélectionné au cours de la croissance tumorale. En effet, une faible expression de HER4 et de ses isoformes associée à une forte expression des autres récepteurs HER augmente les probabilités de former des hétérodimères plutôt que des homodimères HER4 qui induiraient la mort cellulaire.

De nombreuses études décrivent une suppression de tumeur induite par HER4 (Das et al., 2010; Liu et al., 2017b). Malgré cela, le fait que l'on retrouve son expression au niveau tumoral et sur les lignées établies *in vitro* indique que cette expression doit conférer un avantage sélectif pour la cellule. Il est possible que cela implique l'isoforme JMa/CYT2, induisant des signaux de prolifération par sa localisation au noyau (Muraoka-Cook et al., 2009). Les multiples ligands des récepteurs jouent aussi un rôle majeur et il est possible que le récepteur HER4 serve juste de partenaire de dimérisation pour les signalisations les plus importantes pour la survie comme celles induites par l'EGF. Comme l'isoforme JMa/CYT1 a aussi été impliquée dans la progression tumorale (Wali et al., 2014b), des études complémentaires sont nécessaires afin de comprendre comment la signalisation tumorale impliquant HER4 arrive à s'affranchir de cet effet suppresseur de tumeur du récepteur.

Le récepteur HER4 est le plus exprimé dans les lignées de cancer du col de l'utérus, de l'ovaire et du sein. Etant donné l'importance au niveau physiologique de ce récepteur, il n'est pas étonnant de le voir exprimé au niveau tumoral dans ces tissus. De même, l'expression de HER4 au niveau du cerveau étant cruciale, une surexpression de ce récepteur dans les tumeurs du cerveau est très fortement probable.

Il est cependant étonnant de ne pas retrouver l'expression du récepteur HER4 dans les lignées de mélanome alors que HER4 a été décrit comme exprimé au niveau clinique (Zhu et al., 2018) et présenté comme un « *driver* » oncogénique dans ce cancer (Prickett et al., 2009). Ce constat est le même dans le cancer du sein triple-négatif : alors que de nombreux papiers décrivent une expression clinique du récepteur HER4 dans les cancers TNBC (Kim et al., 2016), nous n'avons trouvé que deux lignées exprimant le récepteur HER4 *in vitro*.

Ces différences d'expressions entre les échantillons cliniques et les lignées tumorales pourraient aussi être dues à la capacité suppresseur de tumeur de HER4. L'établissement d'une lignée tumorale *in vitro* est un processus long qui induit irrémédiablement une sélection clonale, et les cellules ayant proliférées peuvent être très différentes des cellules mises en culture à l'origine. Si le récepteur HER4 est effectivement exprimé dans ces cancers chez les patients, la mise en culture de cellules tumorales exprimant HER4 et son activité suppresseur de tumeur peut être une première contre-sélection de ces cellules.

L'étude de Das *et al*, démontrant dans les lignées tumorales de sein que le promoteur de HER4 est hyperméthylé pour bloquer l'expression du récepteur va d'ailleurs dans ce sens (Das et al., 2010). Cela pourrait expliquer pourquoi si peu de lignées tumorales présentent une expression de HER4 alors que le récepteur est exprimé au niveau clinique. Il serait intéressant dans cette optique d'étudier la corrélation au niveau clinique entre l'expression du récepteur et le stade du cancer. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi certaines études sont contradictoires, comme dans le cas du mélanome où les mutations de HER4 sont plutôt proposées comme étant seulement nécessaires à un certain stade de la progression tumorale (Manca et al., 2013).

L'expression de HER4 au niveau clinique est probablement différente selon l'agressivité de la tumeur, et pourrait être perdue au cours du temps à cause de son potentiel effet suppresseur de tumeur. Il a été démontré dans le mélanome que son expression était corrélée à une meilleure survie sans progression grâce à l'isoforme CYT1 (Nielsen et al., 2014b). Cette observation est en accord avec nos résultats démontrant que l'isoforme CYT1 est suppresseur de tumeur. S'il est probable que cette isoforme CYT1 soit issue de JMa, les résultats cliniques se basent surtout sur des résultats en RT-qPCR qui ne permettent pas de déterminer les isoformes « *full-length* ».

Enfin, si l'on peut expliquer la perte d'expression du récepteur HER4 par son potentiel suppresseur de tumeur, on peut aussi expliquer sa présence par son potentiel oncogénique (Williams et al., 2015). Ces deux activités semblant être portées respectivement par les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2, il est indispensable d'étudier la signalisation de ces deux isoformes dans les lignées et leur expression au niveau clinique pour mieux comprendre la signalisation HER4 dans son ensemble.

Expression tumorale des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2

Nous avons étudié l'expression des isoformes de HER4 par RT-qPCR et confirmé une expression majoritaire des isoformes JMa avec une expression similaire de CYT1 et CYT2, en accord avec la littérature (Gilmour et al., 2001). La RT-qPCR ne permet pas de différencier les isoformes « *full-length* », car l'ARNm des isoformes est de trop grande taille pour être quantifié. Nous avons essayé d'étudier l'expression de ces isoformes « *full-length* » par RT-PCR mais

nous ne pouvons pas non plus utiliser cette technique pour quantifier le ratio $JMa/CYT1/JMa/CYT2$ dans les cellules. Cette limitation technique est très contraignante dans le cas de HER4, où il apparaît crucial de déterminer la proportion des isoformes entre elles.

La RT-PCR peut cependant nous donner une idée des isoformes exprimées : nous avons ainsi découvert que la majorité des lignées cancéreuses de l'ovaire exprimaient les quatre isoformes de HER4, comme les lignées COV434 ou KURAMOCHI. Cette expression semble spécifique pour au moins ce tissu car nous n'avons pas retrouvé les isoformes JMb dans les lignées de cancer du sein ou du poumon. Les cellules présentant une mort cellulaire après stimulation par la NRG1 n'expriment pas les isoformes JMb en RT-PCR, et la seule lignée de cancer de l'ovaire présentant un phénotype de nécrose après stimulation par la NRG1, la lignée COV318, n'exprime aussi que les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Cette analyse par RT-PCR nous a permis d'éliminer les isoformes JMb de la signalisation de HER4, au moins en ce qui concerne nos hypothèses.

L'expression conjointe des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 reste malgré tout un frein à l'étude de la signalisation du récepteur, de même que l'expression de HER3 dans la majorité des lignées, si l'on veut étudier l'effet de la NRG1 sur le récepteur HER4. Il a été assez difficile de trouver des lignées exprimant le récepteur HER4 sans HER3, peut-être parce que HER3 est aussi exprimé pour contrebalancer les effets antiprolifératifs de HER4. En présence de HER3, la NRG1 pourrait alors induire des effets pro-prolifératifs *via* des hétérodimères HER3-HER2 ou HER4-HER3. Le développement d'outils nous permettant de quantifier précisément et sans biais les isoformes « *full-length* » de HER4 est indispensable si nous voulons comprendre la signalisation du récepteur.

Il est possible que la signalisation de HER4 soit principalement due aux hétérodimères JMa/CYT1-JMa/CYT2. Il est aussi fort probable que ces hétérodimères puisse créer de nouvelles signalisations, non permises par les seules isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Récemment, une approche d'hybridation *in situ* a été développée pour visualiser des variants d'épissage, avec les amorces spécifiques des isoformes de HER4 pour preuve de concept (Erben et al., 2018). Cette technique pourrait peut-être être adaptée aux isoformes « *full-length* » de HER4.

Il serait aussi intéressant d'étudier la dimérisation des isoformes de HER4 entre elles ainsi qu'avec les autres récepteurs HER, après stimulation par différents ligands, afin d'estimer les signalisations les plus probables lorsque HER4 est exprimé. Cette approche pourrait se faire par HTRF.

La structure du récepteur HER4, surtout au niveau de sa partie C-terminale contenant CYT1 et CYT2, ne permet pas une extinction sélective des isoformes par siRNA ou CRISPR-Cas9. Alors que l'on pourrait en théorie empêcher l'expression de JMa/CYT1 en ciblant

spécifiquement son exon codant pour ses 16 AA, l'extinction unique de JMa/CYT2 semble impossible puisque cette isoforme possède une très forte analogie avec CYT1 (**Figure 43A**).

De manière surprenante, l'extinction totale de HER4 dans la lignée C-33A résulte en la mort de toutes les cellules, indiquant que dans cette lignée dépourvue d'expression de HER3, l'expression de HER4 est indispensable à la survie cellulaire. Cet effet contradictoire avec l'effet suppresseur de tumeur de HER4 peut être dû au fait que la lignée n'exprime quasiment pas d'EGFR et donc que la signalisation se fait principalement par les dimères HER2-HER4. En supprimant l'expression de HER4, le récepteur HER2 ne pouvant lier de ligand ne pourrait plus signaler, induisant la mort de la cellule. Il est aussi possible que la signalisation de HER4 induise la survie indépendamment de HER2, soit par des hétérodimères JMa/CYT1-JMa/CYT2 induisant une nouvelle signalisation, des homodimères JMa/CYT2 induisant 4ICD au noyau, ou encore des homodimères JMa/CYT1 induisant l'activation de la voie PI3K/AKT grâce au motif de liaison à la p85 de CYT1.

L'étude de ces hypothèses pourrait apporter de multiples réponses sur la signalisation de HER4 pour nous permettre de comprendre pourquoi nous n'avons pas réussi à maintenir en culture des cellules exprimant stablement les isoformes de HER4. Il est possible que la présence d'une seule isoforme de HER4, quelle qu'elle soit, soit toxique pour la cellule. Cela pourrait expliquer pourquoi on retrouve toujours au moins deux isoformes exprimées simultanément dans les lignées tumorales. Cependant, le fait que nous n'ayons pas réussi à maintenir des cellules BT549 exprimant stablement JMa/CYT1 avec JMa/CYT2, et le fait que la modification du ratio des deux isoformes dans la lignée C-33A impacte différemment la signalisation et le devenir de la cellule (**Figures 56 et 58**) nous font rejeter cette hypothèse.

Comme l'expression de HER4 et sa stimulation par la NRG1 dans les cellules BT549 sont deux événements induisant la mort cellulaire, il est possible que le promoteur de HER4 soit hyperméthylé dans cette lignée (Das et al., 2010) tout comme celui de la NRG1 (Chua et al., 2009). Dans l'étude de Das *et al*, la réexpression de HER4 dans la lignée TNBC BT20 et sa stimulation par la NRG1 induit l'apoptose des cellules. Il serait intéressant de tester si des agents déméthylant peuvent augmenter l'expression de HER4 dans la lignée BT549 et d'étudier alors si certaines isoformes sont plus exprimées que d'autres. Chua *et al* ont démontré dans leur étude que les lignées T-47D, HCC1187 et MDA-MB-453 présentaient de forts niveaux de méthylation du gène de la NRG1, impliquant la NRG1 comme un gène suppresseur de tumeur. Nos résultats sur ces lignées, où la NRG1 induit effectivement de la mort cellulaire, confirment de façon très intéressante ces observations.

Cet effet passant par HER4, il est fortement probable que toutes ces lignées présentant de forts niveaux de méthylation de la NRG1 expriment en contrepartie le récepteur HER4. En effet, la majorité des cellules exprimant HER4 ne sont pas décrites comme exprimant la NRG1 au niveau ARNm. Même si nous n'avons pas vérifié expérimentalement ces niveaux

d'expression de NRG1 sur nos lignées, l'expression de HER4 pourrait être dépendante de l'expression de la NRG1 : si HER4 et la NRG1 sont bien des suppresseurs de tumeurs comme le montrent nos résultats, l'expression de HER4 pourrait être présente lorsque la NRG1 n'est pas exprimée, et inversement. L'expression de la NRG1 permettrait à la cellule de proliférer *via* HER3 alors que l'expression de HER4 lui permettrait de proliférer *via* d'autres ligands.

Comme pour les cellules BT549, les cellules HCC1395 transduites avec JMa/CYT1 et JMa/CYT2 ont présenté un fort taux de mort cellulaire mais nous avons réussi à les maintenir en culture. Il y avait de manière surprenante beaucoup plus de cellules viables, formant de très larges « *clusters* » (**Figure 62**), et les cellules transduites avec JMa/CYT1 ont proliféré plus vite que celles transduites avec JMa/CYT2.

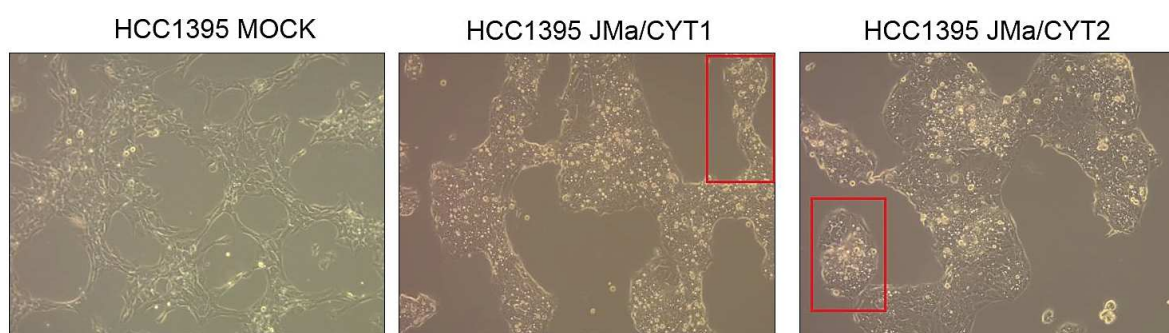


Figure 62 : Phénotype des cellules HCC1395 transduites avec JMa/CYT1 et JMa/CYT2

Les cellules HCC1395 (TNBC) ont été transduites avec des lentivirus codant pour l'expression des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Comparé à la lignée non transduite MOCK, les deux lignées transduites HER4 prolifèrent extrêmement vite avec une prolifération beaucoup plus rapide pour JMa/CYT1. Les encadrés rouges sont représentatifs des « clusters » qui se forment dans chaque lignée lorsque les cellules sont très peu confluentes. Lorsqu'une certaine confluence est atteinte, ces « clusters » se rejoignent pour former le tapis cellulaire pris en photo.

Lorsque nous avons analysé ces cellules en FACS, nous avons été surpris de retrouver certains niveaux d'expression des récepteurs HER modifiés par l'expression des isoformes de HER4. Il est possible que chaque isoforme de HER4 puisse moduler la transcription des autres récepteurs. C'est envisageable par la capacité de cofacteur transcriptionnel de 4ICD de JMa/CYT1 et JMa/CYT2 (Schlessinger and Lemmon, 2006). Les cellules transduites ayant mis du temps à proliférer, il est possible que celles exprimant seulement HER4 soient mortes en début de sélection et que nous ayons sélectionné des clones qui ont surexprimé HER3 pour s'affranchir de l'effet suppresseur de tumeur des isoformes de HER4. Cette surexpression de HER3 peut aussi expliquer les niveaux d'expression stables de HER2, la seule surexpression de HER3 étant probablement suffisante pour la prolifération *via* les hétérodimères HER2-HER3.

La transfection transitoire du récepteur HER4 est apparue comme le moyen le plus efficace pour étudier la signalisation et les effets de ses isoformes. Les modèles de lignées

transfectées transitoirement ne sont cependant pas les modèles idéaux. Ils peuvent nous éloigner de la réalité biologique car nous étudions alors l'effet d'une protéine dans un contexte cellulaire qui n'est pas censé l'exprimer. Dans le cas de HER4, nous pensons que notre modèle de cellules BT549 est pertinent surtout s'il était confirmé que la suppression de son expression est due à des modifications épigénétiques comme la méthylation (Das et al., 2010). De plus, l'expression de HER4 a été décrite chez des patientes TNBC (Kim et al., 2016), ce qui pourrait en faire aussi un bon modèle *in vitro* pour faire le lien avec la recherche translationnelle.

Des rôles biologiques différents pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2

La transfection transitoire des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans les cellules BT549 induit plus ou moins fortement l'expression des deux isoformes. La moindre expression de JMa/CYT1 par rapport à JMa/CYT2 pourrait s'expliquer par le fait que cette isoforme est moins stable. En effet, CYT1 a été décrit comme rapidement dégradé par le protéasome par rapport à CYT2, dont l'expression perdure plus longtemps (Sundvall et al., 2008). Cette différence d'expression pourrait aussi être due à l'effet de l'isoforme en elle-même sur le devenir de la cellule. Dans notre modèle, l'expression de HER4 est observée dès 12h après la transfection, et si l'isoforme JMa/CYT1 est suppresseur de tumeur, 12h est peut-être suffisant pour induire une mort cellulaire. Au laboratoire, certains ligands de récepteurs autres que les récepteurs HER sont décrits comme induisant la mort cellulaire dès 6h de traitement. Les cellules exprimant alors le plus de HER4 transfecté pourraient mourir les premières, ce qui ferait qu'à 24h on ne pourrait analyser en WB que les cellules restantes et notamment les cellules non transfectées, représentant en lysat total une moindre expression de HER4. On ne peut pas exclure non plus qu'au cours de la production de JMa/CYT1 dans le cytosol l'isoforme soit envoyée directement à la mitochondrie sans passer par la membrane. L'hypothèse de la moindre stabilité de CYT1 est toutefois privilégiée.

Ce modèle de transfection transitoire nous a ensuite permis d'étudier l'effet de la NRG1 sur HER4 et ses isoformes. Nous avons aussi utilisé des lignées tumorales non transfectées, n'exprimant pas HER3 afin de s'affranchir de la liaison de la NRG1 sur ce récepteur. Ces lignées HER3-/HER4+ sont les lignées de cancer de l'ovaire COV318 et de cancer du col de l'utérus C-33A.

La stimulation de la lignée C-33A par 30 ng/ml de NRG1, une concentration de l'ordre de celles classiquement utilisées dans la littérature (Ni et al., 2001) (Muraoka-Cook et al., 2009), induit un clivage de PARP dès 24h de traitement et ce clivage augmente fortement à 48h et 72h (**Figure 47A**). Ce clivage est associé à une diminution de l'expression du récepteur HER4, mesuré grâce à un anticorps ciblant la partie extracellulaire du récepteur, l'anticorps E200 de Abcam, spécifique du récepteur HER4. Cet anticorps, dont l'épitope est localisé dans

les derniers AA C-terminaux du récepteur, nous permet de visualiser le récepteur HER4 encore non clivé à 180 kDa mais aussi 4ICD à 80 kDa. Malheureusement, il ne permet pas de différencier les isoformes, et il n'existe à l'heure actuelle aucun anticorps capable de le faire.

Alors que ce clivage de PARP est associé à une grosse proportion de cellules en sub-G1 (**Figure 47B**), nous n'avons pas observé d'apoptose dans ces cellules par un marquage Annexine V/7-AAD. L'absence de clivage de la caspase 3, une caspase effectrice grandement impliquée dans cette voie, confirme cette mort non apoptotique. Il reste maintenant à déterminer l'origine de ce clivage de PARP.

Le récepteur HER4 est très important pour l'organisation du réseau neuronal lors du développement, et cette organisation nécessite à un certain moment d'avoir recours à de l'apoptose. Comme il a été décrit que HER4 était exprimé dans les neurones apoptotiques dans la maladie d'Alzheimer (Woo et al., 2010), tous les mécanismes de morts impliqués dans la mort cellulaire neuronale sont potentiellement activables par le récepteur HER4. Cela inclut les apoptoses extrinsèques et intrinsèques, la nécroptose, la parthanatos, la ferroptose, la pyroptose, l'oncose, la mort induite par l'autophagie et bien d'autres (Fricker et al., 2018). La NRG1 induit probablement une de ces morts cellulaires, cela étant appuyé par le fait que le clivage de PARP observé avec la NRG1 est aussi une signature de mort caractéristique dans la neurodégénération (Chaitanya et al., 2010). Cette mort implique des protéases de « suicide » comme les caspases, les calpaïnes ou les cathepsines, décrites comme pouvant cliver PARP.

Le phénotype de mort induit par la NRG1 sur les cellules COV318 et HCC1187 ressemble à une mort cellulaire nécrotique, avec une désintégration de la membrane plasmique (**Figure 53**). De façon très surprenante, alors qu'il y a clairement une diminution visuelle du nombre de cellules après stimulation à la NRG1 dans ces lignées, les niveaux de protéines mesurés par SRB sont énormes dans ces conditions. Cette augmentation du taux de protéines mesurée pourrait être due à une augmentation de la synthèse protéique. Cette dernière a été décrite dans des conditions de stress du réticulum endoplasmique et conduisant à la mort cellulaire (Han et al., 2013). De manière intéressante, cette synthèse est associée à la production de ROS et à l'activation de la voie JNK (Urano et al., 2000), deux événements associés à la stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par la NRG1 dans nos lignées (**Figure 60**). Cette synthèse protéique pourrait aussi être nécessaire à l'induction de la parthanatos, une mort cellulaire dépendante de la mitochondrie, impliquant les ROS, le relargage d'AIF, la synthèse de polymères PAR et la protéine PARP comme élément central de cette mort (Fatokun et al., 2014).

Il n'est pas exclu que la NRG1 induise la mort cellulaire en utilisant plusieurs mécanismes inducteurs, peut-être dépendant des tissus puisque les cellules C-33A ne présentent pas le phénotype de nécrose des cellules HCC1187 ou COV318, alors que toutes

présentent un clivage de PARP. La mort d'une petite partie des cellules pourrait être due à l'apoptose intrinsèque impliquant la mitochondrie (Naresh et al., 2008). Cela pourrait expliquer ce clivage de PARP et l'augmentation des niveaux d'ATP (**Figures 49 et 54**). La diminution de l'activité mitochondriale observée en MTS appuie cette hypothèse (**Figures 49B et 50**). L'étude des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire induite par la NRG1 *via* HER4 est indispensable afin de pouvoir relier entre elles toutes ces observations et comprendre le rôle de HER4.

La surexpression des isoformes dans la lignée C-33A afin de modifier le ratio d'expression de ces dernières confirme les rôles opposés de JMa/CYT1 et JMa/CYT2 sur le devenir de la cellule. La NRG1 induit la phosphorylation de JNK sur la lignée C-33A avec l'induction du clivage de PARP et de γ H2AX. La surexpression de JMa/CYT1 amplifie ces effets alors que la surexpression de JMa/CYT2 les atténue. Cela confirme que les effets obtenus sur la lignée BT549 sont bien dus aux propriétés des isoformes et que nos modèles sont pertinents. Ce stress induit par la NRG1 sur JMa/CYT1 implique la voie JNK, une voie impactant les mitochondries et induite dans les morts nécrotiques (Festjens et al., 2006). Il reste maintenant à confirmer cette implication par des expériences complémentaires et à déterminer si cette voie JNK est induite par la présence de 4ICD à la mitochondrie ou si elle est indépendante et activée dès la phosphorylation de HER4 à la membrane.

Nous avons vu que l'expression des deux isoformes de HER4 induisait la localisation de HER4 et 4ICD à la mitochondrie dès 24h de transfection. Cette localisation basale pourrait être accentuée par les conditions de culture en milieu 1% SVF. En effet, une localisation mitochondriale d'EGFR et HER2 a déjà été décrite dans la littérature (Bollu et al., 2014) ; (Ding et al., 2012), entraînant des modifications du métabolisme énergétique. L'expression du récepteur HER4 étant augmentée en condition de « *starvation* », il est possible que, dans ces conditions en milieu 1% SVF, HER4 soit relocalisé à la mitochondrie pour contrôler le métabolisme et la survie cellulaire. De nombreuses études décrivent une modulation du métabolisme par HER4 (Haskins et al., 2015) (Zeng et al., 2018), comme de fort taux de glucose qui induisent une signalisation mTOR/S6K dépendante de ce dernier (Nie et al., 2018). Une stimulation par la NRG1 pendant 24h maintient l'expression à la mitochondrie de 4ICD-CYT1, indiquant que la mort cellulaire induite par la NRG1 implique la mitochondrie. (**Figure 57**).

L'induction de la voie JNK, de dommages à l'ADN et la localisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie, après stimulation par la NRG1, nous ont poussés à étudier la production de ROS. Cette production est fortement augmentée par la NRG1 sur JMa/CYT1 et est significative par rapport à la lignée transfectée MOCK et stimulée, impliquant fortement cette isoforme dans les effets induits par la NRG1.

L'induction transitoire de ROS a été décrite comme participant à la signalisation cellulaire, et généralement une induction soutenue engendre un stress oxydatif responsable de dommages à l'ADN et la mort cellulaire. Cependant, la découverte de niveaux importants de ROS dans les cellules cancéreuses suggère que cet état redox altéré pourrait favoriser le métabolisme tumoral (Chio and Tuveson, 2017). La transfection des deux isoformes de HER4 augmente la polarisation de la membrane mitochondriale alors que la stimulation des deux isoformes par la NRG1 induit au contraire la dépolarisation (**Figure 61**). L'hyperpolarisation mitochondriale a été décrite comme induisant la production de ROS menant à la mort nécrotique (Gergely et al., 2002), une observation qui est corrélée avec les effets induits par JMa/CYT1.

La dépolarisation induite par la NRG1 sur JMa/CYT1 pourrait être suffisante pour déclencher l'induction d'une cascade de signalisation de mort cellulaire comme le RIRR, un mécanisme d'amplification des ROS (Zorov et al., 2006). Cet effet pourrait être dû à l'activation de la voie JNK et une action sur la mitochondrie indépendamment de HER4, mais pourrait aussi être amplifié par une autre action de 4ICD à la mitochondrie telle que le relargage d'AIF et du cytochrome c.

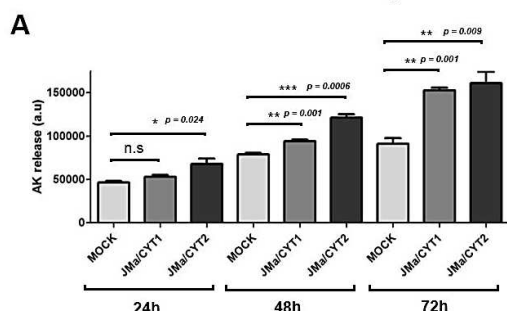
A l'inverse, la production de ROS engendrée par JMa/CYT2 pourrait être dans les limites de la signalisation tumorale et contribuer à celle-ci. La présence de 4ICD à la mitochondrie serait alors un déterminant crucial de la survie cellulaire. Cela pourrait expliquer nos résultats démontrant que l'expression des deux isoformes de HER4 augmente la production de ROS, d'une manière plus significative pour JMa/CYT1 que pour JMa/CYT2 (**Figure 60A**). Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une production soutenue de ROS induite par la NRG1 dans les cellules neuronales favorise la différenciation (Goldsmid et al., 2001).

Bien que plusieurs hypothèses soient envisagées pour expliquer nos résultats et observations, notre hypothèse principale est que la localisation de 4ICD est cruciale pour l'induction de la mort cellulaire par la NRG1 *via* HER4. Alors que les deux isoformes de HER4 pourraient être, entre autres, localisées à la mitochondrie pour moduler le métabolisme en absence de facteurs de croissance, la NRG1 entraînerait la mort cellulaire *via* JMa/CYT1 en induisant la relocalisation de 4ICD-CYT1 de la membrane plasmique à la mitochondrie. Cette relocalisation entraînerait alors une « surcharge » de 4ICD à la mitochondrie et potentialiserait la production de ROS, induisant alors des dommages à l'ADN. La présence de 4ICD à la mitochondrie pourrait engendrer des effets supplémentaires comme le relargage du cytochrome c et d'AIF, impliquant des signalisations respectivement caspases-dépendantes (apoptose) et indépendantes (parthanatos).

Certains résultats et observations supposent que différents mécanismes de mort peuvent être induits. La **Figure 63A** indique que l'expression des deux isoformes de HER4

dans les cellules BT549 induit une forte augmentation du relargage d'adénylate kinase à 48h et 72h post-transfection, indiquant une mort cellulaire. La stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par la NRG1 augmente de manière significative ce relargage après 48h de stimulation, alors que ce n'est pas le cas pour JMa/CYT2, avec même une légère tendance à la baisse (**Figure 63B**). Par contre, le phénotype de ces cellules ne ressemble pas à de la nécrose, comme l'on pouvait l'observer pour les cellules HCC1187 qui proviennent pourtant du même type tumoral. Ces différences de phénotype pourront peut-être s'expliquer lorsque nous aurons découvert le ou les mécanismes de mort cellulaire induits par la NRG1 *via* HER4.

Mesure du relargage d'Adénylate Kinase dans le milieu extracellulaire après transfection des isoformes de HER4 dans la lignée BT549



Mesure du relargage d'Adénylate Kinase dans le milieu extracellulaire après 48h de stimulation des isoformes de HER4 par la NRG1

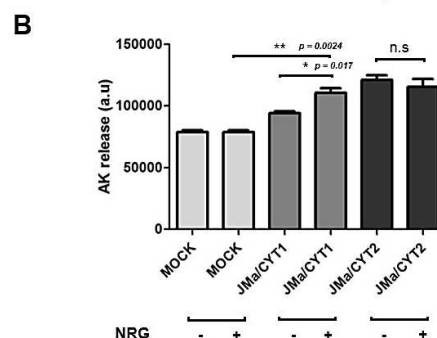


Figure 63 : Mesure de la mort cellulaire des cellules BT549 transfectées avec les isoformes de HER4, stimulées ou non par la NRG1

Mesure du relargage d'adénylate kinase dans le milieu de culture de cellules BT549 transfectées JMa/CYT1 et JMa/CYT2 non stimulées (A) ou stimulées pendant 48h avec 30 ng/ml de NRG1 (B), par bioluminescence. **(A)** La seule expression des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 induit un relargage significatif d'adénylate kinase dans le milieu de culture, indiquant une mort cellulaire. **(B)** La stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par la NRG1 induit à 48h une augmentation significative de ce relargage. La stimulation de JMa/CYT2 par la NRG1 n'induit pas cette augmentation.

Enfin, une première analyse du cycle cellulaire des cellules BT549 transfectées avec les isoformes et stimulées pendant 24h avec la NRG1 confirme que l'expression seule des deux isoformes augmente la mort cellulaire, visualisée avec la proportion de cellules en sub-G1. Cependant, de manière intéressante, cette proportion n'est pas significativement augmentée par la NRG1 (**Figure 64**).

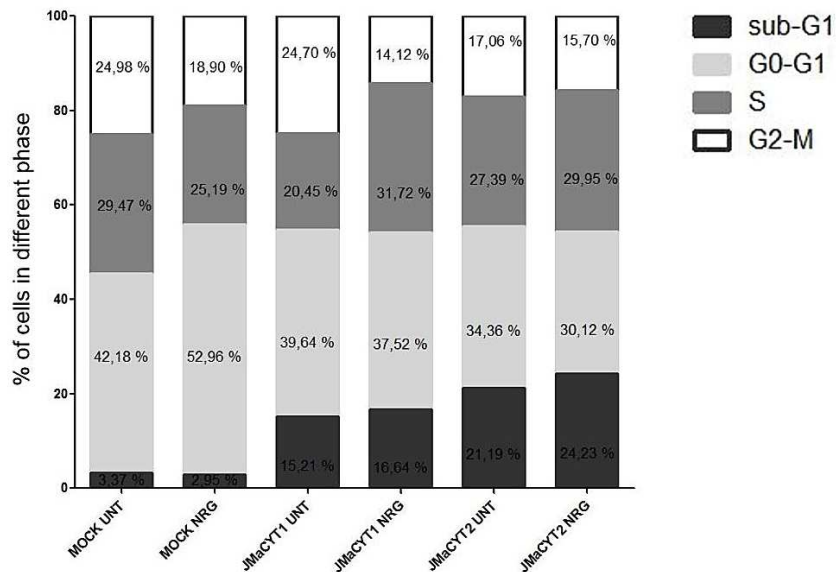


Figure 64 : Analyse du cycle cellulaire de cellules BT549 transfectées avec les isoformes HER4 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 et stimulées pendant 30h avec la NRG1

Les cellules BT549 transfectées avec JMa/CYT1 et JMaCYT2 ont été stimulées ou non par 30 ng/ml de NRG1 pendant 30h, marquées à l'iodure de propidium puis analysées par FACS. Les pourcentages de cellules dans les différentes phases du cycle sont indiqués. La transfection seule des deux isoformes augmente la proportion de cellules en sub-G1. Alors que la NRG1 ne modifie pas le cycle de cellules JMa/CYT2, la NRG1 augmente la proportion de cellules en phase S tout en induisant la mort cellulaire.

Alors qu'il ne semble pas y avoir de changement majeur dans le cycle des cellules BT549 JMa/CYT2 stimulées par la NRG1, les cellules BT549 JMa/CYT1 stimulées par ce ligand voient leur proportion de cellules en phase S augmenter (20% vs 31%). La NRG1 sur les cellules JMa/CYT1 induisant la mort cellulaire, cette augmentation des cellules en phase S est assez inattendue mais pourrait s'expliquer par l'induction de la mort cellulaire induite par une réentrée dans le cycle.

Cette mort cellulaire est un mécanisme d'apoptose assez commun dans les cellules neuronales qui implique des protéines telles que E2F-1 et p53, des protéines du cycle comme pRb et p27, et des protéines de réparation comme ATM (Folch et al., 2012). Après des dommages à l'ADN induits par les ROS générés par la mitochondrie, ATM est activé pour initier la réparation. Dans ce circuit, ATM agit avec p53 et si les dommages ne sont pas réparés, la réentrée dans le cycle induite par les dommages à l'ADN agirait comme un mécanisme d'apoptose (Kruman et al., 2004). Cette hypothèse est appuyée par nos résultats, indiquant que JMa/CYT1 augmente l'expression de p53, p27 et p21 après stimulation par la NRG1. De plus, 4ICD a été décrit comme un *checkpoint* du cycle cellulaire qui est dégradé durant la mitose mais pas durant la phase S (Strunk et al., 2007). Il est possible que la persistance de 4ICD dans ces cellules, due au fait que la NRG1 maintienne JMa/CYT1 et 4ICD dans le cytosol après 24h de stimulation (**Figure 59**), induise l'induction de dommages à l'ADN et la réentrée dans le cycle.

Pris dans leur ensemble, tous ces résultats (présence de HER4 à la mitochondrie, dépolarisation mitochondriale, diminution du métabolisme mitochondrial, augmentation des niveaux protéiques, induction de ROS, de JNK et de dommages à l'ADN, clivage de PARP, augmentation des cellules en phase S et phénotype de nécrose) suggèrent de regarder plus en détails les morts et mécanismes suivants : parthanatos, stress du réticulum endoplasmique, réentrée dans le cycle cellulaire, implication des calpaïnes et de la voie lysosomale. La ferroptose, impliquant une cytotoxicité par le glutamate, peut aussi être investiguée puisque l'axe NRG1-HER4 a été décrit comme modulant l'activité des récepteurs NMDA (Hahn et al., 2006).

Sur la base de tous nos résultats, la **Figure 65** (pages 178-180) présente les hypothèses du mode d'action de HER4 et de la NRG1 pour induire la mort cellulaire :

*La figure présente un modèle théorique des mécanismes d'activation des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 du récepteur HER4, en conditions « normales » (**Figure 65A**) où de multiples facteurs de croissance sont présents, en conditions de stress (**Figure 65B**) ou en présence de NRG1 (**Figure 65C**). Comme les deux isoformes de HER4 possèdent chacune leurs propres spécificités et signalisations, il est important de garder à l'esprit que la signalisation finale déterminant le devenir de la cellule est probablement dépendante du ratio d'expression et d'activation des isoformes de l'une par rapport à l'autre. Pour plus de clarté, seuls les monomères des récepteurs sont représentés (MMP = Mitochondrial Membrane Potential).*

Bien que de nombreuses expériences complémentaires doivent être conduites afin de déterminer les mécanismes de mort mis en jeu par la NRG1 et HER4, il apparaît très clairement que l'axe NRG1-JMa/CYT1 conduit à la suppression de tumeur. Nous avons tenu compte de ces résultats afin de mettre en place une stratégie pertinente de criblage d'anticorps contre le récepteur HER4.

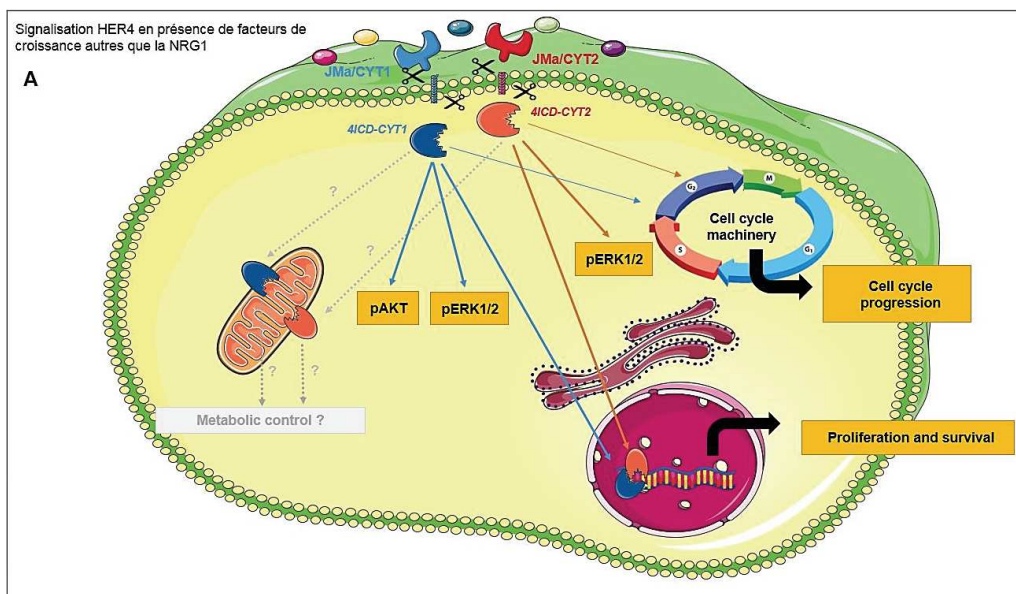
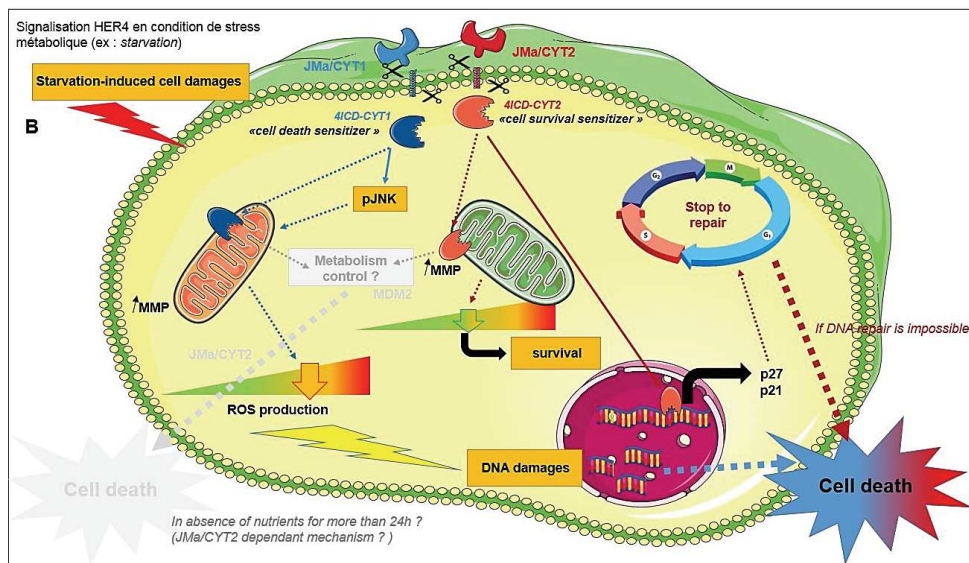


Figure 65 : Modèle d'activation des isoformes du récepteur HER4 stimulées ou non par la NRG1

Les flèches grises pleines indiquent les voies de signalisation fortement soupçonnées comme étant impliquées dans le mécanisme d'action décrit dans la figure. Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action et signalisations potentiellement activables.

Encadré A : Signalisations et rôles des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 dans la signalisation tumorale. En présence de facteurs de croissance (autres que la NRG1) et de conditions favorisant la prolifération tumorale, les deux isoformes contribuent à la survie et la prolifération cellulaire. L'isoforme JMa/CYT1 active les voies PI3K/AKT et MAPK et la signalisation de 4ICD au noyau peut augmenter la transcription de gènes pro-prolifératifs. L'isoforme JMa/CYT2 fait de même mais sans activer la voie PI3K/AKT. Plusieurs études décrivent une interaction de 4ICD avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire ainsi qu'un rôle de checkpoint mitotique pour 4ICD, impliquant HER4 dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. La découverte de l'interaction de 4ICD avec MDM2, de sa présence à la mitochondrie ainsi que son rôle dans la modulation de l'activité métabolique suggère que HER4 pourrait être impliqué dans le contrôle du métabolisme de la cellule tumorale.

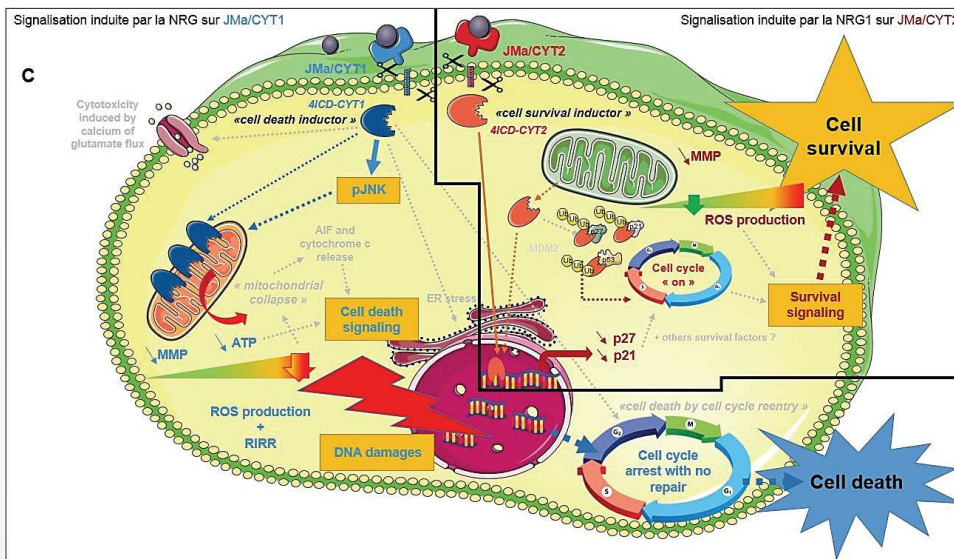


Encadré B : Signalisations et rôles des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 en conditions de stress métaboliques, comme l'absence de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire ou la diminution des réserves énergétiques de la cellule.

Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action et signalisations potentiellement activables.

Dans ce cas, 4ICD issu de JMa/CYT1 (4ICD-CYT1) joue un rôle de « sensibilisateur » à la mort cellulaire : l'activation de la voie JNK par JMa/CYT1 augmente la production de ROS par les mitochondries et la localisation de 4ICD-CYT1 dans ces dernières augmente le potentiel de membrane mitochondrial. Cette hyperpolarisation induit une production de ROS qui s'ajoute à celle induite par la voie JNK : la production de ROS franchit un seuil critique pour la survie cellulaire et induit d'importants dommages à l'ADN, entraînant la mort cellulaire.

A l'inverse, 4ICD issu de JMa/CYT2 (4ICD-CYT2) joue un rôle de « sensibilisateur » à la survie cellulaire : L'induction de 4ICD-CYT2 à la mitochondrie augmente aussi le potentiel de membrane mitochondrial mais la production de ROS reste dans les limites induisant des signalisations cellulaires. Cette production pourrait être contrôlée par d'autres facteurs tels que MDM2, une protéine dont la production est fortement augmentée par la transfection de JMa/CYT2 (résultats non montrés). Si des dommages à l'ADN sont induits, la signalisation de 4ICD-CYT2 au noyau induit la transcription de facteurs tels que p27 et p21 pour stopper le cycle cellulaire et permettre la réparation de l'ADN. Le cycle cellulaire pourrait aussi être bloqué par 4ICD-CYT2 dans l'attente de l'augmentation des réserves énergétiques nécessaires à la progression du cycle cellulaire. Si les dommages à l'ADN sont trop importants ou si les niveaux énergétiques ne remontent pas, la cellule est entraînée vers la mort cellulaire.



Signalisation HER4 en présence de NRG1

Encadré C : Signalisations et rôles des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 en présence de NRG1. La NRG1 sur JMa/CYT1 induit un signal de mort cellulaire.

Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action et signalisations potentiellement activées.

La stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par la NRG1 augmente fortement l'activation de la voie JNK, induisant une cascade de signalisation de stress oxydatif. Le maintien et/ou la relocalisation plus importante de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie induit une dépolariation de la membrane mitochondriale. Ces changements de potentiels induisent le phénomène de RIRR (ROS-induced ROS-release) en se propageant de mitochondrie en mitochondrie, conduisant à une production maximale de ROS. La synthèse d'ATP diminue et l'activité mitochondriale s'effondre, peut-être par l'action directe de 4ICD-CYT1 sur les complexes de la chaîne de transport des électrons. Le relargage du cytochrome c et d'AIF dans le cytosol induisent respectivement des signalisations de mort caspases-dépendantes et indépendantes. Les dommages à l'ADN trop importants conduisent à un arrêt du cycle cellulaire. A ce stade, 4ICD-CYT1 pourrait interagir avec E2F-1 et induire la mort cellulaire par réentrée dans le cycle. Alternativement, 4ICD-CYT1 pourrait induire la mort cellulaire par un stress du réticulum endoplasmique ou l'augmentation des flux calciques et glutamatergiques dans la cellule. La rupture des lysosomes pourrait entraîner la perforation de la membrane plasmique et être responsable des phénotypes de nécrose observés. Il est possible que la mort cellulaire induite soit la résultante de plusieurs mécanismes d'action déclenchés par 4ICD-CYT1.

A l'inverse, la NRG1 sur JMa/CYT2 induit un signal de survie et de prolifération. La stimulation de l'isoforme JMa/CYT2 par la NRG1 induit le relargage de 4ICD-CYT2 de la mitochondrie vers le cytosol, et la dépolariation engendrée par ce relargage maintient les niveaux de ROS dans des seuils acceptables pour la signalisation cellulaire. La signalisation de 4ICD-CYT2 au noyau diminue la transcription de p27 et p21 ce qui permet la progression du cycle cellulaire. Alternativement, 4ICD-CYT2 peut induire la transcription d'autres facteurs de survie et de prolifération. Il est aussi possible que l'interaction de 4ICD-CYT2 avec p53, p27 et p21 induise l'ubiquitinylation des complexes et leur dégradation, un autre moyen de progression du cycle. Pris ensemble, ces signaux contrôlés par 4ICD-CYT2 induisent la survie et la prolifération cellulaire.

V - Développement et caractérisation

d'anticorps anti-HER4

A - Développement d'anticorps anti-HER4 par phage display

La technique de criblage d'anticorps par *phage display* est une alternative à la production d'anticorps monoclonaux par hybridomes car elle ne nécessite pas l'utilisation d'animaux. C'est un outil de sélection puissant car toutes les étapes se déroulent *in vitro*, permettant une très grande flexibilité lors des étapes de « *biopanning* ». C'est pour ces raisons, appuyées par nos résultats précédents, que nous avons choisi d'utiliser cette technique dans le but de développer des anticorps anti-HER4 avec des propriétés particulières.

1. Stratégie de criblage d'anticorps anti-HER4

Les résultats présentés dans la partie IV démontrent que la NRG1 induit une signalisation suppresseur de tumeur *via* HER4 grâce à son isoforme JMa/CYT1. Le blocage de cet axe NRG1-JMa/CYT1 par des anticorps anti-HER4 antagonistes comme le mAb 1479 (Hollmén et al., 2009) a conduit à des résultats décevants.

Nous pensons qu'il est possible, grâce à un criblage adapté, de sélectionner des anticorps agonistes du récepteur HER4 afin d'activer cette signalisation JMa/CYT1 conduisant à la suppression de tumeur. Il est même envisageable de pouvoir potentialiser cette signalisation induite par la NRG1 à l'aide d'anticorps modulateurs allostériques positifs.

Dans ce but, nous avons mis en place, en collaboration avec la plateforme GenAc (Pierre Martineau) une sélection par *phage display* sur cellules. L'idée générale était de stimuler des cellules exprimant l'isoforme JMa/CYT1 avec la NRG1 afin d'induire une conformation spécifique du récepteur HER4 en présence de NRG1. La sélection par *phage display* s'est effectuée sur ces cellules stimulées, afin d'obtenir des anticorps spécifiques de cette conformation. La **Figure 66** présente le schéma simplifié de la sélection :

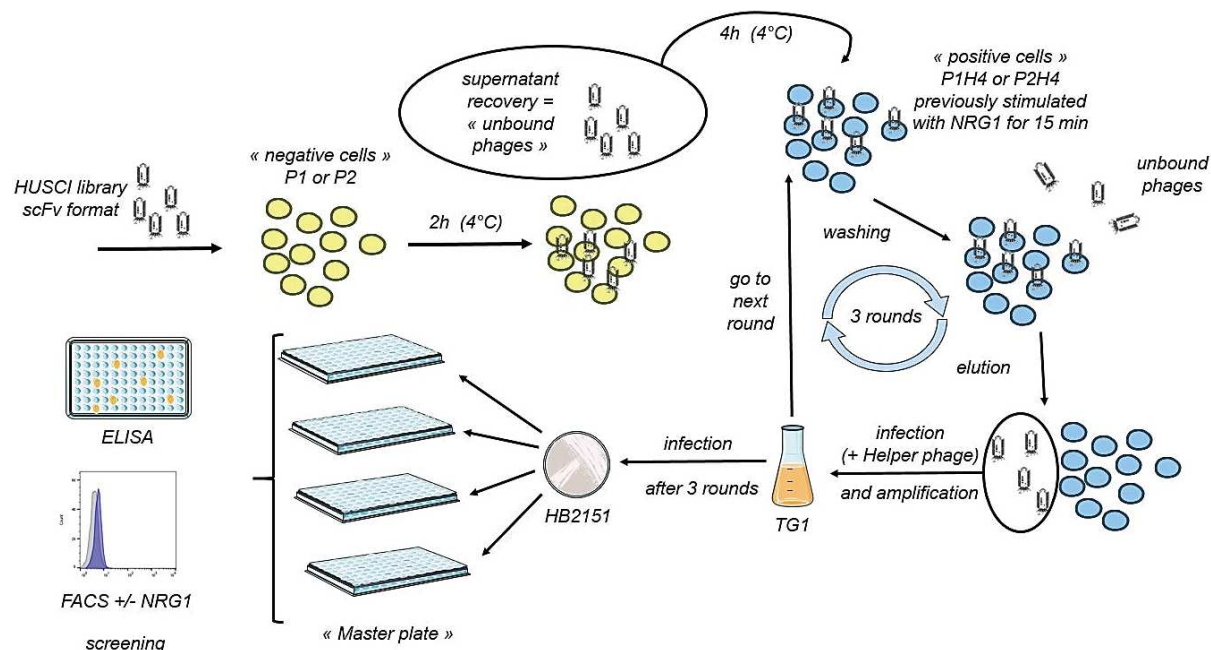


Figure 66 : Stratégie de criblage d'anticorps anti-HER4 par *phage display* sur cellules

La banque HUSC1 de Pierre Martineau a été utilisée pour sélectionner des anticorps anti-HER4. Le protocole complet de la sélection est disponible dans la partie « Matériels et Méthodes ». Toutes les étapes de liaison des scFv ont été réalisées à 4°C pour éviter l'internalisation des récepteurs. Après une contre-sélection sur les lignées P1 ou P2 n'exprimant pas HER4, les phages ne liant ni EGFR ni HER2 ont été incubés sur des cellules P1H4 et P2H4 préalablement stimulées avec 50 ng/ml de NRG1 pendant 15 min à 37°C. Après lavages et élimination des phages non liés, les phages d'intérêts ont été élués avec de la trypsine TPCCK puis des bactéries TG1 ont été infectées avec ces derniers. L'ajout d'un phage Helper permet la réplication des phages et l'amplification en bactéries de la population de phages élués. Ce nouveau « stock » de phages est utilisé pour un prochain cycle de sélection. L'enrichissement en phages spécifiques augmente au cours des tours de sélection et permet de contrôler le bon déroulement de celle-ci. Après 3 tours de sélection, des bactéries HB2151 sont infectées avec les phages puis étalées sur boîtes de Pétri. Pour chaque sélection, 190 clones ont été piqués et amplifiés en « Master plate ». Après induction à l'IPTG, les scFv produits ont été criblés par ELISA sur la protéine HER4 soluble, et par FACS sur les lignées P1H4 et P2H4 stimulées ou non par la NRG1. Sur la base de ces résultats, plusieurs clones ont été sélectionnés pour la suite du projet.

Nous ne présenterons ici que les grandes lignes de la sélection. Les étapes détaillées du protocole de développement des anticorps anti-HER4 (sélection, reformatage, production en cellules HEK293T, purification) sont disponibles dans la partie « Matériels et Méthodes ».

Nous avons utilisé deux lignées de fibroblastes murins NIH3T3 exprimant stablement l'isoforme JMa/CYT1 de HER4. Une des lignées exprime HER4 JMa/CYT1 et EGFR alors que l'autre exprime HER4 JMa/CYT1 et HER2. Ces lignées, qui étaient déjà disponibles au laboratoire avant mon arrivée, expriment EGFR ou HER2 car la seule surexpression de HER4 n'a pas été possible dans ce modèle. Des lignées NIH3T3 exprimant seulement EGFR ou HER2 ont été utilisées comme contrôles. Les lignées exprimant EGFR seul, EGFR/HER4, HER2 seul et HER2/HER4 sont appelées respectivement P1, P1H4, P2 et P2H4. Seule la lignée P1H4 avait été clonée, et nous avons établi une lignée P2H4 monoclonale avant de débuter la sélection. La **Figure 67** présente les profils d'expression en FACS des lignées P1, P1H4, P2 et P2H4 utilisées :

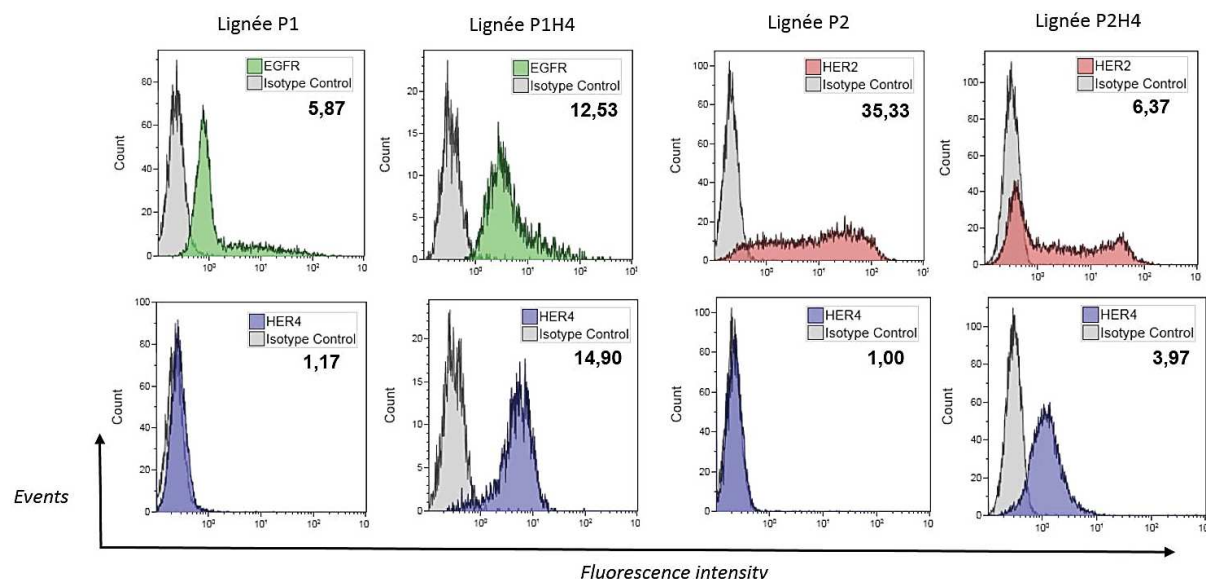


Figure 67 : Expression membranaire des récepteurs EGFR, HER2 et HER4 sur les lignées P1, P1H4, P2 et P2H4

Analyse des niveaux d'expression membranaire des récepteurs EGFR, HER2 et HER4 par FACS sur les lignées P1, P1H4, P2 et P2H4 utilisées pour la sélection en phage display. Les niveaux d'EGFR et HER4 sur la lignée P1H4 sont assez similaires alors que la lignée P2H4 exprime plus de récepteurs HER2 que de récepteurs HER4.

Toutes les lignées présentent les profils d'expression attendus : la lignée P1 exprime le récepteur EGFR seul et la lignée P1H4 exprime des niveaux d'EGFR et de HER4 qui semblent similaires. La lignée P2 exprime très fortement le récepteur HER2. La lignée P2H4 exprime HER2 et HER4, avec une expression de HER2 plus importante.

Ces deux types de cellules P1H4 et P2H4 nous ont permis de mener deux sélections en parallèle. La banque de phagemides HUSCI développée par Pierre Martineau à l'IRCM a été utilisée pour ces sélections. La banque HUSCI est une banque synthétique d'anticorps monoclonaux au format scFv qui a été construite selon la structure d'un anticorps anti- β -galactosidase appelé 13R4, développé dans l'équipe de Pierre Martineau. La variabilité au niveau des CDRs dans la banque a été optimisée et a été restreinte à cinq AA que sont la tyrosine, la sérine, l'asparagine, l'acide aspartique et la glycine. Ces AA ont été sélectionnés car ils sont fréquemment impliqués et/ou retrouvés dans la liaison épitope-paratope (Robin et al., 2014).

Comme les cellules HER4-positives expriment aussi EGFR ou HER2, nous avons, dans un premier temps, incubé la banque HUSCI sur des cellules P1 ou P2 afin de contre-sélectionner les phages spécifiques de ces récepteurs. En pratique, c'est le surnageant issu de cette incubation qui a été récupéré, contenant les phages non liés aux cellules P1 et P2. Ce surnageant a ensuite été incubé sur des cellules P1H4 et P2H4 qui ont été préalablement stimulées par 50 ng/ml de NRG1 pendant 15 min à 37°C, afin d'induire une conformation spécifique du récepteur HER4. Les cellules ont ensuite été lavées 20 fois en PBS afin d'éliminer les phages non spécifiques ou s'étant fixés avec une faible affinité au récepteur

HER4. Les phages ont été élués puis amplifiés dans des bactéries TG1. L'amplification des phages a permis d'enrichir la population en scFv anti-HER4, et cette population enrichie a servi de point de départ pour deux autres tours de sélection. Pour ces deux autres tours, la contre-sélection sur les cellules P1 et P2 n'a pas été effectuée et les phages ont été directement mis au contact des cellules P1H4 et P2H4 stimulées par la NRG1. Après les trois tours de sélection, nous avons infecté des bactéries HB2151 avec les deux populations de phages et sélectionné sur boîtes de Pétri 190 clones pour chaque sélection. Les deux sélections confondues, environ 400 clones ont été testés pour leur capacité de liaison au récepteur HER4 :

2. Criblage et production d'anticorps anti-HER4

a. Sélection de candidats scFv

Les scFv produits par ces clones après une même induction à l'IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) ont été criblés sur la protéine HER4 soluble par ELISA et en parallèle par FACS sur les lignées P1, P2, P1H4 et P2H4 stimulées ou non par la NRG1. Etant donné le grand nombre de résultats générés par ces expériences, seuls quelques résultats les plus représentatifs de ces criblages seront présentés ici.

La **Figure 68** présente les résultats par FACS de la liaison de certains scFv sur le récepteur HER4 membranaire. Ces scFv étant issus de la sélection P1H4, ils ont été criblés pour leur liaison sur les lignées NIH3T3 non transfectée, P1, P1H4 non stimulée et P1H4 stimulée NRG1 :

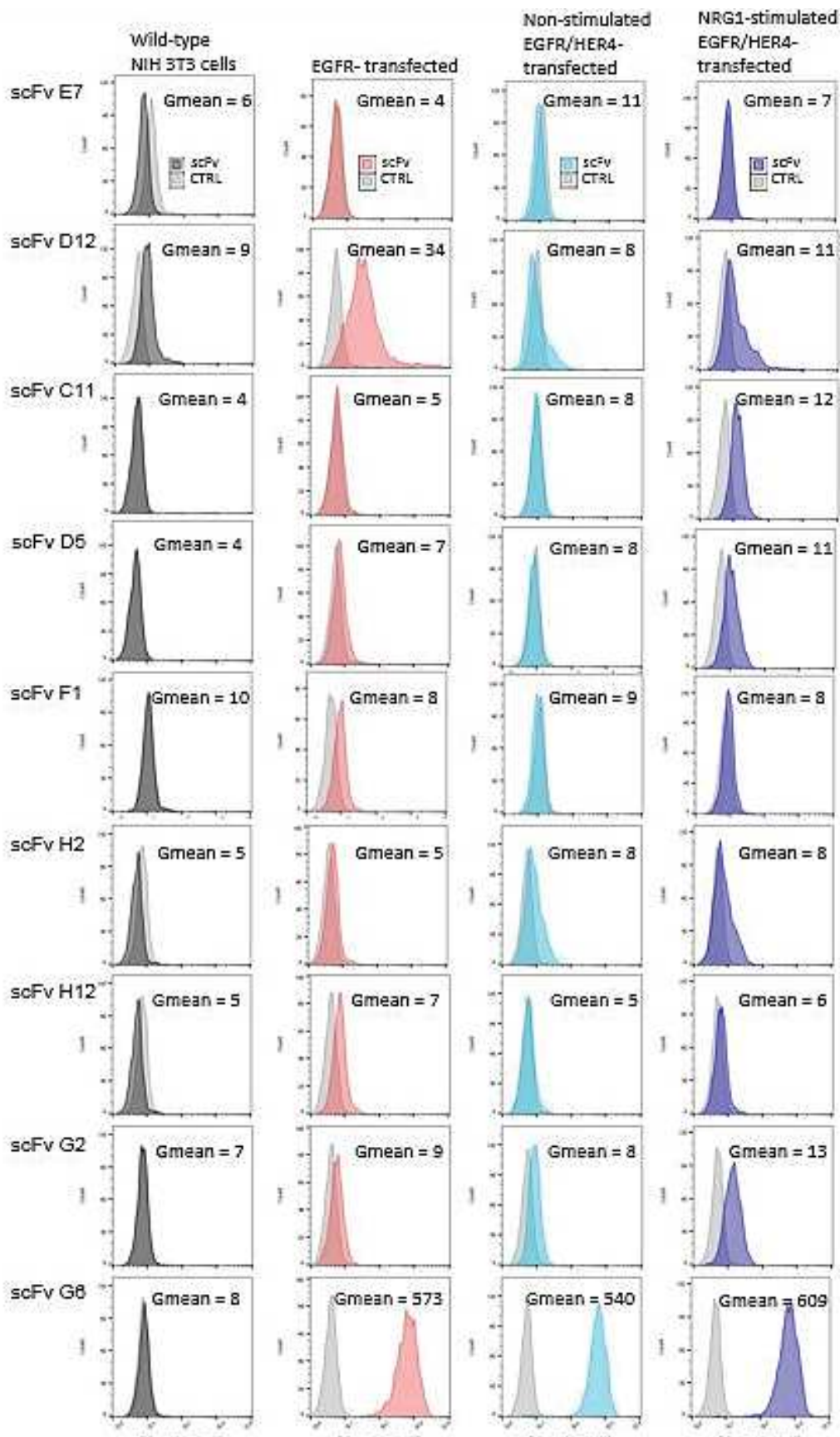


Figure 68 : Profils de liaison au récepteur HER4 de différents scFv de la sélection P1H4, par FACS

Profils typiques de liaison obtenus après incubation des scFv sur les cellules NIH3T3 non transfectées (WT), transfectées avec EGFR (P1), transfectées avec EGFR/HER4 (P1H4) et non stimulées par la NRG1 et transfectées avec EGFR/HER4 (P1H4) et préalablement stimulées par 50 ng/ml de NRG1 pendant 15 min à 37°C. Certains clones ne se lient qu'au récepteur HER4 stimulé à la NRG1 (clone C11) alors que d'autres se lient au récepteur HER4 stimulé ou non (clone H2).

Ces profils sont représentatifs de tous les types de liaison possibles : Le scFv E7 ne se lie à aucune des cellules et présente le même profil en FACS que le contrôle négatif. Bien qu'il ait été conservé après trois tours de sélection, ce clone est un faux positif. Le scFv D12 présente une liaison sur les quatre lignées, indiquant que ce scFv se lie à une protéine présente sur la lignée NIH3T3 WT.

Les scFv D5 et C11 présentent le profil de liaison recherché initialement : ces scFv ne se lient sur le récepteur HER4 que lorsque celui-ci a été préalablement stimulé par la NRG1, suggérant que ces scFv reconnaissent une conformation active du récepteur HER4. Ils ne se lient pas sur le récepteur HER4 non stimulé et ne présentent pas non plus de liaison sur les lignées P1 et NIH3T3 WT. Cela indique que la liaison sur la lignée P1H4 stimulée NRG1 n'est pas due à une liaison sur le récepteur EGFR ou sur une protéine de la cellule NIH3T3. On ne peut pas exclure cependant que ces scFv reconnaissent un épitope spécifique au dimère EGFR/HER4.

Certains scFv se lient spécifiquement au récepteur EGFR comme le montrent les profils des clones F1 et H12. Les profils des clones G2 et G6, qui présentent une liaison sur les lignées P1, P1H4 non stimulées et P1H4 stimulées NRG1 suggèrent que ces clones reconnaissent aussi le récepteur EGFR. Enfin, certains clones comme le clone H2 se lient sur le récepteur HER4, qu'il ait été stimulé par la NRG1 ou non.

De manière intéressante, tous les clones positifs en FACS ont donné un signal négatif en ELISA, à l'exception d'un scFv (résultats non montrés). Cela suggère que les épitopes reconnus sont conformationnels et non présents sur la protéine soluble. Le seul scFv ayant donné un signal assez élevé en ELISA pour pouvoir le considérer comme reconnaissant la protéine soluble HER4 est le scFv H2 cité précédemment (DO mesurée de 0,744 vs 0,046 pour le contrôle négatif).

Sur la base de ces résultats en FACS, nous avons présélectionné une cinquantaine de clones issus des sélections P1H4 ou P2H4. Le reformatage et la production d'anticorps à partir d'un aussi grand nombre de clones n'étant pas envisageables, nous avons sélectionné *in fine* une vingtaine de clones sur trois critères :

1. Le profil de liaison au récepteur HER4 en FACS : nous avons conservé par exemple les clones C11, D5 et H2 issus de la sélection P1H4, représentatifs des différents profils que nous pouvions trouver (**Figure 68**). Des scFv ne se liant qu'au récepteur HER4 non stimulé ont aussi été conservés.
2. La longueur du CDR3 du V_H : lorsque des scFv présentaient un profil de liaison similaire, nous en avons choisi certains par rapport à la longueur de leur CDR3 dans le V_H car c'est la structure de ce CDR3 qui détermine majoritairement la

conformation du paratope (**Figure 32C, page 104**). Nous avons ainsi choisi un panel de scFv présentant toutes les longueurs du CDR3 possibles (de 2 à 8 AA).

3. La capacité à diminuer l'activité mitochondriale (MTS) de cellules T-47D : enfin, nous avons essayé de sélectionner certains scFv sur la base d'un criblage fonctionnel. Nous avons mis en place un criblage par test MTS sur les cellules T-47D, un type cellulaire répondant très bien à la NRG1 et dont les résultats ont été décrits dans la partie IV. Nous avons ainsi sélectionné quelques scFv se liant plus faiblement que les autres sur le récepteur HER4 en FACS mais induisant une très forte diminution de l'activité mitochondriale des cellules T-47D.

Avant mon arrivée, Pierre Martineau avait mené une sélection par *phage display* sur la protéine recombinante HER4, et sélectionné une dizaine de clones dont les profils en FACS sur la lignée P1H4 sont présentés en **Figure 69** :

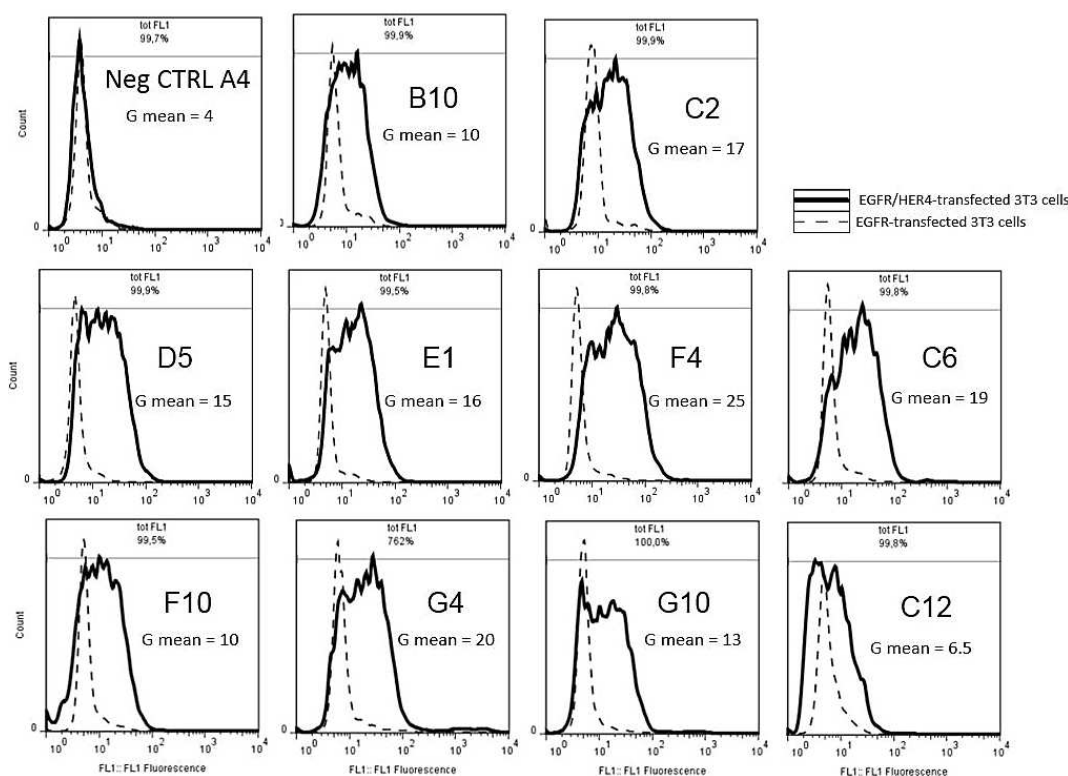


Figure 69 : Profil de liaison en FACS de scFv anti-HER4 sélectionnés par *phage display* sur protéine HER4 recombinante

Sur la base de quelques travaux préliminaires que nous avons menés, nous avons inclus les scFv anti-HER4 D5, E1, C6 et F4 sélectionnés par *phage display* sur protéine recombinante à notre vingtaine de clones sélectionnés par *phage display* sur cellules.

Tous les clones sélectionnés pour la poursuite du travail ont été séquencés et les séquences V_H/V_L sont disponibles. A partir de ces séquences, nous avons reformaté ces scFv au format IgG1, le format classique des anticorps thérapeutiques en cancérologie.

b. Reformatage des scFv au format IgG1

Nous avons utilisé la technologie de clonage *Golden Gate* afin de reformater nos scFv en IgG1. Pour cela, nous avons d'abord amplifié par PCR les fragments V_H et V_L de tous nos scFv et les avons introduits après purification dans un vecteur plasmidique codant pour une IgG1 humaine construite sur le squelette du trastuzumab. Après clonage, tous les produits ont été analysés sur gel d'agarose et séquencés afin de vérifier les constructions. Des tests préliminaires ont ensuite été menés afin de confirmer que les anticorps au format IgG1 présentaient les mêmes profils que les scFv. Pour cela, nous avons transfecté transitoirement des cellules HEK293T avec les plasmides codant les anticorps et récolté le surnageant de culture cinq jours plus tard. Le surnageant contenant les anticorps sécrétés a ensuite été incubé sur les cellules pour une analyse en FACS ou sur la protéine recombinante HER4 pour une analyse de la liaison par ELISA.

Contrairement à nos attentes, quasiment tous les profils de liaison à HER4 ont été modifiés par le reformatage des scFv au format IgG1. Quelques résultats sont présentés en **Figure 70** :

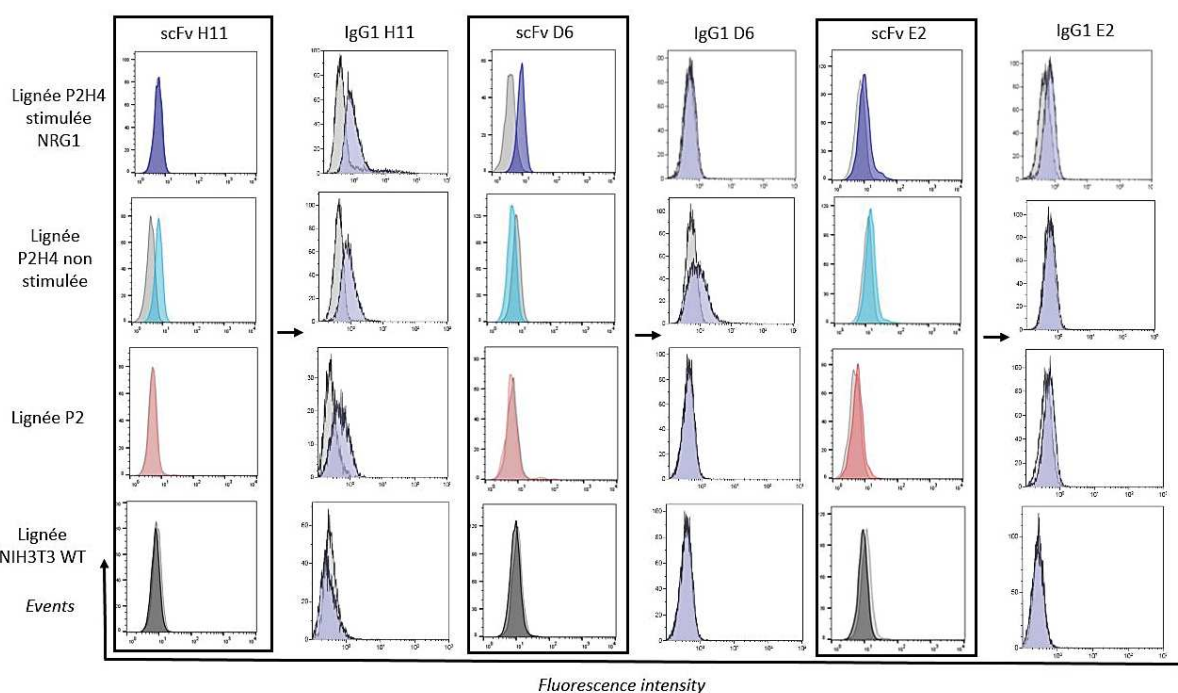


Figure 70 : Profil de liaison sur le récepteur HER4 des candidats scFv après reformatage en anticorps IgG1

Le reformatage des scFv en anticorps IgG1 a entraîné la modification de la liaison au récepteur HER4. A titre d'exemple, les profils des clones H11, D6 et E2 sont présentés ici. Seul le reformatage des scFv D5, F4 et C6 issus de la sélection sur protéine recombinante n'a pas affecté leur liaison sur le récepteur HER4 (résultats non montrés).

Alors que le scFv H11 sélectionné sur la lignée P2H4 présentait une liaison sur la lignée P2H4 non stimulée par la NRG1, son reformatage au format IgG1 a fait perdre cette spécificité

de liaison. L'anticorps se lie sur les lignées P2 et P2H4 indépendamment du ligand, mais pas sur les lignées P1H4 et P1 (résultats non montrés).

Issu de la sélection P2H4, le reformatage du scFv D6 a conduit à la perte de liaison de ce candidat sur la lignée P2H4 stimulée NRG1 au profit d'une liaison sur la lignée P2H4 non stimulée. Cet anticorps reconnaît probablement un épitope spécifique au dimère HER2/HER4 puisqu'il ne présente aucune liaison sur les lignées P1H4 et P1 (résultats non montrés).

Le scFv E1, sélectionné sur la lignée P1H4, présentait une très faible liaison sur la lignée P2H4 stimulée par la NRG1. Son reformatage au format IgG1 a maintenu cette propriété. Cet anticorps présente une liaison sur les lignées P1H4 et P2H4 en présence de NRG1 et aucune sur la lignée P1 (résultats non montrés), indiquant que cette liaison est spécifique du récepteur HER4. La très légère positivité sur la lignée P2 et le fait que l'anticorps se lie sur la lignée P1H4 en présence de NRG1 suggère que l'anticorps peut lier des épitopes présents sur HER2 et HER4 lorsque ce dernier est stimulé par la NRG1.

Alors que les scFv ne présentaient pas de liaison sur le récepteur HER4 recombinant en ELISA, le reformatage en IgG1 a aussi modifié ces profils de liaison. Testés sur les quatre récepteurs HER en ELISA, l'anticorps H11 reconnaissant les lignées P2 et P2H4 en FACS a montré un signal de liaison élevé sur le récepteur HER2 en ELISA, ainsi qu'une faible liaison sur le récepteur HER3 (résultats non montrés). Les résultats de ces tests nous ont confirmé que l'anticorps H11 au format IgG1 était bien un anticorps anti-HER2.

Si certains résultats en FACS ont pu être vérifiés par ELISA, comme ceux pour l'anticorps H11, la majorité des candidats n'a donné aucun signal sur les quatre récepteurs HER malgré leur positivité en FACS (résultats non montrés). C'est le cas des anticorps D6 et E2. Seuls les scFv D5, F4 et C6 sélectionnés sur la protéine HER4 recombinante présentaient encore un signal positif en FACS et en ELISA après reformatage. A l'inverse, le scFv E1 issu de cette sélection ne présentait pas de liaison sur HER4 en FACS après reformatage alors que la liaison sur HER4 en ELISA était significative.

Nous avons donc conservé pour la suite de l'étude une quinzaine d'anticorps dont les anticorps D5, F4, C6 (sélection « protéine »), H2, D6 et E2 (sélection « cellules »).

c. Production des anticorps anti-HER4 en cellules HEK293T

Nous avons produit ces anticorps par transfection transitoire de cellules HEK293T adhérentes. Après cinq jours de production, le surnageant a été récolté et les anticorps purifiés sur colonne de protéine A. Cette purification, en plus de nous donner une estimation du taux de production des différents anticorps, nous a permis de travailler avec des concentrations précises d'anticorps et donc de mieux estimer les liaisons observées préalablement en FACS et en ELISA, qui étaient faites avec du surnageant de production. Nous avons donc testé les

anticorps après purification pour leur liaison sur le récepteur HER4 en FACS, à la concentration de 20 µg/ml. Quelques résultats sont présentés en **Figure 71** :

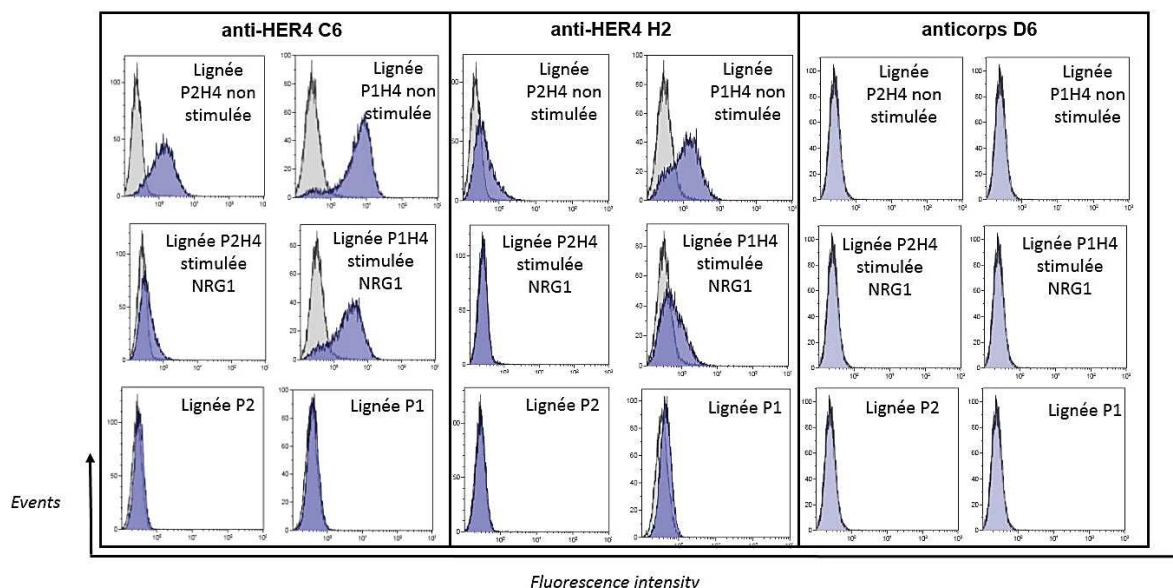


Figure 71 : Profils de liaison au récepteur HER4 des anticorps purifiés, par FACS

L'anticorps purifié C6 présente toujours une liaison au récepteur HER4, comme les anticorps D5 et F4 (résultats non montrés). L'anticorps purifié H2, qui présentait une faible liaison au format scFv et pas de liaison en surnageant se lie bien au récepteur HER4. A l'inverse, l'anticorps D6 qui présentait une liaison en surnageant sur la lignée P2H4 non stimulée ne présente plus aucune liaison après purification.

Les anticorps C6, D5 et F4 purifiés présentent une liaison sur les lignées P1H4 et P2H4 non stimulées et aucune liaison sur les lignées P1 et P2, indiquant que ces anticorps, sélectionnés sur protéine HER4 recombinante, sont des anticorps anti-HER4.

La liaison de l'anticorps C6 est grandement affectée lorsque l'hétérodimère HER2/HER4 est stimulé par la NRG1 alors que ce n'est pas le cas lorsque l'hétérodimère EGFR/HER4 est stimulé par ce même ligand. Ces différences de liaison suggèrent que le récepteur HER4 adopte une conformation différente selon son partenaire, EGFR ou HER2.

L'anticorps H2 purifié présente lui aussi une liaison spécifique du récepteur HER4, puisque l'anticorps se lie sur les lignées P1H4 et P2H4 mais pas sur les lignées P1 et P2. De manière très intéressante, la liaison de cet anticorps est totalement abolie lorsque la lignée P2H4 est préalablement stimulée par la NRG1. Ce n'est pas le cas lorsque c'est la lignée P1H4 qui est stimulée par la NRG1, suggérant que les épitopes reconnus sont conformationnels et que dans ce cas aussi, les conformations du récepteur HER4 induites par EGFR ou HER2 en présence de NRG1 impactent la liaison de l'anticorps.

La liaison de l'anticorps D5 est fortement inhibée lorsque la lignée P2H4 est stimulée par la NRG1, de manière similaire à l'anticorps C6. Lorsque la lignée P1H4 est stimulée par la

NRG1, la liaison de cet anticorps diminue environ de moitié. L'anticorps F4 présente un profil similaire à celui de l'anticorps D5 en absence et en présence de NRG1 (résultats non montrés).

Contre toute attente, nous n'avons pas retrouvé la liaison de l'anticorps D6 sur la lignée P2H4, observée avec l'anticorps issu de HEK293T en présence de surnageant. En fait, l'anticorps purifié ne présentait aucune liaison sur aucune lignée, indépendamment de la présence de NRG1. Ces résultats décevants avec le produit purifié et les premiers résultats en surnageant suggèrent qu'un facteur contenu dans le surnageant de HEK293T est responsable de la liaison de l'anticorps sur le récepteur HER4, peut-être par un effet allostérique.

La liaison des anticorps anti-HER4 D5, F4, C6 et H2 a été confirmée sur la protéine recombinante HER4 par ELISA. Ces anticorps ne reconnaissent pas les récepteurs EGFR, HER2 et HER3. L'anticorps D6 ne présente aucune liaison sur aucun des récepteurs HER (résultats non montrés). Malgré l'efficacité de certains anticorps à diminuer l'activité mitochondriale de cellules cancéreuses, l'absence de preuves robustes de leur liaison au récepteur HER4 nous a conduits à ne sélectionner que les anticorps D5, F4, C6 et H2 pour la suite de l'étude. Seul l'anticorps anti-HER4 H2 est issu de la sélection par *phage display* sur cellules.

B - Caractérisation des anticorps anti-HER4 sélectionnés

1. Liaison au récepteur HER4

a. Liaison sur le récepteur HER4 membranaire +/- NRG1

Nous avons, dans un premier temps, caractérisé la liaison des anticorps sur le récepteur HER4 membranaire, par FACS. Nous avons utilisé la lignée cancéreuse C-33A pour cette caractérisation puisqu'elle exprime un taux assez important de récepteurs HER4 et n'exprime pas HER3. Cela en fait un modèle de choix pour évaluer la liaison des anticorps en absence et en présence de NRG1. La **Figure 72A** présente le profil de liaison des quatre anticorps sur cette lignée, à une concentration de 15 µg/ml en absence de NRG1 :

L'analyse démontre que les quatre anticorps peuvent se lier sur la lignée C-33A et confirme que nos anticorps sont capables de se lier au récepteur HER4 sur les cellules tumorales, et pas seulement sur les cellules NIH3T3 transfectées HER4. Les anticorps D5 et C6 présentent, respectivement, la moins bonne et la meilleure liaison parmi les quatre anticorps.

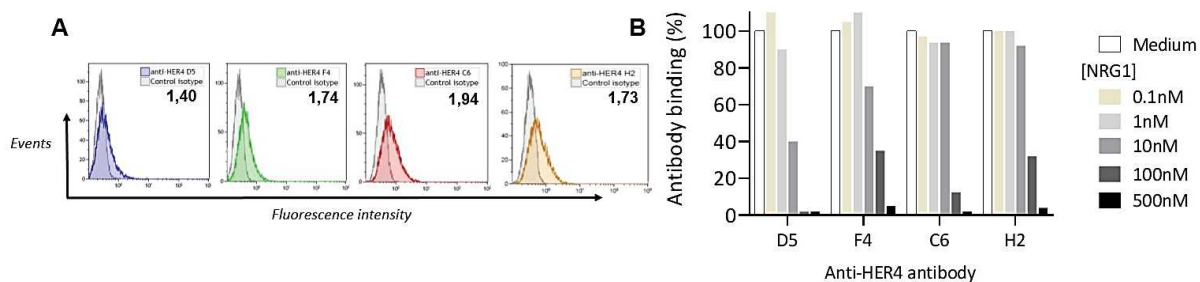


Figure 72 : Liaison des anticorps D5, F4, C6 et H2 sur le récepteur HER4 en absence ou en présence de NRG1

(A) Liaison des anticorps anti-HER4 D5, F4, C6 et H2 à 15 µg/ml sur la lignée C-33A, en absence de NRG1, par cytométrie en flux. Les anticorps présentant la meilleure liaison au récepteur HER4 sont les anticorps F4, C6 et H2. **(B)** Liaison des anticorps anti-HER4 sur cette même lignée, en présence de NRG1. Les anticorps sont incubés à 15 µg/ml seuls ou en présence de concentrations croissantes de NRG1, et la liaison est déterminée par cytométrie en flux. La présence de NRG1 affecte différemment la liaison des anticorps au récepteur HER4. A la concentration de 1 nM (environ 30 ng/ml), tous les anticorps peuvent encore se lier au récepteur HER4.

La liaison des anticorps est différemment affectée par la présence de NRG1. La liaison des anticorps D5, F4, C6 et H2 n'est globalement pas affectée par de faibles concentrations de NRG1 (de 0,1 à 1 nM : ± 3 à 30 ng/ml). A la concentration de 10 nM de NRG1, la liaison des anticorps D5 et F4 à HER4 diminue drastiquement (40 à 60% de diminution de liaison) alors que la liaison des anticorps C6 et H2 n'est pas affectée. A 100 nM de NRG1, les anticorps D5 et C6 ne se lient pratiquement plus à HER4 (90 à 100% de diminution de liaison), les anticorps F4 et H2 maintenant environ 40% de la liaison initiale. Tous les anticorps ne sont plus capables de lier HER4 à la plus forte concentration de NRG1 (500 nM) (**Figure 72B**).

Les résultats précédents démontrent que nos anticorps se fixent sur les récepteurs HER4 de la lignée C-33A, qui exprime les isoformes HER4 JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Afin de vérifier si nos anticorps possédaient des profils de liaison différents selon les isoformes, nous avons transfecté transitoirement des cellules BT549 avec les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. 24h après la transfection, nous avons analysé les profils de liaison de nos anticorps à 20 µg/ml, en FACS. Nous avons aussi analysé la liaison des anticorps en présence de 30 ng/ml de NRG1, concentration utilisée dans nos expériences. Ces résultats nous permettront d'appréhender les effets des anticorps sur les isoformes du récepteur. La **Figure 73** présente ces résultats :

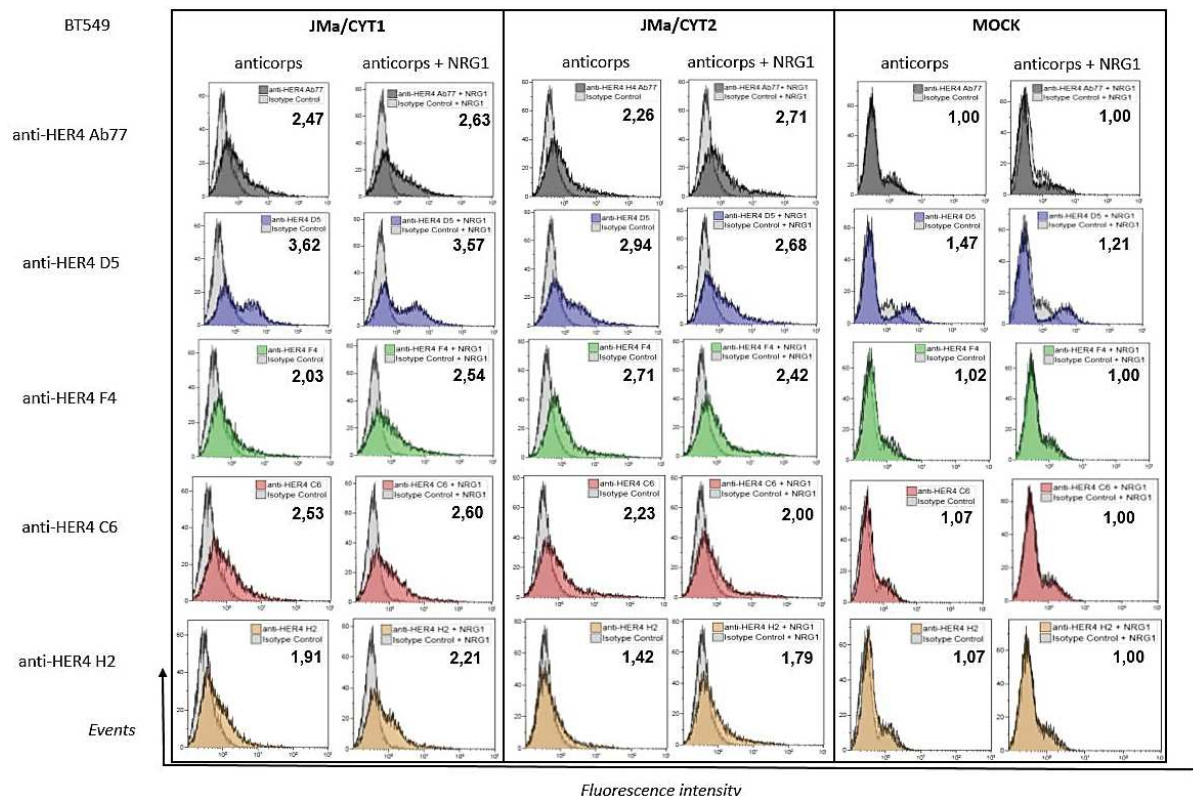


Figure 73 : Liaison des anti-HER4 +/- NRG1 sur les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2

Analyse par cytométrie en flux de la liaison des anticorps anti-HER4 seuls ou en présence de 30 ng/ml de NRG1 sur les lignées BT549 transfectées transitoirement avec les plasmides MOCK, JMa/CYT1 et JMa/CYT2. L'analyse a été effectuée 24h post-transfection. L'anti-HER4 Ab77 développé par Yosef Yarden (Weizmann Institute, Israël) est utilisé comme contrôle positif de l'expression de HER4.

De manière générale, nos quatre anticorps sont capables de se lier aux deux isoformes de HER4. Ces liaisons étaient fortement probables étant donné l'homologie totale en AA entre les deux parties ECD des isoformes JMa. L'anti-HER4 Ab77, un anticorps développé par Yosef Yarden (Weizmann Institute, Israël) et publié (Chen et al., 1996), est utilisé comme contrôle positif de l'expression de HER4. Les ratios d'expression par rapport au contrôle isotypique sont indiqués, bien que ces résultats ne peuvent être qu'informatifs puisque issus d'une seule expérience avec une seule concentration de NRG1. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces variations de liaisons, en utilisant notamment différentes concentrations de NRG1.

Quelques observations sont cependant intéressantes et nécessitent des expériences approfondies. L'anti-HER4 F4 se lie mieux à l'isoforme JMa/CYT2 qu'à l'isoforme JMa/CYT1 en absence de NRG1. La présence de NRG1 améliore la liaison de l'anticorps sur l'isoforme JMa/CYT1. L'anti-HER4 H2, sélectionné par *phage display* sur des cellules exprimant uniquement l'isoforme JMa/CYT1, présente la moins bonne liaison sur les isoformes de HER4, avec une liaison plus forte sur JMa/CYT1.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que les anticorps anti-HER4 D5, F4 et C6 peuvent se lier aux deux isoformes de HER4 alors que l'anticorps H2 semble plus

spécifique de l'isoforme JMa/CYT1. Les résultats de liaison en présence de NRG1 confirment ceux de la **Figure 72B**, indiquant que les quatre anti-HER4 voient leur liaison à HER4 différemment affectée par la présence de NRG1 et que cet effet semble dépendant des isoformes.

b. Liaison sur le récepteur HER4 recombinant

En parallèle de cette analyse de la liaison par FACS, nous avons étudié la liaison de nos anticorps sur le récepteur HER4 recombinant par ELISA. La **Figure 74A** présente les résultats de ces liaisons sur la protéine HER4 humaine :

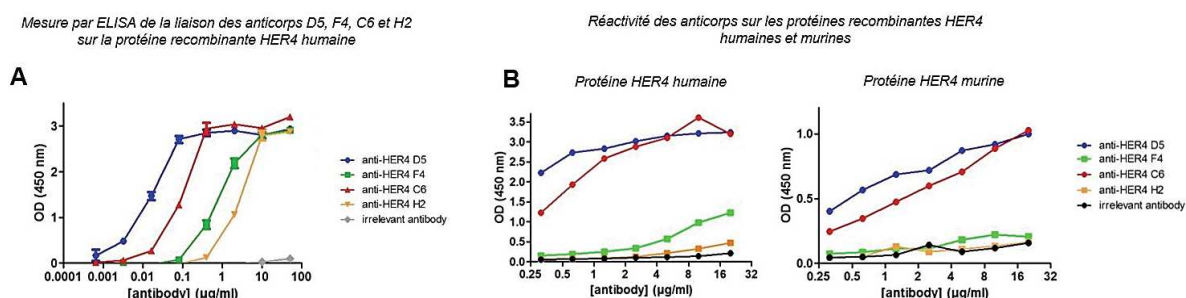


Figure 74 : Mesure de la liaison des anticorps D5, F4, C6 et H2 sur les protéines recombinantes HER4 d'origine humaine et murine

(A) Analyse par ELISA de la liaison des anticorps anti-HER4 D5, F4, C6 et H2 sur la protéine recombinante HER4 humaine adsorbée à 250 ng/ml. Les anticorps sont incubés en dilution de raison 10 avec une concentration de départ de 50 µg/ml. L'anticorps D5 présente la meilleure liaison au récepteur HER4 recombinant suivi des anticorps C6, F4 et H2. **(B)** Analyse par ELISA de la liaison des anticorps sur les récepteurs humains et murins, sur les protéines HER4 recombinantes adsorbées à 250 ng/ml. Les anticorps sont incubés en dilution de raison 2 avec une concentration de départ de 20 µg/ml. Les anticorps D5 et C6 présentent une réactivité croisée sur les protéines HER4 humaines et murines contrairement aux anticorps F4 et H2.

Les récepteurs HER4 humains et murins sont adsorbés à la concentration de 250 ng/ml. L'anticorps D5 présente la meilleure réactivité sur le récepteur HER4 avec une EC_{50} d'environ 15 ng/ml, suivi par les anticorps C6 ($EC_{50} \pm 100$ ng/ml), F4 ($EC_{50} \pm 1$ µg/ml) et H2 ($EC_{50} \pm 5$ µg/ml). La saturation du signal avec les anticorps D5 et C6 est atteinte dès 500 ng/ml d'anticorps. Ces résultats sur la protéine HER4 recombinante ne reflètent pas les résultats de liaison sur la protéine HER4 membranaire puisque l'anticorps D5 est celui qui se lie le mieux en ELISA mais le moins bien sur la lignée tumorale C-33A. A l'inverse, l'anticorps H2, se liant faiblement au récepteur HER4 en ELISA, présente sur cette lignée C-33A une meilleure liaison que l'anticorps D5. Ces différences suggèrent que les épitopes reconnus par les anticorps sont en grande partie conformationnels.

Nous avons aussi déterminé la réactivité de nos anticorps sur la protéine recombinante HER4 murine, ce qui pourrait nous permettre d'appréhender certaines toxicités lors de l'étude pré-clinique de nos anticorps. La **Figure 74B** présente la réactivité croisée des anticorps D5,

F4, C6 et H2 sur les récepteurs HER4 humains et murins par ELISA. Seuls les anticorps D5 et C6, qui présentent la meilleure affinité pour le récepteur HER4 recombinant humain, affichent une réactivité sur le récepteur recombinant murin. Les anticorps F4 et H2 ne reconnaissent pas la protéine HER4 murine.

Pris dans leur ensemble, ces résultats de liaison des anticorps anti-HER4 en ELISA et en FACS, en présence ou en absence de NRG1, sur le récepteur HER4 et ses deux isoformes suggèrent que les épitopes reconnus par les anticorps sont fortement conformationnels.

c. Détermination des épitopes des anticorps anti-HER4

Nous avons dans un premier temps essayé de déterminer les épitopes de nos anticorps à l'aide d'une membrane « *SPOT* ». Cette technique consiste à synthétiser une suite de peptides définis sur une membrane de manière à reconstituer complètement ou en partie la protéine d'intérêt. La révélation des épitopes consiste en une révélation classique de WB où ces derniers sont révélés après incubation de l'anticorps primaire d'intérêt et de son secondaire adéquat.

Pour déterminer les épitopes des anticorps anti-HER4, nous avons fait synthétiser des peptides de 15 AA (chaque peptide décalé de 3 AA par rapport au précédent) de manière à reconstituer l'isoforme entière JMa/CYT1 sur la membrane. Nous avons choisi de faire synthétiser JMa/CYT1 entièrement car cette isoforme est la plus longue des isoformes de HER4. En contrôle positif, nous espérions ainsi déterminer les épitopes de l'anticorps commercial E200 ciblant la partie intracellulaire de HER4 et révéler des différences pour les isoformes CYT1 et CYT2. Comme le montre la **Figure 75A**, l'épitope reconnu par l'anticorps commercial anti-HER4 E200 (Abcam) se situe dans la partie C-terminale du récepteur (région 1288-1308). Cette partie étant commune aux deux isoformes CYT1 et CYT2, l'anticorps commercial E200 ne permet donc pas de discriminer les isoformes de HER4 en WB.

Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas pu déterminer l'épitope de nos anticorps D5, F4, C6 et H2 par cette technique (**Figure 75B**). Cette absence de résultat indique que les épitopes reconnus sont conformationnels.

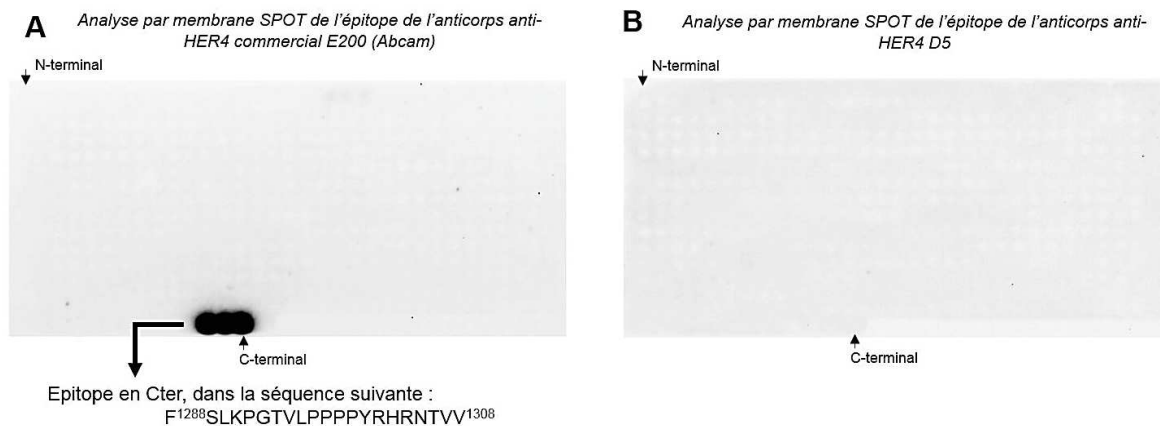


Figure 75 : Détermination des épitopes d'anticorps anti-HER4 par membrane SPOT

Des peptides de 15 AA et décalés de 3 AA par rapport au précédent ont été synthétisés sur membrane SPOT de manière à reconstituer la séquence de l'isoforme JMa/CYT1. **(A)** Analyse de l'épitope de l'anti-HER4 commercial E200 (Abcam) incubé à 0,5 µg/ml. Cet anticorps, développé par immunisation de lapins avec un peptide linéaire, cible la partie intracellulaire du récepteur. Le résultat de la révélation indique que son épitope se situe dans les 21 derniers AA du récepteur. Ces AA sont communs à CYT1 et CYT2. **(B)** Analyse de l'épitope de l'anticorps anti-HER4 D5, incubé à 1 µg/ml. Le résultat négatif suggère que l'épitope est conformationnel. Les résultats obtenus avec les anticorps anti-HER4 F4, C6 et H2 sont identiques.

En collaboration avec la société MAbTope, nous avons utilisé une approche *in silico* afin de déterminer les épitopes de nos anticorps. Cette étude est toujours en cours et des résultats préliminaires ont été fournis pour les anticorps C6 et D5. La structure cristallographique du récepteur HER4 en absence de ligand (Bouyain et al., 2005) a été utilisée comme matrice pour prédire les épitopes des deux anticorps (**Figure 76**) :

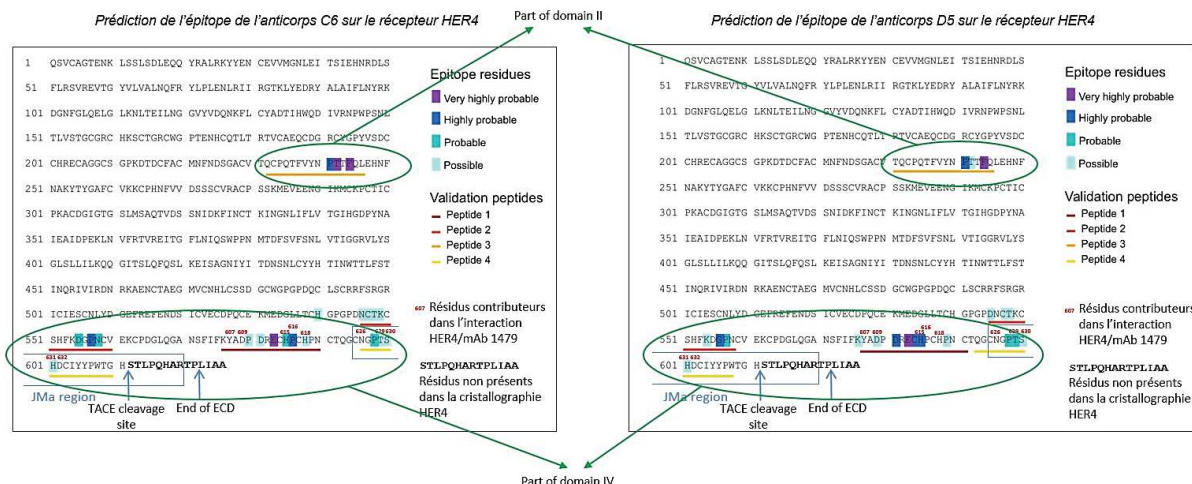


Figure 76 : Prédiction des épitopes des anticorps C6 et D5 sur le récepteur HER4 en absence de NRG1

Les prédictions des épitopes sont basées sur la cristallographie du récepteur HER4 non stimulé par la NRG1. Les épitopes deux anticorps seraient formés par quelques AA présents dans une partie de la boucle du domaine II et une majorité d'AA présents dans le domaine IV, juste avant la région JMa clivable par TACE. Les positions notées en rouges correspondent à l'épitope du mAb1479 développé par le groupe d'Elenius (Hollmén et al., 2012) dont la liaison à HER4 inhibe le clivage du récepteur HER4 et son activation.

Les AA des deux épitopes prédits par MAbTope sur HER4 en absence de NRG1 se situent majoritairement dans le domaine IV, juste avant la région JMa clivable par TACE. Les AA en rouges indiquent l'épitope du mAb1479 développé par le groupe d'Elenius (**Figure 76**). Cet anticorps est spécifique des isoformes JMa et inhibe le clivage de HER4 et son activation. Cet effet est probablement dû à l'encombrement stérique créé par l'anticorps dans la région JMa, empêchant l'accès de cette zone à l'enzyme TACE.

Respectivement 3 et 2 AA situés dans le domaine II, et 3 à 4 AA situés dans le domaine IV, sont prédits comme très fortement ou fortement probables pour la liaison des anticorps C6 et D5 (**Figure 76**). Ces AA sont éloignés dans la séquence de HER4 mais sont rapprochés lorsque le récepteur est en conformation inactive puisque le domaine II porte le bras de dimérisation qui est enfoui dans le domaine IV (**Figure 77**).

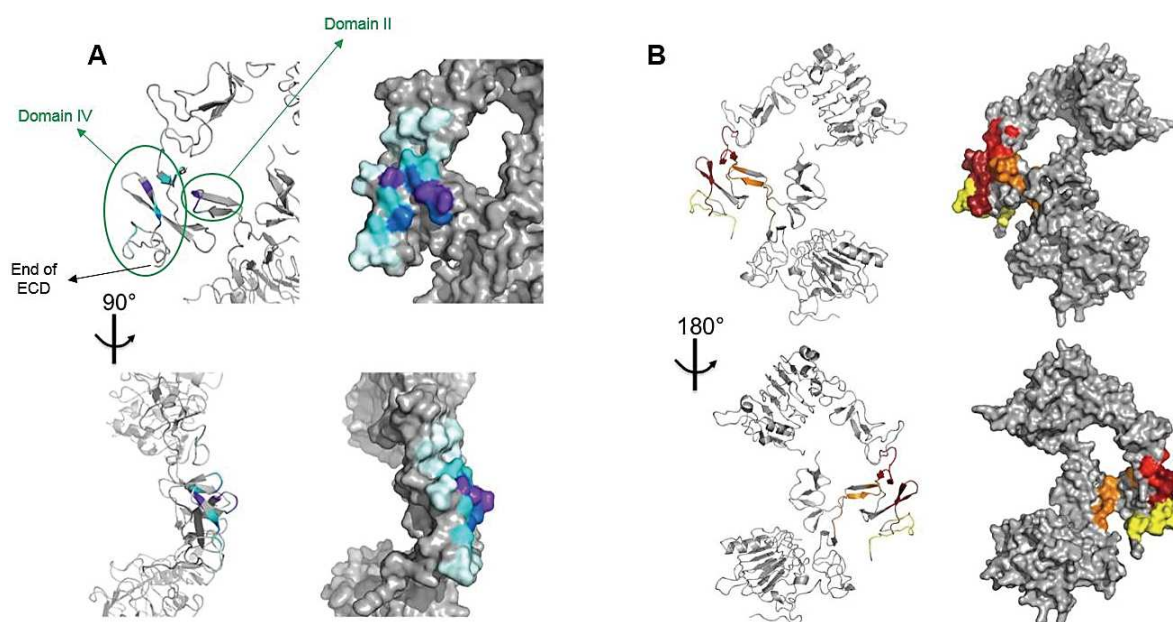


Figure 77 : Modélisation de l'épitope de l'anticorps C6 sur le récepteur HER4 en absence de NRG1

Les deux épitopes prédits pour les anticorps C6 et D5 sont très proches et sont composés de quelques AA du domaine II et d'une majorité d'AA du domaine IV. **(A)** Modélisation de l'épitope de l'anticorps C6 sur le récepteur HER4 en conformation inactive. L'épitope de l'anticorps D5 présente le même profil à quelques AA près. **(B)** Visualisation des parties du récepteur HER4 en cours de synthèse pour valider expérimentalement la prédiction des épitopes.

La très forte probabilité de contribution des AA présents dans le domaine II pour la formation des épitopes suggère très fortement que ces derniers sont bien conformationnels. Ces prédictions sont appuyées par nos résultats sur membrane *SPOT*. Cette prédiction d'épitope est toujours à l'étude et des peptides de validation sont en cours de synthèse pour valider expérimentalement ces épitopes. Des mutants du récepteur sont aussi à l'étude afin de valider ces épitopes par FACS. Les séquences des anticorps F4 et H2 étant extrêmement

proches de celles des anticorps D5 et C6, il est probable que leurs épitopes soient eux aussi situés dans ces mêmes zones domaine II + domaine IV.

Après la caractérisation de nos anticorps pour leur liaison au récepteur HER4, nous avons étudié leurs effets biologiques sur des lignées cancéreuses *in vitro*. Nous avons étudié cela dans un premier temps sur la lignée BT549 transfectées avec les isoformes de HER4 afin de déterminer si nos anticorps pouvaient potentialiser l'action suppresseur de tumeur du récepteur.

2. Effets des anticorps anti-HER4 sur la lignée BT549 transfectée HER4

24h après la transfection transitoire de cellules BT549 avec les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2, nous avons stimulé ces cellules avec 20 µg/ml d'anticorps D5, F4, C6 et H2 pendant 24h et analysé l'induction de la mort cellulaire en WB. Nous avons vu, dans les résultats présentés en partie IV, que la NRG1 induisait la mort cellulaire de cellules tumorales exprimant HER4 *via* l'isoforme JMa/CYT1. Afin d'étudier si nos anticorps pouvaient potentialiser l'effet de la NRG1 sur HER4, nous avons aussi stimulé ces mêmes cellules avec 20 µg/ml d'anticorps en présence de 30 ng/ml de NRG1. La **Figure 78** présente les résultats de ces traitements sur l'isoforme JMa/CYT1 :

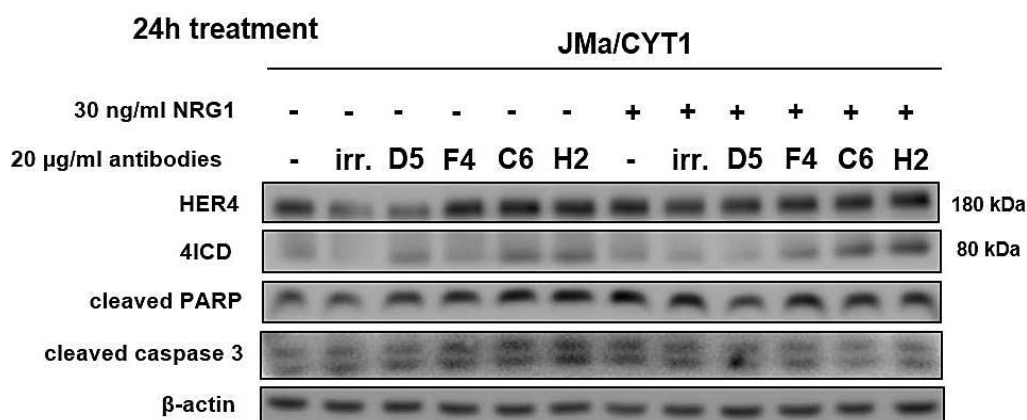


Figure 78 : Effets des anticorps anti-HER4 +/- NRG1 sur la lignée BT549 transfectée JMa/CYT1

Effets des anticorps D5, F4, C6 et H2 en absence ou en présence de NRG1 sur les niveaux d'expression de JMa/CYT1 et les clivages de PARP et de la caspase 3, après 24h de traitement.

Le traitement par les anticorps de la lignée transfectée MOCK ne modifie pas les niveaux des protéines observées, le récepteur HER4 n'étant pas présent (résultats non montrés). Cela indique que nos anticorps sont bien spécifiques du récepteur HER4.

Après 24h de traitement, en absence de stimulation par la NRG1, l'anticorps D5 dégrade le récepteur HER4 alors que les anticorps F4, C6 et H2 maintiennent son expression. Malgré le même effet induit par l'anticorps contrôle ipilimumab (anti-CTLA-4 utilisé comme

« irr »), la diminution des niveaux de HER4 après traitement par le D5 est associée à une augmentation de la quantité de 4ICD. Cet anticorps n'augmente pas les niveaux de clivages de PARP et de la caspase 3 à 24h. La stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par les anticorps F4, C6 et H2 induit les clivages de PARP et de la caspase 3, ce dernier indiquant l'induction d'une mort cellulaire caspase-dépendante. Les deux anticorps C6 et H2 induisent la libération de 4ICD et sont aussi probablement des anticorps activateurs de l'isoforme JMa/CYT1.

24h de stimulation de l'isoforme JMa/CYT1 par la NRG1 induit le clivage de PARP, confirmant les résultats précédemment obtenus et présentés en partie IV. En présence de NRG1, les anticorps n'induisent pas la dégradation de HER4. De manière intéressante, 4ICD se retrouve libéré après stimulation par l'anticorps F4 en présence de NRG1 mais pas par l'anticorps seul ni la NRG1 seule. Cette observation indique un effet synergique de l'anticorps F4 et de la NRG1 sur le clivage de 4ICD.

A l'inverse, alors que l'anticorps D5 seul induit la libération de 4ICD, ce n'est plus le cas en présence de NRG1. En présence de NRG1, les anticorps C6 et H2 sont toujours capables d'induire la libération de 4ICD à partir de l'isoforme JMa/CYT1 (**Figure 78**).

Contrairement à leur effet sur l'isoforme JMa/CYT1, les anticorps ne sont pas capables d'induire la libération de 4ICD à partir de l'isoforme JMa/CYT2 (**Figure 79**) :

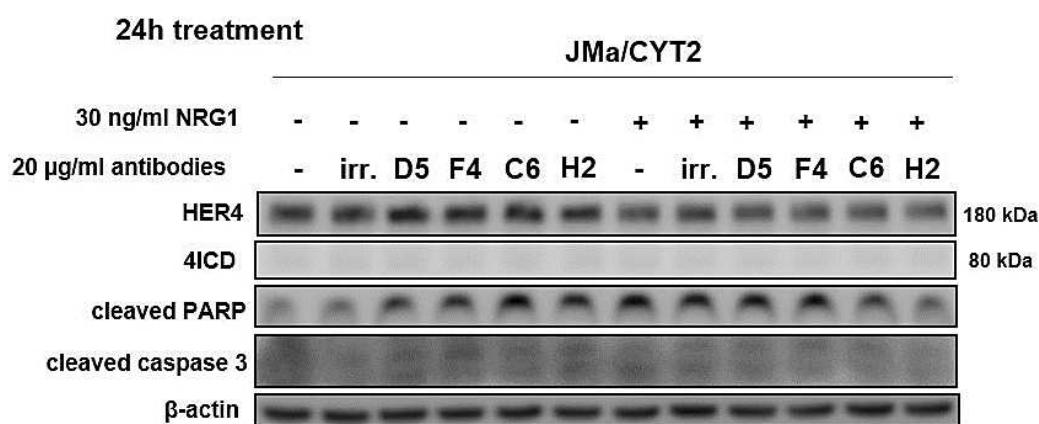


Figure 79 : Effets des anticorps anti-HER4 +/- NRG1 sur la lignée BT549 transfectée JMa/CYT2

Effets des anticorps D5, F4, C6 et H2 en absence ou en présence de NRG1 sur les niveaux d'expression de JMa/CYT2 et les clivages de PARP et de la caspase 3, après 24h de traitement.

Après 24h de traitement, en absence de stimulation par la NRG1, l'anticorps D5 maintient l'expression de HER4 JMa/CYT2, contrairement à son effet sur JMa/CYT1. Comme sur JMa/CYT1, les anticorps C6, F4 et H2 maintiennent l'expression de JMa/CYT2. 4ICD n'est pas visible après traitement, indiquant que les anticorps n'induisent pas le clivage de 4ICD *via* cette isoforme ou que la stabilité de 4ICD-CYT2 à 24h est moins importante que la stabilité de 4ICD-CYT1. Les quatre anticorps induisent une augmentation du clivage de PARP sur

JMa/CYT2 mais pas le clivage de la caspase 3, contrairement à l'effet des anticorps sur JMa/CYT1.

24h de traitement par les anticorps en présence de NRG1 ne modifie pas les niveaux d'expression de l'isoforme JMa/CYT2. Les anticorps en présence de NRG1 n'induisent pas la libération de 4ICD-CYT2. Cependant, sur cette isoforme JMa/CYT2, l'anticorps D5 + NRG1 maintient les niveaux de clivage de PARP contrairement à l'effet de la combinaison sur JMa/CYT1 (**Figure 79**).

Ces résultats, observés sur des lignées transfectées n'exprimant qu'une seule isoforme de HER4, doivent nous servir seulement à appréhender les mécanismes d'action de nos anticorps et ne peuvent refléter totalement l'action de ces derniers sur les cellules tumorales. En effet, puisque les cellules tumorales expriment simultanément les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2, il est fort probable que les anticorps induisent sur ces lignées des effets spécifiques aux hétérodimères JMa/CYT1-JMa/CYT2, différents de ceux induits par les homodimères de l'une ou l'autre des isoformes.

Toutefois, ces résultats nous permettent de démontrer que l'activation de l'isoforme HER4 JMa/CYT1 par des anticorps comme le C6 ou le H2 potentialise l'effet suppresseur de tumeur déjà induit par le récepteur HER4 (**Figure 80**, voir les conditions « *H2 MOCK* » vs « *irr. JMa/CYT1* » vs « *H2 JMa/CYT1* »).

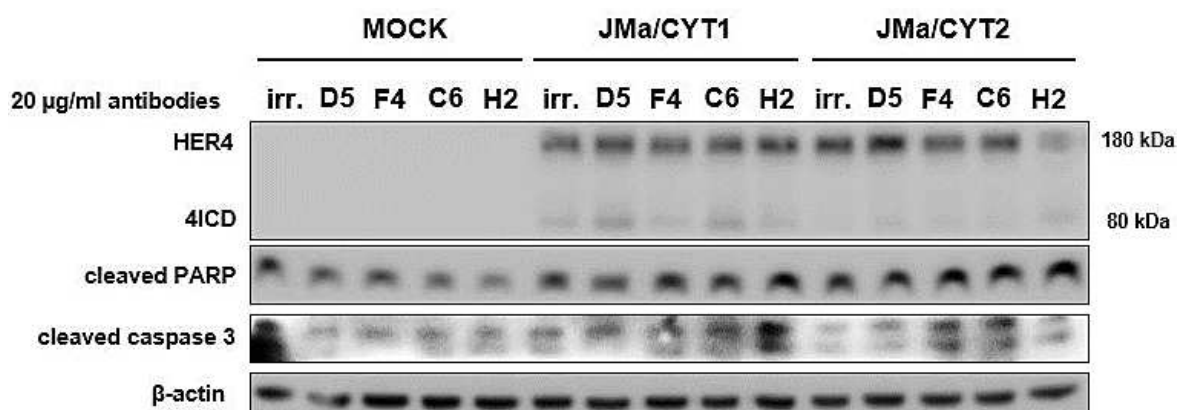


Figure 80 : Potentialisation de l'activité suppresseur de tumeur de HER4 par les anticorps

Après 24h de transfection avec les plasmides MOCK, JMa/CYT1 et JMa/CYT2, la lignée BT549 est stimulée avec 20 μg/ml d'anticorps D5, F4, C6 et H2 pendant 24h. Alors que l'expression des deux isoformes de HER4 induit le clivage de PARP, la stimulation de ces isoformes par certains anticorps comme le H2 augmente ce clivage, indiquant une potentialisation de l'effet suppresseur de tumeur de HER4 par les anticorps.

A ce stade, ces premiers résultats indiquent que nos quatre anticorps induisent des signalisations de mort cellulaire *via* les deux isoformes de HER4, en absence de NRG1. Afin de déterminer plus précisément les mécanismes d'action de nos anticorps, nous avons dans un premier temps étudié la localisation de 4ICD après traitement par nos anticorps anti-HER4.

3. Modulation de la signalisation HER4 par les anticorps

a. Différentes localisations de 4ICD induites par les anticorps

En partie IV, nous avons décrit l'effet de la NRG1 sur JMa/CYT1 et émis l'hypothèse que la mort induite par cette isoforme était due à la localisation de 4ICD à la mitochondrie. Afin de déterminer si nos anticorps pouvaient induire la mort par ce même mécanisme, nous avons transfecté transitoirement les cellules BT549 avec les plasmides codant pour JMa/CYT1 et JMa/CYT2 puis les avons soumis à un fractionnement subcellulaire après traitement par nos anticorps.

La **Figure 81** présente les résultats du fractionnement subcellulaire des cellules transfectées avec les deux isoformes, après 6h de traitement avec les anticorps C6, H2, D5 et F4. Nous avons déterminé ce temps de stimulation de 6h en nous basant sur les résultats de fractionnement obtenus après traitement à la NRG1. En effet, 6h de stimulation avec 30 ng/ml de NRG1 est suffisant pour induire 4ICD-CYT1 à la mitochondrie (résultats non montrés). La **Figure 81A** présente l'effet des anticorps sur les cellules BT549 JMa/CYT1 en absence de NRG1.

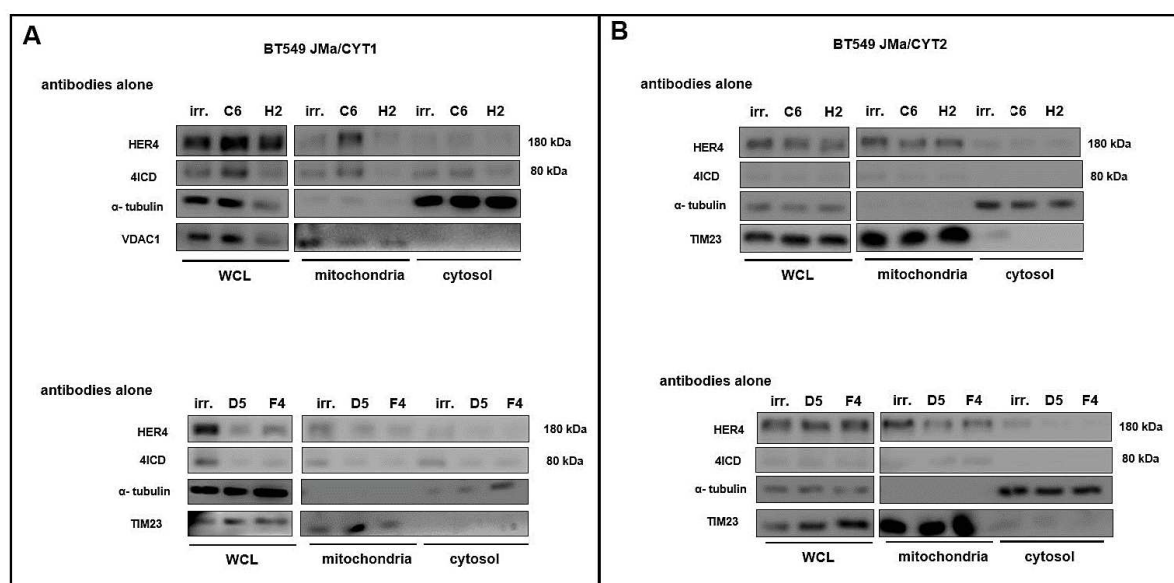


Figure 81 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 transfectées HER4 et traitées avec les anticorps pendant 6h

Les cellules BT549 ont été transfectées avec les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 puis stimulées avec 20 µg/ml d'anticorps pendant 6h à 37°C. Les cellules ont ensuite été soumises à un fractionnement subcellulaire pour isoler les mitochondries et le cytosol. La présence de HER4 et 4ICD dans ces fractions a été étudiée en WB avec l'anticorps E200.

Sur ces cellules, la stimulation de JMa/CYT1 par l'anticorps C6 pendant 6h induit la relocalisation de HER4 et 4ICD-CYT1 à la mitochondrie, de manière similaire à la NRG1. 4ICD est visible dans la fraction WCL (*Whole Cell Lysate*), indiquant que l'anticorps est capable

d'induire le clivage du récepteur dès 6h de stimulation. L'anticorps C6 est le seul anticorps anti-HER4 à induire cette localisation. Les anticorps H2, D5 et F4 n'induisent pas le clivage de HER4 après 6h de stimulation de l'isoforme JMa/CYT1.

De manière intéressante, l'anticorps C6 n'est pas capable d'induire le clivage et la localisation de 4ICD à la mitochondrie dans les cellules BT549 transfectées avec l'isoforme JMa/CYT2 en absence de NRG1 (**Figure 81B**). Ces résultats sont en accord avec ceux observés avec la NRG1 seule et confirment que l'isoforme JMa/CYT1 est critique pour l'effet suppresseur de tumeur de HER4, en relocalisant 4ICD-CYT1 à la mitochondrie. Comme sur JMa/CYT1, les anticorps H2, D5 et F4 n'induisent pas la libération de 4ICD-CYT2 ni sa relocalisation à la mitochondrie après 6h de traitement.

En présence de 30 ng/ml de NRG1 sur JMa/CYT1, l'anticorps C6 est toujours capable d'induire la relocalisation de HER4 à la mitochondrie après 6h de traitement. L'anticorps H2, en présence de NRG1, relocalise HER4 et 4ICD-CYT1 à la mitochondrie beaucoup plus fortement que ne le fait la NRG1 seule (**Figure 82A**).

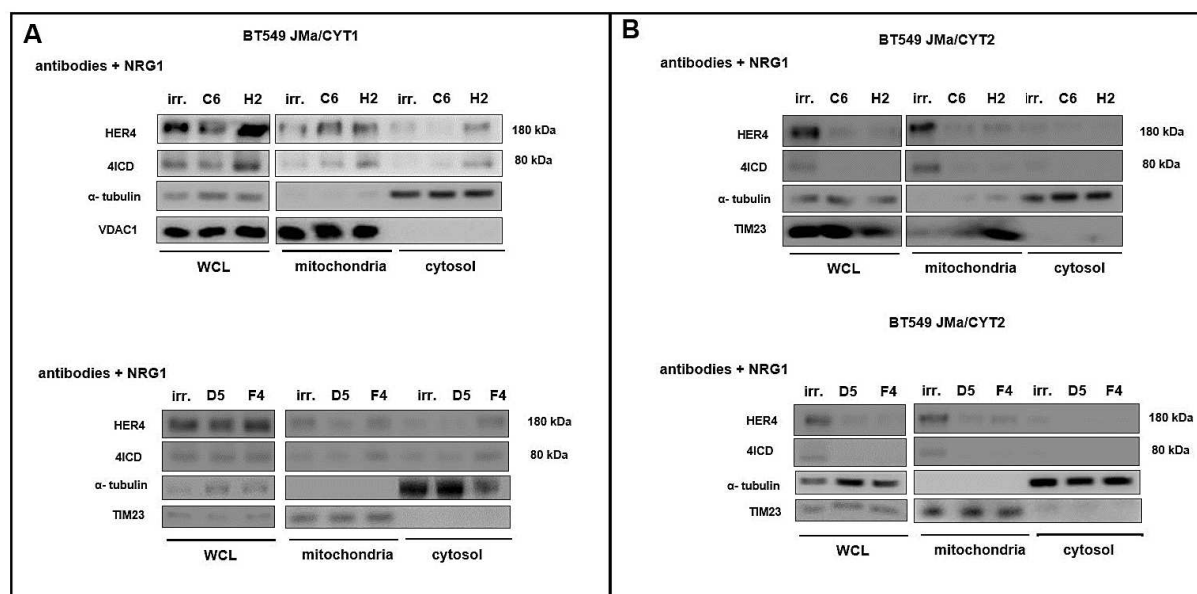


Figure 82 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 transfectées HER4 et traitées avec les anticorps en présence de NRG1 pendant 6h à 37°C

Les cellules BT549 ont été transfectées avec les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2, puis stimulées avec 20 μ g/ml d'anticorps + 30 ng/ml de NRG1 pendant 6h à 37°C. Les cellules ont ensuite été soumises à un fractionnement subcellulaire pour isoler les mitochondries et le cytosol. La présence de HER4 et 4ICD dans ces fractions a été étudiée en WB avec l'anticorps E200.

Cette observation suggère un effet synergique de l'anticorps H2 et de la NRG1 sur le clivage de JMa/CYT1 et la relocalisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie. En présence de NRG1, l'anticorps H2 induit aussi la relocalisation d'une fraction de HER4 dans le cytosol (**Figure 82A**). L'anticorps C6, qui induit la localisation de 4ICD-CYT1 indépendamment de la

NRG1, n'induit pas la relocalisation de HER4 dans le cytosol. L'anticorps D5 n'a aucun effet sur la localisation de 4ICD. Dans la **Figure 82B**, La stimulation de JMa/CYT2 par la NRG1 induit la libération de 4ICD-CYT2, qui est présent à la mitochondrie après 6h de traitement. Aucun anticorps n'induit la relocalisation de 4ICD-CYT2 à la mitochondrie dans les cellules JMa/CYT2 stimulées par la NRG1 (**Figure 82B**).

Nous avons vu précédemment que tous nos anticorps induisaient la mort cellulaire des cellules BT549 JMa/CYT1 non stimulées par la NRG1. La localisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie induite par l'anticorps C6 suggère que cet anticorps entraîne les mêmes signalisations de mort cellulaire que la NRG1 sur cette isoforme. Cela fait de cet anticorps un candidat très intéressant pour le développement d'un anticorps thérapeutique anti-HER4. L'absence de relocalisation de 4ICD induite par les autres anticorps suggère un autre mécanisme d'action pour ces derniers.

Sur la base de ces résultats, nous avons conservé pour la suite de l'étude les anticorps C6 et D5 : l'anticorps C6 induit la relocalisation de 4ICD indépendamment de la NRG1 alors que l'anticorps D5 n'induit aucune relocalisation. Ces choix nous ont aussi été dictés par les taux de production des anticorps en cellules HEK293T. En effet, alors que l'anticorps H2 semble très intéressant, nous l'avons écarté car nous n'avons pas réussi à le produire en quantité suffisante pour toutes nos expériences *in vitro*. De plus, cet anticorps a tendance à s'agréger lors de la purification. Nous avons aussi pensé qu'il est plus intéressant de conserver l'anticorps C6 qui induit 4ICD à la mitochondrie indépendamment de la présence de NRG1, pour le traitement de tumeurs ne sécrétant pas ce ligand.

Nous avons démontré dans les résultats présentés en partie IV que la NRG1 entraînait la mort cellulaire en relocalisant 4ICD-CYT1 dans les mitochondries, en induisant la dépolarisation membranaire de ces dernières et en augmentant la production de ROS. En se basant sur ce mécanisme d'action, nous avons évalué la capacité de nos deux anticorps D5 et C6 à induire la dépolarisation de la membrane mitochondriale.

De manière similaire à la NRG1, l'induction de 4ICD à la mitochondrie par l'anticorps C6 en absence de NRG1 entraîne après 24h de traitement la dépolarisation de la membrane mitochondriale des cellules BT549 transfectées JMa/CYT1, mais pas des cellules JMaCYT2 (**Figure 83**).

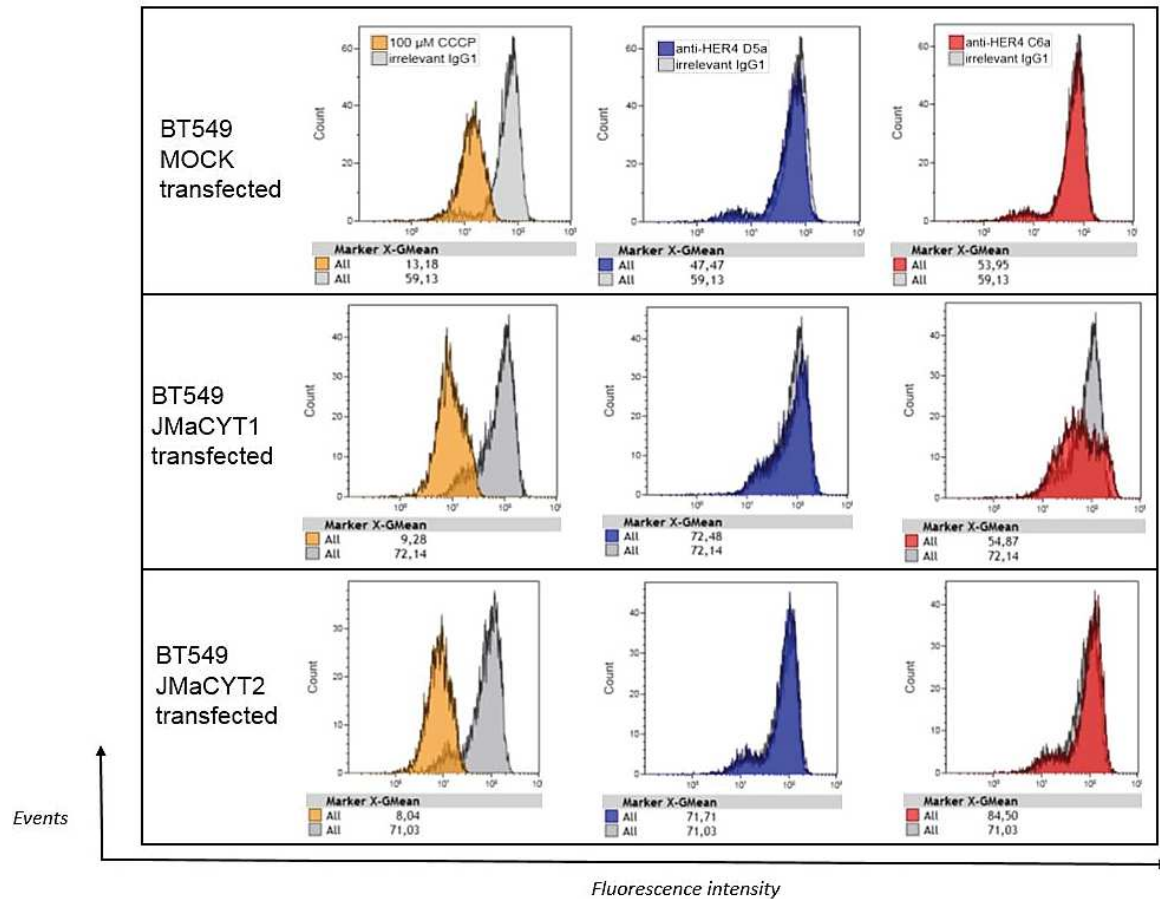


Figure 83 : Mesure des variations du potentiel mitochondrial induites par les anticorps D5 et C6 sur les cellules BT549 transfectées HER4

Les cellules BT549 ont été transfectées avec les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 puis stimulées avec 20 μ g/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 24h. Les cellules ont été ensuite marquées avec 20 nM de DioC₆ pendant 15 min à l'obscurité et analysées par FACS. La moyenne géométrique (Gmean) reflète le niveau de dépolarisation.

Conformément aux résultats de fractionnement subcellulaire sur JMa/CYT1 et JMa/CYT2, l'anticorps D5 qui n'induit pas de relocalisation mitochondriale de 4ICD ne modifie pas le potentiel de membrane mitochondriale dans les cellules BT549 JMaCYT1 et JMaCYT2. Pris globalement, ces résultats confirment que l'effet suppresseur de tumeur induit par 4ICD à la mitochondrie est spécifique de l'isoforme JMa/CYT1.

Nous avons ensuite étudié si cette dépolarisation induite par l'anticorps C6 sur JMa/CYT1 pouvait, comme la NRG1, engendrer la production de ROS. Nous avons traité les cellules BT549, transfectées avec les isoformes, avec 20 μ g/ml d'anticorps pendant 22h puis mesuré la production de ROS par bioluminescence. Les résultats présentés en **Figure 84** indiquent que les anticorps n'ont pas d'effet sur la lignée BT549 transfectée MOCK. Sur la lignée BT549 transfectée JMa/CYT1, seul l'anticorps C6 induit une légère augmentation de la production de ROS. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents, bien que cette augmentation soit assez faible. De façon intéressante, les deux anticorps augmentent la

production de ROS dans la lignée BT549 transfectée JMa/CYT2, l'augmentation la plus importante étant induite par l'anticorps D5.

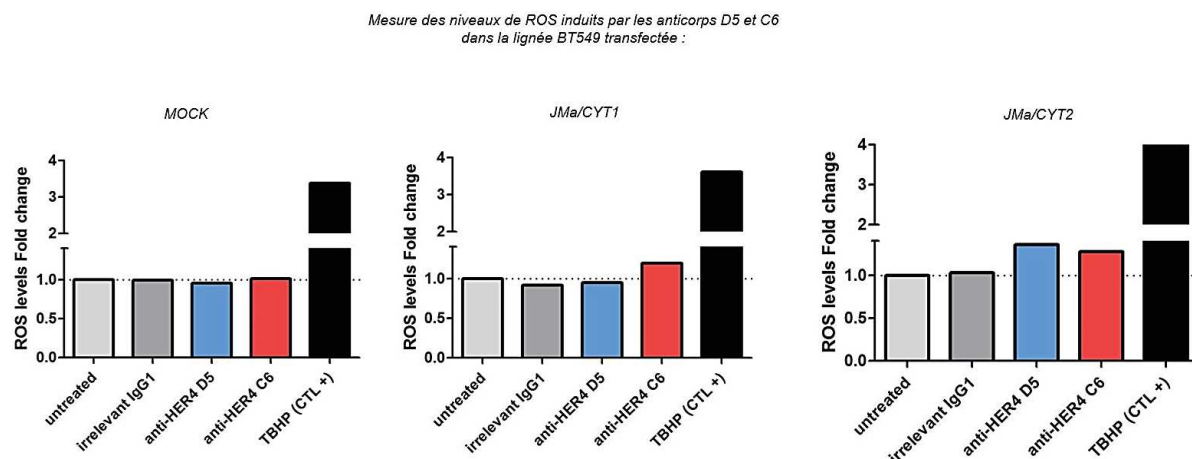


Figure 84 : Mesure de la production de ROS induite par les anticorps D5 et C6 sur la lignée BT549 transfectée HER4

Les cellules BT549 ont été transfectées avec les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 puis stimulées pendant 22h avec 20 µg/ml d'anticorps D5 ou C6. Les niveaux de ROS ont été mesurés par bioluminescence à l'aide du kit DCFDA Cellular ROS Detection Assay (Abcam). Le TBHP est utilisé comme contrôle positif d'induction de ROS.

Ces résultats sur l'isoforme JMa/CYT2 indiquent que les deux anticorps peuvent induire la mort cellulaire et augmenter la production de ROS par d'autres mécanismes que l'envoi de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie. Ces mécanismes d'action restent à élucider et pourraient impliquer les voies présentées dans la partie IV.

b. Effets des anticorps anti-HER4 sur la phosphorylation du récepteur

La mort cellulaire des cellules BT549 transfectées HER4, induite par l'anticorps C6 en libérant 4ICD-CYT1 et en le relocalisant à la mitochondrie, suggère que ce dernier module l'activité du récepteur HER4. Afin de vérifier cela, nous avons étudié les profils de phosphorylation du récepteur HER4 sur des temps courts pour déterminer le mode d'action de nos anticorps.

Nous avons étudié les phosphorylations du récepteur HER4 sur trois tyrosines en positions 984, 1056 et 1284. La phosphorylation de la tyrosine 1056 nous semble la plus importante car elle a été décrite comme critique pour l'activité suppresseur de tumeur de HER4 et présente uniquement dans CYT1 (Gallo et al., 2006). Nous pensons que des anticorps ciblant HER4 de manière efficace devraient induire la phosphorylation de cette tyrosine. La tyrosine 984, présente dans CYT1 et CYT2, est décrite comme un site de liaison de STAT5A sur 4ICD (Han et al., 2016), important pour l'induction de la différenciation. De manière intéressante, cette tyrosine est située juste à côté du domaine *BH3-only* de 4ICD : la

phosphorylation de cette tyrosine pourrait être impliquée dans l'adressage de 4ICD à la mitochondrie. Enfin, la tyrosine 1284, présente également dans CYT1 et CYT2, est située dans la partie C-terminale du récepteur. Jusqu'à présent, la phosphorylation de cette tyrosine n'a été impliquée dans aucune fonction de HER4. Elle est largement utilisée dans la littérature comme contrôle positif de l'activation de HER4 : le mAb1479, bloquant le clivage des isoformes JMa, empêche la phosphorylation du récepteur HER4 sur sa Tyr 1284 par la NRG1 (Hollmén et al., 2009). L'anti-HER4 Ab77 est décrit comme un agoniste du récepteur HER4 (Chen et al., 1996) qui induit la prolifération cellulaire, mais son effet sur les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 n'est pas connu. La **Figure 85** présente les phosphorylations induites après 1h et 1h30 de traitement par les anticorps D5 et C6 sur les deux isoformes de HER4, en absence de stimulation par la NRG1 :

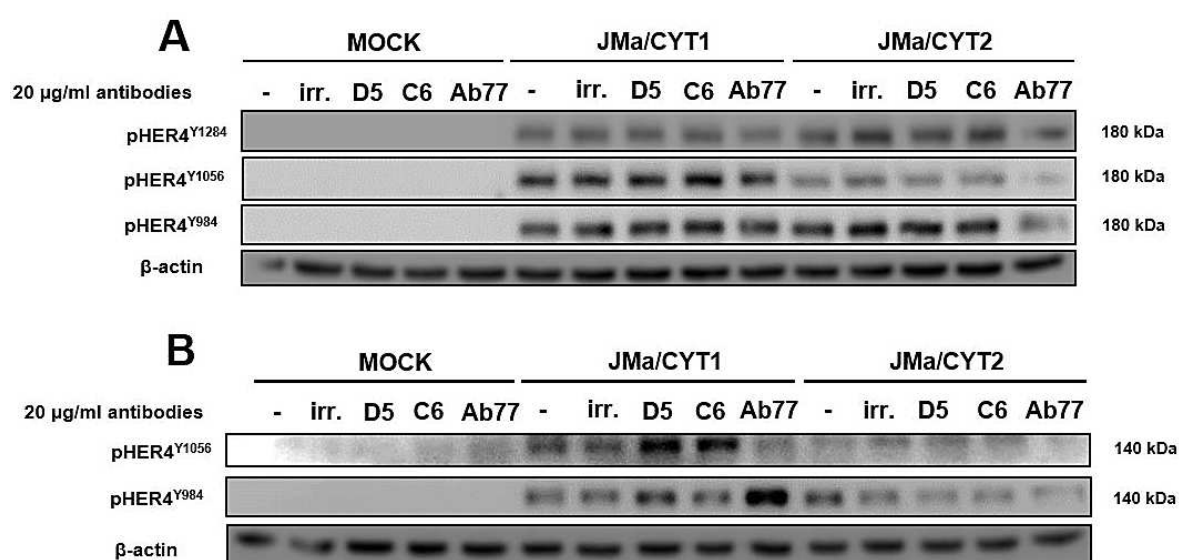


Figure 85 : Phosphorylations induites sur les deux isoformes de HER4 après 1h et 1h30 de traitement par les anticorps D5 et C6

Les cellules BT549 ont été transfectées avec les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 puis traitées avec 20 µg/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 1h (**A**) et 1h30 (**B**). L'anticorps anti-HER4 Ab77 a été décrit comme agoniste du récepteur HER4 mais son effet sur la phosphorylation des isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 n'est pas connu. Les anticorps D5, C6 et Ab77 modulent l'activité de l'isoforme JMa/CYT1 en induisant sa phosphorylation sur différentes tyrosines.

L'expression de JMa/CYT1 dans la lignée BT549 est associée à la phosphorylation des trois tyrosines, avec une phosphorylation basale plus importante de la Tyr 1056. Après 1h de traitement, l'anticorps C6 augmente la phosphorylation des Tyr 1056 et 984 de l'isoforme « *full-length* » HER4 JMa/CYT1 à 180 kDa. Les anticorps D5 et Ab77 ne modifient pas ces niveaux de phosphorylation après 1h de traitement (**Figure 85A**).

Après 1h de traitement, les anticorps D5 et C6 ne semblent pas moduler la phosphorylation de l'isoforme « *full-length* » HER4 JMa/CYT2 à 180 kDa. Seul l'anticorps Ab77 modifie le profil de phosphorylation de cette isoforme, en diminuant les phosphorylations

de toutes ses tyrosines. Ces résultats suggèrent que l'anticorps Ab77 est un anticorps antagoniste ou modulateur allostérique négatif de l'isoforme JMa/CYT2. Cette observation est soutenue par le fait que cet anticorps abolit complètement l'activation des voies p38 MAPK et AKT après 1h de traitement sur cette isoforme (résultats non montrés).

La phosphorylation de la Tyr 1056 de l'isoforme HER4 JMa/CYT1 par l'anticorps C6, après 1h de traitement (**Figure 85A**), est maintenue après 1h30 de traitement par cet anticorps (**Figure 85B**).

Cependant, cette phosphorylation sur la Tyr 1056 apparait à une masse moléculaire d'environ 140 kDa, qui pourrait correspondre au fragment m80 (le récepteur HER4 après clivage par TACE) enchassé dans la membrane (Vecchi et al., 1996). Ces résultats suggèrent que l'anticorps C6 module l'activité du récepteur HER4 selon un schéma et une cinétique définie.

Notre hypothèse est que l'anticorps C6, en se fixant sur JMa/CYT1, phosphoryle le récepteur « *full-length* » sur sa Tyr 1056. L'absence de phosphorylation du récepteur à 180 kDa et sa phosphorylation à 140 kDa après 1h30 de traitement suggère le clivage de l'ECD du récepteur dans ce laps de temps. Ce clivage extracellulaire laisse le fragment m80 enchassé dans la membrane plasmique, de masse moléculaire d'environ 140 kDa. Ce fragment m80 ainsi phosphorylé, outre le fait que sa phosphorylation peut pré-orienter 4ICD vers une certaine signalisation (mitochondries), peut alors servir de substrat pour la γ -secretase, induisant le clivage de m80 et la libération de 4ICD après 90 min (**Figure 86**). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer ce mécanisme d'action.

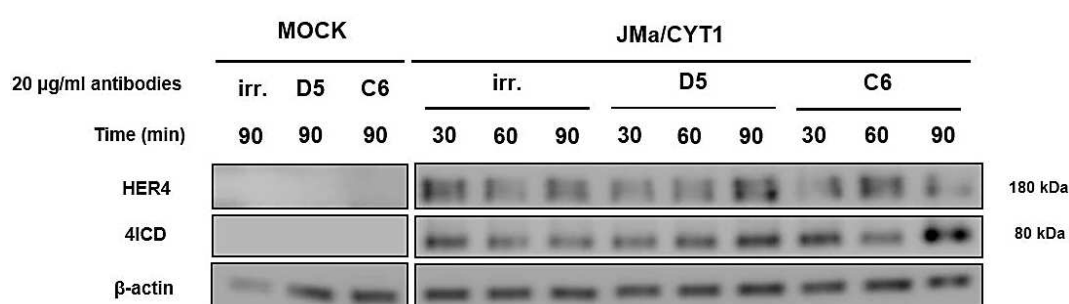


Figure 86 : Effets des anticorps D5 et C6 sur le clivage de l'isoforme JMa/CYT1

Les cellules BT549 ont été transfectées avec les plasmides codant pour l'isoforme JMa/CYT1 puis stimulées avec 20 μ g/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 30 min, 1h et 1h30. L'anticorps C6 induit la phosphorylation de la Tyr 1056 de l'isoforme HER4 JMa/CYT1 après 60 min de traitement et son clivage à 90 min, libérant ainsi 4ICD. Ces résultats suggèrent que l'anticorps C6 est un anticorps activateur du récepteur HER4.

L'augmentation de 4ICD à 80 kDa, induite par l'anticorps C6, est corrélée à l'absence de phosphorylation de l'isoforme « *full-length* » à 180 kDa (résultats non montrés). Pris dans

leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'anticorps C6 est un anticorps modulateur allostérique positif de l'isoforme HER4 JMa/CYT1.

c. Au-delà de HER4 : capacité des anticorps à biaiser la signalisation des RTK : preuve de concept avec les anticorps anti-HER4 C6 et Ab77

Nous avons montré dans la partie IV que l'effet suppresseur de tumeur de HER4 sous pression de NRG1 était induit par la relocalisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie. C'est sur cette capacité à relocaliser 4ICD que nous avons sélectionné l'anticorps C6. Cet anticorps semble induire la mort cellulaire par les mêmes mécanismes que la NRG1, alors que les prédictions *in silico* indiquent que cet anticorps cible un épitope différent de celui de la NRG1. Ces résultats suggèrent que des anticorps peuvent moduler la signalisation d'un RTK aussi finement que le ligand endogène en agissant sur des parties spécifiques du récepteur.

Cette capacité d'un anticorps à biaiser la signalisation d'un récepteur HER n'a jamais été démontrée jusqu'à présent. Afin de valider ces résultats et ainsi d'établir la preuve de concept que des anticorps différents ciblant un même récepteur peuvent induire des signalisations biaisées, nous avons utilisé notre modèle de cellules BT549 transfectées avec les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2. Ces modèles, qui n'expriment chacun qu'une seule isoforme de HER4, nous permettent de suivre la localisation de 4ICD dans les différents compartiments après traitement par les anticorps. Nous avons stimulé ces cellules avec notre anticorps C6 et l'anticorps Ab77 pendant 6h avant d'isoler les fractions mitochondriales et cytosoliques par fractionnement subcellulaire. La **Figure 87** présente ces résultats :

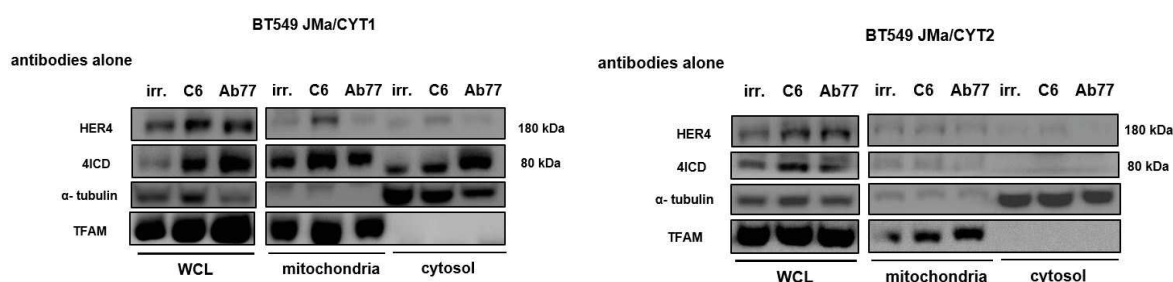


Figure 87 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 JMa/CYT1 et JMa/CYT2 après traitement par les anticorps C6 et Ab77

Les cellules BT549 ont été transfectées avec les plasmides codant pour les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2 puis traitées avec 20 µg/ml d'anticorps C6 et Ab77 pendant 6h à 37°C. Les cellules ont ensuite été soumises à un fractionnement subcellulaire pour isoler les mitochondries et le cytosol. La présence de HER4 et 4ICD dans ces fractions a été étudiée en WB avec l'anticorps E200.

Comme nous l'avons démontré, l'anticorps C6 est un anticorps modulateur qui induit la mort cellulaire en relocalisation 4ICD à la mitochondrie. L'anticorps Ab77 est décrit comme

un anticorps agoniste dont les résultats non publiés par le laboratoire de Yosef Yarden indiquent qu'il induit la prolifération cellulaire de cellules tumorales.

La **Figure 87** démontre qu'à partir de l'isoforme JMa/CYT1, l'anticorps C6 induit majoritairement la relocalisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie alors que l'anticorps Ab77, à partir de cette même isoforme, induit principalement la relocalisation de 4ICD-CYT1 dans le cytosol. Ces résultats indiquent clairement que deux anticorps sur un même RTK peuvent induire des signalisations biaisées.

Les anticorps n'induisent aucun biais de 4ICD à partir de l'isoforme JMa/CYT2, suggérant que cette relocalisation de 4ICD est peut-être dépendante des 16 AA de CYT1. Alors que les parties ECD des deux isoformes sont identiques, ces résultats démontrent que les anticorps sont capables de moduler très finement des signalisations et que des changements mineurs de conformation peuvent engendrer des changements majeurs de signalisation.

Ces résultats de biais de la signalisation sont à compléter avec des expériences supplémentaires sur les effets des anticorps *in vitro*. Des résultats préliminaires sur la lignée C-33A indiquent que l'anticorps C6 induit la mort en diminuant l'activité mitochondriale, en augmentant le clivage de PARP et les dommages à l'ADN alors qu'un traitement par l'anticorps anti-HER4 Ab77 augmente la prolifération cellulaire en augmentant l'activité mitochondriale et en protégeant les cellules de l'apoptose. La NRG1 associée à l'anti-HER4 C6 amplifie cette mort cellulaire alors que l'anti-HER4 Ab77 antagonise l'effet de la NRG1, ce qui confirme les effets opposés des anticorps sur le récepteur HER4 (résultats non montrés).

Ces résultats et observations suggèrent qu'il est possible de développer des anticorps agonistes ou modulateurs allostériques de n'importe quelle voie de signalisation, ce qui ouvre des perspectives immenses quant au développement d'anticorps thérapeutiques biaisants ciblant les RTK.

4. Effets *in vitro* des anticorps anti-HER4 D5 et C6 sur les lignées cancéreuses

Ces premiers résultats nous ont permis d'appréhender les mécanismes d'action de nos anticorps D5 et C6. L'anticorps C6 semble agir comme la NRG1 *via* JMa/CYT1 en induisant la relocalisation de 4ICD à la mitochondrie et la dépolarisation mitochondriale, contrairement à l'anticorps D5. Les mécanismes de mort induits *via* l'isoforme JMa/CYT2 n'ont pas été mis en évidence mais pourraient impliquer l'induction de dommages à l'ADN.

Nous avons ensuite testé l'effet de nos anticorps sur des lignées cancéreuses *in vitro*. Dans les lignées testées, l'anticorps contrôle isotypique ipilimumab (« irr. ») présente globalement le même profil que la condition « non traité ». Nous n'avons donc pas représenté

cette dernière dans les figures. Même si l'augmentation au cours du temps du clivage de PARP dans la condition « *irr* » (et dans la condition « non traité ») est associée à l'augmentation de l'expression de HER4, ce clivage reflète probablement l'apoptose naturellement induite après 72h de culture des cellules sans renouvellement de milieu.

La **Figure 88** présente les effets des anticorps à 24h-48h-72h sur la lignée de cancer du sein triple-négatif HCC1187 :

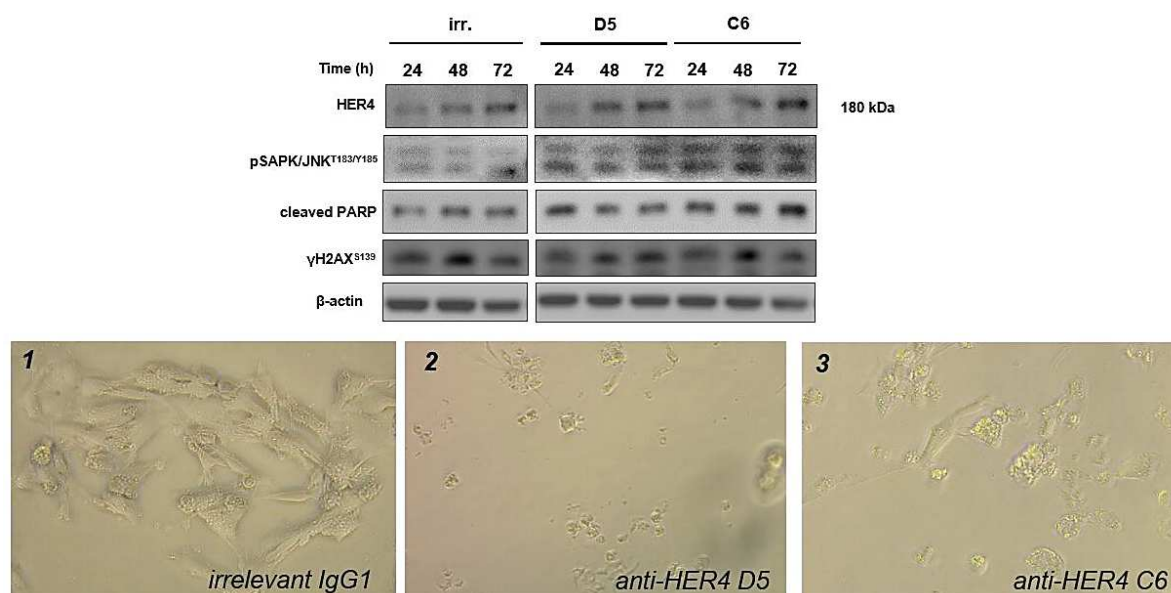


Figure 88 : Effet des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h sur la lignée de cancer du sein triple-négatif HCC1187

Les cellules HCC1187 ont été traitées avec 20 µg/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 24h, 48h et 72h puis analysées par WB pour l'induction de dommages à l'ADN et du clivage de PARP. La voie JNK est activée par les anticorps dans cette lignée.

Alors que les deux anticorps induisent la mort des cellules HCC1187 dès 24h de traitement (**photos Figure 88**), ces derniers ne semblent pas l'induire par les mêmes mécanismes d'action. En effet, l'anticorps D5 induit un clivage de PARP à 24h de traitement mais qui n'est pas amplifié à 48h et 72h. Malgré cela, des dommages à l'ADN sont induits à 72h (γH2AX). Contrairement à l'anticorps D5, l'anticorps C6 induit un clivage progressif de PARP mais n'induit pas de γH2AX. L'anticorps C6 induit l'activation de JNK à 24h et l'augmentation de l'expression du récepteur HER4 après 72h de traitement (**Figure 88**).

Nous avons démontré dans la partie IV que la NRG1 induisait la mort des cellules HCC1187, associée à un phénotype particulier avec une désintégration de la membrane plasmique (**Figure 53, page 157**). Ce phénotype est observé seulement après traitement par l'anticorps C6 (**Figure 88**). L'activation de la voie JNK et le clivage de PARP par cet anticorps suggère que l'anticorps C6 induit la mort cellulaire par les mêmes voies que la NRG1. Ces voies ne semblent pas induites par l'anticorps D5.

La mort induite par la NRG1 sur les cellules HCC1187 est associée à une augmentation des niveaux protéiques (test Sulforhodamine B, **Figure 53, page 157**). Cette augmentation est aussi induite par les anticorps sur la lignée de cancer du sein triple-négatif MDA-MB-453 (**Figure 89**) :

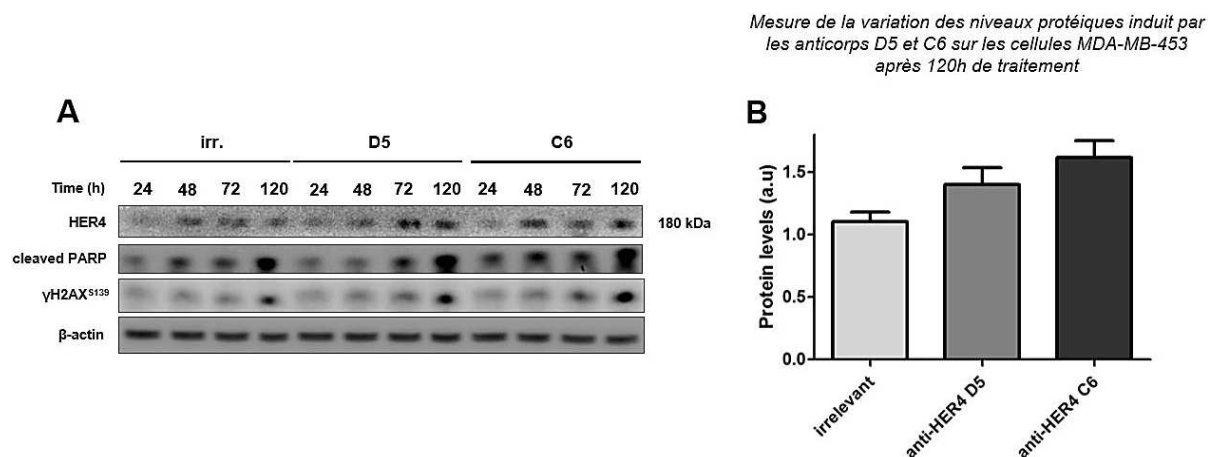


Figure 89 : Effet des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h-120h sur la lignée de cancer du sein triple-négatif MDA-MB-453

(A) Les cellules MDA-MB-453 ont été stimulées avec 20 µg/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 24h, 48h, 72h et 120h puis analysées par WB pour l'induction de dommages à l'ADN et du clivage de PARP. **(B)** Mesure de la variation des niveaux protéiques induits par les anticorps D5 et C6 après 120h de traitement (test sulforhodamine B). La mort des cellules MDA-MB-453 induite par les deux anticorps est associée à une augmentation des niveaux protéiques.

Dans cette lignée, les deux anticorps induisent le clivage de PARP. Ce clivage apparaît après 72h de traitement par l'anticorps D5 mais dès 24h de traitement par l'anticorps C6. L'anticorps C6 induit des dommages à l'ADN après 72h de traitement. Les niveaux d'expression de HER4 sont augmentés par les deux anticorps après 120h de traitement (**Figure 89A**). A 120h, le clivage de PARP et l'induction de dommages à l'ADN par les anticorps sont associés à une augmentation non significative des niveaux protéiques dans ces cellules. (**Figure 89B**).

Nous retrouvons cette augmentation des niveaux protéiques dans la lignée de cancer de l'ovaire KURAMOCHI, où les deux anticorps induisent l'augmentation des niveaux protéiques, de manière significative pour l'anticorps C6 (**Figure 90B**). Cette dernière est aussi associée à la mort cellulaire, comme démontré dans la **Figure 90A** :

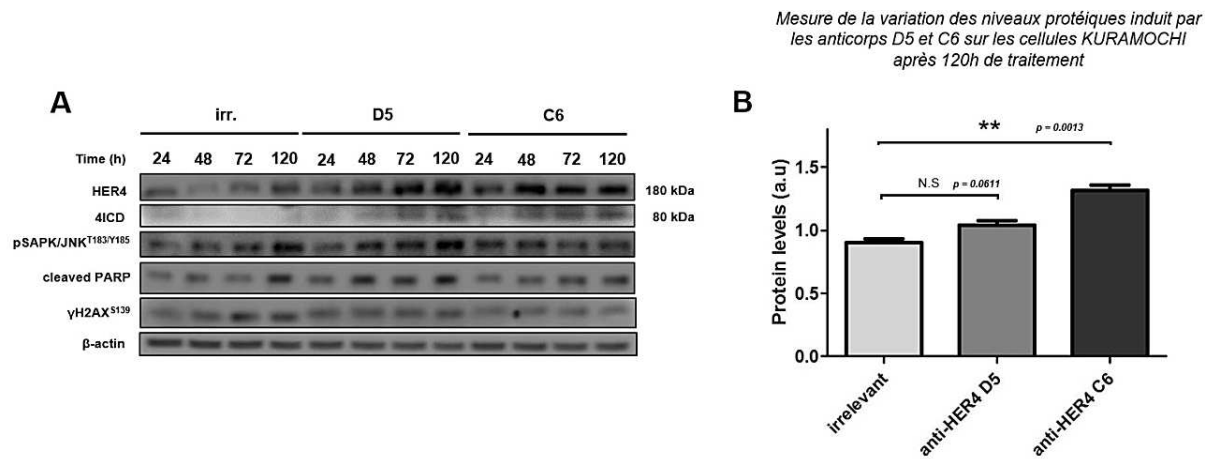


Figure 90 : Effet des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h-120h sur la lignée de cancer de l'ovaire KURAMOCHI

(A) Les cellules KURAMOCHI ont été traitées avec 20 µg/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 24h, 48h, 72h et 120h puis analysées par WB pour l'induction de dommages à l'ADN et du clivage de PARP. La voie JNK est fortement activée par l'anticorps D5 dans cette lignée. **(B)** Mesure de la variation des niveaux protéiques induits par les anticorps D5 et C6 après 120h de traitement. L'anticorps C6, qui induit la mort cellulaire, augmente significativement les niveaux protéiques dans les cellules KURAMOCHI.

Dans cette lignée de cancer de l'ovaire, l'anticorps D5 est l'anticorps le plus efficace puisqu'il induit le clivage de PARP dès 48h de traitement. Ce clivage est associé à une activation de la voie JNK dans le même temps. Contrairement à l'anticorps D5, l'anticorps C6 induit la phosphorylation de JNK à seulement 24h et 48h de traitement. Le clivage de PARP est seulement induit après 72h de traitement par cet anticorps. Les deux anticorps n'induisent pas de dommages à l'ADN, visualisé par l'absence de γH2AX. Dans cette lignée, les deux anticorps augmentent l'expression de HER4 et l'expression de 4ICD est visible dès 72h de traitement par les deux anticorps (**Figure 90A**).

Enfin, le phénotype observé sur les cellules de cancer du col de l'utérus C-33A récapitule assez bien les effets des deux anticorps (**photos Figure 91**).

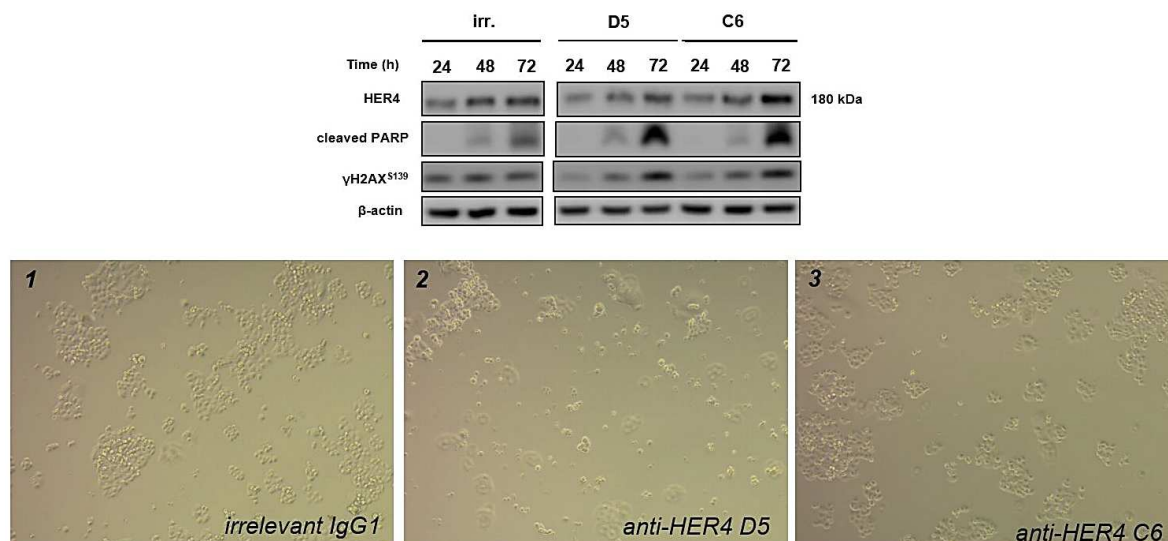


Figure 91 : Effets des anticorps D5 et C6 à 24h-48h-72h sur la lignée de cancer du col de l'utérus C-33A

Les cellules C-33A ont été stimulées avec 20 μ g/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 24h, 48h et 72h puis analysées par WB pour l'induction de dommages à l'ADN et du clivage de PARP.

Dans ces cellules, l'anticorps D5 induit un phénotype de mort proche de l'apoptose puisque les cellules se détachent de la matrice. Contrairement à l'anticorps D5, les cellules traitées par l'anticorps C6 sont toujours adhérentes. Les deux anticorps induisent un fort clivage de PARP après 72h de traitement, associé à l'induction de dommages à l'ADN. Comme sur les cellules HCC1187, l'anticorps C6 induit l'augmentation de l'expression du récepteur HER4 après 72h de traitement. Dans ces cellules, l'anticorps D5 diminue l'expression du récepteur après 48h de traitement (**Figure 91**).

Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que les deux anticorps D5 et C6 induisent la mort cellulaire dans toutes les lignées testées. Cependant, nos deux anticorps semblent induire cette mort par des mécanismes d'action différents et selon des cinétiques différentes. Ces paramètres peuvent dépendre en partie du type tumoral. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer précisément les mécanismes d'action de ces deux anticorps.

Sur la base de tous ces résultats, un brevet concernant ces anticorps est en cours de dépôt par Inserm Transfert (**voir pages 231-243**) et des expériences pré-clinique vont débiter afin de confirmer les effets de ces deux anticorps anti-HER4 D5 et C6 *in vivo*.

C - Discussion

Nous avons utilisé la technique de *phage display* sur cellules afin de cribler et de développer des anticorps anti-HER4 car elle nous paraissait être la meilleure stratégie pour découvrir des anticorps agonistes ou modulateurs allostériques positifs du récepteur HER4.

Cette technique permet une grande liberté dans la sélection puisque toutes les étapes se font *in vitro*, ce qui est clairement un avantage lorsqu'on désire induire des conformations spécifiques de récepteurs juste avant de cribler une banque de phages.

Développement d'anticorps anti-HER4

Dans notre stratégie, nous avons utilisé des cellules exprimant seulement l'isoforme JMa/CYT1 que nous avons préalablement stimulé avec de la NRG1. Le fait que nous n'ayons pu sélectionner qu'un seul anticorps (le clone H2 issu de la sélection P1H4) au cours de ces sélections s'explique par les nombreuses difficultés que nous avons rencontrées tout au long du processus. Tout d'abord, le criblage par *phage display* sur cellules ne peut être pleinement efficace que si le modèle de cellules utilisé est le plus adapté à la stratégie visée.

Dans le cas de cette sélection d'anticorps anti-HER4, nous avons à notre disposition seulement des cellules exprimant EGFR et HER4 (P1H4) ou HER2 et HER4 (P2H4) sur des cellules NIH3T3. Les expressions d'EGFR et HER2 étant très élevées par rapport à celles de HER4, cela a induit un biais dans nos sélections que nous avons essayé de supprimer en effectuant une contre-sélection des phages sur les lignées P1 et P2. C'est pourquoi parmi tous nos clones testés, beaucoup se sont avérés être des anti-EGFR ou anti-HER2. De plus, un biais a aussi été créé par la présence d'hétérodimères et non uniquement d'homodimères de HER4 dans ces lignées. Cela a pu contribuer à sélectionner des anticorps spécifiques des hétérodimères EGFR/HER4 ou HER2/HER4 et ainsi biaiser notre sélection d'anticorps spécifiques de HER4. Malgré cela, nous avons sélectionné une vingtaine de clones qui présentaient différentes propriétés de liaison, dépendantes de la stimulation à la NRG1 ou non.

Nous avons perdu la spécificité HER4 lorsque nous avons reformaté la majorité de nos candidats scFv au format IgG1. L'hypothèse que nous avons pour expliquer cela est que le passage du format scFv (monovalent) au format IgG1 (bivalent) a créé un encombrement stérique au niveau de l'épitope du récepteur ne permettant plus la liaison du paratope. Il est aussi possible que l'insertion du fragment Fc ait contribué à modifier la conformation du paratope, puisque toutes les parties de l'anticorps impactent la structure-fonction de l'anticorps (Yang et al., 2017).

Nous avons malgré tout pu conserver quelques clones que nous avons produits en cellules HEK293T et d'abord testés à partir du surnageant de ces cellules. Cette étape devrait être supprimée car la présence de facteurs dans le surnageant des cellules pourrait modifier la liaison de certains anticorps au récepteur et donner ainsi des faux-positifs. Nous pensons que c'est ce qu'il s'est passé avec l'anticorps D6, qui présentait une liaison spécifique à l'hétérodimère HER2/HER4 en présence de surnageant et plus aucune après purification de l'anticorps (**Figures 70 et 71**).

Nous n'avons pu nous baser que sur ces résultats en FACS pour sélectionner des anticorps anti-HER4 pour la poursuite de notre étude, puisque tous les clones positifs en FACS donnaient un signal négatif en ELISA sur la protéine HER4 recombinante. Le clone H2, issu de la sélection P1H4, est le seul anticorps positif aux formats scFv et IgG par ELISA. Ce clone présentait un profil de liaison à HER4 en FACS parmi les plus faibles de tous les clones sélectionnés.

Après avoir reformaté en IgG1 les scFv D5, F4, C6 et E1 sélectionnés sur la protéine HER4 recombinante, nous les avons produits et purifiés en cellules HEK293T, avec l'anticorps H2. Pour une raison que nous n'expliquons pas, seul l'anticorps E1 n'a pas pu être produit et purifié dans des quantités raisonnables en cellules HEK293T. Pourtant, nous avons validé sa production par WB au format IgG1 après transfection des cellules HEK293T en plaque 6 puits. Cela pourrait s'expliquer par la présence de HER4 sur les cellules HEK293T (résultats non montrés). Il est possible que l'anticorps E1 une fois sécrété en grande quantité par les cellules se fixe sur le récepteur HER4 et induise la mort cellulaire. Cette hypothèse est appuyée par l'observation que les cellules produisant cet anticorps présentaient beaucoup plus de mort cellulaire que les autres. Il est aussi possible que la production de cet anticorps dans la cellule HEK293T soit toxique pour cette dernière. La présence de HER4 sur les cellules HEK293T pourrait expliquer pourquoi nous avons aussi eu beaucoup de mal à produire l'anticorps H2, qui est par ailleurs très efficace pour induire la mort cellulaire (**Figure 80**). Afin d'augmenter les rendements de production, nous avons testé plusieurs stratégies comme la production en cellules CHO adhérentes ou l'ajout séquentiel de tryptone, glucose et acide valproïque pour augmenter les rendements des cellules HEK293T (Jäger et al., 2013). Malheureusement, aucune de ces stratégies ne nous a permis d'augmenter les rendements de production de nos anticorps.

Malgré ces obstacles, nous avons pu sélectionner des anticorps anti-HER4 qui ont des effets très intéressants sur les cellules cancéreuses *in vitro*. Si une autre sélection par *phage display* sur cellules devait être entreprise pour développer de nouveaux anticorps anti-HER4, il serait important de tenir compte des aspects et paramètres suivants :

- Le choix du modèle sur lequel effectuer la sélection : dans l'idéal, ce modèle ne devrait exprimer aucun autre récepteur HER et de très forts niveaux de HER4. Ce modèle reste à construire mais on pourrait envisager de transduire des cellules HCC1395 avec le gène codant pour les isoformes de HER4 et le gène codant pour un de ses ligands n'induisant pas la mort. On pourrait espérer ainsi créer une boucle autocrine favorisant le maintien de l'expression de HER4 à la surface cellulaire. Les cellules utilisées devraient être d'origine humaine.

- Il est important d'exprimer le récepteur HER4 dans des cellules qui proviennent d'un tissu dans lequel le récepteur HER4 est généralement exprimé. Ce point est crucial pour s'assurer que la signalisation à partir du récepteur transduit peut avoir lieu dans la cellule,

condition *sine qua non* pour la mise en place d'un criblage fonctionnel. Par exemple, ce criblage pourrait être basé sur la capacité des candidats anticorps à relocaliser 4ICD dans des compartiments spécifiques. Cela implique de bien connaître la biologie de la cible.

- Adapter le *timing* de stimulation au ligand : dans le contexte de développement d'agonistes biaisés, la durée de la stimulation par le ligand endogène devrait être prise en compte car le temps de résidence sur le récepteur détermine les différents complexes protéiques engagés dans la signalisation (Lane et al., 2017).

- Le format de la banque de phages : afin de s'affranchir ou de limiter au maximum les pertes ou modifications de liaisons induites par le reformatage des scFv, des banques de phages au format Fab devraient être utilisées.

- Un criblage fonctionnel rapide et efficace : la mise en place de ce dernier point est dépendante du degré de connaissance de la biologie de la cible. Idéalement, ce criblage devrait être facile et rapide à mettre en place, robuste et le plus pertinent pour la fonction recherchée.

Enfin, nous ne devrions pas avoir d'*a priori* sur l'effet d'un anticorps en fonction de sa liaison au récepteur puisque notre anticorps anti-HER4 H2, qui a toujours présenté la plus faible liaison au récepteur HER4 tout au long de la sélection, est le seul à pouvoir relocaliser 4ICD à la mitochondrie en présence de NRG1. De plus, cet anticorps est peut-être le plus efficace de tous pour induire l'apoptose. Nous n'avons malheureusement pas pu l'étudier plus en détail, pour des raisons de production et d'agrégation trop contraignantes.

Caractérisation des anticorps anti-HER4

Les expériences de compétition avec la NRG1 démontrent que la liaison des quatre anticorps est plus ou moins inhibée par la NRG1. Des expériences supplémentaires avec des doses variables d'anticorps sont nécessaires pour confirmer ces effets. Par exemple, nous ne savons pas si l'anticorps C6 à 15 µg/ml et la NRG1 à 10 nM peuvent se fixer simultanément sur le récepteur HER4 ou si la liaison du C6 est due au fait que la NRG1 ne peut pas déplacer la liaison de l'anticorps à cette concentration (**Figure 72B**).

Nous avons ensuite évalué la liaison de ces anticorps sur les deux isoformes de HER4, dans les cellules BT549. De manière intéressante, l'anticorps H2 est capable de se lier plus fortement à l'isoforme JMa/CYT1 qu'à l'isoforme JMa/CYT2, alors que les parties ECD des deux isoformes sont identiques. Puisque la différence entre les deux isoformes n'est seulement que de 16 AA et qu'elle est située dans la partie intracellulaire du récepteur, cela suggère que les conformations adoptées intracellulairement par les isoformes se répercutent au niveau extracellulaire. Il est donc envisageable de sélectionner des anticorps anti-HER4 spécifiques de chaque isoforme de HER4...

Sur les cellules BT549, l'anticorps H2 est le seul anticorps qui voit sa liaison augmenter sur les deux isoformes avec la NRG1. Ces effets doivent être confirmés en présence de concentrations croissantes de NRG1. Cependant, cette augmentation de la liaison en présence de NRG1 n'est pas retrouvée sur la lignée tumorale C-33A, qui exprime simultanément les deux isoformes de HER4. Cela peut s'expliquer par les hétérodimères JMa/CYT1-JMa/CYT2, EGFR/HER4 et HER2/HER4 qui peuvent être formés dans cette lignée et modifier la liaison des anticorps au récepteur.

Parmi nos quatre anticorps, seuls les anticorps D5 et C6 présentent une liaison au récepteur HER4 murin en ELISA. Cette propriété est intéressante et nous permettra d'appréhender la toxicité de nos anticorps *in vivo*. Comme nous avons vu que la liaison sur la protéine recombinante ne reflétait pas toujours la liaison sur la protéine membranaire, il faudrait s'assurer de cette réactivité croisée de nos anticorps en évaluant ces liaisons par FACS sur des cellules murines exprimant le récepteur HER4 murin.

Nous avons ensuite essayé de déterminer les épitopes reconnus par nos anticorps grâce à une membrane SPOT. Nous pensions déjà que les épitopes reconnus avaient de fortes chances d'être conformationnels, ce que les tests sur membrane ont confirmé puisqu'ils ne peuvent révéler que des épitopes linéaires. Pour les déterminer, nous avons ensuite utilisé une approche *in silico* en collaboration avec la société MAbTope. Les prédictions obtenues avec les anticorps D5 et C6 indiquent que les épitopes des anticorps sont partagés entre les domaines II et IV du récepteur HER4. Ces sites sont assez éloignés du site de fixation de la NRG1 (Bouyain et al., 2005), ce qui laisse suggérer que les anticorps pourraient se lier au récepteur en présence de NRG1. Il serait d'ailleurs très intéressant d'obtenir les prédictions des épitopes sur le récepteur HER4 liant la NRG1 afin de comparer les sites d'interaction.

Cela pourrait grandement nous aider à comprendre les effets des anticorps sur les cellules tumorales en présence ou en absence de NRG1 et à expliquer les différentes liaisons observées sur le récepteur HER4. Nous avons comparé les épitopes prédits pour nos deux anticorps avec celui publié du mAb1479, l'anticorps anti-HER4 bloquant le clivage de HER4 par TACE (Hollmén et al., 2012). Il est intéressant de constater que même si nos anticorps semblent se lier, en partie, dans la même zone que le mAb1479, ils n'induisent pas du tout les mêmes effets biologiques. Cela suggère que des changements subtils de conformation du récepteur induits par la fixation des anticorps peuvent engendrer des signalisations totalement opposées. On peut imaginer qu'en se liant en amont du site de clivage de TACE, nos anticorps n'encombrent pas stériquement cette zone pour l'activation de HER4 par clivage. Nos anticorps, en se liant au domaine IV, pourraient même influencer directement l'activation du récepteur et faciliter ce clivage. A ce stade, nous pouvons fortement penser que nos anticorps ne sont pas des antagonistes compétitifs de la NRG1.

Nous ne savons pas encore si nos anticorps sont des agonistes ou des modulateurs allostériques positifs du récepteur HER4, puisqu'ils semblent se fixer majoritairement sur le domaine IV du récepteur. A l'avenir, si les cristallographies des isoformes de HER4 étaient disponibles, cela nous permettrait de déterminer si les épitopes reconnus par nos anticorps sur les deux isoformes peuvent être différents.

Sur la base de ces prédictions et de nos résultats, nous considérons que la fixation de la NRG1 sur le récepteur HER4 n'empêche pas celle de nos anticorps. Nous avons ensuite étudié l'effet de nos quatre anticorps sur la mort cellulaire de cellules BT549 transfectées avec les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2, en absence et en présence de NRG1.

Effets des anticorps anti-HER4 sur les isoformes JMa/CYT1 et JMa/CYT2

En absence de NRG1, nos quatre anticorps induisent des voies de mort cellulaire à partir des deux isoformes mais les mécanismes d'activation semblent différents. Les anticorps D5, C6 et H2 sur JMa/CYT1 induisent la libération de 4ICD, suggérant un effet modulateur de ces anticorps sur cette isoforme. Cette libération de 4ICD est associée au clivage de la caspase 3 seulement avec cette isoforme, ce qui suggère que 4ICD-CYT1 peut activer une voie d'entrée en apoptose, peut-être via la mitochondrie et la dimérisation avec BAK (Naresh et al., 2006). Nous avons vu que notre anticorps C6 induisait la libération de 4ICD-CYT1 et sa localisation à la mitochondrie (**Figure 81**), entraînant le clivage de PARP et de la caspase 3 après 24h de traitement. Afin de vérifier si 4ICD-CYT1 pouvait promouvoir la mort en interagissant avec BAK, nous avons effectué des expériences de co-IP après traitement aux anticorps D5 et C6. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction entre 4ICD-CYT1 et BAK ou BAX, ni même une interaction BAK/BAX (résultats non montrés). Cela indique que si 4ICD-CYT1 induit la mort cellulaire par la mitochondrie, cette mort n'est pas déclenchée par la formation de pores par BAK ou BAX. Il est cependant possible que l'on n'ait pas pu mettre en évidence cette interaction à cause des anticorps utilisés pour la co-IP, où l'anticorps utilisé pour la capture de la protéine A pourrait recouvrir le site d'interaction avec la protéine B. On ne peut pas exclure cela d'autant plus que les protéines étudiées sont de faible masse moléculaire.

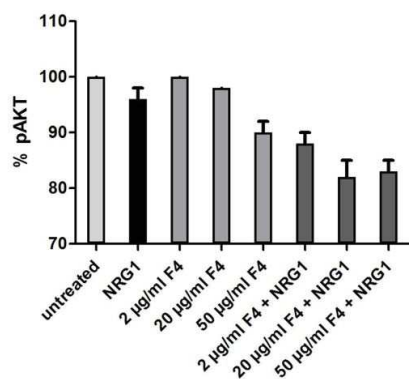
De manière intéressante, BIK (*Bcl-2 Interacting Killer*) est une protéine *BH3-only* pro-apoptotique dont les niveaux sont augmentés par l'expression de l'isoforme JMa/CYT1 (Wali et al., 2014a). Cette protéine a été décrite comme impliquée dans l'induction du stress du Réticulum Endoplasmique (RE) menant à la fission mitochondriale et impliquant des flux calciques (Chinnadurai et al., 2008). L'expression de BIK a aussi été décrite comme induite par des stress génotoxiques et par certaines protéines comme E2F. En activant HER4, nos anticorps pourraient induire plusieurs voies de signalisation par 4ICD dont une conduirait à l'augmentation des niveaux de BIK et engendrerait un stress du RE. Cette voie de stress est

à étudier car le stress du RE conduit à la mort cellulaire par un mécanisme induisant l'augmentation de la synthèse protéique et la production de ROS (Han et al., 2013). Nous avons démontré que nos anticorps augmentaient les niveaux de ROS (**Figure 84**) et observé une augmentation des niveaux protéiques par SRB, sur différentes cellules tumorales traitées avec nos anticorps (**Figure 90**). De plus, cette hypothèse est appuyée par le fait que sur la lignée C-33A, l'anticorps D5 induit dès 1h30 de traitement une forte augmentation de la phosphorylation de p70S6K (résultats non montrés), une protéine impliquée dans l'augmentation de la synthèse protéique et phosphorylée après traitement par la tunicamycine, un inducteur de stress du RE (Ji et al., 2018).

Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer ces mécanismes d'action sur les deux isoformes. Il est possible que plusieurs mécanismes de mort soient activés, dépendants ou non des isoformes, et que le type de mort induit soit déterminé en fonction de la puissance de chaque voie de signalisation. Alors qu'il est clair que la composante mitochondriale entre en jeu dans la mort induite par l'anticorps C6 sur JMa/CYT1, le mécanisme qui induit la mort par JMa/CYT2 n'est pas élucidé. Ce mécanisme ne semble pas impliquer directement 4ICD-CYT2 à la mitochondrie.

Ces résultats complémentaires pourront nous aider à comprendre pourquoi certains anticorps sur JMa/CYT1 antagonisent l'effet suppresseur de tumeur de la NRG1 mais pas sur JMa/CYT2 (**Figures 78A et 79A**). Sur cette isoforme JMa/CYT1, l'anticorps F4 en présence de NRG1 induit la libération de 4ICD plus fortement que ne le fait la NRG1 et l'anticorps seul. Cela indique un effet synergique de l'anticorps et de la NRG1 qu'il serait intéressant d'étudier pour comprendre l'allostérie sur les RTK. Cet effet synergique sur le clivage de 4ICD est retrouvé au niveau de la signalisation, où l'anticorps F4 en présence de NRG1 potentialise l'effet de cette dernière sur la diminution de la phosphorylation d'AKT, dans la lignée C-33A (**Figure 92**).

Mesure par HTRF de la phosphorylation d'AKT induite par la NRG1 seule, l'anticorps anti-HER4 F4 seul et l'anticorps anti-HER4 F4 en présence de NRG1



Mesure par HTRF de la phosphorylation de ERK1/2 induite par la NRG1 seule, l'anticorps anti-HER4 F4 seul et l'anticorps anti-HER4 F4 en présence de NRG1

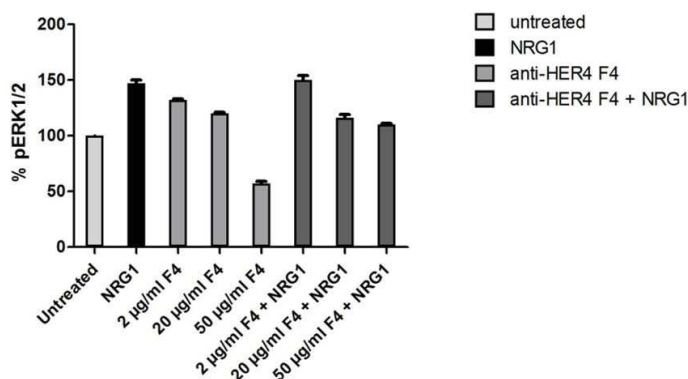


Figure 92 : Mesure par HTRF des niveaux de phosphorylation d'AKT et de ERK1/2 dans la lignée C-33A après stimulation par la NRG1 seule, l'anticorps F4 seul ou l'anticorps F4 en présence de NRG1

Après 14h de starvation, les cellules C-33A ont été stimulées avec 30 ng/ml de NRG1 ; 2, 20 et 50 µg/ml d'anticorps anti-HER4 F4 ou 2 ; 20 et 50 µg/ml d'anticorps anti-HER4 F4 en présence de 30 ng/ml de NRG1. Après 2h de stimulation à 37°C, les cellules ont été lysées puis les phosphorylations d'AKT et de ERK1/2 ont été analysées par HTRF.

Alors que la NRG1 et l'anticorps anti-HER4 F4 à 2 µg/ml ne modifient pas significativement les niveaux de phosphorylation d'AKT, cette phosphorylation est fortement diminuée lorsque l'anticorps F4 est incubé en présence de NRG1, indiquant un effet synergique de l'anticorps et de la NRG1 sur cette voie. Cet effet n'est pas retrouvé sur la voie ERK1/2. Cela indique que la signalisation des RTK peut être biaisée et que des anticorps sont capables de moduler finement des signalisations. Ces expériences nécessitent d'être reproduites notamment sur chaque isoforme de HER4 afin de pouvoir disséquer les mécanismes de signalisation du récepteur.

Biais de la signalisation du récepteur HER4 par les anticorps C6 et H2

Les résultats de fractionnement subcellulaire présentés en **Figures 81, 82 et 87** démontrent très clairement que la signalisation des RTK peut être biaisée vers certaines voies de signalisation. Il est très intéressant d'observer que l'anticorps anti-HER4 H2, le seul à avoir été sélectionné par *phage display* sur cellules, est aussi le seul parmi nos quatre anticorps à induire la relocalisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie après 6h de traitement, seulement en présence de NRG1. Ce résultat suggère que l'anticorps anti-HER4 H2 se lie sur JMa/CYT1 de manière allostérique et que la conformation du récepteur induite par la NRG1 et l'anticorps permet à 4ICD d'être libéré et induit à la mitochondrie. Le fait que cet anticorps n'induit pas cette signalisation à partir de l'isoforme JMa/CYT2 renforce l'hypothèse que des modifications subtiles de conformations sont suffisantes pour modifier une signalisation.

Alors que l'anticorps C6 ne semble pas partager le même épitope sur HER4 que la NRG1, il est intéressant d'observer qu'il peut quand même induire la localisation de 4ICD-

CYT1 à la mitochondrie. Cette localisation est indépendante de la présence de la NRG1 (**Figures 81 et 82**). Les expériences de mesure du potentiel mitochondrial confirment cette localisation de 4ICD induite par l'anticorps C6, puisque cet anticorps induit la dépolarisation des mitochondries spécifiquement à partir de l'isoforme JMa/CYT1 (**Figure 83**). Nous n'avons pas testé l'effet des anticorps F4 et H2, mais il serait intéressant de voir si l'anticorps H2 en présence de NRG1 peut aussi induire cette dépolarisation. Il serait intéressant de compléter ces expériences par de la microscopie électronique afin de visualiser 4ICD dans les mitochondries.

Nous avons décrit dans la partie IV une dépolarisation des mitochondries induite par la NRG1 sur JMa/CYT1 et associée à la production de ROS. Sur cette isoforme, l'anticorps C6 augmente légèrement la production de ROS après 22h de traitement (**Figure 84**). Ces expériences doivent être confirmées mais soutiennent que les mécanismes induits par l'anticorps C6 sont en partie les mêmes que ceux induits par la NRG1. Comme suggéré plus haut, plusieurs mécanismes pourraient être interconnectés car les anticorps D5 et C6 augmentent plus fortement la production de ROS à partir de JMa/CYT2 qu'à partir de JMa/CYT1. De plus, des expériences de fractionnement subcellulaire des cellules BT549 JMa/CYT1 après 17h de traitement par les anticorps D5 et C6 indiquent que l'anticorps C6 induit le relargage d'AIF de la mitochondrie (**Figure 93**). AIF est responsable de l'induction de mort indépendante des caspases comme la parthanatos, qui nécessite aussi la dépolarisation des mitochondries, un événement précoce dans l'induction de cette mort (Andrabi et al., 2008).

Les mécanismes de mort induits par nos anticorps doivent être définis, ainsi que le *timing* de ces différentes signalisations. Cela nous permettrait de comprendre et d'expliquer pourquoi l'anticorps C6 induit la localisation de 4ICD-CYT1 après 6h et 12h de traitement mais plus après 17h (**Figure 93**). Une hypothèse est que la présence de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie pourrait servir de « senseur » ou de « déclencheur » de la mort cellulaire. Une fois la mort initiée, 4ICD pourrait alors être relargué de la mitochondrie. Une autre hypothèse serait que 4ICD déclenche le stress du RE et la fission mitochondriale : cela pourrait expliquer pourquoi après 17h de traitement par l'anticorps C6 on observe une diminution de HER4, 4ICD, AIF et du cytochrome c. Cela implique que la mort induite par nos anticorps anti-HER4 serait déclenchée très tôt. Des expériences complémentaires devraient apporter des réponses à ces questions.

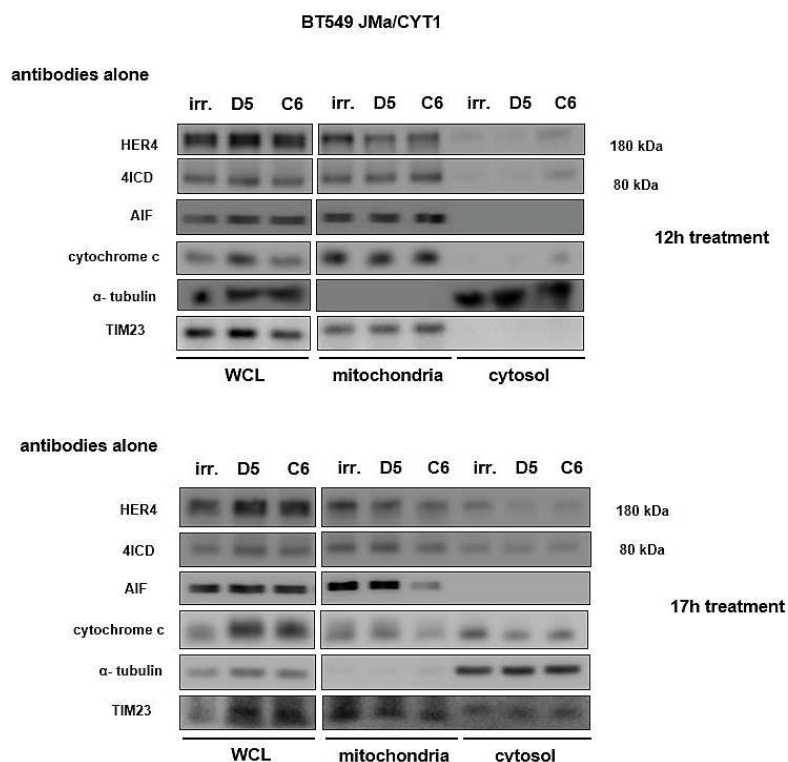


Figure 93 : Fractionnement subcellulaire des cellules BT549 transfectées avec JMa/CYT1 et traitées avec les anticorps D5 et C6 pendant 12h et 17h

Les cellules BT549 ont été transfectées avec le plasmide codant pour l'isoforme JMa/CYT1 puis traitées avec 20 µg/ml d'anticorps D5 ou C6 pendant 12h et 17h à 37°C. Les cellules ont ensuite été soumises à un fractionnement subcellulaire pour isoler les mitochondries et le cytosol. La présence de HER4 et 4ICD dans ces fractions a été étudiée en WB avec l'anticorps E200. Le relargage d'AIF de la mitochondrie, induit par l'anticorps C6 après 17h de traitement, indique l'activation de signalisations de mort cellulaire indépendantes des caspases.

Il est possible que l'induction de la mort soit très rapide avec nos anticorps, surtout si nous confirmions que ce sont des anticorps agonistes ou modulateurs allostériques positifs du récepteur HER4. Comme présenté en **Figure 85**, l'anticorps C6 augmente la phosphorylation de JMa/CYT1 sur la Tyr 1056. Cette Tyr a été décrite comme nécessaire à l'effet suppresseur de tumeur de HER4 (Gallo et al., 2006) mais n'a jamais été reliée à une signalisation précise. Il se pourrait que la phosphorylation de cette Tyr permette le recrutement de protéines adaptatrices pour conduire 4ICD à la mitochondrie, comme les protéines 14-3-3. Cependant cette Tyr a aussi été décrite comme un site de liaison à la sous-unité p85 de la PI3K, impliquant des signalisations de survie (Elenius et al., 1999). Il a été décrit que l'ICD de Notch4, un récepteur au mécanisme d'action similaire à HER4, était phosphorylé par AKT et associé aux protéines 14-3-3 pour induire sa localisation nucléaire (Ramakrishnan et al., 2015). Sur ce modèle, il est possible que la signalisation de 4ICD soit dépendante du type de protéine 14-3-3 recruté.

Au-delà de l'effet de nos anticorps sur HER4, nos résultats de fractionnement subcellulaire avec les anticorps anti-HER4 C6 et Ab77 sur l'isoforme JMa/CYT1 démontrent clairement que le biais des RTK est possible avec des anticorps (**Figure 87**). Alors que l'anticorps C6 induit la relocalisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie, l'anticorps Ab77 induit

la relocalisation de 4ICD-CYT1 dans le cytosol. L'anticorps Ab77 est décrit comme induisant la prolifération cellulaire mais à notre connaissance le mécanisme n'a pas été élucidé. Il se pourrait que ce soit *via* l'interaction de 4ICD avec les protéines du cycle cellulaire, dans un mécanisme qui accélérerait l'entrée dans le cycle (Strunk et al., 2007). La découverte des mécanismes gouvernant la localisation de 4ICD pourrait nous permettre de mieux appréhender ces concepts de biais des RTK.

Nous pensons que les protéines d'échafaudage 14-3-3 sont responsables de ces signalisations opposées, et que le domaine C-terminal de HER4 est important pour diriger ces signalisations. Ce domaine C-terminal est un site de liaison pour les protéines à domaine PDZ, qui régulent de nombreuses interactions protéine-protéine (Wang et al., 2008). Les différentes interactions possibles dépendent sûrement des états de phosphorylation du récepteur, puisqu'il a été décrit que selon l'état de phosphorylation de HER4, le récepteur pouvait soit interagir avec des protéines 14-3-3 soit avec des protéines à domaine PDZ (Espejo et al., 2017).

Le récepteur HER4 peut interagir avec les sept familles de protéines 14-3-3, ce qui rend le récepteur capable d'induire des signalisations variées. En utilisant la technique Split-TEV décrite par Wehr *et al* et validée sur HER4, nous pourrions étudier ces interactions (Wehr et al., 2008). Enfin, il est aussi possible que ces signalisations soient dépendantes de l'état d'ubiquitinylation du récepteur. Comme il a été décrit que la mono-ubiquitinylation de Notch était nécessaire pour son clivage par la γ -sécrétase (Gupta-Rossi et al., 2004), il est possible que le récepteur HER4 soit ubiquitinylé suite à son activation, ce qui aurait pour effet d'activer certaines signalisations. Ces dernières pourraient conduire 4ICD à la mitochondrie en faisant intervenir la machinerie ESCRT (Le Borgne, 2006). Si ces hypothèses étaient vérifiées, cela pourrait amener une meilleure compréhension de la signalisation des RTK et servir de modèle pour le développement d'anticorps thérapeutiques biaisant ces récepteurs.

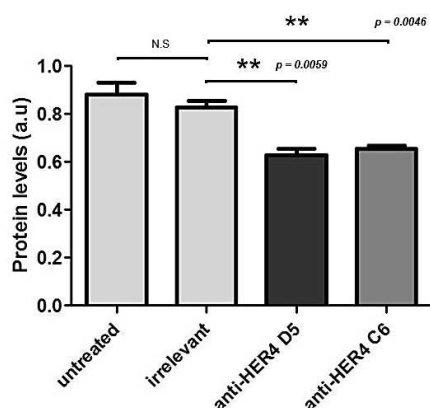
Dernier point très intéressant, ces expériences de fractionnement ont été réalisées à chaque fois sur une seule isoforme, en ne tenant pas compte de la dimérisation de cette dernière. Les cellules BT549 expriment basalement les récepteurs EGFR et HER2, ce qui pourrait biaiser la proportion des dimères formés en faveur d'hétérodimères plutôt que d'homodimères HER4. Ces hétérodimères avec EGFR ou HER2 pourraient modifier la localisation de 4ICD dans la cellule. Il est possible que le récepteur HER4 puisse être activé sous forme monomérique puis dimériser seulement dans les endosomes, comme cela a été démontré pour le RTK TrkB (Zahavi et al., 2018). Selon ce schéma, le récepteur pourrait adopter une conformation plus flexible dès la membrane et orienter 4ICD indépendamment du partenaire de dimérisation, avant que 4ICD ne soit effectivement dirigé dans la cellule après la dimérisation dans les endosomes et le clivage du récepteur. Ce mécanisme pourrait présenter une alternative à celui présenté plus haut. Cependant, l'hypothèse d'une sélection

différentielle des protéines de signalisation telles que les protéines 14-3-3 nous paraît plus probable.

En résumé, la mort cellulaire induite par nos anticorps ne résulterait pas d'une absence de signalisation, qui engendrerait ensuite la mort comme le ferait un anticorps antagoniste, mais bel et bien d'une signalisation classique, comme le ferait par exemple FasL sur son récepteur. Cette hypothèse suggère une induction de la mort bien plus rapide qu'avec des anticorps antagonistes, qui est corrélée à ce que l'on observe sur certaines cellules cancéreuses traitées avec nos anticorps.

En effet, dans la lignée HCC1187, les deux anticorps D5 et C6 induisent un phénotype de mort nécrotique dès 24h de traitement. Dans les cellules COV318, ce phénotype est même observé avant 24h, avec un clivage de PARP observé en WB dès 6h de traitement avec l'anticorps C6 (résultats non montrés). Ici encore, les différents effets de nos anticorps sur les lignées cancéreuses pourront être expliqués quand nous aurons déterminé précisément leurs mécanismes d'action. Dans les cellules HCC1187, le phénotype de mort induit par les anticorps est le même que celui induit par la NRG1. Cependant, les voies de signalisation activées semblent être différentes. Alors que la NRG1 sur ces cellules augmente les niveaux protéiques et les niveaux d'ATP (**Figures 53 et 54**), les anticorps D5 et C6 diminuent ces niveaux (**Figure 94**).

Mesure de la variation des niveaux protéiques induit par les anticorps D5 et C6 sur les cellules HCC1187 après 120h de traitement



Mesure de la variation des niveaux d'ATP induit par les anticorps D5 et C6 sur les cellules HCC1187 après 120h de traitement

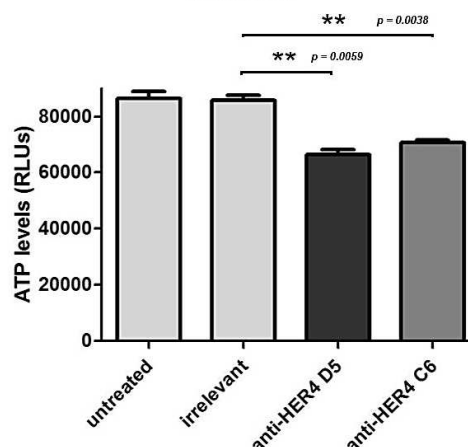


Figure 94 : Mesure des variations des niveaux protéiques et d'ATP induites par les anticorps D5 et C6 après 120h de traitement de cellules HCC1187

Les cellules HCC1187 ont été traitées avec 20 µg/ml d'anticorps D5 et C6 pendant 120h puis les niveaux protéiques et les niveaux d'ATP ont été respectivement mesurés par SRB et bioluminescence. Alors que l'anti-HER4 C6 induit un phénotype de mort nécrotique comme la NRG1, l'anticorps diminue les niveaux protéiques et les niveaux d'ATP.

Ces résultats indiquent que l'anticorps C6 et la NRG1 n'induisent pas exactement les mêmes voies de mort cellulaire et que plusieurs mécanismes d'action peuvent être induits

dans la cellule pour conduire à un même phénotype, suite à l'activation du récepteur HER4. Les résultats présentés en **Figures 89 et 90** suggèrent d'étudier les voies induisant un stress du RE et la parthanatos, pour les raisons évoquées précédemment. Enfin, une composante autophagique ne peut être exclue puisque nos anticorps activent la voie JNK et induisent la production de ROS, comme la NRG1 (Schmukler et al., 2012).

Sur la base de tous nos résultats, les **Figures 95 et 96** présentent les hypothèses du mode d'action de nos anticorps sur le récepteur HER4, en absence et en présence de NRG1 :

*La **Figure 95** présente le mécanisme d'activation du récepteur HER4 par l'anticorps C6, en absence (figure du haut) ou en présence (figure du bas) de NRG1. La **Figure 96** présente le mécanisme d'activation du récepteur HER4 par l'anticorps D5, en absence (figure du haut) ou en présence (figure du bas) de NRG1. Les flèches pleines indiquent les voies de signalisation fortement soupçonnées comme mécanisme d'action principal, dont certaines ont été présentées dans la partie résultats. Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action potentiellement activables par les anticorps.*

Bien que de nombreuses expériences complémentaires doivent être menées afin de mettre à jour les mécanismes d'action précis de nos anticorps, les résultats présentés indiquent que des anticorps agonistes ou modulateurs allostériques positifs du récepteur HER4 sont très efficaces pour induire la mort de cellules tumorales.

Effet de l'anticorps anti-HER4 C6 en absence de NRG1

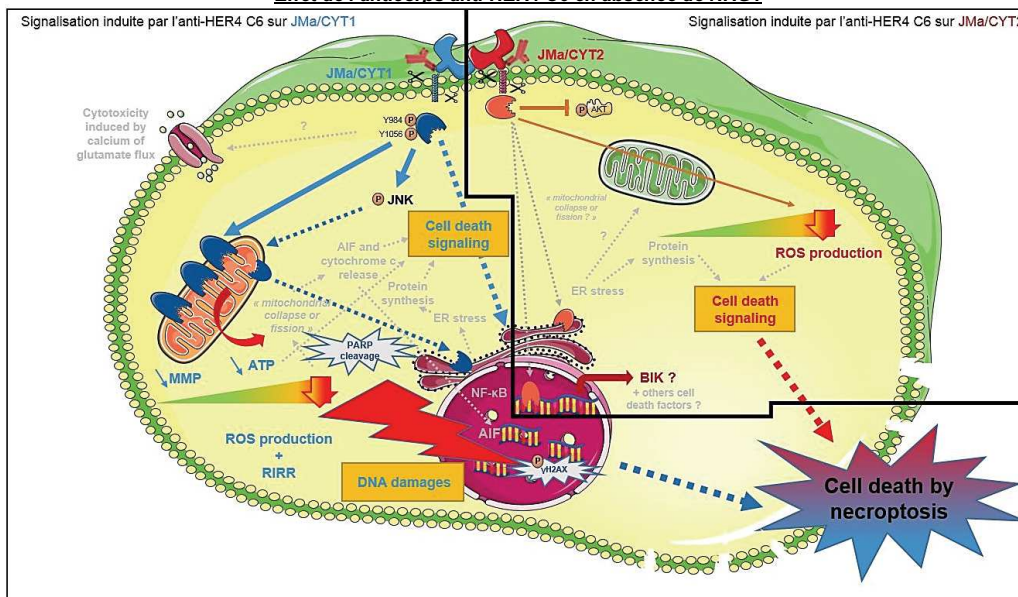
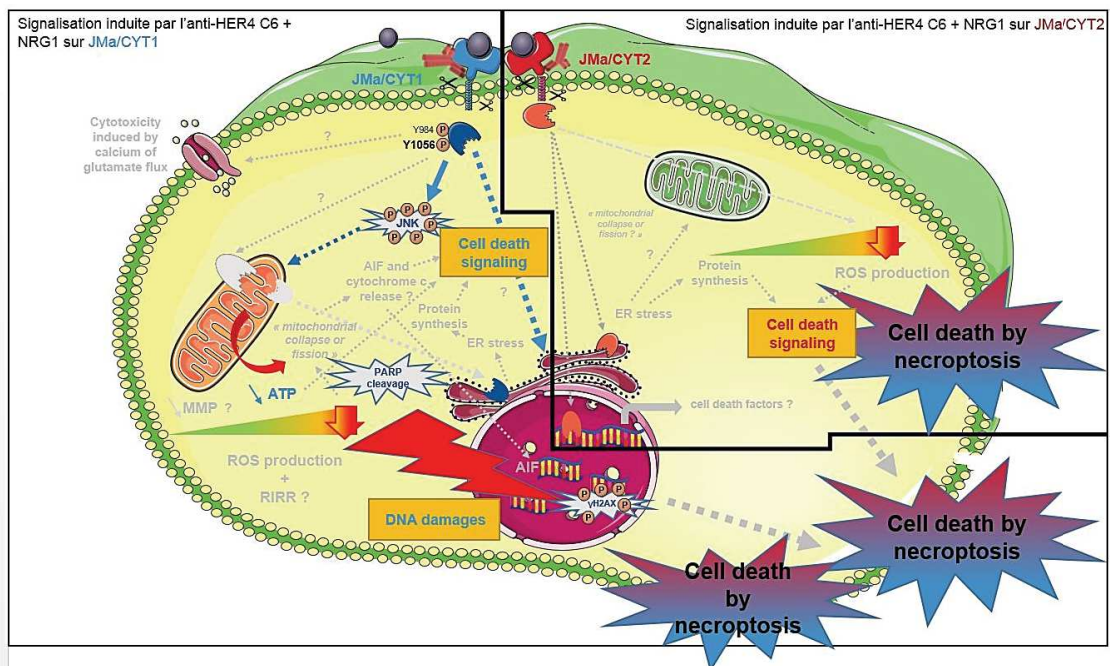


Figure 95 : Effets de l'anticorps anti-HER4 C6 sur les cellules tumorales exprimant HER4, en absence et en présence de NRG1

Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action et signalisations potentiellement activables par l'anticorps, en absence de NRG1

En absence de NRG1, la fixation de l'anticorps C6 sur l'isoforme JMa/CYT1 induit les phosphorylations des Tyr 984 et 1056 du récepteur et libère 4ICD. L'anticorps active la voie JNK et relocalise 4ICD-CYT1 à la mitochondrie. Cette relocalisation induit la dépolarisation des mitochondries et augmente la production de ROS. La diminution de la production d'ATP associée à l'augmentation des ROS et de la voie JNK induit des dommages à l'ADN. La dépolarisation mitochondriale permet la libération d'AIF dans le cytosol, qui peut alors signaler au noyau et induire des mécanismes de mort indépendants des caspases. Plusieurs mécanismes hypothétiques peuvent s'ajouter à ces effets : 4ICD-CYT1 pourrait signaler au noyau et induire la transcription de facteurs de mort tels que BIK. En collaborant avec E2F et éventuellement 4ICD, BIK pourrait induire un stress du réticulum endoplasmique et conduire à la mort cellulaire en augmentant la synthèse protéique. Le clivage de PARP induit par l'anticorps C6 sur JMa/CYT1 pourrait être dû à l'action des calpaïnes, activées par des flux calciques. Cela pourrait expliquer l'augmentation de l'activation de NF-κB observée après traitement par cet anticorps sur l'isoforme JMa/CYT1. Les mécanismes induisant la mort par l'isoforme JMa/CYT2 n'ont pas été étudiés en détail. Sur cette isoforme JMa/CYT2, l'anticorps C6 inhibe la voie AKT et augmente assez fortement la production de ROS. Le clivage de PARP n'est pas induit par l'anticorps sur cette isoforme. La mort pourrait être induite par le stress du réticulum endoplasmique. A partir des deux isoformes, l'activation de HER4 par l'anticorps C6 conduit à l'induction d'un phénotype de mort nécrotique similaire à celui observé avec la NRG1.

Effet de l'anticorps anti-HER4 C6 en présence de NRG1



Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action et signalisations potentiellement activables par l'anticorps, en présence de NRG1

En présence de NRG1, la phosphorylation de la Tyr 1056 sur JMa/CYT1 est fortement augmentée. Cela conduit à une très forte activation de la voie JNK et de l'induction de dommages à l'ADN. L'anticorps C6 potentialise l'effet de la NRG1 puisque l'activité mitochondriale s'effondre et les dommages à l'ADN apparaissent dès 14h de traitement (contre 24h pour la NRG1 ou l'anticorps seul). Le clivage de PARP est très fortement augmenté après 24h de traitement, indiquant un effet synergique de l'anticorps C6 associé à la NRG1. Sur l'isoforme JMa/CYT2, l'anticorps C6 en présence de NRG1 n'a aucun effet sur la voie AKT. Le clivage de PARP n'est pas induit à partir de cette isoforme. La production de ROS n'a pas été évaluée dans ces conditions. Sur les cellules tumorales, le phénotype nécrotique apparaît très rapidement, dès 18h de traitement.

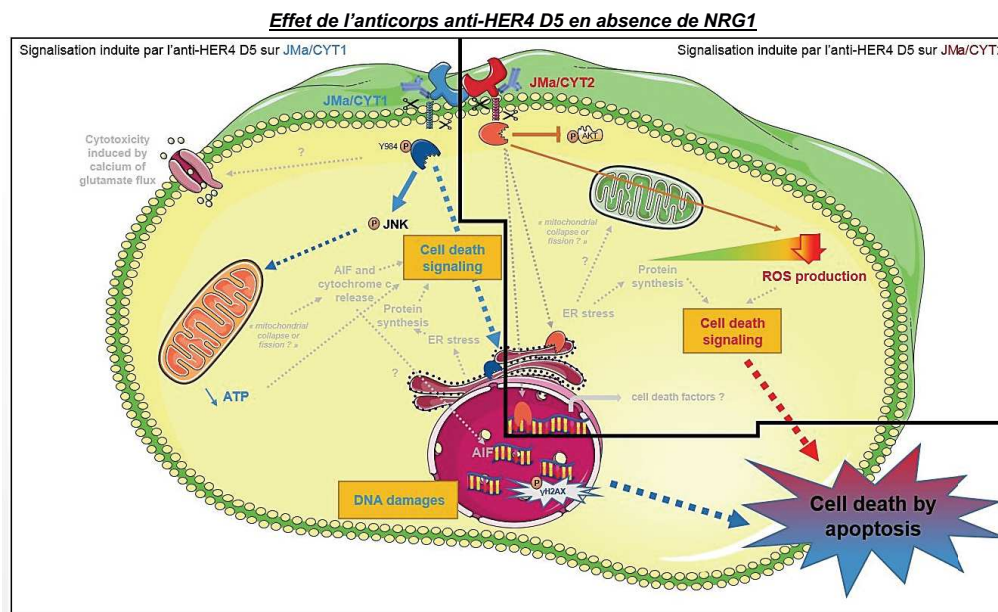
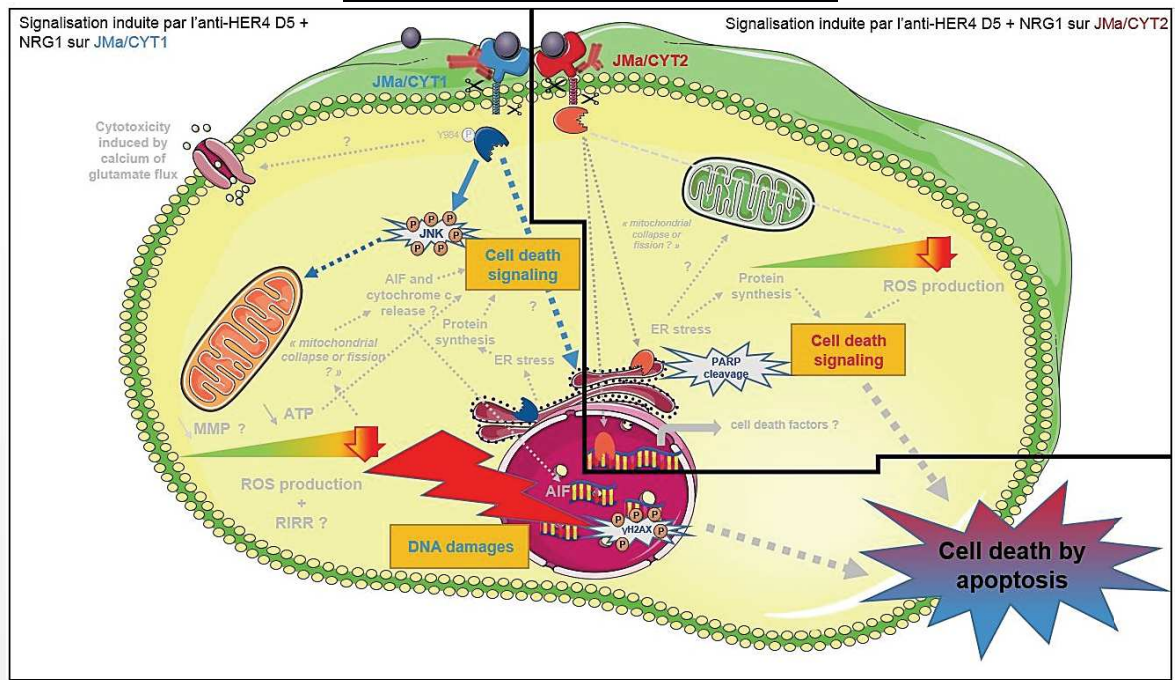


Figure 96 : Effets de l'anticorps anti-HER4 D5 sur les cellules tumorales exprimant HER4, en absence et en présence de NRG1

Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action et signalisations potentiellement activables par l'anticorps, en absence de NRG1

En absence de NRG1, la fixation de l'anticorps D5 sur l'isoforme JMa/CYT1 induit la phosphorylation de la Tyr 984 du récepteur et libère 4ICD. L'anticorps active la voie JNK mais ne relocalise pas 4ICD-CYT1 à la mitochondrie. L'anticorps n'augmente pas la production de ROS sur cette isoforme et induit un faible clivage de PARP. Des dommages à l'ADN sont induits. Comme pour l'anticorps C6, plusieurs mécanismes hypothétiques peuvent s'ajouter à ces effets : 4ICD-CYT1 pourrait signaler au noyau et induire la transcription de facteurs de mort. Si l'anticorps D5 ne relocalise pas 4ICD-CYT1 à la mitochondrie, il pourrait au contraire favoriser sa relocalisation au noyau et la transcription de facteurs de mort. Un stress du réticulum endoplasmique induit par l'anticorps D5 pourrait être le principal mécanisme de mort induit par l'anticorps. Les mécanismes induisant la mort à partir de l'isoforme JMa/CYT2 n'ont pas été étudiés en détail. Comme l'anticorps C6 sur cette isoforme, l'anticorps D5 inhibe la voie AKT et augmente assez fortement la production de ROS. L'activité mitochondriale est assez fortement diminuée après traitement par l'anticorps D5. Le clivage de PARP n'est pas induit par l'anticorps via cette isoforme. Contrairement à l'effet de la NRG1 et de l'anticorps C6, l'activation de HER4 par l'anticorps D5 conduit à l'induction d'un phénotype de mort apoptotique, avec des cellules se détachant de la matrice.

Effet de l'anticorps anti-HER4 D5 en présence de NRG1



Les flèches grises en pointillés représentent les mécanismes d'action et signalisations potentiellement activables par l'anticorps, en présence de NRG1

En présence de NRG1, l'anticorps D5 sur JMa/CYT1 induit la libération de 4ICD-CYT1. Les phosphorylations du récepteur n'ont pas été étudiées. L'anticorps D5 en présence de NRG1 entraîne une très forte activation de la voie JNK mais la diminution de l'activité mitochondriale induite par l'anticorps D5 n'est pas potentialisée en présence de NRG1. Des dommages à l'ADN sont induits de manière assez importante. Les mécanismes d'action de l'anticorps D5 en présence de NRG1 n'ont pas été étudiés en détail sur l'isoforme JMa/CYT2 mais le clivage de PARP est induit. Sur les cellules tumorales, l'anticorps D5 en présence de NRG1 induit un phénotype qui ressemble à de l'apoptose, même si les effets semblent moins tranchés que ceux induits par l'anticorps C6 en présence de NRG1.

Brevet en préparation :

ANTIBODIES HAVING SPECIFICITY TO HER4 AND USES THEREOF

Romain Lanotte, André Pèlegri, Pierre Martineau and Thierry Chardès

IRCM, INSERM U1194/ICM Val d'Aurelle/Montpellier University

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention relates to antibodies having specificity to HER4 and uses thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Human epidermal growth factor receptor 4 (HER4) is a tyrosine kinase receptor belonging to the EGFR family. HER 4 is involved in the phenomena of resistance to treatments (Canfield et al, 2015 Cell Cycle 14(4):648-55) and plays a role of oncogenic driver in certain cancers (Prickett et al, 2009 Nat Genet. 41(10):1127-32). mRNA of HER4 undergoes alternative splicing which leads to membrane addressing of four isoforms that differ in extracellular (JMa or JMb (Elenius et al, 1997 J Biol Chem. 17;272(42):26761-8)) and cytoplasmic (CYT1 or CYT2: (Elenius et al, 1999 Oncogene 22;18(16):2607-15)) parts. These four produced receptors are called JMaCYT1, JMaCYT2, JMbCYT1 and JMbCYT2. The JMa isoforms (unlike JMb) have a juxtamembrane cleavage site by the enzyme TACE. Cleavage occurring mainly during ligand-dependent activation of the receptor, its natural ligand being neuregulin (NRG). This first cleavage allows a second intracellularly by the γ -secretase enzyme, releasing the intracellular portion of the so-called 4ICD receptor, mainly dictating HER4 signaling (Williams et al, 2004a, J Cell Biol. 167(3):469-78). The JMaCYT1 or JMbCYT1 isoforms can in particular activate the PI3K /AKT pathway and induce the degradation of the receptor, unlike JMaCYT2 or JMbCYT2. Although it induces cell proliferation (Kainulainen et al, 2000 al, J Biol Chem. 275(12):8641-9), NRG has also been described as having a pro-apoptotic action via HER4 (Das et al, 2010 Oncogene. 29(37):5214-9). The JMa isoforms appear to be predominantly expressed on the surface of tumor cells, with homogeneous expression of CYT1/CYT2 (Veikkolainen et al, 2011 Cell Cycle. 10(16):2647-57).

The inventors hypothesized that HER4 targeting would be relevant only in the case where JMa isoforms are only affected, so as to bias 4ICD signaling. Effective anti-HER4 antibodies should be receptor agonists, to potentiate this tumor suppressor effect, directing 4ICD to mitochondria to induce apoptosis (Naresh et al, 2006 Cancer Res. 66(12):6412-20), whereas classical 4ICD signaling to the nucleus promotes proliferation (Kainulainen et al, 2000 J Biol Chem. 275(12):8641-9).

The inventors have selected, by phage display on cells, HER4 agonist antibodies (P. Martineau Coll., IRCM). No therapeutic anti-HER4 antibody having this biological profile has been described to date. Accordingly, the overall objectives are thus to develop antibodies against HER4 receptor in order to propose a new targeted therapy against cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION:

The present invention relates to antibodies (particularly monoclonal antibodies) having specificity to HER4 and uses thereof. In particular, the present invention is defined by the claims.

The inventors have isolated by antibody phage display three fully human anti-HER4 single-chain variable antibody fragment (scFv), selected on human HER4 extracellular domain, referred as C6 mAb, D5 mAb and F4 mAb and one fully human anti-HER4 scFv named H2 mAb, selected on NRG1 β 1-stimulated EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected NIH3T3 cells.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The present invention relates to antibodies C6 mAb, D5 mAb, F4 mAb and H2 mAb having specificity to anti-HER4 wherein:

C6 mAb, has:

(a) a heavy chain wherein the variable domain comprises:

- a H-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 2;
- a H-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 3;
- a H-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 4;

(b) a light chain wherein the variable domain comprises :

- a L-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 6;
- a L-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 7;
- a L-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 8;

D5 mAb, has:

(a) a heavy chain wherein the variable domain comprises:

- a H-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 10;
- a H-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 11;
- a H-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 12;

(b) a light chain wherein the variable domain comprises :

- a L-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 14;
- a L-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 15;
- a L-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 16;

F4 mAb, has:

(a) a heavy chain wherein the variable domain comprises:

- a H-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 18;
- a H-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 19;
- a H-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 20;

(b) a light chain wherein the variable domain comprises :

- a L-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 22;
- a L-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 23;
- a L-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 24;

H2 mAb, has:

(a) a heavy chain wherein the variable domain comprises:

- a H-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 26;
- a H-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 27;
- a H-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 28;

(b) a light chain wherein the variable domain comprises :

- a L-CDR1 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 30;
- a L-CDR2 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 31;
- a L-CDR3 having a sequence set forth as SEQ ID NO: 32;

The inventors selected these antibodies for their intrinsic anti-metastatic properties. They showed that the antibodies C6 and H2 having specificity to anti-HER4 can promote the cleavage of the 4ICD of JMaCYT1, but not of JMaCYT2. 4ICD is then involved in the tumor suppressor pathways and in the apoptosis of cancer cells. In contrast antibodies D5 and F4 did not promote 4ICD cleavage.

EXAMPLE:

Example 1: HER4-specific human monoclonal antibody selection by phage display

Phage display selection

The HUSCI library uses a single framework optimized for high level expression. The diversity was restricted to five amino acids (Y,N,D,G,S) and introduced in the six CDRs at the positions corresponding to the most contributing residues of the paratope. The antigen used was commercial human HER4-Fc (ref.1131-ER-50; RD Systems) or NRG1 β 1-stimulated EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected NIH3T3 cells. The negative antigen was BSA or EGFR-transfected NIH3T3 cells. Two strategies of scFv selection from the HUSCL library were performed.

In the first strategy, HER4-Fc or BSA was coated at 100 ng/well in PBS (pH 7.4) on 96-well plates (Nunc Maxisorp, Paisley, UK) overnight at 4°C. After washing in PBS/ tween 0.1% (PBS-T), non-specific binding sites were blocked with 1% gelatin/PBS-T, and 10¹⁰ scFv phages/ml were applied to each well for 2h at room temperature as described previously. Revelation was done using anti-M13 antibody conjugated to peroxidase. To enrich the polyclonal scFv population in HER4-binders, this experiment

was repeated in four successive selection rounds. Polyclonal scFv enriched in HER4-binders were transformed into BL21 (DE3)/pLysS bacteria. BL21 (DE3)/pLysS colonies (total 400) were picked into the 96-well microtiter plates to produce scFv by auto-induction and lysed. Human HER4-Fc or BSA was coated at 100 ng/well on 96-well plate overnight at 4°C. After washing (PBS/ tween 0.1%), and blocking (1% gelatin/PBS-T), whole bacterial lysate containing monoclonal scFv was applied for 2h at 4°C. Revelation was done using anti-c-Myc antibody conjugated to peroxidase.

In the second strategy, 10^7 EGFR-transfected NIH3T3 cells were saturated in PBS-2%BSA for 2h at 4°C, and subsequently pre-incubated with 10^{10} scFv phages/ml for 2h at 4°C, to remove non-specific binders. The scFv phage supernatant was then applied for 2h with 50 ng/ml NRG1 β 1-pre-stimulated EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected NIH3T3 cells (10^7 cells) at 4°C. To enrich the population of HER4-binders, this experiment was repeated in three successive selection rounds, alternating with saturation in PBS-2%BSA or PBS-2%non-fat dry milk buffers. scFv populations enriched in HER4-binders were transformed in HB2151 bacteria, and picked colonies were further produced following 9mM IPTG induction step for 16-30h at 4°C. After centrifugation, scFv-containing supernatants were screened by flow cytometry towards wild-type or HER4 JMaCYT1-transfected NIH3T3 cells (see above) for 3h at 4°C. After washings in PBS-2%FCS, cell-bound scFv were incubated with FITC-conjugated anti-Myc antibody for 45min at 4°C.

From the 1st selection strategy, the 10 scFvs selected showed binding to EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected NIH3T3 cells by flow cytometry (Figure 1), but no binding was evidenced to EGFR-transfected NIH3T3 cells. In this experiment, scFvs C2, C6, D5, E1, F4 and G4 demonstrated the stronger binding. From the 2nd selection strategy, the 9 scFvs selected were profiled by flow cytometry towards wild-type NIH3T3 cells, EGFR- vs EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected NIH3T3 cells, and NRG1 β 1-stimulated EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected NIH3T3 cells. As shown in Figure 2, scFv H2 bound to EGFR/HER4-transfected cells stimulated or not with NRG1 β 1, whereas scFvs C11 and D5 only targeted NRG1 β 1-stimulated EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected cells. In contrast, scFvs G2 and G6 showed binding to EGFR-transfected cells, and unstimulated or NRG1 β 1-stimulated EGFR/HER4 JMaCYT1-transfected cells. F1 and H12 only bound to EGFR-transfected cells. scFv D12 targeted both wild-type and transfected cells, whereas scFv E7 showed no binding.

HER4-specific scFv selected from the 1st strategy (C6, D5 and F4) and the 2nd strategy (H2) were sub-cloned in human IgG1, κ format and were transiently expressed in HEK293T cells, and purified on HiTrap protein-A column (GE Healthcare).

ELISA binding onto HER4-Fc protein

Ninety six-well enzyme immunoassay plates (Nunc Maxisorp) were coated overnight at 4°C with HER4-Fc antigen at a concentration of 250ng/ml in PBS pH 7.4. After four washes in PBS, containing 0.1% Tween 20 (PBS-T), plates were saturated with a 2% solution of bovine serum albumin (BSA) in PBS-T buffer for 2h at 37°C. Two-fold or ten-fold serial dilutions of purified HER4-specific mAbs were added after four washes in PBS-T and plates were incubated at 37°C for 2h. Following four washes in PBS-T, 100 μ l of a peroxidase-conjugated goat anti-human F(ab')₂ antibody (Jackson Immunoresearch) were added to each well. The conjugate was used at a 1:5000 dilution in PBS-T-2%BSA. The plates were

incubated at 37°C for 1h and then washed three times in PBS-T and once in PBS. Finally a Tetramethylbenzidine solution (Sigma) was added for 30 min at ambient temperature in the dark. The reaction was stopped by adding 50µl/well 1M H₂SO₄ and the absorbance was measured at 450nm. We selected four anti-HER4 antibodies which bind in a dose-dependent manner to both human and mouse HER4-Fc by ELISA (Figure 3A), but did not bind to EGFR, HER2 and HER3 receptors (data not shown). HER4-specific antibodies D5 and C6, giving 50%-absorbance at concentration of 20ng/ml and 100ng/ml respectively, on human HER4-Fc, are more efficient for binding than F4 and H2, which gave a 50%-absorbance at concentration around 1-5µg/ml (figure 3B).

Flow cytometry binding onto HER4-positive cervix carcinoma cells C33A

To confirm HER4 specificity, 15µg/ml antibodies were each incubated with 3x10⁵ cervix carcinoma cells C-33A (ATCC HTB-31) for 2h at 4°C in PBS-1%FCS. After three washings in PBS-1%FCS, cells were probed with 1/100 dilution of FITC-conjugated goat anti-human Fc antibody (Sigma) for 1h at 4°C in the dark. After washings in PBS, HER4 binding onto C-33A cells was analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 4, all the anti-HER4 antibodies bind to HER3-negative HER4-positive C-33A cells with different intensities, with regard to HER4-specific commercial antibody H4.77.16 (Ab77; Thermo Fisher). In this case, F4 showed similar binding as H4.77.16 whereas the others antibodies C6, D5 and H2 demonstrated a lower positive binding.

Example 2: Competition with NRG1β1 of the anti-HER4 human antibodies of the invention

Cytometry competition experiments were performed in order to quantify the ability of NRG1β1 to inhibit antibody binding to HER4 in a C-33A cell-based assay. To this end, 3x10⁵ C-33A cervix carcinoma cells were co-incubated with a non-saturating dose of 15µg/ml antibody, and various concentrations of the competing NRG1β1 ligand (0.1nM to 500nM) for 1.5h on ice. Cells were then washed and further incubated with a 1:100 dilution of FITC-conjugated goat anti-human Fc antibody (Sigma) for 1h on ice, before cytometry analysis. Competition experiments by FACS demonstrated that C6 and H2 antibodies did not compete with 10nM NRG1β1 (Figure 5A) thus suggesting that these antibodies did not bind to the NRG1-binding site in physiological conditions. In contrast, antibodies D5 and F4 were partially inhibited by 10nM NRG1β1, demonstrating that epitopes recognized by these antibodies are closed to or located in the NRG1-binding site, or could be sterically-impaired for antibody binding when NRG1 induces transconformation of active HER4 receptor for dimerization. Lower concentrations of NRG1β1 (0.1-1nM) did not affect anti-HER4 binding (Figure 5B). Higher “non-physiological” concentrations of NRG1β1 (100-500nM) inhibited the binding of antibodies to HER4 (Figure 5B). In these cases, F4 and H2 antibodies still demonstrated around 30%-residual binding at 100nM NRG1β1.

Example 3: Inhibition of cell viability by the anti-HER4 human antibodies of the invention

1×10^4 C-33A cells were cultured in each well of 96-well plates for 24h in RPMI complete medium. Cells were either incubated with anti-HER4 antibodies at a final concentration of 100 μ g/ml, or 1% serum-starved for 18h at 37°C before co-incubation of 100 μ g/ml antibodies and 0.3nM (10ng/ml) NRG1 β 1. After 5 days of culture, proliferation was measured by adding 20 μ l/well of a solution containing the tetrazolium compound MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] and the electron coupling reagent PMS (phenazine methosulfate). MTS is reduced by cells into a formazan product that is soluble in tissue culture medium. The absorbance of the formazan at 490nm can be measured using a spectrophotometer. As shown in Figure 6, anti-HER4 antibody D5 inhibited 50% viability of the C-33A cell line, with or without co-stimulation with NRG1 β 1. No significant inhibition was observed with untreated cells or after treatment with irrelevant antibody. In contrast, anti-HER4 antibodies C6, F4 and H2, used alone, induced 15% to 25% inhibition of cell viability; this inhibition being increased to 50% when NRG1 β 1 was added. Finally, the anti-HER4 antibody Ab77, kindly donated by Pr. Y. Yarden (Weizmann Institute) increased the viability of C-33A cells, as previously proposed (Chen et al. 1996).

Example 4: Western blot analysis of HER4 phosphorylation in C33A cervix cancer cell line after stimulation with NRG1 β 1 and treatment with human antibodies of the invention

3×10^5 C-33A cells were seeded in 12-well plates for 24h in RPMI-10%FCS before 12h-starvation in RPMI-1%FCS. Cells were then co-incubated with 20 μ g/ml HER4-specific human antibodies and 1nM (30 ng/ml) NRG1 β 1 in RPMI-1%FCS 1% for various times at 37°C. After washing in cold PBS, cells were scraped from plastic dishes using a rubber policeman in 0.5 ml cold PBS. After centrifugation, cell pellets were lysed in 50 μ l of lysis buffer containing 50mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100 (v/v), 10% glycerol (v/v), 100mM sodium fluoride, 1mM sodium orthovanadate (Sigma), and one complete protease inhibitor mixture tablet (Roche Diagnostics, Meylan, France). After 45min-incubation, samples were cleared of insoluble fraction by centrifugation and protein concentrations in cell lysates were determined by Bradford colorimetric reaction.

After electrophoresis on 10% SDS-PAGE under reducing conditions, the cell lysates were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Molsheim, France) which were saturated in 25mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl buffer containing 0.1% Tween 20 (TNT) and 5% nonfat dry milk for 2h at ambient temperature. A 1 μ g/ml solution in TNT-2%BSA of antibodies directed to total HER4 (E200, Abcam), HER4 phosphorylated Y1056 (Ab92782, Abcam) or Y1284 (ref.4757S, CST) were incubated for 18h at 4°C. GAPDH, as loading control, was detected by a specific antibody (ref.5174S, CST). After three washes in TNT, blots were incubated with peroxidase-conjugated mouse-specific (1/2000) or rabbit-specific (1/10000) antibodies (Sigma) as appropriate, for 1h in TNT-2% nonfat dry milk at ambient temperature. After 3 washes in TNT, the blots were visualized using chemiluminescent substrate (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer; or SuperSignal West femto, ThermoFisher). As shown in Figure 7, anti-HER4 antibodies D5, F4, C6 and H2 did not affect HER4 expression until 24h-end of experiment, in contrast to strong HER4 downregulation induced by HER4-specific control antibody Ab77. F4 antibody, but not D5, C6 and H2, increased basal Y1056 phosphorylation on the HER4 receptor. On

the other hand, D5, C6 and H2 antibodies, but not F4, inhibited NRG1 β 1-induced Y1284 phosphorylation on the HER4 receptor after 1h-post treatment. HER4-specific control antibody Ab77, which has been shown to enhance cell viability of C33A cells, strongly increased NRG1 β 1-induced Y1284 phosphorylation (Figure 7).

Example 5: Biased routing/signaling of 4ICD induced by anti-HER4 human antibodies of the invention in JMaCYT1- vs JMaCYT2-transfected BT549 cells

HER3-negative HER4-negative BT549 cells were transiently-transfected with JMaCYT1 or JMaCYT2 HER4 isoforms. To this end, BT549 cells were grown in P150cm² Petri dishes at 37°C under 5% CO₂. When 80% confluency was reached, cell medium was removed and replaced by 15 ml of fresh cell culture medium (DMEM supplemented with penicillin-streptomycin, 2 mM Hepes and 1X MEM non-essential amino-acids solution). In parallel, a transfection mixture containing 20 μ l of JMaCYT1 or JMaCYT2 HER4 plasmid at 1 μ g/ml, 30 μ l of PEI (Polysciences) at 1mg/ml in 1ml 150mM NaCl was prepared and pre-incubated for 30min at room temperature before the addition to the cells. The Petri dishes were then incubated at 37°C under 5% CO₂ for 6h in DMEM-10%FCS followed by 12h-starvation in DMEM-1%FCS before treatment with anti-HER4 antibodies, or control antibody Rituximab (RTX) at 20 μ g/ml, with or without 1nM (30ng/ml) NRG1 β 1, for an additional 6h.

Transfected BT549 cells were scraped from plastic dishes using a rubber policeman as described above and washed twice in cold PBS. For subcellular fractionation, cells were resuspended in 1ml cold Mitochondrial Isolation Buffer pH7.4 (MIB) containing 200mM sucrose, 10mM TRIS/MOPS, 1mM TRIS/EGTA and proteases inhibitors (Roche). The cell suspension was transferred to a 30ml Nalgene tube (ref.3138-0030, ThermoFisher), and immediately homogenized using Ultraturrax T18 (IKA) for 10-15sec at 2.5 speed. Cell lysis was checked under microscope. If needed, cells were homogenized one more time to reach 90% cell lysis (similar time and speed as described above). 50 μ l cell lysates were saved as Whole Cell Lysates (WCL). Remaining lysates were then centrifuged at 600g at 4°C for 10min.

From the centrifuged lysates, the supernatant containing cytoplasm and mitochondria was saved and further centrifuged at 600g for 10min to remove nuclei contamination, before a second centrifugation at 7500g for 10min at 4°C to pellet mitochondria. Mitochondria pellet was resuspended in 50 μ l lysis buffer (Mitochondrial Fraction) and supernatant-containing cytoplasm was precipitated for 1h with 4V cold acetone, centrifuged and dissolved in 50 μ l lysis buffer (Cytosolic Fraction). From the centrifuged lysates, the pellet containing nuclei was washed, and centrifuged twice again at 600g at 4°C for 10min (1ml MIB per wash) to remove all cytoplasm and mitochondria soluble contaminants. The 3-times washed nuclei pellets were pooled in 50 μ l lysis buffer as described above.

All collected fractions were dosed using Nanodrop 2000 (ThermoFisher), diluted with 2X Laemmli Buffer and boiled for 10min at 95°C. 50 μ g proteins of each fraction were loaded on SDS-PAGE. After electrophoresis on 10% SDS-PAGE under reducing conditions, the whole cell lysates (WCL), as well as nuclear, mitochondrial and cytosolic subcellular fractions were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were further probed with anti-HER4 antibody E200 (Abcam), which identifies the whole HER4 receptor and its IntraCellular Domain 4ICD, and with anti- α Tubulin (ref.3873S,

CST), anti-VDCA1 (Voltage-Dependent Anion-selective Channel 1; ref.4661S, CST) or –TIM23 (Mitochondrial Import Inner Membrane translocase subunit; Becton Dickinson, ref.611223), and anti-Histone H3 (ref.9715S, CST) antibodies which identify the cytosolic, mitochondrial and nuclear fractions respectively. After three washes in TNT, blots were incubated with peroxidase-conjugated mouse-specific (1/10000) or rabbit-specific (1/10000) antibodies (Sigma) as appropriate, for 1h in TNT-2% nonfat dry milk at ambient temperature. After 3 washes in TNT, the blots were visualized using chemiluminescent substrate (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer). As shown in Figures 8, anti-HER4 antibody C6 biased 4ICD routing towards the mitochondria in JMaCYT1-transfected BT549 cells; this effect being observed either with or without co-stimulation with NRG1 β 1. H2 antibody induced similar biased 4ICD cell fate towards mitochondria, but only when NRG1 β 1 was added (Figure 8). This antibody-induced biased signaling of 4ICD was not observed for C6 and H2 antibodies in JMaCYT2-transfected BT549 cells (Figure 9), thus suggesting 4ICD-biased routing is specific to cells expressing the JMaCYT1 HER4 isoform. In contrast, antibodies D5 and F4 did not induce biased 4ICD routing towards mitochondria, but maintained 4ICD into the nucleus, either in JMaCYT1 or JMaCYT2-transfected BT549 cells.

Example 6: Mitochondria depolarization induced by human anti-HER4 antibody C6, but not by antibody D5, in JMaCYT1-transfected BT549 cells

The antibodies C6, which biased 4ICD cell fate towards mitochondria, and D5, which did not induced 4ICD bias, were produced and purified in CHO cells (outsourcing from Evitria AG, Zurich, Switzerland). BT549 cells were transiently transfected with Mock, JMaCYT1 or JMaCYT2 isoforms in P150 Petri dishes as described above. After 24h transfection, 2x10⁵ cells originating from the same pool of transfection (to ensure similar transfection conditions) were seeded in 12-well plates for 10h in DMEM-10%FCS, before starvation in DMEM-1%FCS 1% for additional 12h. After one PBS wash, cells were treated with 20 μ g/ml of anti-HER4 antibodies C6 and D5, or anti-HER4 antibody Ab77 (Chen et al. 1996) in DMEM-1%FCS for 24h at 37°C, before DioC6 staining for analysis of mitochondria depolarization. To this end, transfected-BT549 cells treated with antibodies were washed in PBS, trypsinized and further incubated with 20nM of the mitochondria fluorescent dye 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DioC6) in PBS, for 20 min at 37°C in the dark. As positive control of depolarization, untreated transfected-BT549 cells were incubated with 20nM DioC6 and 100 μ M of the protonophore carboxyl cyanide m-cholophenylhydrazine (CCCP). After centrifugation, cells were resuspended in PBS and analyzed by FL1 flow cytometry. As shown in Figure 10, anti-HER4 antibody C6 induced mitochondria depolarization in JMaCYT1-transfected BT549 cells, but not in Mock- or JMaCYT2-transfected cells. In contrast, antibodies D5 or Ab77 did not induce mitochondria depolarization. As positive control, the protonophore CCCP strongly depolarized mitochondria in Mock-, JMaCYT1- or JMaCYT2- transfected cells. Altogether, results from figures 8, 9 and 10 demonstrated that the human anti-HER4 antibody C6 induced biased 4ICD routing to mitochondria in JMaCYT1 tumor cells, but not in JMaCYT2, leading to membrane mitochondria depolarization. In contrast, D5 antibody triggered neither 4ICD cell fate towards mitochondria nor mitochondria depolarization, but maintained 4ICD into the nucleus.

Example 7: Western blot analysis of HER4 phosphorylation on JMaCYT1- vs JMaCYT2-transfected BT549 cells treated with C6 and D5 antibodies

BT549 cells were transiently transfected with Mock, JMaCYT1 or JMaCYT2 isoforms in P150 Petri dishes as described above. After 24h transfection, 2x10⁵ cells originating from the same pool of transfection were seeded in 12-well plates for 10h in DMEM-10%FCS, before starvation in DMEM-1%FCS for additional 12h. After one PBS wash, cells were treated with 20 µg/ml human anti-HER4 antibodies C6 and D5, or irrelevant antibodies Rituximab (Rtx) or Ipilimumab (Ipi), in DMEM-1%FCS for 30min, 60min or 90min at 37°C. After washing twice in cold PBS, cells were scraped from Petri dishes using a rubber policeman in 50 µl of boiled Laemmli extraction buffer containing 60mM Tris pH6.8, 10% glycérol (v/v), 1% SDS (v/v). Samples were dosed with Nanodrop 2000 (ThermoFisher) and 20 µg of protein were submitted to 10% SDS-PAGE under reducing conditions. The cell lysates were then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Molsheim, France) which were saturated in 25mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl buffer containing 0.1% Tween 20 (TNT) and 5% nonfat dry milk for 2h at ambient temperature. A 1 µg/ml solution in TNT-2%BSA of antibodies directed to total HER4 (E200, Abcam), HER4 phosphorylated Y1056 (bs-13094R, Bioss Antibodies), Y1284 (ref.4757S, CST) or Y984 (ref.3790S, CST) were incubated for 18h at 4°C. Beta-actin, as loading control, was detected by a specific antibody (ref.3700, CST). After three washes in TNT, blots were incubated with peroxidase-conjugated mouse-specific (1/2000) or rabbit-specific (1/10000) antibodies (Sigma) as appropriate, for 1h in TNT-2% nonfat dry milk at ambient temperature. After 3 washes in TNT, the blots were visualized using chemiluminescent substrate (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer; or SuperSignal West femto, ThermoFisher). As shown in Figure 11A, 60min-treatment of C6 antibody induced phosphorylation of Y1056 and Y984 on HER4, but not Y1284, in JMaCYT1 BT549 cells; such effects being also observed with D5 antibody, but at lower intensity. In contrast, no effect on HER4 phosphorylation was observed in D5- or C6-treated JMaCYT2 cells. Ab77 abrogated all the HER4 phosphorylation profile both in JMaCYT1- and JMaCYT2-transfected BT549. Concomitantly, D5 antibody inhibited pAKT S473 and pp38 T180/Y182 in JMaCYT1 BT549 cells; such effects being also observed at lower intensity with C6 antibody (Figure 11A). As confirmed in a time-dependent manner (Figure 11B), D5 and C6 induced Y984 and Y1056 phosphorylation from 30min to 60min post-treatment, but unexpectedly C6 abolished HER4 phosphorylation at 90min post-treatment. All these effects translated to an increased expression of 4ICD in D5- and C6-treated JMaCYT1 BT549 cells at 90min (Figure 11).

Example 8: Effect of human anti-HER4 antibodies C6 and D5 on poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and γH2AX-mediated double-strand breaks in C-33A cervix cancer cell line

2x10⁵ C-33A cells were seeded in 12-well plates for 24h in RPMI-10%FCS. After one PBS wash, cells were treated with 20 µg/ml of anti-HER4 antibodies D5 and C6, or irrelevant antibody Rituximab (Rtx), in RPMI-10%FCS from 24h to 72h at 37°C. After washing twice in cold PBS, cells were lysed, submitted to PAGE-SDS and western blot as described above. Detection was performed with appropriate primary antibodies directed to cleaved PARP (E51, Abcam) and γH2AX (ref.05-636, Millipore). As shown in Figure 12, antibodies D5 and C6 increased PARP cleavage at 72h post-treatment, with regard to lower PARP activation induced by irrelevant antibody rituximab; this mechanism initiating

HER4 antibody-induced apoptosis of C-33A cervix cancer cells. Concomitantly, increased γ H2AX activation, which signed DNA double-strand breaks, was observed in D5- and C6-treated C-33A cells from 48h to 72h post-treatment, compared to control. Unexpectedly, C6 increased HER4 expression at 72h post-treatment. These effects were also observed, but at different intensities and time-frame, in ovarian COV318 and Kuramochi, triple-negative breast MDA-MB-453 and HCC1187 cancer cell lines (data not shown).

Example 9: HER4 epitope mapping of human anti-HER4 antibodies D5 and C6

The HER4 epitope mapping of antibodies D5 and C6 was predicted using the MAbTope technology (Bourquard et al. 2015) developed by the MAbSilico company (Nouzilly, France). This technology, based on mathematical formalization of 3D antibody structures of both antibody and target, combined to machine-learning, allows identifying residues involved in the target epitope. To this end, homology models of the 3D structures of the variable domains of C6 and D5 were made using Modeller program (Webb et al. 2017; <https://salilab.org/modeller/>). Given the high similarities between the sequences of the two antibodies D5 and C6, the same templates were used for modelling C6 and D5 variable domains were PDB:4ZS6 (Yu et al. 2015) for VH and PDB:4NIK (Robin et al. 2014) for VL. The relative orientation of VH and VL domains was taken from PDB:4ZS6. The 3D structure chosen for the target HER4 receptor was PDB:2AHX (Bouyain et al. 2005). The top30 ranked conformations of the antibody/HER4 complex are well gathered (Figure 13), confirming that the docking procedure is correct. From the top30 ranking structures, the amino-acid residues from the sequence of the HER4 extracellular domain were scored for their probability to belong to the epitope of antibodies D5 and C6. Predicted residues were divided in four categories as a function of their raw probability to belong to the epitope (Figure 14A and 15A). For epitope mapping of C6 antibody, residues T242 and F244 from domain II of HER4, and residue E583 from domain IV were identified as very highly probable, whereas P241, P557 and P586 as highly probable, and D555, N558, H585 and P598 as probable (Figure 14). For epitope mapping of D5 antibody, only domain II-F244 and domain IV-E583 were very highly probable residues, and P241, G557, D581, C584 and H585 belonged to highly probable residues whereas P557, P598 and T599 were probable (Figure 15). Altogether, these predictions indicated that human anti-HER4 antibodies D5 and C6 bind to conformational epitopes both located in domain II and domain IV of the HER4 extracellular region.

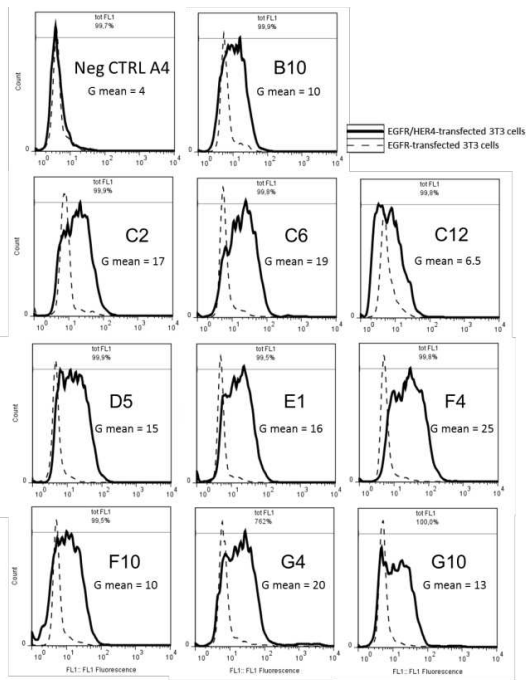


Figure 1

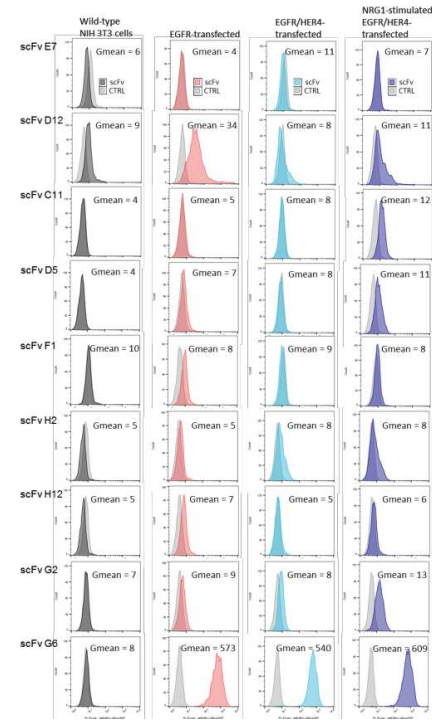


Figure 2

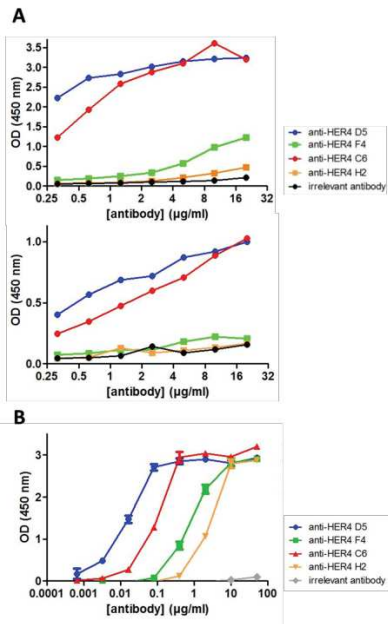


Figure 3

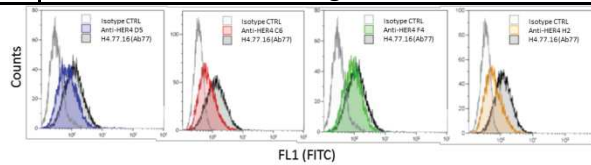


Figure 4

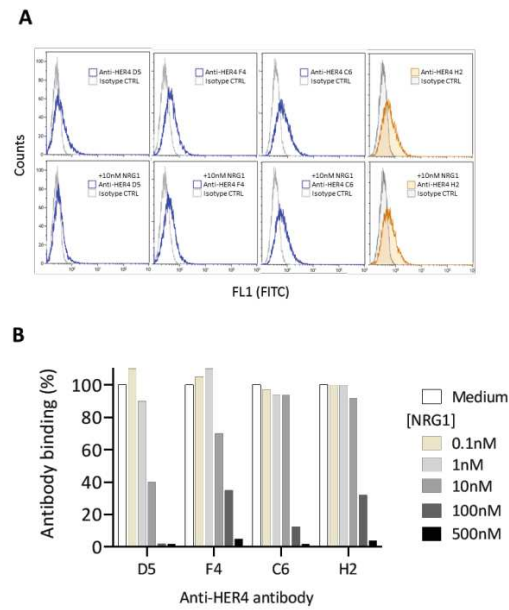
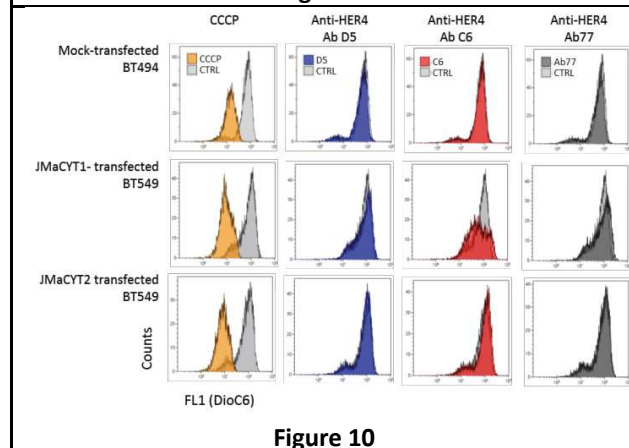
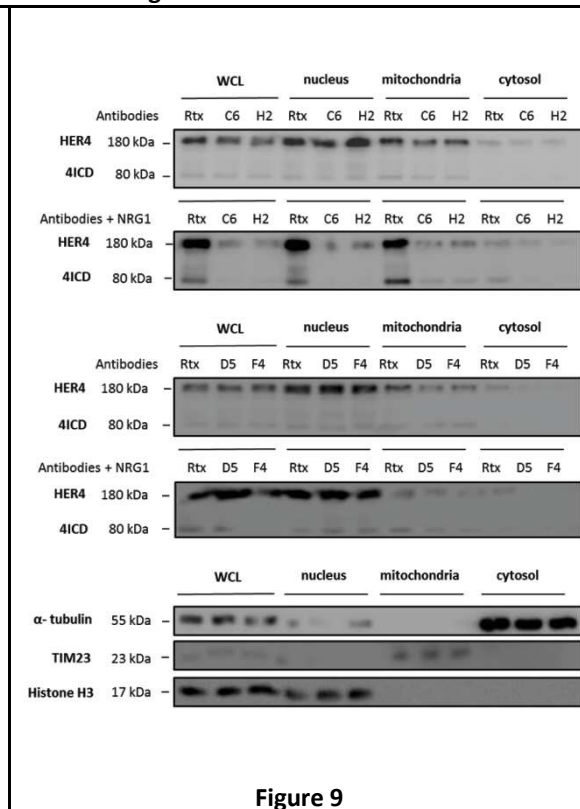
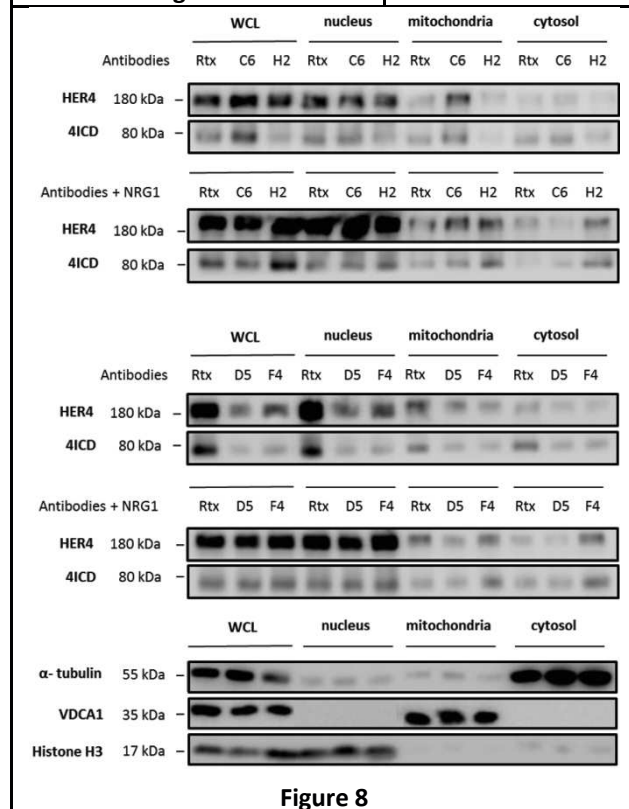
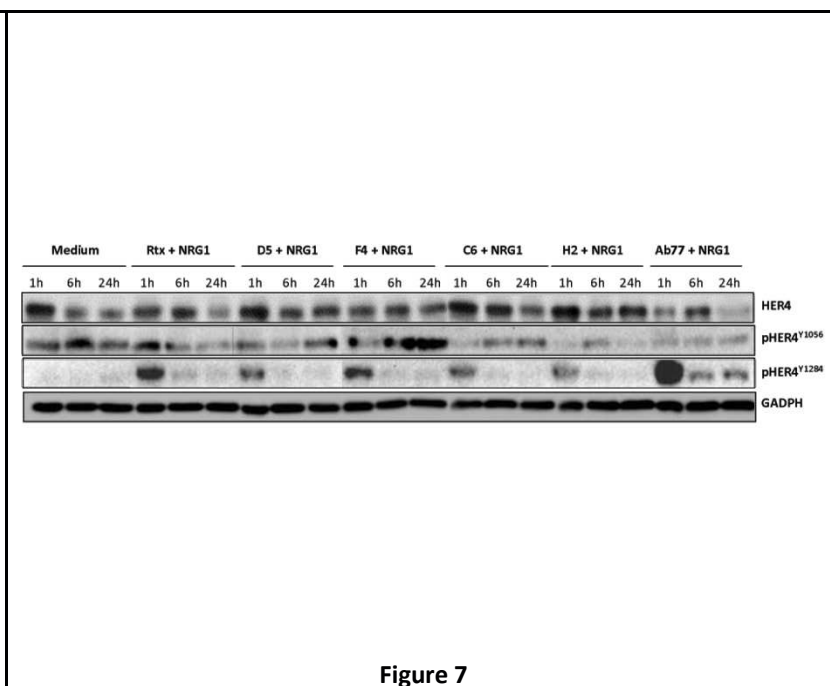
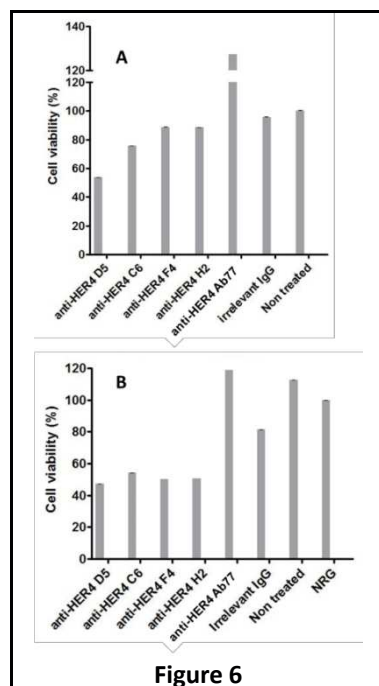


Figure 5



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Les récepteurs de la famille HER jouent un rôle majeur dans le développement, la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. L'implication des récepteurs EGFR, HER2 et HER3 dans ces mécanismes n'est plus à démontrer, et la bonne connaissance de ces récepteurs a conduit au développement et au succès d'anticorps thérapeutiques tels que le cetuximab ciblant EGFR ou le trastuzumab ciblant HER2. Après avoir été longtemps peu considéré, le récepteur HER3 a été à son tour décrit comme un acteur majeur de l'oncogenèse et de la résistance aux traitements, par sa dimérisation préférentielle avec HER2.

Le cas du récepteur HER4 est complexe. Bien que ce récepteur soit présent au niveau tumoral, aucun anticorps anti-HER4 n'est entré en phase clinique à l'heure actuelle. Très peu d'équipes s'intéressent à son rôle dans le développement tumoral. Cela est dû en partie à sa biologie particulière, permettant à ce récepteur d'être exprimé à la membrane sous quatre isoformes, dont certaines sont clivables et rendent les signalisations et le rôle du récepteur HER4 encore plus difficile à appréhender. C'est pourquoi ce récepteur est décrit alternativement comme un oncogène et un suppresseur de tumeur.

Si l'on décrit le récepteur HER4 selon sa puissance à induire des signalisations par l'intermédiaire de ses sites de phosphorylations, alors le récepteur HER4 n'est pas un puissant oncogène (Takahashi and Li, 2008). Comme tout système biologique a besoin de mécanismes régulateurs pour son bon fonctionnement, il est possible que le récepteur HER4 soit le régulateur de la famille HER.

Plus particulièrement, nous pensons que ce rôle est assuré par l'isoforme JMa/CYT1 du récepteur HER4, alors que son isoforme JMa/CYT2 serait plutôt impliquée dans la survie cellulaire. Les isoformes JMb non clivables se comportent comme des RTK « classiques ». Puisque leurs rôles semblent restreints à certains organes, nous pensons que ces isoformes ne peuvent induire que des signaux de survie et prolifération. Une étude détaillée de la littérature nous a permis d'émettre l'hypothèse que l'isoforme JMa/CYT1 jouait un rôle principalement suppresseur de tumeur en induisant des signalisations de mort cellulaire par l'intermédiaire des ligands de la famille des NRG (Naresh et al., 2006) (Schumacher et al., 2017).

Les résultats présentés en partie IV confirment cette hypothèse. Nous avons démontré sur des cellules transfectées que la mort cellulaire induite par la NRG1 était due à l'isoforme JMa/CYT1. Sur des cellules tumorales exprimant le récepteur HER4, la NRG1 induit des phénotypes de morts nécrotiques ou apoptotiques. Ces phénotypes induits semblent être en partie dépendants du type cellulaire. En agissant directement sur l'intégrité de la mitochondrie, la NRG1 peut induire un phénotype de mort nécrotique. Mais les mécanismes précis d'induction de cette mort restent à définir, puisque la NRG1 peut activer de multiples signalisations. Les voies de stress oxydatifs sont à privilégier avec l'augmentation des ROS, de la voie JNK et des dommages à l'ADN. Mais d'autres mécanismes d'action peuvent entrer

en jeu, impliquant d'autres types de stress comme un stress du réticulum endoplasmique ou d'autres voies impliquant le cycle cellulaire. L'investigation de ces voies est nécessaire, comme l'étude de l'effet des autres ligands du récepteur, afin de comprendre le rôle de HER4 dans la tumorigenèse.

Ces résultats nous ont confortés dans l'idée que le récepteur HER4 pouvait être un puissant inducteur de mort cellulaire. Nous l'avons démontré sur des cellules HCC1187, qui subissent une mort cellulaire massive après stimulation par la NRG1 alors que le récepteur HER4 y est faiblement exprimé. Ces résultats pourraient expliquer la raison pour laquelle l'expression du récepteur HER4 est bénéfique pour la survie des patients atteints de cancer. Ces résultats appuient aussi l'hypothèse qu'un ciblage thérapeutique du récepteur HER4 à l'aide d'anticorps ne serait pertinent que s'il ne bloquait pas l'activité de ce dernier. C'est dans ce but que nous avons développé des anticorps modulateurs de l'activité du récepteur HER4, par *phage display* sur protéine recombinante et sur cellules.

Les résultats détaillés en partie V présentent le développement et la caractérisation de ces anticorps et confirment que des anticorps modulateurs positifs de l'activité du récepteur HER4, tels que les anticorps C6 et H2, sont de très puissants inducteurs de mort sur les cellules tumorales. Nos anticorps ne semblent pas entrer en compétition avec la NRG1 et certains semblent être des modulateurs allostériques du récepteur HER4. En effet, certains anticorps peuvent induire la relocalisation de 4ICD à la mitochondrie et la production de ROS selon le même mécanisme que la NRG1 (anticorps C6) alors que d'autres n'induisent cette relocalisation qu'en présence de NRG1 (anticorps H2). De nombreuses études complémentaires sont nécessaires pour décrire en détail les mécanismes d'action de nos anticorps, notamment leurs effets sur l'isoforme JMa/CYT2. Cependant, l'ensemble de ces résultats démontre que ces anticorps anti-HER4 agonistes ou modulateurs allostériques « *first-in-class* » pourraient représenter une nouvelle solution thérapeutique pour les patients atteints de cancer.

Ces anticorps pourraient notamment bénéficier aux patientes atteintes de cancer du sein triple-négatif, un sous-type de cancer du sein de très mauvais pronostic et pour lequel peu de traitements existent. Le récepteur HER4 a été décrit comme exprimé chez environ 20% des patientes TNBC (Kim et al., 2016). Des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec l'Unité de Recherche Translationnelle de l'ICM indiquent que l'ARNm du récepteur HER4 est détectable à différents niveaux sur une cohorte de 58 patientes. Il reste maintenant à étudier quelles sont les isoformes « *full-length* » exprimées chez ces patientes, ce que ne permet pas de renseigner ces expériences de RT-qPCR. La mise au point d'anticorps spécifiques des différentes isoformes pourrait nous permettre d'appréhender ces expressions, par exemple par IHC. L'étude de l'expression des isoformes de HER4 dans cette cohorte doit être approfondie mais ces premiers résultats indiquent que le récepteur HER4 est présent chez les patientes TNBC.

Nous avons démontré que le récepteur HER4 possédait une composante suppresseur de tumeur. Cette composante peut être activée par l'isoforme JMa/CYT1 sous certaines conditions de stimulation. Nous faisons l'hypothèse que c'est pour cette raison que l'expression du récepteur HER4 serait souvent perdue au cours du développement tumoral. Il nous reste néanmoins à comprendre pourquoi cette isoforme peut être exprimée par les cellules cancéreuses alors qu'elle peut aussi induire la suppression de tumeur. La signalisation oncogénique de JMa/CYT1 pourrait être due à sa capacité à activer la voie PI3K/AKT.

Lorsque le récepteur est exprimé, nous avons démontré que nos anticorps anti-HER4 modulateurs pouvaient rapidement induire la mort des cellules tumorales. Ces résultats restent à confirmer par des expériences *in vivo*. Ces expériences sont en cours avec les anticorps C6 et D5 et représentent la première perspective de ce travail. Puisque l'absence du récepteur HER4 au niveau tumoral est due à l'hyperméthylation de son promoteur, la seconde perspective de ce projet devrait être de tester l'effet de nos anticorps anti-HER4 après traitement des cellules tumorales par des agents déméthylants.

Enfin, nous avons pu démontrer qu'il était possible d'induire avec des anticorps une signalisation biaisée des RTK de la famille HER, ce qui n'avait jamais été démontré jusqu'à présent. Les mécanismes de ce biais sont à mettre en évidence mais ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes quant au développement d'anticorps thérapeutiques de nouvelle génération.

BIBLIOGRAPHIE

- Adilakshmi, T., Ness-Myers, J., Madrid-Aliste, C., Fiser, A., and Tapinos, N. (2011). A nuclear variant of ErbB3 receptor tyrosine kinase regulates ezrin distribution and Schwann cell myelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 5106–5119.
- Aigner, A., Juhl, H., Malerczyk, C., Tkybusch, A., Benz, C.C., and Czubayko, F. (2001). Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene* *20*, 2101–2111.
- Alimandi, M., Wang, L.M., Bottaro, D., Lee, C.C., Kuo, A., Frankel, M., Fedi, P., Tang, C., Lippman, M., and Pierce, J.H. (1997). Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. *EMBO J.* *16*, 5608–5617.
- Alvarado, D., Klein, D.E., and Lemmon, M.A. (2010). Structural basis for negative cooperativity in growth factor binding to an EGF receptor. *Cell* *142*, 568–579.
- Andrabi, S.A., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2008). Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1147*, 233–241.
- Andrique, L., Fauvin, D., El Maassarani, M., Colasson, H., Vannier, B., and Séité, P. (2012). ErbB3(80 kDa), a nuclear variant of the ErbB3 receptor, binds to the Cyclin D1 promoter to activate cell proliferation but is negatively controlled by p14ARF. *Cell. Signal.* *24*, 1074–1085.
- Anton, E.S., Ghashghaei, H.T., Weber, J.L., McCann, C., Fischer, T.M., Cheung, I.D., Gassmann, M., Messing, A., Klein, R., Schwab, M.H., et al. (2004). Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* *7*, 1319–1328.
- Aqeilan, R.I., Donati, V., Palamarchuk, A., Trapasso, F., Kaou, M., Pekarsky, Y., Sudol, M., and Croce, C.M. (2005). WW domain-containing proteins, WWOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function. *Cancer Res.* *65*, 6764–6772.
- Arasada, R.R., and Carpenter, G. (2005). Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment. *J. Biol. Chem.* *280*, 30783–30787.
- Arencibia, J.M., Pastor-Flores, D., Bauer, A.F., Schulze, J.O., and Biondi, R.M. (2013). AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1834*, 1302–1321.
- Arienti, C., Zanoni, M., Pignatta, S., Del Rio, A., Carloni, S., Tebaldi, M., Tedaldi, G., and Tesei, A. (2016). Preclinical evidence of multiple mechanisms underlying trastuzumab resistance in gastric cancer. *Oncotarget* *7*, 18424–18439.
- Bae, J.A., Yoon, S., Park, S.-Y., Lee, J.H., Hwang, J.-E., Kim, H., Seo, Y.-W., Cha, Y.J., Hong, S.P., Kim, H., et al. (2014). An unconventional KITENIN/ErbB4-mediated downstream signal of EGF upregulates c-Jun and the invasiveness of colorectal cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 4115–4128.
- Bae, J.A., Kho, D.H., Sun, E.G., Ko, Y.-S., Yoon, S., Lee, K.H., Ahn, K.Y., Lee, J.H., Joo, Y.E., Chung, I.J., et al. (2016). Elevated Coexpression of KITENIN and the ErbB4 CYT-2 Isoform Promotes the Transition from Colon Adenoma to Carcinoma Following APC loss. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *22*, 1284–1294.
- Bakker, J., Spits, M., Neefjes, J., and Berlin, I. (2017). The EGFR odyssey - from activation to destruction in space and time. *J. Cell Sci.* *130*, 4087–4096.
- Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J. Clin. Invest.* *107*, 241–246.
- Barnes, N.L.P., Khavari, S., Boland, G.P., Cramer, A., Knox, W.F., and Bundred, N.J. (2005). Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 2163–2168.

- Bedinger, D.H., Goldfine, I.D., Corbin, J.A., Roell, M.K., and Adams, S.H. (2015). Differential pathway coupling of the activated insulin receptor drives signaling selectivity by XMetA, an allosteric partial agonist antibody. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 35–43.
- Béguelin, W., Díaz Flaqué, M.C., Proietti, C.J., Cayrol, F., Rivas, M.A., Tkach, M., Rosemblyt, C., Tocci, J.M., Charreau, E.H., Schillaci, R., et al. (2010). Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5456–5472.
- Ben-Yosef, R., Starr, A., Karaush, V., Loew, V., Lev-Ari, S., Barnea, I., Lidawi, G., Shtabsky, A., Greif, Y., Yarden, Y., et al. (2007). ErbB-4 may control behavior of prostate cancer cells and serve as a target for molecular therapy. *The Prostate* 67, 871–880.
- Berger, M.B., Mendrola, J.M., and Lemmon, M.A. (2004). ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett.* 569, 332–336.
- Bersell, K., Arab, S., Haring, B., and Kühn, B. (2009). Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 138, 257–270.
- Bhaskar, V., Goldfine, I.D., Bedinger, D.H., Lau, A., Kuan, H.F., Gross, L.M., Handa, M., Maddux, B.A., Watson, S.R., Zhu, S., et al. (2012). A fully human, allosteric monoclonal antibody that activates the insulin receptor and improves glycemic control. *Diabetes* 61, 1263–1271.
- Bièche, I., Onody, P., Tozlu, S., Driouch, K., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2003). Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 106, 758–765.
- Blobel, C.P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32–43.
- Bollu, L.R., Ren, J., Blessing, A.M., Katreddy, R.R., Gao, G., Xu, L., Wang, J., Su, F., and Weihua, Z. (2014). Involvement of de novo synthesized palmitate and mitochondrial EGFR in EGF induced mitochondrial fusion of cancer cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 2415–2430.
- Bouyain, S., Longo, P.A., Li, S., Ferguson, K.M., and Leahy, D.J. (2005). The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15024–15029.
- Bussu, F., Ranelletti, F.O., Gessi, M., Graziani, C., Lanza, P., Lauriola, L., Paludetti, G., and Almadori, G. (2012). Immunohistochemical expression patterns of the HER4 receptors in normal mucosa and in laryngeal squamous cell carcinomas: antioncogenic significance of the HER4 protein in laryngeal squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope* 122, 1724–1733.
- Canfield, K., Li, J., Wilkins, O.M., Morrison, M.M., Ung, M., Wells, W., Williams, C.R., Liby, K.T., Vullhorst, D., Buonanno, A., et al. (2015). Receptor tyrosine kinase ERBB4 mediates acquired resistance to ERBB2 inhibitors in breast cancer cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 14, 648–655.
- Cao, X., Zhu, H., Ali-Osman, F., and Lo, H.-W. (2011). EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocalization: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis. *Mol. Cancer* 10, 26.
- Capelan, M., Pugliano, L., De Azambuja, E., Bozovic, I., Saini, K.S., Sotiriou, C., Loi, S., and Piccart-Gebhart, M.J. (2013). Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 24, 273–282.
- Carpenter, G. (2003). ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp. Cell Res.* 284, 66–77.
- Carpenter, G., Lembach, K.J., Morrison, M.M., and Cohen, S. (1975). Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 250, 4297–4304.
- Carpenter, G., King, L., and Cohen, S. (1979). Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 cell membrane preparations by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 254, 4884–4891.

- Castiglioni, F., Tagliabue, E., Campiglio, M., Pupa, S.M., Balsari, A., and Ménard, S. (2006). Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 221–232.
- Chacko, A.-M., Nayak, M., Greineder, C.F., Delisser, H.M., and Muzykantov, V.R. (2012). Collaborative enhancement of antibody binding to distinct PECAM-1 epitopes modulates endothelial targeting. *PloS One* 7, e34958.
- Chaitanya, G.V., Steven, A.J., and Babu, P.P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal. CCS* 8, 31.
- Changeux, J.-P., and Christopoulos, A. (2016). Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell* 166, 1084–1102.
- Changeux, J.-P., and Christopoulos, A. (2017). Allosteric modulation as a unifying mechanism for receptor function and regulation. *Diabetes Obes. Metab.* 19 Suppl 1, 4–21.
- Che, T.-F., Lin, C.-W., Wu, Y.-Y., Chen, Y.-J., Han, C.-L., Chang, Y., Wu, C.-T., Hsiao, T.-H., Hong, T.-M., and Yang, P.-C. (2015). Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC. *Oncotarget* 6, 37349–37366.
- Chen, X., Levkowitz, G., Tzahar, E., Karunagaran, D., Lavi, S., Ben-Baruch, N., Leitner, O., Ratzkin, B.J., Bacus, S.S., and Yarden, Y. (1996). An immunological approach reveals biological differences between the two NDF/heregulin receptors, ErbB-3 and ErbB-4. *J. Biol. Chem.* 271, 7620–7629.
- Cheng, Q.-C., Tikhomirov, O., Zhou, W., and Carpenter, G. (2003). Ectodomain cleavage of ErbB-4: characterization of the cleavage site and m80 fragment. *J. Biol. Chem.* 278, 38421–38427.
- Chinkers, M., and Cohen, S. (1981). Purified EGF receptor-kinase interacts specifically with antibodies to Rous sarcoma virus transforming protein. *Nature* 290, 516–519.
- Chinnadurai, G., Vijayalingam, S., and Rashmi, R. (2008). BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene* 27 Suppl 1, S20-29.
- Chio, I.I.C., and Tuveson, D.A. (2017). ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol. Med.* 23, 411–429.
- Chiu, M.L., and Gilliland, G.L. (2016). Engineering antibody therapeutics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 38, 163–173.
- Cho, H.-S., and Leahy, D.J. (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 297, 1330–1333.
- Cho, H.-S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756–760.
- Chobotova, K., Spyropoulou, I., Carver, J., Manek, S., Heath, J.K., Gullick, W.J., Barlow, D.H., Sargent, I.L., and Mardon, H.J. (2002). Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech. Dev.* 119, 137–144.
- Chua, Y.L., Ito, Y., Pole, J.C.M., Newman, S., Chin, S.-F., Stein, R.C., Ellis, I.O., Caldas, C., O'Hare, M.J., Murrell, A., et al. (2009). The NRG1 gene is frequently silenced by methylation in breast cancers and is a strong candidate for the 8p tumour suppressor gene. *Oncogene* 28, 4041–4052.
- Chung, I., Akita, R., Vandlen, R., Toomre, D., Schlessinger, J., and Mellman, I. (2010). Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature* 464, 783–787.
- Cohen, S. (2008). Origins of growth factors: NGF and EGF. *J. Biol. Chem.* 283, 33793–33797.
- Coumailleau, F., Fürthauer, M., Knoblich, J.A., and González-Gaitán, M. (2009). Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature* 458, 1051–1055.

- Das, P.M., Thor, A.D., Edgerton, S.M., Barry, S.K., Chen, D.F., and Jones, F.E. (2010). Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene* 29, 5214–5219.
- Davies, A.M., Allan, E.G., Keeble, A.H., Delgado, J., Cossins, B.P., Mitropoulou, A.N., Pang, M.O.Y., Ceska, T., Beavil, A.J., Craggs, G., et al. (2017). Allosteric mechanism of action of the therapeutic anti-IgE antibody omalizumab. *J. Biol. Chem.* 292, 9975–9987.
- Davies, S., Holmes, A., Lomo, L., Steinkamp, M.P., Kang, H., Muller, C.Y., and Wilson, B.S. (2014). High incidence of ErbB3, ErbB4, and MET expression in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol.* 33, 402–410.
- De Smet, F., Christopoulos, A., and Carmeliet, P. (2014). Allosteric targeting of receptor tyrosine kinases. *Nat. Biotechnol.* 32, 1113–1120.
- Demory, M.L., Boerner, J.L., Davidson, R., Faust, W., Miyake, T., Lee, I., Hüttemann, M., Douglas, R., Haddad, G., and Parsons, S.J. (2009). Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J. Biol. Chem.* 284, 36592–36604.
- Depboylu, C., Höllerhage, M., Schnurbusch, S., Brundin, P., Oertel, W.H., Schrattenholz, A., and Höglinger, G.U. (2012). Neuregulin-1 receptor tyrosine kinase ErbB4 is upregulated in midbrain dopaminergic neurons in Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 531, 209–214.
- Deribe, Y.L., Wild, P., Chandrashaker, A., Curak, J., Schmidt, M.H.H., Kalaidzidis, Y., Milutinovic, N., Kratchmarova, I., Buerkle, L., Fetchko, M.J., et al. (2009). Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. *Sci. Signal.* 2, ra84.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290.
- Ding, Y., Liu, Z., Desai, S., Zhao, Y., Liu, H., Pannell, L.K., Yi, H., Wright, E.R., Owen, L.B., Dean-Colomb, W., et al. (2012). Receptor tyrosine kinase ErbB2 translocates into mitochondria and regulates cellular metabolism. *Nat. Commun.* 3, 1271.
- Doherty, J.K., Bond, C., Jardim, A., Adelman, J.P., and Clinton, G.M. (1999). The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10869–10874.
- Dominguez, S.L., Hegde, G.V., Hanson, J.E., Xiang, H., Mandikian, D., Boswell, C.A., Chiu, C., Wu, Y., Tsai, S.P., Fleck, D., et al. (2018). Antibody-mediated stabilization of NRG1 induces behavioral and electrophysiological alterations in adult mice. *Sci. Rep.* 8, 8239.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M.D. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521–527.
- Dubé, P.E., Yan, F., Punit, S., Girish, N., McElroy, S.J., Washington, M.K., and Polk, D.B. (2012). Epidermal growth factor receptor inhibits colitis-associated cancer in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 2780–2792.
- Elenius, K., Corfas, G., Paul, S., Choi, C.J., Rio, C., Plowman, G.D., and Klagsbrun, M. (1997). A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 272, 26761–26768.
- Elenius, K., Choi, C.J., Paul, S., Santiestevan, E., Nishi, E., and Klagsbrun, M. (1999). Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 18, 2607–2615.
- Elizalde, P.V., Cordo Russo, R.I., Chervo, M.F., and Schillaci, R. (2016). ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy. *Endocr. Relat. Cancer* 23, T243–T257.

- Erben, L., He, M.-X., Laeremans, A., Park, E., and Buonanno, A. (2018). A Novel Ultrasensitive In Situ Hybridization Approach to Detect Short Sequences and Splice Variants with Cellular Resolution. *Mol. Neurobiol.* 55, 6169–6181.
- Espejo, A.B., Gao, G., Black, K., Gayatri, S., Veland, N., Kim, J., Chen, T., Sudol, M., Walker, C., and Bedford, M.T. (2017). PRMT5 C-terminal Phosphorylation Modulates a 14-3-3/PDZ Interaction Switch. *J. Biol. Chem.* 292, 2255–2265.
- Esper, R.M., Pankonin, M.S., and Loeb, J.A. (2006). Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res. Rev.* 51, 161–175.
- Eto, K., Hommyo, A., Yonemitsu, R., and Abe, S.-I. (2010). ErbB4 signals Neuregulin1-stimulated cell proliferation and c-fos gene expression through phosphorylation of serum response factor by mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol. Cell. Biochem.* 339, 119–125.
- Falls, D.L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell Res.* 284, 14–30.
- Fatokun, A.A., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2000–2016.
- Feng, S.-M., Sartor, C.I., Hunter, D., Zhou, H., Yang, X., Caskey, L.S., Dy, R., Muraoka-Cook, R.S., and Earp, H.S. (2007). The HER4 cytoplasmic domain, but not its C terminus, inhibits mammary cell proliferation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 1861–1876.
- Feng, S.-M., Muraoka-Cook, R.S., Hunter, D., Sandahl, M.A., Caskey, L.S., Miyazawa, K., Atfi, A., and Earp, H.S. (2009). The E3 ubiquitin ligase WWP1 selectively targets HER4 and its proteolytically derived signaling isoforms for degradation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 892–906.
- Ferguson, K.M., Darling, P.J., Mohan, M.J., Macatee, T.L., and Lemmon, M.A. (2000). Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors. *EMBO J.* 19, 4632–4643.
- Feroz, K., Williams, E., and Riese, D.J. (2002). ErbB2 and ErbB3 do not quantitatively modulate ligand-induced ErbB4 tyrosine phosphorylation. *Cell. Signal.* 14, 793–798.
- Ferretti, E., Di Marcotullio, L., Gessi, M., Mattei, T., Greco, A., Po, A., De Smaele, E., Giangaspero, F., Riccardi, R., Di Rocco, C., et al. (2006). Alternative splicing of the ErbB-4 cytoplasmic domain and its regulation by hedgehog signaling identify distinct medulloblastoma subsets. *Oncogene* 25, 7267–7273.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1371–1387.
- Fiddes, R.J., Janes, P.W., Sivertsen, S.P., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A., and Daly, R.J. (1998). Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer cells. *Oncogene* 16, 2803–2813.
- Fleishman, S.J., Schlessinger, J., and Ben-Tal, N. (2002). A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15937–15940.
- Folch, J., Junyent, F., Verdager, E., Auladell, C., Pizarro, J.G., Beas-Zarate, C., Pallàs, M., and Camins, A. (2012). Role of cell cycle re-entry in neurons: a common apoptotic mechanism of neuronal cell death. *Neurotox. Res.* 22, 195–207.
- Foltz, I.N., Karow, M., and Wasserman, S.M. (2013). Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know. *Circulation* 127, 2222–2230.
- Forget, A., Martignetti, L., Puget, S., Calzone, L., Brabetz, S., Picard, D., Montagud, A., Liva, S., Sta, A., Dingli, F., et al. (2018). Aberrant ERBB4-SRC Signaling as a Hallmark of Group 4 Medulloblastoma Revealed by Integrative Phosphoproteomic Profiling. *Cancer Cell* 34, 379–395.e7.

- Foveau, B., Ancot, F., Leroy, C., Petrelli, A., Reiss, K., Vingtdoux, V., Giordano, S., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2009). Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol. Biol. Cell* 20, 2495–2507.
- Foyil, K.V., and Bartlett, N.L. (2010). Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 5, 140–147.
- Freed, D.M., Bessman, N.J., Kiyatkin, A., Salazar-Cavazos, E., Byrne, P.O., Moore, J.O., Valley, C.C., Ferguson, K.M., Leahy, D.J., Lidke, D.S., et al. (2017). EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics. *Cell* 171, 683-695.e18.
- Fregnan, F., Gnani, S., Macrì, L., Perroteau, I., and Gambarotta, G. (2014). The four isoforms of the tyrosine kinase receptor ErbB4 provide neural progenitor cells with an adhesion preference for the transmembrane type III isoform of the ligand neuregulin 1. *Neuroreport* 25, 233–241.
- Frey, M.R., Hilliard, V.C., Mullane, M.T., and Polk, D.B. (2010). ErbB4 promotes cyclooxygenase-2 expression and cell survival in colon epithelial cells. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 90, 1415–1424.
- Fricker, M., Tolkovsky, A.M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G.C. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiol. Rev.* 98, 813–880.
- Fujiwara, S., Hung, M., Yamamoto-Ibusuk, C.-M., Yamamoto, Y., Yamamoto, S., Tomiguchi, M., Takeshita, T., Hayashi, M., Sueta, A., and Iwase, H. (2014). The localization of HER4 intracellular domain and expression of its alternately-spliced isoforms have prognostic significance in ER+ HER2- breast cancer. *Oncotarget* 5, 3919–3930.
- Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S.-C., Tomii, K., Horton, P., and Imai, K. (2015). MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 14, 1113–1126.
- Furger, C., Fiddes, R.J., Quinn, D.I., Bova, R.J., Daly, R.J., and Sutherland, R.L. (1998). Granulosa cell tumors express erbB4 and are sensitive to the cytotoxic action of heregulin-beta2/PE40. *Cancer Res.* 58, 1773–1778.
- Gallo, R.M., Bryant, I., Fry, R., Williams, E.E., and Riese, D.J. (2006). Phosphorylation of ErbB4 on Tyr1056 is critical for inhibition of colony formation by prostate tumor cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 372–382.
- Gambarotta, G., Pascal, D., Ronchi, G., Morano, M., Jager, S.B., Moimas, S., Zentilin, L., Giacca, M., Perroteau, I., Tos, P., et al. (2015). Local delivery of the Neuregulin1 receptor ecto-domain (ecto-ErbB4) has a positive effect on regenerated nerve fiber maturation. *Gene Ther.* 22, 901–907.
- Garrett, J.T., Olivares, M.G., Rinehart, C., Granja-Ingram, N.D., Sánchez, V., Chakrabarty, A., Dave, B., Cook, R.S., Pao, W., McKinely, E., et al. (2011). Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5021–5026.
- Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., et al. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell* 11, 495–505.
- Gerarduzzi, C., de Polo, A., Liu, X.-S., El Kharbili, M., Little, J.B., and Yuan, Z.-M. (2016). Human epidermal growth factor receptor 4 (Her4) Suppresses p53 Protein via Targeting the MDMX-MDM2 Protein Complex: IMPLICATION OF A NOVEL MDMX SER-314 PHOSPHOSITE. *J. Biol. Chem.* 291, 25937–25949.
- Gergely, P., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P.E., and Perl, A. (2002). Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46, 175–190.
- Geuijen, C.A.W., De Nardis, C., Maussang, D., Rovers, E., Gallenne, T., Hendriks, L.J.A., Visser, T., Nijhuis, R., Logtenberg, T., de Kruif, J., et al. (2018). Unbiased Combinatorial Screening Identifies a Bispecific IgG1 that Potently Inhibits HER3 Signaling via HER2-Guided Ligand Blockade. *Cancer Cell* 33, 922-936.e10.

- Gilbertson, R., Hernan, R., Pietsch, T., Pinto, L., Scotting, P., Allibone, R., Ellison, D., Perry, R., Pearson, A., and Lunec, J. (2001). Novel ERBB4 juxtamembrane splice variants are frequently expressed in childhood medulloblastoma. *Genes. Chromosomes Cancer* 31, 288–294.
- Gilmore-Hebert, M., Ramabhadran, R., and Stern, D.F. (2010). Interactions of ErbB4 and Kap1 connect the growth factor and DNA damage response pathways. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 1388–1398.
- Gilmour, L.M., Macleod, K.G., McCaig, A., Gullick, W.J., Smyth, J.F., and Langdon, S.P. (2001). Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. *Cancer Res.* 61, 2169–2176.
- Gilmour, L.M.R., Macleod, K.G., McCaig, A., Sewell, J.M., Gullick, W.J., Smyth, J.F., and Langdon, S.P. (2002). Neuregulin expression, function, and signaling in human ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 3933–3942.
- Giri, D.K., Ali-Seyed, M., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Ling, P., Bartholomeusz, G., Wang, S.-C., and Hung, M.-C. (2005). Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol. Cell. Biol.* 25, 11005–11018.
- Goh, L.K., and Sorkin, A. (2013). Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a017459.
- Goh, L.K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S., and Sorkin, A. (2010). Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 189, 871–883.
- Goldshmit, Y., Erlich, S., and Pinkas-Kramarski, R. (2001). Neuregulin rescues PC12-ErbB4 cells from cell death induced by H₂O₂. Regulation of reactive oxygen species levels by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 46379–46385.
- Goldsmith, Y., Erlich, S., and Pinkas-Kramarski, R. (2001). Neuregulin induces sustained reactive oxygen species generation to mediate neuronal differentiation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 21, 753–769.
- Goth, C.K., Halim, A., Khetarpal, S.A., Rader, D.J., Clausen, H., and Schjoldager, K.T.-B.G. (2015). A systematic study of modulation of ADAM-mediated ectodomain shedding by site-specific O-glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14623–14628.
- Gould, G.W., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 287–292.
- Gu, J., Yang, J., Chang, Q., Lu, X., Wang, J., Chen, M., Ghayur, T., and Gu, J. (2014). Identification of anti-ErbB2 dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) proteins with unique activities. *PLoS One* 9, e97292.
- Guillaudeau, A., Durand, K., Bessette, B., Chaunavel, A., Pommepuy, I., Progetti, F., Robert, S., Caire, F., Rabinovitch-Chable, H., and Labrousse, F. (2012). EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS One* 7, e37204.
- Gullick, W.J. (2001). The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr. Relat. Cancer* 8, 75–82.
- Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israël, A., and Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J. Cell Biol.* 166, 73–83.
- Hahn, C.-G., Wang, H.-Y., Cho, D.-S., Talbot, K., Gur, R.E., Berrettini, W.H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K.E., Siegel, S.J., et al. (2006). Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat. Med.* 12, 824–828.
- Han, W., and Jones, F.E. (2014). HER4 selectively coregulates estrogen stimulated genes associated with breast tumor cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 458–463.

- Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., et al. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* 15, 481–490.
- Han, W., Sfondouris, M.E., and Jones, F.E. (2016). Direct coupling of the HER4 intracellular domain (4ICD) and STAT5A signaling is required to induce mammary epithelial cell differentiation. *Biochem. Biophys. Rep.* 7, 323–327.
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A., and George, A.J.T. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 325–338.
- Haskins, J.W., Nguyen, D.X., and Stern, D.F. (2014). Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Sci. Signal.* 7, ra116.
- Haskins, J.W., Zhang, S., Means, R.E., Kelleher, J.K., Cline, G.W., Canfrán-Duque, A., Suárez, Y., and Stern, D.F. (2015). Neuregulin-activated ERBB4 induces the SREBP-2 cholesterol biosynthetic pathway and increases low-density lipoprotein uptake. *Sci. Signal.* 8, ra111.
- Hayman, M.J., and Beug, H. (1984). Identification of a form of the avian erythroblastosis virus erb-B gene product at the cell surface. *Nature* 309, 460–462.
- Hegde, G.V., de la Cruz, C.C., Chiu, C., Alag, N., Schaefer, G., Crocker, L., Ross, S., Goldenberg, D., Merchant, M., Tien, J., et al. (2013). Blocking NRG1 and other ligand-mediated Her4 signaling enhances the magnitude and duration of the chemotherapeutic response of non-small cell lung cancer. *Sci. Transl. Med.* 5, 171ra18.
- Hei, Y., Chen, R., Yi, X., Wei, L., Long, Q., and Liu, W. (2018). The Expression of Hippocampal NRG1/ErbB4 Correlates With Neuronal Apoptosis, but Not With Glial Activation During Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Front. Aging Neurosci.* 10, 149.
- Herr, D.R. (2012). Potential use of G protein-coupled receptor-blocking monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancers. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 297, 45–81.
- Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., et al. (2012). G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* 482, 237–240.
- Ho, C.C.M., Chhabra, A., Starkl, P., Schnorr, P.-J., Wilmes, S., Moraga, I., Kwon, H.-S., Gaudenzio, N., Sibilano, R., Wehrman, T.S., et al. (2017). Decoupling the Functional Pleiotropy of Stem Cell Factor by Tuning c-Kit Signaling. *Cell* 168, 1041–1052.e18.
- Hobbs, S.S., Coffing, S.L., Le, A.T.D., Cameron, E.M., Williams, E.E., Andrew, M., Blommel, E.N., Hammer, R.P., Chang, H., and Riese, D.J. (2002). Neuregulin isoforms exhibit distinct patterns of ErbB family receptor activation. *Oncogene* 21, 8442–8452.
- Hobbs, S.S., Cameron, E.M., Hammer, R.P., Le, A.T.D., Gallo, R.M., Blommel, E.N., Coffing, S.L., Chang, H., and Riese, D.J. (2004). Five carboxyl-terminal residues of neuregulin2 are critical for stimulation of signaling by the ErbB4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 23, 883–893.
- Holliger, P., and Hudson, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126–1136.
- Hollmén, M., and Elenius, K. (2010). Potential of ErbB4 antibodies for cancer therapy. *Future Oncol. Lond. Engl.* 6, 37–53.
- Hollmén, M., Määttä, J.A., Bald, L., Sliwkowski, M.X., and Elenius, K. (2009). Suppression of breast cancer cell growth by a monoclonal antibody targeting cleavable ErbB4 isoforms. *Oncogene* 28, 1309–1319.
- Hollmén, M., Liu, P., Kurppa, K., Wildiers, H., Reinval, I., Vandeorpe, T., Smeets, A., Deraedt, K., Vahlberg, T., Joensuu, H., et al. (2012). Proteolytic processing of ErbB4 in breast cancer. *PloS One* 7, e39413.

- Hsu, S.-C., Miller, S.A., Wang, Y., and Hung, M.-C. (2009). Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. *Am. J. Transl. Res.* **1**, 249–258.
- Hua, Y., Gorshkov, K., Yang, Y., Wang, W., Zhang, N., and Hughes, D.P.M. (2012). Slow down to stay alive: HER4 protects against cellular stress and confers chemoresistance in neuroblastoma. *Cancer* **118**, 5140–5154.
- Hupfeld, C.J., and Olefsky, J.M. (2007). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 561–577.
- Hutcheson, I.R., Goddard, L., Barrow, D., McClelland, R.A., Francies, H.E., Knowlden, J.M., Nicholson, R.I., and Gee, J.M.W. (2011). Fulvestrant-induced expression of ErbB3 and ErbB4 receptors sensitizes oestrogen receptor-positive breast cancer cells to heregulin β 1. *Breast Cancer Res. BCR* **13**, R29.
- Icli, B., Bharti, A., Pentassuglia, L., Peng, X., and Sawyer, D.B. (2012). ErbB4 localization to cardiac myocyte nuclei, and its role in myocyte DNA damage response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 116–121.
- Jackson-Fisher, A.J., Bellinger, G., Shum, E., Duong, J.K., Perkins, A.S., Gassmann, M., Muller, W., Kent Lloyd, K.C., and Stern, D.F. (2006). Formation of Neu/ErbB2-induced mammary tumors is unaffected by loss of ErbB4. *Oncogene* **25**, 5664–5672.
- Jäger, V., Büssow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A., and Schirrmann, T. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* **13**, 52.
- Ji, Y., Luo, X., Yang, Y., Dai, Z., Wu, G., and Wu, Z. (2018). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in intestinal epithelial cells: a feed-back regulation by mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **9**, 38.
- Jie, B., Zhang, X., Wu, X., Xin, Y., Liu, Y., and Guo, Y. (2012). Neuregulin-1 suppresses cardiomyocyte apoptosis by activating PI3K/Akt and inhibiting mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Cell. Biochem.* **370**, 35–43.
- Jones, F.E. (2008). HER4 intracellular domain (4ICD) activity in the developing mammary gland and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **13**, 247–258.
- Junttila, T.T., Sundvall, M., Määttä, J.A., and Elenius, K. (2000). Erbb4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 304–310.
- Junttila, T.T., Sundvall, M., Lundin, M., Lundin, J., Tanner, M., Härkönen, P., Joensuu, H., Isola, J., and Elenius, K. (2005). Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res.* **65**, 1384–1393.
- Jura, N., Endres, N.F., Engel, K., Deindl, S., Das, R., Lamers, M.H., Wemmer, D.E., Zhang, X., and Kuriyan, J. (2009). Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **137**, 1293–1307.
- Jura, N., Zhang, X., Endres, N.F., Seeliger, M.A., Schindler, T., and Kuriyan, J. (2011). Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanisms. *Mol. Cell* **42**, 9–22.
- Kainulainen, V., Sundvall, M., Määttä, J.A., Santiestevan, E., Klagsbrun, M., and Elenius, K. (2000). A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **275**, 8641–8649.
- Kang, H.-G., Jenabi, J.M., Zhang, J., Keshelava, N., Shimada, H., May, W.A., Ng, T., Reynolds, C.P., Triche, T.J., and Sorensen, P.H.B. (2007). E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res.* **67**, 3094–3105.
- Kani, K., Warren, C.M., Kaddis, C.S., Loo, J.A., and Landgraf, R. (2005). Oligomers of ERBB3 have two distinct interfaces that differ in their sensitivity to disruption by heregulin. *J. Biol. Chem.* **280**, 8238–8247.

- Kaplon, H., and Reichert, J.M. (2018). Antibodies to watch in 2018. *MAbs* 10, 183–203.
- Kennedy, S.P., Hastings, J.F., Han, J.Z.R., and Croucher, D.R. (2016). The Under-Appreciated Promiscuity of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 88.
- Khersonsky, O., and Fleishman, S.J. (2017). Incorporating an allosteric regulatory site in an antibody through backbone design. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 26, 807–813.
- Kim, H.J., and Bar-Sagi, D. (2004). Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 441–450.
- Kim, J.-Y., Jung, H.H., Do, I.-G., Bae, S., Lee, S.K., Kim, S.W., Lee, J.E., Nam, S.J., Ahn, J.S., Park, Y.H., et al. (2016). Prognostic value of ERBB4 expression in patients with triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 16, 138.
- King, L.E., Carpenter, G., and Cohen, S. (1980). Characterization by electrophoresis of epidermal growth factor stimulated phosphorylation using A-431 membranes. *Biochemistry* 19, 1524–1528.
- Kirabo, A., Ryzhov, S., Gupte, M., Sengsayadeth, S., Gumina, R.J., Sawyer, D.B., and Galindo, C.L. (2017). Neuregulin-1 β induces proliferation, survival and paracrine signaling in normal human cardiac ventricular fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 105, 59–69.
- Kiuchi, T., Ortiz-Zapater, E., Monypenny, J., Matthews, D.R., Nguyen, L.K., Barbeau, J., Coban, O., Lawler, K., Burford, B., Rolfe, D.J., et al. (2014). The ErbB4 CYT2 variant protects EGFR from ligand-induced degradation to enhance cancer cell motility. *Sci. Signal.* 7, ra78.
- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 827–837.
- Kong, A., Calleja, V., Leboucher, P., Harris, A., Parker, P.J., and Larijani, B. (2008). HER2 oncogenic function escapes EGFR tyrosine kinase inhibitors via activation of alternative HER receptors in breast cancer cells. *PLoS One* 3, e2881.
- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216–233.
- Koumakpayi, I.H., Diallo, J.-S., Le Page, C., Lessard, L., Gleave, M., Bégin, L.R., Mes-Masson, A.-M., and Saad, F. (2006). Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 2730–2737.
- Koumakpayi, I.H., Diallo, J.-S., Le Page, C., Lessard, L., Filali-Mouhim, A., Bégin, L.R., Mes-Masson, A.-M., and Saad, F. (2007). Low nuclear ErbB3 predicts biochemical recurrence in patients with prostate cancer. *BJU Int.* 100, 303–309.
- Koumakpayi, I.H., Le Page, C., Delvoye, N., Saad, F., and Mes-Masson, A.-M. (2011). Macropinocytosis inhibitors and Arf6 regulate ErbB3 nuclear localization in prostate cancer cells. *Mol. Carcinog.* 50, 901–912.
- Koziolek, E.J., Donoghue, J.F., Bentley, J.D., Lovrecz, G., Dolezal, O., Ward, C.W., Rothacker, J., Nice, E.C., Burgess, A.W., Hafner, M., et al. (2012). A high-affinity ErbB4Fc fusion protein is a potent antagonist of heregulin-mediated receptor activation. *Growth Factors Chur Switz.* 30, 310–319.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., and Aaronson, S.A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9193–9197.
- Kruman, I.I., Wersto, R.P., Cardozo-Pelaez, F., Smilenov, L., Chan, S.L., Chrest, F.J., Emokpae, R., Gorospe, M., and Mattson, M.P. (2004). Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41, 549–561.

- Kuramochi, Y., Cote, G.M., Guo, X., Lebrasseur, N.K., Cui, L., Liao, R., and Sawyer, D.B. (2004). Cardiac endothelial cells regulate reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis through neuregulin-1beta/erbB4 signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 51141–51147.
- Kurppa, K.J., Rokavec, M., Sundvall, M., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Joensuu, H., Brauch, H., and Elenius, K. (2014). ERBB4 promoter polymorphism is associated with poor distant disease-free survival in high-risk early breast cancer. *PloS One* 9, e102388.
- Kurppa, K.J., Denessiouk, K., Johnson, M.S., and Elenius, K. (2016). Activating ERBB4 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 35, 1283–1291.
- Landgraf, R., and Eisenberg, D. (2000). Heregulin reverses the oligomerization of HER3. *Biochemistry* 39, 8503–8511.
- Lane, J.R., May, L.T., Parton, R.G., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2017). A kinetic view of GPCR allostery and biased agonism. *Nat. Chem. Biol.* 13, 929–937.
- Lappano, R., and Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 47–60.
- Le, X.-F., Varela, C.R., and Bast, R.C. (2002). Heregulin-induced apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 7, 483–491.
- Le Borgne, R. (2006). Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 213–222.
- Le Clorennec, C., Bazin, H., Dubreuil, O., Larbouret, C., Ogier, C., Lazrek, Y., Garambois, V., Poul, M.-A., Mondon, P., Barret, J.-M., et al. (2017). Neuregulin 1 Allosterically Enhances the Antitumor Effects of the Noncompeting Anti-HER3 Antibody 9F7-F11 by Increasing Its Binding to HER3. *Mol. Cancer Ther.* 16, 1312–1323.
- Lee, C.M., Shrieve, D.C., Zempolich, K.A., Lee, R.J., Hammond, E., Handrahan, D.L., and Gaffney, D.K. (2005). Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.* 99, 415–421.
- Lee, H., Akita, R.W., Sliwkowski, M.X., and Maihle, N.J. (2001). A naturally occurring secreted human ErbB3 receptor isoform inhibits heregulin-stimulated activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4. *Cancer Res.* 61, 4467–4473.
- Lefkowitz, R.J., Rajagopal, K., and Whalen, E.J. (2006). New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors. *Mol. Cell* 24, 643–652.
- Lemmon, M.A. (2009). Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp. Cell Res.* 315, 638–648.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Li, L.-Y., Chen, H., Hsieh, Y.-H., Wang, Y.-N., Chu, H.-J., Chen, Y.-H., Chen, H.-Y., Chien, P.-J., Ma, H.-T., Tsai, H.-C., et al. (2011). Nuclear ErbB2 enhances translation and cell growth by activating transcription of ribosomal RNA genes. *Cancer Res.* 71, 4269–4279.
- Li, Q., Zhang, L., Li, X., Yan, H., Yang, L., Li, Y., Li, T., Wang, J., and Cao, B. (2016). The prognostic significance of human epidermal growth factor receptor family protein expression in operable pancreatic cancer : HER1-4 protein expression and prognosis in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 16, 910.
- Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J.W., Kussie, P., and Ferguson, K.M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7, 301–311.
- Liao, H.-J., and Carpenter, G. (2007). Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol. Biol. Cell* 18, 1064–1072.

- Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., and Hung, M.C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* 3, 802–808.
- Linggi, B., Cheng, Q.C., Rao, A.R., and Carpenter, G. (2006). The ErbB-4 s80 intracellular domain is a constitutively active tyrosine kinase. *Oncogene* 25, 160–163.
- Liu, B., Ordonez-Ercan, D., Fan, Z., Edgerton, S.M., Yang, X., and Thor, A.D. (2007). Downregulation of erbB3 abrogates erbB2-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 120, 1874–1882.
- Liu, J., Cho, S.-N., Wu, S.-P., Jin, N., Moghaddam, S.J., Gilbert, J.L., Wistuba, I., and DeMayo, F.J. (2017a). Mig-6 deficiency cooperates with oncogenic Kras to promote mouse lung tumorigenesis. *Lung Cancer Amst. Neth.* 112, 47–56.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., and Zhao, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 627–644.
- Liu, W., Purevdorj, E., Zscheppang, K., von Mayersbach, D., Behrens, J., Brinkhaus, M.-J., Nielsen, H.C., Schmiedl, A., and Dammann, C.E.L. (2010). ErbB4 regulates the timely progression of late fetal lung development. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 832–839.
- Liu, Y., Song, L., Ni, H., Sun, L., Jiao, W., Chen, L., Zhou, Q., Shen, T., Cui, H., Gao, T., et al. (2017b). ERBB4 acts as a suppressor in the development of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 38, 465–473.
- Ljuslinder, I., Malmer, B., Isaksson-Mettävainio, M., Oberg, A., Henriksson, R., Stenling, R., and Palmqvist, R. (2009). ErbB 1-4 expression alterations in primary colorectal cancers and their corresponding metastases. *Anticancer Res.* 29, 1489–1494.
- Luo, J., Sobkiw, C.L., Logsdon, N.M., Watt, J.M., Signoretti, S., O’Connell, F., Shin, E., Shim, Y., Pao, L., Neel, B.G., et al. (2005). Modulation of epithelial neoplasia and lymphoid hyperplasia in PTEN[±] mice by the p85 regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10238–10243.
- Lynch, C.C., Vargo-Gogola, T., Martin, M.D., Fingleton, B., Crawford, H.C., and Matrisian, L.M. (2007). Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor. *Cancer Res.* 67, 6760–6767.
- Ma, X., Li, L., Tian, T., Liu, H., Li, Q., and Gao, Q. (2017). Study of lung cancer regulatory network that involves erbB4 and tumor marker gene. *Saudi J. Biol. Sci.* 24, 649–657.
- Määttä, J.A., Sundvall, M., Junttila, T.T., Peri, L., Laine, V.J.O., Isola, J., Egeblad, M., and Elenius, K. (2006). Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth. *Mol. Biol. Cell* 17, 67–79.
- Macdonald-Obermann, J.L., and Pike, L.J. (2014). Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. *J. Biol. Chem.* 289, 26178–26188.
- Macdonald-Obermann, J.L., Piwnica-Worms, D., and Pike, L.J. (2012). Mechanics of EGF receptor/ErbB2 kinase activation revealed by luciferase fragment complementation imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 137–142.
- Machleidt, A., Buchholz, S., Diermeier-Daucher, S., Zeman, F., Ortmann, O., and Brockhoff, G. (2013). The prognostic value of Her4 receptor isoform expression in triple-negative and Her2 positive breast cancer patients. *BMC Cancer* 13, 437.
- Magdelaine-Beuzelin, C., Ohresser, M., and Watier, H. (2009). [Neonatal Fc receptor, key control of immunoglobulins biodistribution]. *Med. Sci.* 25, 1053–1056.
- Malm, M., Frejd, F.Y., Ståhl, S., and Löfblom, J. (2016). Targeting HER3 using mono- and bispecific antibodies or alternative scaffolds. *MAbs* 8, 1195–1209.

- Manca, A., Lissia, A., Cossu, A., Rubino, C., Ascierto, P.A., Stanganelli, I., and Palmieri, G. (2013). Mutations in ERBB4 may have a minor role in melanoma pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1685–1687.
- Martelli, A.M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L., and Evangelisti, C. (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 2168–2178.
- Masroor, M., Javid, J., Mir, R., Y, P., A, I., Z, M., Mohan, A., Ray, P.C., and Saxena, A. (2016). Prognostic significance of serum ERBB3 and ERBB4 mRNA in lung adenocarcinoma patients. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 857–863.
- Mayes, P.A., Hance, K.W., and Hoos, A. (2018). The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 509–527.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11598–11603.
- Meijer, I.M.J., van Rotterdam, W., van Zoelen, E.J.J., and van Leeuwen, J.E.M. (2013). Cbl and Itch binding sites in ERBB4 CYT-1 and CYT-2 mediate K48- and K63-polyubiquitination, respectively. *Cell. Signal.* 25, 470–478.
- de Melo Gagliato, D., Jardim, D.L.F., Marchesi, M.S.P., and Hortobagyi, G.N. (2016). Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget* 7, 64431–64446.
- Mendoza, M.C., Er, E.E., and Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* 36, 320–328.
- Mendoza-Naranjo, A., El-Naggar, A., Wai, D.H., Mistry, P., Lazic, N., Ayala, F.R.R., da Cunha, I.W., Rodriguez-Viciana, P., Cheng, H., Tavares Guerreiro Fregnani, J.H., et al. (2013). ERBB4 confers metastatic capacity in Ewing sarcoma. *EMBO Mol. Med.* 5, 1087–1102.
- Merilahti, J.A.M., Ojala, V.K., Knittle, A.M., Pulliainen, A.T., and Elenius, K. (2017). Genome-wide screen of gamma-secretase-mediated intramembrane cleavage of receptor tyrosine kinases. *Mol. Biol. Cell* 28, 3123–3131.
- Mill, C.P., Zordan, M.D., Rothenberg, S.M., Settleman, J., Leary, J.F., and Riese, D.J. (2011). ErbB2 Is Necessary for ErbB4 Ligands to Stimulate Oncogenic Activities in Models of Human Breast Cancer. *Genes Cancer* 2, 792–804.
- Miller, M.A., Oudin, M.J., Sullivan, R.J., Wang, S.J., Meyer, A.S., Im, H., Frederick, D.T., Tadros, J., Griffith, L.G., Lee, H., et al. (2016). Reduced Proteolytic Shedding of Receptor Tyrosine Kinases Is a Post-Translational Mechanism of Kinase Inhibitor Resistance. *Cancer Discov.* 6, 382–399.
- Miller, M.A., Sullivan, R.J., and Lauffenburger, D.A. (2017). Molecular Pathways: Receptor Ectodomain Shedding in Treatment, Resistance, and Monitoring of Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 623–629.
- Mishra, R., Hanker, A.B., and Garrett, J.T. (2017). Genomic alterations of ERBB receptors in cancer: clinical implications. *Oncotarget* 8, 114371–114392.
- Mitsui, K., Yonezawa, M., Tatsuguchi, A., Shinji, S., Gudis, K., Tanaka, S., Fujimori, S., and Sakamoto, C. (2014). Localization of phosphorylated ErbB1-4 and heregulin in colorectal cancer. *BMC Cancer* 14, 863.
- Mohd Nafi, S.N., Generali, D., Kramer-Marek, G., Gijssen, M., Strina, C., Cappelletti, M., Andreis, D., Haider, S., Li, J.-L., Bridges, E., et al. (2014). Nuclear HER4 mediates acquired resistance to trastuzumab and is associated with poor outcome in HER2 positive breast cancer. *Oncotarget* 5, 5934–5949.
- Momeny, M., Saunus, J.M., Marturana, F., McCart Reed, A.E., Black, D., Sala, G., Iacobelli, S., Holland, J.D., Yu, D., Da Silva, L., et al. (2015). Heregulin-HER3-HER2 signaling promotes matrix metalloproteinase-dependent blood-brain-barrier transendothelial migration of human breast cancer cell lines. *Oncotarget* 6, 3932–3946.

- Moriki, T., Maruyama, H., and Maruyama, I.N. (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J. Mol. Biol.* *311*, 1011–1026.
- Morohashi, Y., and Tomita, T. (2013). Protein trafficking and maturation regulate intramembrane proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 2855–2861.
- Mota, J.M., Collier, K.A., Barros Costa, R.L., Taxter, T., Kalyan, A., Leite, C.A., Chae, Y.K., Giles, F.J., and Carneiro, B.A. (2017). A comprehensive review of heregulins, HER3, and HER4 as potential therapeutic targets in cancer. *Oncotarget* *8*, 89284–89306.
- Mroczkowski, B., Reich, M., Whittaker, J., Bell, G.I., and Cohen, S. (1988). Expression of human epidermal growth factor precursor cDNA in transfected mouse NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 126–130.
- Mukund, S., Shang, Y., Clarke, H.J., Madjidi, A., Corn, J.E., Kates, L., Kolumam, G., Chiang, V., Luis, E., Murray, J., et al. (2013). Inhibitory mechanism of an allosteric antibody targeting the glucagon receptor. *J. Biol. Chem.* *288*, 36168–36178.
- Munk, M., Memon, A., Poulsen, S.S., Borre, M., Nexø, E., and Sørensen, B.S. (2013). The HER4 isoform JM-a/CYT2 relates to improved survival in bladder cancer patients but only if the estrogen receptor α is not expressed. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *73*, 503–513.
- Muraoka-Cook, R.S., Caskey, L.S., Sandahl, M.A., Hunter, D.M., Husted, C., Strunk, K.E., Sartor, C.I., Rearick, W.A., McCall, W., Sgagias, M.K., et al. (2006a). Heregulin-dependent delay in mitotic progression requires HER4 and BRCA1. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6412–6424.
- Muraoka-Cook, R.S., Sandahl, M., Husted, C., Hunter, D., Miraglia, L., Feng, S., Elenius, K., and Earp, H.S. (2006b). The intracellular domain of ErbB4 induces differentiation of mammary epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4118–4129.
- Muraoka-Cook, R.S., Sandahl, M., Hunter, D., Miraglia, L., and Earp, H.S. (2008). Prolactin and ErbB4/HER4 signaling interact via Janus kinase 2 to induce mammary epithelial cell gene expression differentiation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 2307–2321.
- Muraoka-Cook, R.S., Sandahl, M.A., Strunk, K.E., Miraglia, L.C., Husted, C., Hunter, D.M., Elenius, K., Chodosh, L.A., and Earp, H.S. (2009). ErbB4 splice variants Cyt1 and Cyt2 differ by 16 amino acids and exert opposing effects on the mammary epithelium in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4935–4948.
- Naillat, F., Veikkolainen, V., Miinalainen, I., Sipilä, P., Poutanen, M., Elenius, K., and Vainio, S.J. (2014). ErbB4, a receptor tyrosine kinase, coordinates organization of the seminiferous tubules in the developing testis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *28*, 1534–1546.
- Narayan, M., Wilken, J.A., Harris, L.N., Baron, A.T., Kimbler, K.D., and Maihle, N.J. (2009). Trastuzumab-induced HER reprogramming in “resistant” breast carcinoma cells. *Cancer Res.* *69*, 2191–2194.
- Naresh, A., Long, W., Vidal, G.A., Wimley, W.C., Marrero, L., Sartor, C.I., Tovey, S., Cooke, T.G., Bartlett, J.M.S., and Jones, F.E. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.* *66*, 6412–6420.
- Naresh, A., Thor, A.D., Edgerton, S.M., Torkko, K.C., Kumar, R., and Jones, F.E. (2008). The HER4/4ICD estrogen receptor coactivator and BH3-only protein is an effector of tamoxifen-induced apoptosis. *Cancer Res.* *68*, 6387–6395.
- Needham, S.R., Roberts, S.K., Arkhipov, A., Mysore, V.P., Tynan, C.J., Zanetti-Domingues, L.C., Kim, E.T., Losasso, V., Korovesis, D., Hirsch, M., et al. (2016). EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms. *Nat. Commun.* *7*, 13307.
- Nevoltris, D., Lombard, B., Dupuis, E., Mathis, G., Chames, P., and Baty, D. (2015). Conformational nanobodies reveal tethered epidermal growth factor receptor involved in EGFR/ErbB2 predimers. *ACS Nano* *9*, 1388–1399.

- Ni, C.Y., Murphy, M.P., Golde, T.E., and Carpenter, G. (2001). gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294, 2179–2181.
- Ni, C.-Y., Yuan, H., and Carpenter, G. (2003). Role of the ErbB-4 carboxyl terminus in gamma-secretase cleavage. *J. Biol. Chem.* 278, 4561–4565.
- Nie, S.-D., Li, X., Tang, C.-E., Min, F.-Y., Shi, X.-J., Wu, L.-Y., Zhou, S.-L., Chen, Z., Wu, J., Song, T., et al. (2018). High glucose forces a positive feedback loop connecting ErbB4 expression and mTOR/S6K pathway to aggravate the formation of tau hyperphosphorylation in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurobiol. Aging* 67, 171–180.
- Nielsen, T.O., Sorensen, S., Dagnæs-Hansen, F., Kjems, J., and Sorensen, B.S. (2013). Directing HER4 mRNA expression towards the CYT2 isoform by antisense oligonucleotide decreases growth of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer* 108, 2291–2298.
- Nielsen, T.O., Friis-Hansen, L., Poulsen, S.S., Federspiel, B., and Sorensen, B.S. (2014a). Expression of the EGF family in gastric cancer: downregulation of HER4 and its activating ligand NRG4. *PloS One* 9, e94606.
- Nielsen, T.O., Poulsen, S.S., Journe, F., Ghanem, G., and Sorensen, B.S. (2014b). HER4 and its cytoplasmic isoforms are associated with progression-free survival of malignant melanoma. *Melanoma Res.* 24, 88–91.
- Nixon, A.E., Sexton, D.J., and Ladner, R.C. (2014). Drugs derived from phage display: from candidate identification to clinical practice. *MAbs* 6, 73–85.
- Ocana, A., Vera-Badillo, F., Seruga, B., Templeton, A., Pandiella, A., and Amir, E. (2013). HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 266–273.
- Offterdinger, M., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., and Grunt, T.W. (2002). c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 157, 929–939.
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 21843–21850.
- Okazaki, S., Nakatani, F., Masuko, K., Tsuchihashi, K., Ueda, S., Masuko, T., Saya, H., and Nagano, O. (2016). Development of an ErbB4 monoclonal antibody that blocks neuregulin-1-induced ErbB4 activation in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470, 239–244.
- Omerovic, J., Puggioni, E.M.R., Napoletano, S., Visco, V., Fraioli, R., Frati, L., Gulino, A., and Alimandi, M. (2004). Ligand-regulated association of ErbB-4 to the transcriptional co-activator YAP65 controls transcription at the nuclear level. *Exp. Cell Res.* 294, 469–479.
- Omerovic, J., Santangelo, L., Puggioni, E.M.-R., Marrocco, J., Dall’Armi, C., Palumbo, C., Belleudi, F., Di Marcotullio, L., Frati, L., Torrisi, M.-R., et al. (2007). The E3 ligase Aip4/Itch ubiquitinates and targets ErbB-4 for degradation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 2849–2862.
- Paatero, I., and Elenius, K. (2008). ErbB4 and its isoforms: patentable drug targets? *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 2, 27–33.
- Paatero, I., Lassus, H., Junttila, T.T., Kaskinen, M., Bützow, R., and Elenius, K. (2013). CYT-1 isoform of ErbB4 is an independent prognostic factor in serous ovarian cancer and selectively promotes ovarian cancer cell growth in vitro. *Gynecol. Oncol.* 129, 179–187.
- Pascal, D., Giovannelli, A., Gnani, S., Hoyng, S.A., de Winter, F., Morano, M., Fregnan, F., Dell’Albani, P., Zaccheo, D., Perroteau, I., et al. (2014). Characterization of glial cell models and in vitro manipulation of the neuregulin1/ErbB system. *BioMed Res. Int.* 2014, 310215.
- Patel, P., Charles, L., Corbin, J., Goldfine, I.D., Johnson, K., Rubin, P., and De León, D.D. (2018). A unique allosteric insulin receptor monoclonal antibody that prevents hypoglycemia in the SUR-1-/- mouse model of KATP hyperinsulinism. *MAbs* 10, 796–802.

- Pedersen, K., Angelini, P.-D., Laos, S., Bach-Faig, A., Cunningham, M.P., Ferrer-Ramón, C., Luque-García, A., García-Castillo, J., Parra-Palau, J.L., Scaltriti, M., et al. (2009). A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3319–3331.
- Pejovic, T., Pande, N.T., Mori, M., Mhawech-Fauceglia, P., Harrington, C., Mongoue-Tchokote, S., Dim, D., Andrews, C., Beck, A., Tarumi, Y., et al. (2009). Expression profiling of the ovarian surface kinome reveals candidate genes for early neoplastic changes. *Transl. Oncol.* 2, 341–349.
- Piper, R.C., and Lehner, P.J. (2011). Endosomal transport via ubiquitination. *Trends Cell Biol.* 21, 647–655.
- Pitfield, S.E., Bryant, I., Penington, D.J., Park, G., and Riese, D.J. (2006). Phosphorylation of ErbB4 on tyrosine 1056 is critical for ErbB4 coupling to inhibition of colony formation by human mammary cell lines. *Oncol. Res.* 16, 179–193.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., and Shoyab, M. (1993a). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1746–1750.
- Plowman, G.D., Green, J.M., Culouscou, J.M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M., and Buckley, S. (1993b). Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* 366, 473–475.
- Pohl, C., and Jentsch, S. (2008). Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. *Cell* 132, 832–845.
- Prickett, T.D., Agrawal, N.S., Wei, X., Yates, K.E., Lin, J.C., Wunderlich, J.R., Cronin, J.C., Cruz, P., Rosenberg, S.A., and Samuels, Y. (2009). Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat. Genet.* 41, 1127–1132.
- Ramachandra, C.J.A., Mehta, A., Wong, P., and Shim, W. (2016). ErbB4 Activated p38 γ MAPK Isoform Mediates Early Cardiogenesis Through NKx2.5 in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 288–298.
- Ramakrishnan, G., Davaakhuu, G., Chung, W.C., Zhu, H., Rana, A., Filipovic, A., Green, A.R., Atfi, A., Pannuti, A., Miele, L., et al. (2015). AKT and 14-3-3 regulate Notch4 nuclear localization. *Sci. Rep.* 5, 8782.
- Ranganathan, A.C., Adam, A.P., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2006). Opposing roles of mitogenic and stress signaling pathways in the induction of cancer dormancy. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 1799–1807.
- Reif, R., Adawy, A., Vartak, N., Schröder, J., Günther, G., Ghallab, A., Schmidt, M., Schormann, W., and Hengstler, J.G. (2016). Activated ErbB3 Translocates to the Nucleus via Clathrin-independent Endocytosis, Which Is Associated with Proliferating Cells. *J. Biol. Chem.* 291, 3837–3847.
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52, 179–197.
- Riese, D.J. (2011). Ligand-based receptor tyrosine kinase partial agonists: New paradigm for cancer drug discovery? *Expert Opin. Drug Discov.* 6, 185–193.
- Rio, C., Buxbaum, J.D., Peschon, J.J., and Corfas, G. (2000). Tumor necrosis factor- α -converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J. Biol. Chem.* 275, 10379–10387.
- Robin, G., Sato, Y., Desplancq, D., Rochel, N., Weiss, E., and Martineau, P. (2014). Restricted diversity of antigen binding residues of antibodies revealed by computational alanine scanning of 227 antibody-antigen complexes. *J. Mol. Biol.* 426, 3729–3743.
- Rokicki, J., Das, P.M., Giltnane, J.M., Wansbury, O., Rimm, D.L., Howard, B.A., and Jones, F.E. (2010). The ER α coactivator, HER4/4ICD, regulates progesterone receptor expression in normal and malignant breast epithelium. *Mol. Cancer* 9, 150.
- Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* 79, 34–74.

- Roth, B.L., Irwin, J.J., and Shoichet, B.K. (2017). Discovery of new GPCR ligands to illuminate new biology. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 1143–1151.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T., and Stehelin, D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* **281**, 452–455.
- Rudloff, U., and Samuels, Y. (2010). A growing family: adding mutated ErbB4 as a novel cancer target. *Cell Cycle Georget. Tex* **9**, 1487–1503.
- Sahu, A., Patra, P.K., Yadav, M.K., and Varma, M. (2017). Identification and characterization of ErbB4 kinase inhibitors for effective breast cancer therapy. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **37**, 470–480.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101.
- Sardi, S.P., Murtie, J., Koirala, S., Patten, B.A., and Corfas, G. (2006). Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* **127**, 185–197.
- Sassen, A., Rochon, J., Wild, P., Hartmann, A., Hofstaedter, F., Schwarz, S., and Brockhoff, G. (2008). Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res. BCR* **10**, R2.
- Sassen, A., Diermeier-Daucher, S., Sieben, M., Ortmann, O., Hofstaedter, F., Schwarz, S., and Brockhoff, G. (2009). Presence of HER4 associates with increased sensitivity to Herceptin in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **11**, R50.
- Sato, S., Drake, A.W., Tsuji, I., and Fan, J. (2012). A potent anti-HB-EGF monoclonal antibody inhibits cancer cell proliferation and multiple angiogenic activities of HB-EGF. *PLoS One* **7**, e51964.
- Saule, S., Roussel, M., Lagrou, C., and Stehelin, D. (1981). Characterization of the oncogene (erb) of avian erythroblastosis virus and its cellular progenitor. *J. Virol.* **38**, 409–419.
- Scarfò, I., Pellegrino, E., Mereu, E., Kwee, I., Agnelli, L., Bergaggio, E., Garaffo, G., Vitale, N., Caputo, M., Machiorlatti, R., et al. (2016). Identification of a new subclass of ALK-negative ALCL expressing aberrant levels of ERBB4 transcripts. *Blood* **127**, 221–232.
- Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., Brand, M., and Zerial, M. (2008). The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development. *Cell* **133**, 486–497.
- Schlessinger, J., and Lemmon, M.A. (2006). Nuclear signaling by receptor tyrosine kinases: the first robin of spring. *Cell* **127**, 45–48.
- Schmukler, E., Shai, B., Ehrlich, M., and Pinkas-Kramarski, R. (2012). Neuregulin promotes incomplete autophagy of prostate cancer cells that is independent of mTOR pathway inhibition. *PLoS One* **7**, e36828.
- Scholler, P., Nevoitris, D., de Bundel, D., Bossi, S., Moreno-Delgado, D., Rovira, X., Møller, T.C., El Moustaine, D., Mathieu, M., Blanc, E., et al. (2017). Allosteric nanobodies uncover a role of hippocampal mGlu2 receptor homodimers in contextual fear consolidation. *Nat. Commun.* **8**, 1967.
- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–S52.
- Schuchardt, B.J., Bhat, V., Mikles, D.C., McDonald, C.B., Sudol, M., and Farooq, A. (2013). Molecular origin of the binding of WWOX tumor suppressor to ErbB4 receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* **52**, 9223–9236.
- Schumacher, M.A., Hedl, M., Abraham, C., Bernard, J.K., Lozano, P.R., Hsieh, J.J., Almohazey, D., Bucar, E.B., Punit, S., Dempsey, P.J., et al. (2017). ErbB4 signaling stimulates pro-inflammatory macrophage apoptosis and limits colonic inflammation. *Cell Death Dis.* **8**, e2622.

- Scott, G.K., Robles, R., Park, J.W., Montgomery, P.A., Daniel, J., Holmes, W.E., Lee, J., Keller, G.A., Li, W.L., and Fendly, B.M. (1993). A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2247–2257.
- Settleman, J. (2009). A therapeutic opportunity in melanoma: ErbB4 makes a mark on skin. *Cancer Cell* **16**, 278–279.
- Sheng, Q., Liu, X., Fleming, E., Yuan, K., Piao, H., Chen, J., Moustafa, Z., Thomas, R.K., Greulich, H., Schinzel, A., et al. (2010). An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* **17**, 298–310.
- Shenoy, S.K., Modi, A.S., Shukla, A.K., Xiao, K., Berthouze, M., Ahn, S., Wilkinson, K.D., Miller, W.E., and Lefkowitz, R.J. (2009). Beta-arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 6650–6655.
- Shi, F., Telesco, S.E., Liu, Y., Radhakrishnan, R., and Lemmon, M.A. (2010). ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7692–7697.
- Shukla, A.K., Violin, J.D., Whalen, E.J., Gesty-Palmer, D., Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2008). Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9988–9993.
- Sieggall, C.B., Bacus, S.S., Cohen, B.D., Plowman, G.D., Mixan, B., Chace, D., Chin, D.M., Goetze, A., Green, J.M., and Hellström, I. (1995). HER4 expression correlates with cytotoxicity directed by a heregulin-toxin fusion protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 7625–7630.
- Song, G., Zhang, H., Chen, C., Gong, L., Chen, B., Zhao, S., Shi, J., Xu, J., and Ye, Z. (2017). miR-551b regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer by inhibiting ERBB4 expression. *Oncotarget* **8**, 45725–45735.
- Song, J.-Y., Lee, S.-W., Hong, J.P., Chang, S.E., Choe, H., and Choi, J. (2009). Epidermal growth factor competes with EGF receptor inhibitors to induce cell death in EGFR-overexpressing tumor cells. *Cancer Lett.* **283**, 135–142.
- Sorkin, A., and Goh, L.K. (2009). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* **315**, 683–696.
- Starr, A., Greif, J., Vexler, A., Ashkenazy-Voghera, M., Gladesh, V., Rubin, C., Kerber, G., Marmor, S., Lev-Ari, S., Inbar, M., et al. (2006). ErbB4 increases the proliferation potential of human lung cancer cells and its blockage can be used as a target for anti-cancer therapy. *Int. J. Cancer* **119**, 269–274.
- Steffensen, K.D., Waldstrøm, M., Andersen, R.F., Olsen, D.A., Jeppesen, U., Knudsen, H.J., Brandslund, I., and Jakobsen, A. (2008). Protein levels and gene expressions of the epidermal growth factor receptors, HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors. *Int. J. Oncol.* **33**, 195–204.
- Strohecker, A.M., Yehiely, F., Chen, F., and Cryns, V.L. (2008). Caspase cleavage of HER-2 releases a Bad-like cell death effector. *J. Biol. Chem.* **283**, 18269–18282.
- Strunk, K.E., Husted, C., Miraglia, L.C., Sandahl, M., Rearick, W.A., Hunter, D.M., Earp, H.S., and Muraoka-Cook, R.S. (2007). HER4 D-box sequences regulate mitotic progression and degradation of the nuclear HER4 cleavage product s80HER4. *Cancer Res.* **67**, 6582–6590.
- Sundvall, M., Peri, L., Määttä, J.A., Tvorogov, D., Paatero, I., Savisalo, M., Silvennoinen, O., Yarden, Y., and Elenius, K. (2007). Differential nuclear localization and kinase activity of alternative ErbB4 intracellular domains. *Oncogene* **26**, 6905–6914.
- Sundvall, M., Korhonen, A., Paatero, I., Gaudio, E., Melino, G., Croce, C.M., Aqeilan, R.I., and Elenius, K. (2008). Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4162–4167.

- Sundvall, M., Korhonen, A., Vaparanta, K., Anckar, J., Halkilahti, K., Salah, Z., Aqeilan, R.I., Palvimo, J.J., Sistonen, L., and Elenius, K. (2012). Protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3) protein promotes SUMOylation and nuclear sequestration of the intracellular domain of ErbB4 protein. *J. Biol. Chem.* 287, 23216–23226.
- Suo, Z., Risberg, B., Kallson, M.G., Willman, K., Tierens, A., Skovlund, E., and Nesland, J.M. (2002). EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J. Pathol.* 196, 17–25.
- Takahashi, T.T., and Li, S. (2008). Interactome of ErbB4 unveiled. *Chem. Biol.* 15, 753–754.
- Tang, C.K., Goldstein, D.J., Payne, J., Czubayko, F., Alimandi, M., Wang, L.M., Pierce, J.H., and Lippman, M.E. (1998). ErbB-4 ribozymes abolish neuregulin-induced mitogenesis. *Cancer Res.* 58, 3415–3422.
- Thomasson, M., Hedman, H., Ljungberg, B., and Henriksson, R. (2012). Gene expression pattern of the epidermal growth factor receptor family and LRIG1 in renal cell carcinoma. *BMC Res. Notes* 5, 216.
- Thor, A.D., Edgerton, S.M., and Jones, F.E. (2009). Subcellular localization of the HER4 intracellular domain, 4ICD, identifies distinct prognostic outcomes for breast cancer patients. *Am. J. Pathol.* 175, 1802–1809.
- Tidcombe, H., Jackson-Fisher, A., Mathers, K., Stern, D.F., Gassmann, M., and Golding, J.P. (2003). Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8281–8286.
- Tikhomirov, O., and Carpenter, G. (2005). Bax activation and translocation to mitochondria mediate EGF-induced programmed cell death. *J. Cell Sci.* 118, 5681–5690.
- Tzahar, E., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Yi, L., Peles, E., Lavi, S., Chang, D., Liu, N., Yayon, A., and Wen, D. (1994). ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/heregulin isoforms. *J. Biol. Chem.* 269, 25226–25233.
- Uings, I.J., and Farrow, S.N. (2000). Cell receptors and cell signalling. *Mol. Pathol.* MP 53, 295–299.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., and Schlessinger, J. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418–425.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.
- Vecchi, M., and Carpenter, G. (1997). Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism. *J. Cell Biol.* 139, 995–1003.
- Vecchi, M., Baulida, J., and Carpenter, G. (1996). Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 271, 18989–18995.
- Veikkolainen, V., Vaparanta, K., Halkilahti, K., Iljin, K., Sundvall, M., and Elenius, K. (2011). Function of ERBB4 is determined by alternative splicing. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2647–2657.
- Veikkolainen, V., Naillat, F., Railo, A., Chi, L., Manninen, A., Hohenstein, P., Hastie, N., Vainio, S., and Elenius, K. (2012). ErbB4 modulates tubular cell polarity and lumen diameter during kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23, 112–122.
- Vexler, A., Lidawi, G., Loew, V., Barnea, I., Karaush, V., Lev-Ari, S., Shtabsky, A., and Ben-Yosef, R. (2008). Anti-ERBB4 targeted therapy combined with radiation therapy in prostate cancer. Results of in vitro and in vivo studies. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1090–1094.
- Vidal, G.A., Naresh, A., Marrero, L., and Jones, F.E. (2005). Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J. Biol. Chem.* 280, 19777–19783.

- Vitetta, E.S., and Uhr, J.W. (1994). Monoclonal antibodies as agonists: an expanded role for their use in cancer therapy. *Cancer Res.* **54**, 5301–5309.
- Wacker, D., Stevens, R.C., and Roth, B.L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **170**, 414–427.
- Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 537–549.
- Wali, V.B., Haskins, J.W., Gilmore-Hebert, M., Platt, J.T., Liu, Z., and Stern, D.F. (2014a). Convergent and divergent cellular responses by ErbB4 isoforms in mammary epithelial cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **12**, 1140–1155.
- Wali, V.B., Gilmore-Hebert, M., Mamillapalli, R., Haskins, J.W., Kurppa, K.J., Elenius, K., Booth, C.J., and Stern, D.F. (2014b). Overexpression of ERBB4 JM-a CYT-1 and CYT-2 isoforms in transgenic mice reveals isoform-specific roles in mammary gland development and carcinogenesis. *Breast Cancer Res. BCR* **16**, 501.
- Wang, Y.-N., and Hung, M.-C. (2012). Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci.* **2**, 13.
- Wang, H., Sun, W., Sun, M., Fu, Z., Zhou, C., Wang, C., Zuo, D., Zhou, Z., Wang, G., Zhang, T., et al. (2018). HER4 promotes cell survival and chemoresistance in osteosarcoma via interaction with NDRG1. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 1839–1849.
- Wang, J., Yin, J., Yang, Q., Ding, F., Chen, X., Li, B., and Tian, X. (2016). Human epidermal growth factor receptor 4 (HER4) is a favorable prognostic marker of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.*
- Wang, N.X., Lee, H.-J., and Zheng, J.J. (2008). Therapeutic use of PDZ protein-protein interaction antagonism. *Drug News Perspect.* **21**, 137–141.
- Wang, S.-C., Lien, H.-C., Xia, W., Chen, I.-F., Lo, H.-W., Wang, Z., Ali-Seyed, M., Lee, D.-F., Bartholomeusz, G., Ou-Yang, F., et al. (2004). Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* **6**, 251–261.
- Ward, M.D., and Leahy, D.J. (2015). Kinase activator-receiver preference in ErbB heterodimers is determined by intracellular regions and is not coupled to extracellular asymmetry. *J. Biol. Chem.* **290**, 1570–1579.
- van de Water, J.A.J.M., Bagci-Onder, T., Agarwal, A.S., Wakimoto, H., Roovers, R.C., Zhu, Y., Kasmieh, R., Bhare, D., Van Bergen en Henegouwen, P.M.P., and Shah, K. (2012). Therapeutic stem cells expressing variants of EGFR-specific nanobodies have antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16642–16647.
- Webb, D.R., Handel, T.M., Kretz-Rommel, A., and Stevens, R.C. (2013). Opportunities for functional selectivity in GPCR antibodies. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 147–152.
- Wehr, M.C., Reinecke, L., Botvinnik, A., and Rossner, M.J. (2008). Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV. *BMC Biotechnol.* **8**, 55.
- Weiner, G.J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 361–370.
- Wheeler, D.L., Rangnekar, V.M., and Schwarze, S.R. (2008). ErbB4 targeting approaches for prostate cancer treatment. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1095–1097.
- Wilken, J.A., Perez-Torres, M., Nieves-Alicea, R., Cora, E.M., Christensen, T.A., Baron, A.T., and Maihle, N.J. (2013). Shedding of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) is mediated by a metalloprotease/fibronectin/integrin axis and inhibited by cetuximab. *Biochemistry* **52**, 4531–4540.
- Williams, C.C., Allison, J.G., Vidal, G.A., Burow, M.E., Beckman, B.S., Marrero, L., and Jones, F.E. (2004). The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J. Cell Biol.* **167**, 469–478.

- Williams, C.S., Bernard, J.K., Demory Beckler, M., Almohazey, D., Washington, M.K., Smith, J.J., and Frey, M.R. (2015). ERBB4 is over-expressed in human colon cancer and enhances cellular transformation. *Carcinogenesis* 36, 710–718.
- Witton, C.J., Reeves, J.R., Going, J.J., Cooke, T.G., and Bartlett, J.M.S. (2003). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J. Pathol.* 200, 290–297.
- Woo, R.-S., Lee, J.-H., Yu, H.-N., Song, D.-Y., and Baik, T.-K. (2010). Expression of ErbB4 in the apoptotic neurons of Alzheimer's disease brain. *Anat. Cell Biol.* 43, 332–339.
- Wootten, D., Christopoulos, A., and Sexton, P.M. (2013). Emerging paradigms in GPCR allosteric: implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 630–644.
- Wootten, D., Reynolds, C.A., Smith, K.J., Mobarec, J.C., Koole, C., Savage, E.E., Pabreja, K., Simms, J., Sridhar, R., Furness, S.G.B., et al. (2016). The Extracellular Surface of the GLP-1 Receptor Is a Molecular Trigger for Biased Agonism. *Cell* 165, 1632–1643.
- Xia, W., Petricoin, E.F., Zhao, S., Liu, L., Osada, T., Cheng, Q., Wulfkühle, J.D., Gwin, W.R., Yang, X., Gallagher, R.I., et al. (2013). An heregulin-EGFR-HER3 autocrine signaling axis can mediate acquired lapatinib resistance in HER2+ breast cancer models. *Breast Cancer Res. BCR* 15, R85.
- Xu, N., Lao, Y., Zhang, Y., and Gillespie, D.A. (2012). Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability. *J. Oncol.* 2012, 951724.
- Xu, Y., Shao, Y., Zhou, J., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2009). Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. *J. Cell. Biochem.* 107, 873–880.
- Yamamoto, T., Nishida, T., Miyajima, N., Kawai, S., Ooi, T., and Toyoshima, K. (1983). The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family. *Cell* 35, 71–78.
- Yan, M., Parker, B.A., Schwab, R., and Kurzrock, R. (2014). HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. *Cancer Treat. Rev.* 40, 770–780.
- Yan, M., Schwaederle, M., Arguello, D., Millis, S.Z., Gatalica, Z., and Kurzrock, R. (2015a). HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer Metastasis Rev.* 34, 157–164.
- Yan, Y., Hein, A.L., Greer, P.M., Wang, Z., Kolb, R.H., Batra, S.K., and Cowan, K.H. (2015b). A novel function of HER2/Neu in the activation of G2/M checkpoint in response to γ -irradiation. *Oncogene* 34, 2215–2226.
- Yang, D., Kroe-Barrett, R., Singh, S., Roberts, C.J., and Laue, T.M. (2017). IgG cooperativity - Is there allosteric? Implications for antibody functions and therapeutic antibody development. *MAbs* 9, 1231–1252.
- Yao, Y., Wang, G., Li, Z., Yan, B., Guo, Y., Jiang, X., and Xi, Z. (2010). Mitochondrially localized EGFR is independent of its endocytosis and associates with cell viability. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42, 763–770.
- Yarden, Y., and Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat. Rev. Cancer* 12, 553–563.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.
- Yea, K., Zhang, H., Xie, J., Jones, T.M., Yang, G., Song, B.D., and Lerner, R.A. (2013). Converting stem cells to dendritic cells by agonist antibodies from unbiased morphogenic selections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14966–14971.
- Yea, K., Xie, J., Zhang, H., Zhang, W., and Lerner, R.A. (2015). Selection of multiple agonist antibodies from intracellular combinatorial libraries reveals that cellular receptors are functionally pleiotropic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 26, 1–7.

- Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., and Misra, A. (2013). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials* 34, 8690–8707.
- Yu, T., Li, J., Yan, M., Liu, L., Lin, H., Zhao, F., Sun, L., Zhang, Y., Cui, Y., Zhang, F., et al. (2015). MicroRNA-193a-3p and -5p suppress the metastasis of human non-small-cell lung cancer by downregulating the ERBB4/PIK3R3/mTOR/S6K2 signaling pathway. *Oncogene* 34, 413–423.
- Yue, X., Song, W., Zhang, W., Chen, L., Xi, Z., Xin, Z., and Jiang, X. (2008). Mitochondrially localized EGFR is subjected to autophagic regulation and implicated in cell survival. *Autophagy* 4, 641–649.
- Yun, S., Koh, J., Nam, S.K., Park, J.O., Lee, S.M., Lee, K., Lee, K.S., Ahn, S.-H., Park, D.J., Kim, H.-H., et al. (2018). Clinical significance of overexpression of NRG1 and its receptors, HER3 and HER4, in gastric cancer patients. *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* 21, 225–236.
- Zahavi, E.E., Steinberg, N., Altman, T., Chein, M., Joshi, Y., Gradus-Pery, T., and Perlson, E. (2018). The receptor tyrosine kinase TrkB signals without dimerization at the plasma membrane. *Sci. Signal.* 11.
- Zeng, F., Xu, J., and Harris, R.C. (2009a). Nedd4 mediates ErbB4 JM-a/CYT-1 ICD ubiquitination and degradation in MDCK II cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 1935–1945.
- Zeng, F., Wang, Y., Kloepper, L.A., Wang, S., and Harris, R.C. (2018). ErbB4 deletion predisposes to development of metabolic syndrome in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*
- Zeng, N., Liu, L., McCabe, M.G., Jones, D.T.W., Ichimura, K., and Collins, V.P. (2009b). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes reveals differential expression of the four ERBB4 juxtamembrane region variants between medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35, 353–366.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., and Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125, 1137–1149.
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J., and Rishi, A.K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1978–1986.
- Zhao, W.-Y., Zhuang, C., Xu, J., Wang, M., Zhang, Z.-Z., Tu, L., Wang, C.-J., Ling, T.-L., Cao, H., and Zhang, Z.-G. (2014). HER4 is a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor specifically originated from stomach. *Am. J. Cancer Res.* 4, 838–849.
- Zheng, H., Shen, H., Oprea, I., Worrall, C., Stefanescu, R., Girnita, A., and Girnita, L. (2012). β -Arrestin-biased agonism as the central mechanism of action for insulin-like growth factor 1 receptor-targeting antibodies in Ewing's sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20620–20625.
- Zhou, W., and Carpenter, G. (2000). Heregulin-dependent trafficking and cleavage of ErbB-4. *J. Biol. Chem.* 275, 34737–34743.
- Zhu, W., Li, S., Zou, B., Liu, H., and Wang, S. (2018). Expressions and clinical significance of HER4 and CD44 in sinonasal mucosal malignant melanoma. *Melanoma Res.* 28, 105–110.
- Zhu, Y., Sullivan, L.L., Nair, S.S., Williams, C.C., Pandey, A.K., Marrero, L., Vadlamudi, R.K., and Jones, F.E. (2006). Coregulation of estrogen receptor by ERBB4/HER4 establishes a growth-promoting autocrine signal in breast tumor cells. *Cancer Res.* 66, 7991–7998.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2006). Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 509–517.

Résumé :

Les récepteurs de la famille HER jouent un rôle majeur dans le développement du cancer. Alors qu'EGFR, HER2 et HER3 sont très bien étudiés et ciblés par des anticorps thérapeutiques, le dernier récepteur de cette famille, HER4, n'est que peu étudié et son implication dans la cancérogenèse est controversée. Il n'existe à ce jour pas d'anticorps thérapeutique anti-HER4 sur le marché ou en phase clinique. Ce récepteur est présent à la surface en quatre isoformes (JMa/CYT1 ; JMa/CYT2 ; JMb/CYT1 ; JMb/CYT2). Les isoformes JMa sont activées par clivage du récepteur, contrairement aux deux isoformes JMb. Le clivage de ces isoformes conduit à la libération de la partie intracellulaire du récepteur, appelée 4ICD. Ce fragment peut être dirigée au noyau ou dans d'autres compartiments cellulaires, impliquant HER4 dans des signalisations oncogéniques ou suppresseurs de tumeur. La littérature décrivant une activité pro-apoptotique de 4ICD et de la NRG1, le principal ligand de HER4, nous avons étudié la signalisation de ces isoformes afin de déterminer leurs rôles au niveau tumoral. Nos résultats indiquent que la NRG1 induit une signalisation suppresseur de tumeur *via* JMa/CYT1 et une signalisation oncogénique *via* JMa/CYT2. Sur la base de ces résultats, nous avons développé un criblage original d'anticorps anti-HER4 par *phage display*, sur des cellules exprimant l'isoforme JMa/CYT1 et stimulées par la NRG1. Nous avons caractérisés quatre anticorps anti-HER4, dont l'activité et les signalisations de certains sont modulées par la NRG1. Deux de ces anticorps, caractérisés comme étant des agonistes du récepteur HER4, induisent la mort des cellules tumorales par des mécanismes que nous sommes en train d'élucider. De manière similaire à la NRG1, un des anticorps induit la relocalisation de 4ICD-CYT1 à la mitochondrie pour induire la mort cellulaire. Ces résultats prometteurs ouvrent la voie à un ciblage thérapeutique du récepteur HER4 à l'aide d'anticorps agonistes pour le traitement des cancers.

Abstract:

HER family is composed by four members which play a major role in cancer development. EGFR, HER2 and HER3 are well described and targeted with therapeutic monoclonal antibodies. HER4, the last one, is poorly described with a contentious role in cancerogenesis. Nowadays, there is no therapeutic antibody targeting HER4 in clinic. Four isoforms of the receptor are addressed to the plasma membrane and are called JMa/CYT1; JMa/CYT2; JMb/CYT1 and JMb/CYT2. JMa isoforms are activated by cleavage, but not JMb isoforms. Following their activation, JMa isoform cleavage releases the intracellular part of the receptor called 4ICD. This part can be directed to the nucleus or others subcellular compartments, involving HER4 in oncogenic or tumor suppressor signalling. Because a pro-apoptotic activity of 4ICD and its main ligand NRG1 have been described, we studied JMa isoforms signalling to determine their roles in cancer. We demonstrated that NRG1 induce a tumor suppressor signalling from JMa/CYT1 and an oncogenic signalling from JMa/CYT2. Based on these results, we developed an innovative screening for anti-HER4 antibodies by whole cell panning with phage display. To this end, we used NRG1-stimulated cells expressing JMa/CYT1 isoforms. We characterized four anti-HER4 antibodies and functions of some of them are affected and modulated by NRG1. Two antibodies were characterized as agonistic anti-HER4 antibodies and induce cell death of cancer cells by different mechanisms. Like NRG1, one of them induce mitochondrial localization of 4ICD-CYT1 to induce cell death. These promising results pave the way to a therapeutic targeting of HER4 receptor with agonistic antibodies to treat cancer.