



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription ZEB1 dans la progression et chimiorésistance du cholangiocarcinome

Cindy Lobe

► **To cite this version:**

Cindy Lobe. Rôle du facteur de transcription ZEB1 dans la progression et chimiorésistance du cholangiocarcinome. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT: 2019SORUS618 . tel-03368133

HAL Id: tel-03368133

<https://theses.hal.science/tel-03368133v1>

Submitted on 6 Oct 2021

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.

Sorbonne Université

École Doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique – ED
394

Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM UMR_S938

Équipe « Maladies fibro-inflammatoires d'origine métabolique et biliaire du
foie »

Rôle du facteur de transcription ZEB1 dans la progression et la chimiorésistance du cholangiocarcinome

par Cindy LOBE

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique
Dirigée par Dr Laura FOUASSIER

Présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2019

Devant un jury composé de :

DUVAL Alex, Professeur des Universités
CAMEL Julie, Chargé de Recherche
GASSAMA-DIAGNE Ama, Directeur de Recherche
BOSSARD Pascale, Chargé de Recherche
PARADIS Valérie, Professeur des Universités
FOUASSIER Laura, Chargé de Recherche

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, qui m'ont fait l'honneur de consacrer de leur temps afin d'évaluer la qualité et la pertinence de mes travaux.

Aux Docteurs Julie Caramel et Ama Gassama,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant que rapporteur, avec ce que cela implique d'investissement professionnel. Soyez assurées de ma reconnaissance.

Au Professeur Alex Duval,

Merci infiniment d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'en assurer la présidence.

Au Docteur Pascale Bossard,

Je vous remercie de votre aide généreuse et de vos précieux conseils qui m'ont été bénéfiques pour la réalisation de ma thèse. Je vous suis reconnaissante de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

Au Professeur Valérie Paradis,

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

J'ai eu la chance, de réaliser mon doctorat dans une grande équipe accueillante et toujours à l'écoute. Ma reconnaissance est grande vis à vis de toutes ces personnes avec qui j'ai partagé ces quatre années importantes de ma vie.

Au Docteur Laura Fouassier,

Merci pour cette belle expérience qui dépasse et de loin l'apprentissage académique. Merci de m'avoir guidée et encadrée tout au long de ces années, depuis le master 2, en faisant preuve d'une grande patience à mon égard. Vous m'avez donné la chance de m'immerger dans le monde de la recherche scientifique, avec ce que cela représente en termes de rigueur

et de ténacité. Merci, d'avoir veillé à ce que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions possibles. La dernière année fut une année très difficile mais avez toujours su me montrer votre soutien et me motiver. Vous avez été extrêmement compréhensive et pour tout cela je voulais vous dire un grand MERCI. Ce fut un réel plaisir pour moi de travailler à vos côtés.

Au Docteur Javier Vaquero,

Merci infiniment pour tout le temps que tu as consacré à me former et à m'encadrer durant ces longues années de travail, depuis le master 2. Tu m'as énormément appris dans le domaine de la recherche et tu as été un réel mentor pour moi, « my big brother in sciences » like I always said. Merci pour ton aide généreuse, tes précieux conseils et surtout merci d'avoir fait en sorte que ce projet se réalise. Tu es un vrai exemple à suivre et ce fut un plaisir pour moi de travailler à vos côtés.

A la Ligue Contre le Cancer

Sans qui cette expérience de vie et l'apport scientifique qui en découle n'auraient pas eu lieu. Merci à toutes ces personnes, qui par leurs dons à la ligue, ont participé au financement de ce doctorat. Le cancer est une pathologie dévastatrice et complexe, nombre de gens attendent des réponses, des pistes à exploiter pour lutter contre plaie. J'espère sincèrement avoir apporté une pierre solide à l'édifice qui, un jour, vaincra cette maladie.

Au Professeur Chantal Housset,

Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe dans laquelle j'ai eu le plaisir de réaliser ce doctorat. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre sens critique et vos conseils avisés dont j'ai pu bénéficier un bon nombre de fois.

Au Docteur Ander Arbelaiz,

Je te remercie pour nos échanges constructifs, ta gentillesse et tout le soutien que tu as pu m'apporter. Et surtout merci pour tes bonnes blagues et ta bonne humeur quotidienne.

Au Docteur Anne Stary,

Merci pour tous tes conseils accompagnés de ta sympathie. Merci de ton aide précieuse pour la réalisation de ce projet.

A Marie Valette

Merci pour le travail de grande qualité que tu as fourni pour la réalisation de ce projet et cela dans la bonne humeur. Merci pour ta gentillesse, ce fut un plaisir de travailler avec toi.

Au Docteur Lynda Aoudjehane

Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci pour tous tes conseils, ton soutien et ta bonne humeur.

Au Docteur Ester Gonzalez, Marie Clavel et Alix Bruneau

Merci de votre sympathie et d'avoir toujours été une oreille attentive à mon égard durant cette dernière année de thèse. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés.

Au Professeur Françoise Praz,

Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe dans laquelle j'ai eu le plaisir de réaliser ce doctorat.

A Claire Calmel,

Merci pour ta gentillesse et tes précieux conseils toujours accompagnés d'un sourire. Merci d'avoir veillé à notre sécurité et à notre confort à tous, au laboratoire comme au bureau.

A Olivier Buhard et Nathalie Ferrand

Merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils, délivrés avec gentillesse.

A mes anciennes collègues devenues amies Eva Benabou et Sylvana Tarahoui

Merci à vous PG et MG (vous me comprendrez) pour toutes ces belles années de travail passées ensemble et d'avoir été d'un grand soutien. De vrais liens d'amitiés se sont créés et ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Merci également au Docteur Astrid Kamgeng, au Docteur Tounsia Ait Slimane, Jean-Louis Delaunay, Yves Chrétien, au Docteur Axelle Cadoret et tout le reste de l'équipe.

Merci aux responsables de plateformes de cytométrie, d'imagerie et d'animalerie : Annie Munier-Godebert, Romain Morichon et Tatiana Ledent.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de projet.

A ma famille et mes proches,

A mes tantes Gisèle, Annie et Betty ainsi que mes oncles Christophe et Henri,

A mes frères, Yohane, Steve et Cédric,

A mes parents Isaac et Chantal,

A Louis-Frédéric,

Merci pour votre soutien inconditionnel, vous êtes ma force et ce que j'ai de plus précieux.

Enfin et surtout, merci à mes raisons de vivre, Aliyah et Samuel.

Table des matières

Liste des abréviations.....	8
Table des figures.....	12
1 INTRODUCTION : GENERALITES.....	13
1.1 Le foie.....	13
1.2 Les voies biliaires.....	15
1.2.1 Anatomie.....	15
1.2.2 Les cholangiocytes.....	16
1.2.3 Les cholangiopathies.....	16
1.3 Cholangiocarcinome.....	17
1.3.1 Aspects généraux.....	17
1.3.2 Classification.....	19
1.3.3 Facteurs de risque.....	20
1.3.4 Mécanismes moléculaires de carcinogénèse du CCA.....	22
1.3.4.1 Altérations génétiques et épigénétiques.....	23
1.3.4.2 Facteurs et voies de signalisation.....	25
1.3.4.2.1 Facteurs endocriniens et neuroendocriniens.....	25
1.3.4.2.2 Facteurs de croissance.....	26
1.3.4.2.3 Composés biliaires.....	27
1.3.4.2.4 Voies de signalisation du développement embryonnaire.....	28
1.3.4.2.5 Facteurs inflammatoires.....	28
1.3.4.3 Microenvironnement tumoral.....	29
1.3.4.3.1 Fibroblastes associés au cancer (CAFs).....	29
1.3.4.3.2 Cellules immunitaires.....	30
1.3.5 Diagnostique du CCA.....	31
1.3.6 Traitement et pronostic.....	33
1.4 Voie du récepteur de l'EGF (EGFR) dans le cholangiocarcinome.....	34
1.4.1 Récepteur de l'EGF (EGFR).....	34
1.4.2 Activation du récepteur et voie de signalisation.....	37
1.4.2.1 Cascade des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK).....	38
1.4.2.2 Voie de la Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K).....	39
1.4.2.3 Voie Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT).....	39
1.4.3 Rôle physiologique de EGFR.....	40
1.4.4 Rôle de EGFR dans le cholangiocarcinome.....	40
1.4.5 Altérations de la voie EGFR dans la carcinogénèse du CCA.....	41
1.4.6 Thérapies anti-EGFR dans le cholangiocarcinome.....	42
1.4.6.1 Inhibiteurs d'EGFR et leur mode d'action.....	42
1.4.6.2 Inhibiteurs d'EGFR testés dans le CCA.....	43
1.5 Résistance aux thérapies ciblant EGFR dans le cholangiocarcinome.....	46
1.5.1 Résistance primaire.....	46
1.5.1.1 Altérations d'EGFR.....	46
1.5.1.2 Altérations de KRAS.....	46
1.5.1.3 Altérations de BRAF.....	47
1.5.2 Résistance secondaire.....	48
1.5.2.1 Activation de voies de signalisation alternatives.....	48

1.5.2.1.1	Signalisation Hepatocyte Growth Factor Receptor /Hepatocyte Growth Factor (MET/HGF)	48
1.5.2.1.2	Signalisation IGF	50
1.5.2.2	La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	52
1.5.2.2.1	Généralités	52
1.5.2.2.2	Lien entre la TEM et l'acquisition de propriétés de CSC	60
1.5.2.2.3	TEM et CSC dans le CCA	61
1.5.2.3	TEM et CSC dans la résistance aux anti-EGFR	63
1.5.2.4	Rôle du microenvironnement tumoral dans la résistance aux anti-EGFR	65
1.6	Facteur de transcription ZEB1	66
1.6.1	Généralités	66
1.6.2	ZEB1 dans l'initiation et la progression tumorale	68
1.6.2.1	ZEB1 et voies de signalisation	68
1.6.2.1.1	Voie Wnt/B-caténine	68
1.6.2.1.2	Voie RAS/ERK	69
1.6.2.1.3	Voie TGF- β	69
1.6.2.1.4	Voie PI3K/Akt	70
1.6.2.2	ZEB1 dans la régulation de la TEM	70
1.6.2.3	ZEB1 dans la régulation du phénotype de CSC	72
1.6.2.4	ZEB1 dans la régulation épigénétique	74
1.6.2.5	Autres fonctions de ZEB1	75
1.6.3	ZEB1 dans la résistance aux traitements	77
1.6.3.1	Radiorésistance	77
1.6.3.2	Résistance aux chimiothérapies conventionnelles	79
1.6.3.3	Résistance aux thérapies ciblées	80
1.6.4	Schéma récapitulatif des différentes fonctions oncogéniques de ZEB1	81
1.6.5	ZEB1 dans le CCA	81
2	OBJECTIFS DE LA THESE	82
3	RESULTATS	84
3.1	Article 1 : The IGF2/IR/IGF1R Pathway in Tumor Cells and Myofibroblasts Mediates Resistance to EGFR Inhibition in Cholangiocarcinoma	84
3.2	Editorial: Unveiling resistance mechanisms to EGFR inhibitors in cholangiocarcinoma	116
3.3	Article 2 : Role of transcription factor ZEB1 in cholangiocarcinoma progression and chemoresistance	119
4	CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION	147
5	BIBLIOGRAPHIE	158

Liste des abréviations

ABC : ATP binding cassette

ALDH: Aldehyde deshydrogenase

ASCO: American society of clinical oncology

α -SMA : actine-alpha d e type musculaire lisse

BAP1: BRCA1-associated protein 1

Bcl: B-cell lymphoma

BMI1: Polycomb complex protein

BRAF: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

BRCA1: Breast cancer 1

CA19-9: Carbohydrate antigene 19-9

CAF: Cancer-associated fibroblast

CBP : CREB-binding protein

CCA : Cholangiocarcinome

CCAd : Cholangiocarcinome distal

CCAe : Cholangiocarcinome extrahépatique

CCAi : Cholangiocarcinome intrahépatique

CCAp : Cholangiocarcinome péri-hilaire

CD : Cluster differentiation

CDKN : cyclin dependent kinase inhibitor

CEA : Carcinoembryonic antigen

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CHK1 : Checkpoint Kinase 1

COX : Cycloxygénase

CPRE : cholangio-pancréatographie rétrograde endoscopique

CREB : C-AMP Response Element-binding protein

CSC : Cellule souche cancéreuse

CSP : Cholangite sclérosante primitive

CtBP : C-terminal binding protein

CXCL : Stromal cell-derived factor 1 ligand

CXCR : Stromal cell-derived factor 1 receptor

DKK1: Dickkopf-related protein 1
DNMT3B: DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
EBP50: Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50
EGF: Epidermal growth factor
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule
ER: Estrogen receptor
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
ESRP1: Epithelial Splicing Regulatory Protein 1
Fas: Apoptosis stimulating fragment
FBP1: Fructose-1,6-bisphosphatase 1
FGF: Fibroblast growth factor
FGFR: Fibroblast growth factor receptor
FISH: Fluorescence in situ hybridization
FTY720: Fingolimod
FXR: Farnesoid X receptor
GEMOX: Gemcitabine et oxaliplatine
GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β
HAT: Histone acetyl transferase
HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor
HDAC: Histone desacetyl transferase
HER: Human epithelial growth factor receptor
HGF: Hepatocyte growth factor
HH : Hedgehog
(s)HH : Sonic edgehog
IDH : Isocitrate dehydrogenase
IGF: insulin-like growth factor
IGF1R: insulin-like growth factor receptor 1
IL : Interleukin
IR : Insulin receptor
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITK : Inhibiteur de l'activité tyrosine kinase

JAK: Janus kinase

KLF4: Kruppel-like factor 4

KMT2C: Lysine N-methyltransferase 2C

KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LAM2: Laminin subunit gamma-2

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MDM2: Murine double minute 2

MEF: Mouse embryonic fibroblast

MEF2D: Myocyte enhancer factor 2D

MET: Hepatocyte growth factor receptor

miR: microRNA

MLL: Mixed lineage leukemia

MMP: Matrix metalloproteinases

mTOR: mechanistic target of rapamycin

NOS: Nitric oxide synthase

(i)NOS: Inducible nitric oxide synthase

PBRM1: Polybromo 1

PCAF: P300/CBP-associated factor

PD1: Program cell death

PDL-1: Program cell death-ligand 1

PDGF: Platelet-derived growth factor

PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor

PEAK1: Pseudopodium enriched atypical kinase 1

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

PRMT1: Protein arginine N-methyltransferase 1

PTPN3: Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 3

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

RHEB: Ras Homolog Enriched in Brain

RT-qPCR : quantitative real-time polymerase chain reaction

S1PR2: Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2

SAHF: Senescence-Associated Heterochromatic Foci
SDF1: Stromal cell-derived factor 1
SH: Src homology
SOS1: Son of sevenless homolog 1
SOX: Sry-related HMG box
ST14: Suppression of tumorigenicity 14
STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
TAM: Tumor-associated macrophages
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
(h)TERT : (human) Telomerase reverse transcriptase
TCF8: Transcription factor 8
TF : Transcription Factor
TGF β : Transforming growth factor
TP53: Tumor protein 53
TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex 2 ou Tuberin
TME: Transition mésenchymo-épithéliale
TMZ : Temozolomide
uPA : Urokinase-type plasminogen activator
USP7 : Ubiquitin specific protease 7
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGF: Vascular endothelial growth factor receptor
VHB : Virus de l'hépatite B
VHC : Virus de l'hépatite C
ZEB1/2: Zinc finger E-box binding homeobox 1/2

Table des Figures

Figure 1 : Le foie dans le système digestif.....	13
Figure 2 : Structure des lobules hépatiques.....	15
Figure 3 : Anatomie des voies biliaires.....	16
Figure 4 : Diagramme des étiologies les plus pertinentes associées aux cholangiopathies.....	17
Figure 5 : Incidence mondiale du cholangiocarcinome au cours de la période 1971-2009.....	18
Figure 6 : Classification du cholangiocarcinome.....	19
Figure 7 : Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération et l'apoptose dans le cholangiocarcinome.....	27
Figure 8 : Résumé des classes de CCAi.....	29
Figure 9 : Diagnostic du CCA par tomographie axiale informatisée (CT) et IRM.....	32
Figure 10 : Structure schématique d'EGFR.....	35
Figure 11 : Famille ErbB.....	36
Figure 12 : Représentation schématique de l'activation de EGFR.....	38
Figure 13 : Mécanisme d'échappement aux traitements des anti-EGFR.....	50
Figure 14 : Représentation schématique des récepteurs de la signalisation IGF : IR, IGF1R et récepteur hybride IR/IGF1R.....	51
Figure 15 : Événements clés durant la TEM.....	54
Figure 16 : Les trois différents types de TEM.....	55
Figure 17 : Voies de signalisation et acteurs impliqués dans la régulation de la TEM dans le CCA.....	59
Figure 18 : Perspectives de stratégie thérapeutique ciblant les CSC.....	65
Figure 19 : Représentation schématique de la protéine ZEB1.....	67
Figure 20 : Représentation schématique du lien entre l'expression de ZEB1 et de CD44s.....	74
Figure 21 : Fonctions oncogéniques du facteur de transcription ZEB1.....	81
Figure 22 : Role of ZEB1 in metabolism dysregulation of CCA cells.....	154
Figure 23 : Role of ZEB1 in cell cycle regulation of CCA cells.....	156

1 Introduction : généralités

1.1 Le foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain, avec ses 1,5 kg chez l'adulte, et fait partie de l'appareil digestif. Il se situe sous le diaphragme, dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale, au-dessus de l'estomac (Figure 1). Il remplit de nombreuses fonctions vitales telles que :

- le stockage des nutriments (glycogène, vitamines, minéraux, etc.),
- la production de bile pour faciliter l'absorption des graisses et des vitamines liposolubles lors de la digestion,
- la synthèse de nombreuses protéines plasmatiques (albumine, lipoprotéines, facteurs de coagulation, enzymes, acides aminés non essentiels, etc.) et lipides (triglycérides et cholestérol)
- la détoxification de substances nocives [Feldman M., Friedman L.S. and Brandt, L.J., Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease – 2 Volume Set. 2015: ELSEVIER].



Figure 1 : Le foie dans le système digestif. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-foie/Anatomie-du-foie>.

Au niveau cellulaire, le foie est composé de cellules épithéliales, endothéliales et stromales. Les cellules épithéliales regroupent les hépatocytes qui forment le parenchyme hépatique, et les cellules qui tapissent les voies biliaires, appelées cholangiocytes. Les cellules endothéliales sont des cellules sinusoidales formant les capillaires hépatiques, tandis que les cellules présentes dans le stroma hépatique sont composées de fibroblastes, de cellules étoilées du foie qui stockent la vitamine A, de cellules immunitaires (parmi lesquelles les cellules de Kupffer ou macrophages hépatiques), mastocytes et leucocytes [Feldman M., Friedman L.S. and Brandt, L.J., Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease – 2 Volume Set. 2015: ELSEVIER].

Les hépatocytes constituent le type cellulaire le plus abondant du foie (environ 80%) et assurent la plupart des fonctions hépatiques. Les cholangiocytes, même s'ils représentent entre 3 et 5% de toutes les cellules du foie, remplissent des fonctions essentielles telles que la production, la régulation et le transport de la bile. Le reste des cellules non épithéliales participe au maintien structurel, fonctionnel et de défense de l'organe.

Au niveau structurel, l'unité fonctionnelle hépatique principale est constituée de lobules hépatiques, structures polyédriques, principalement hexagonales, formées par des feuillettes d'hépatocytes disposés radialement autour d'une veine centrale. À l'extérieur de ces lobules se trouve la triade porte, formée d'une branche de la veine porte, d'une artère et du canal biliaire (Figure 2).

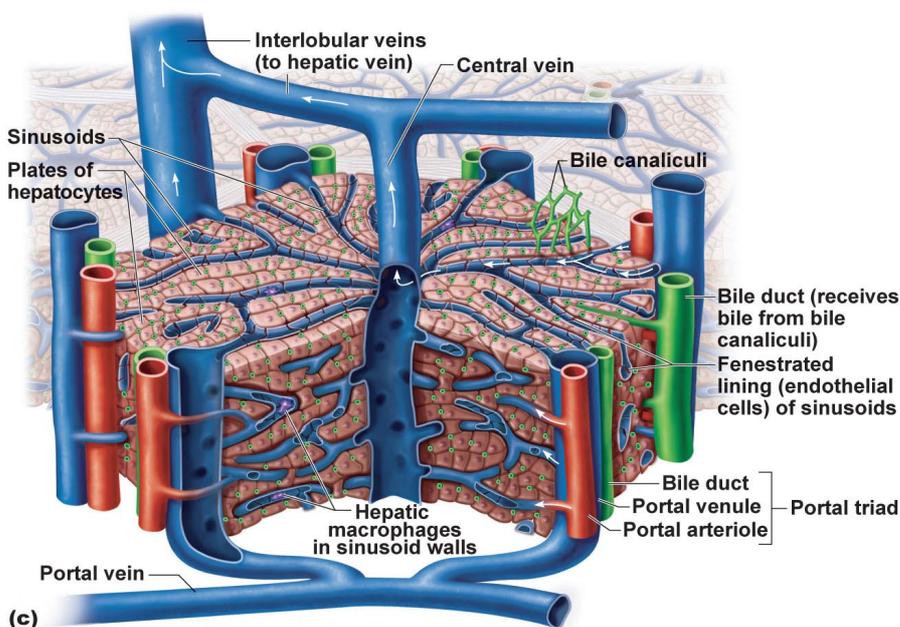


Figure 2: Structure des lobules hépatiques. 2011 Pearson Education, Inc. <https://www.pinterest.se/pin/369928556874116837>.

1.2 Les voies biliaires

1.2.1 Anatomie

Les voies biliaires sont constituées d'un système de canaux recouverts de cholangiocytes qui régulent la production et la composition de la bile générée par les hépatocytes dans le foie et la transportent dans la vésicule biliaire ou elle est stockée avant d'atteindre l'intestin grêle (duodénum) au moment des repas. La bile générée dans les canalicules hépatocytaires circule dans les canaux biliaires des triades portales, puis dans les canaux hépatiques droit et gauche qui sont unifiés dans le canal hépatique commun. Celui-ci rejoint le canal cystique qui mène à la vésicule biliaire, formant le canal biliaire principal (ou cholédoque) qui se jette dans le duodénum (Figure 3). Anatomiquement, les voies biliaires sont divisées en canaux biliaires intrahépatiques (petits canaux à l'intérieur du foie), périhilaires (zone située entre la confluence des canaux hépatiques droit et gauche jusqu'à celle du canal cystique et le canal cholédoque) et distal (canal cholédoque) [LaRusso, M.F.a.N.F., Gastroenterology and Hepatology: Gall Bladder and Bile Ducts. Vol. 6. 2006].

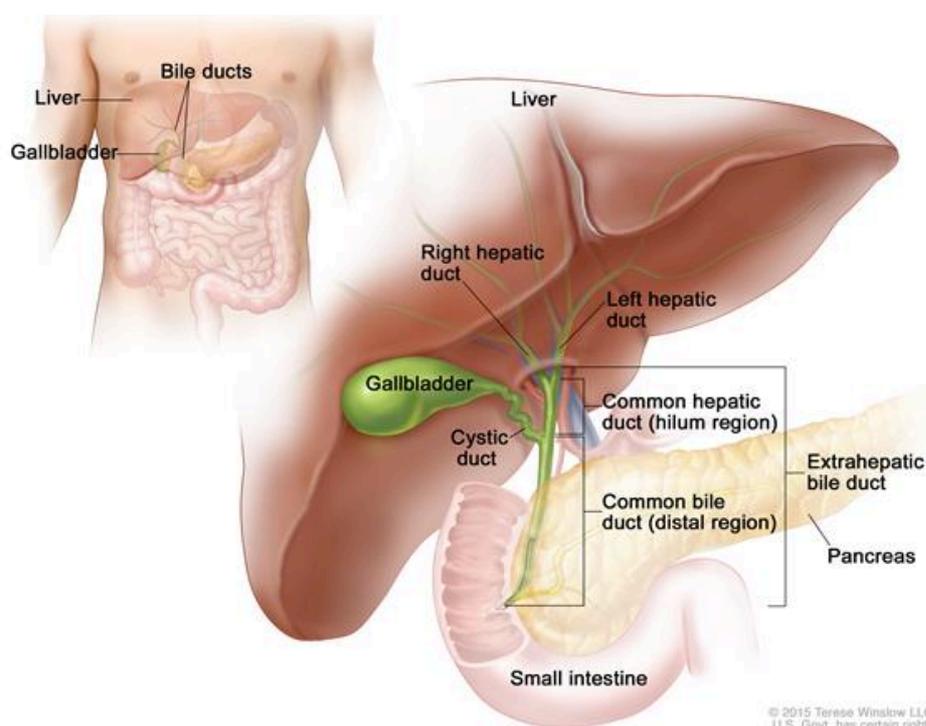


Figure 3 : Anatomie des voies biliaires. 2015 Terese Winslow LLC

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/extrahepatic-bile-duct>.

1.2.2 Les cholangiocytes

Les cholangiocytes sont des cellules importantes pour le bon fonctionnement du foie. D'un point de vue biologique, ces cellules jouent un rôle clé dans la régulation de la composition de la bile générée dans les hépatocytes, en favorisant la réabsorption des sels biliaires ainsi que leur alcalinisation et leur fluidisation, ce qui donne une bile riche en bicarbonate capable de neutraliser dans le duodénum le pH acide provenant de l'estomac après un apport alimentaire [1].

1.2.3 Les cholangiopathies

D'un point de vue pathologique, les cholangiocytes sont la cible de diverses maladies appelées "cholangiopathies" [8]. Selon leur étiologie, les cholangiopathies sont classées comme suit :

- a) associées à des processus auto-immuns [telles que la cholangite biliaire primitive [2] (CBP) et la cholangite sclérosante primitive [3] (CSP), etc.],
- b) infectieuses (*Cryptosporidium parvum* [4], etc.),
- c) génétiques [maladie polykystique du foie [5], fibrose kystique [6], syndrome d'Alagille (SAG) [7], etc.],
- d) causées par des altérations vasculaires (cholangiopathies post-ischémiques [8], etc.),
- e) néoplasiques (cancer biliaire ou cholangiocarcinome [9]),
- f) médicamenteuses (fluoracile, etc.) [10], ou
- g) idiopathiques (atrésie biliaire [11], sarcoïdose biliaire idiopathique [12], etc.) (Figure 4).

Ces pathologies biliaires sont généralement caractérisées par une inflammation chronique, une réaction canalaire et une fibrose péri-canalaire.

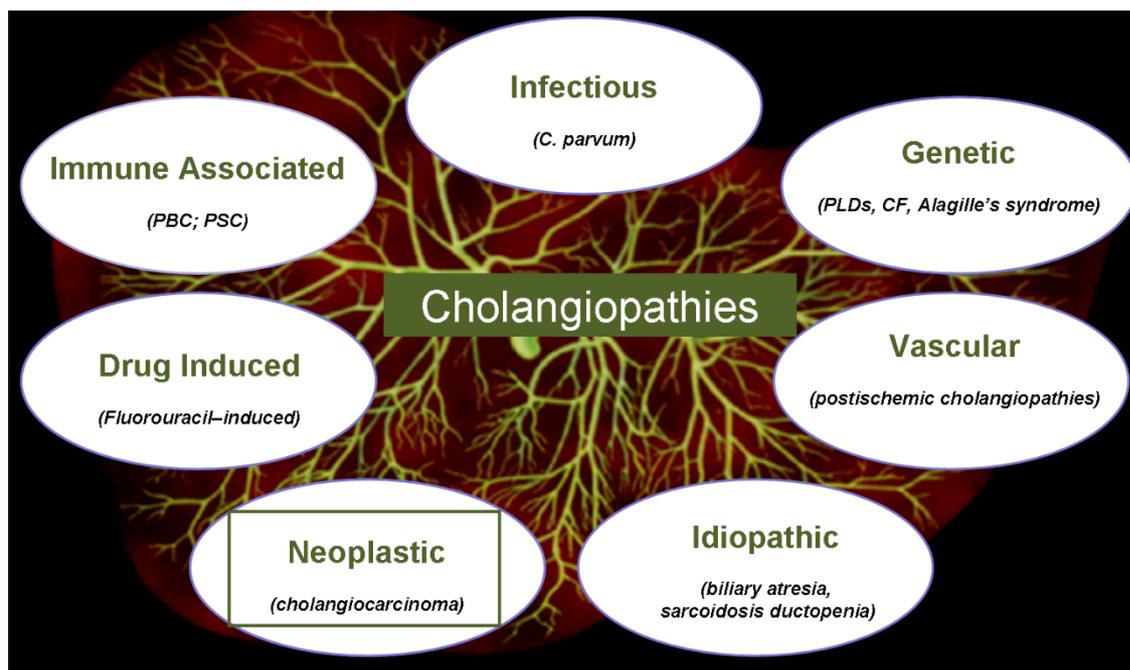


Figure 4 : Diagramme des étiologies les plus pertinentes associées aux cholangiopathies.

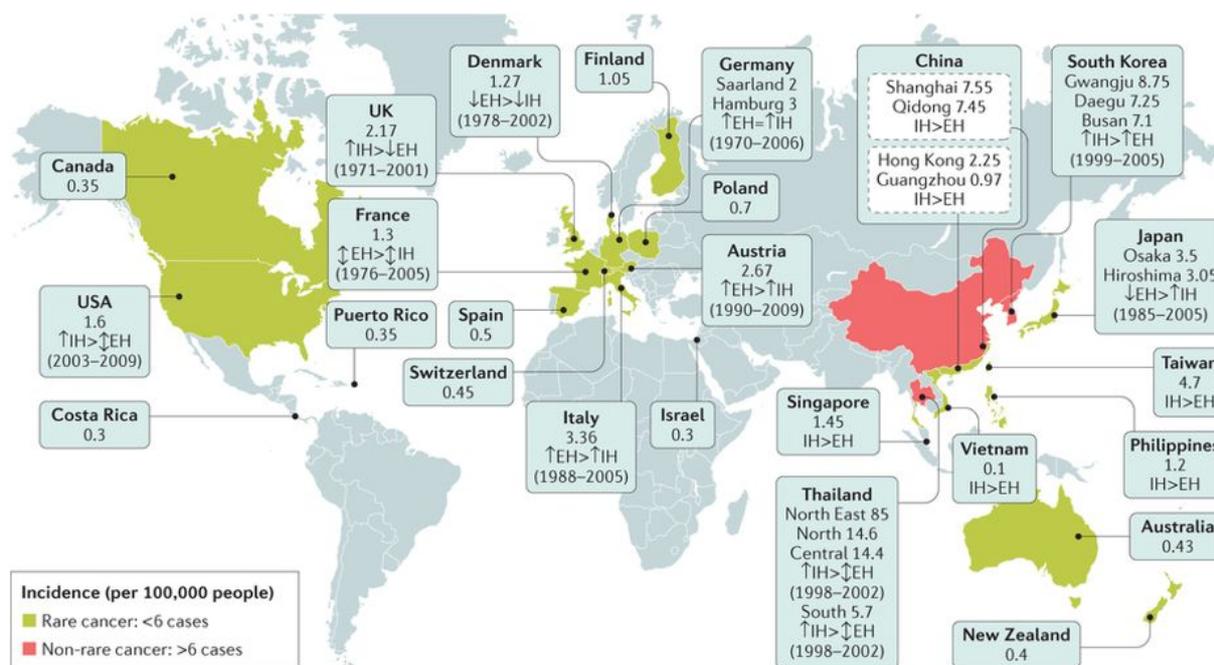
1.3 Cholangiocarcinome

1.3.1 Aspects généraux

Le cholangiocarcinome (CCA) constitue un groupe hétérogène de tumeurs malignes pouvant émerger en tout point de l'arbre biliaire [13]. En fonction de leur localisation anatomique, on distingue les CCA intrahépatique (CCAI), péri-hilaire (CCAp) et distal (CCAd), qui présentent des similitudes particulières, mais également des différences importantes inter et intra-tumorales pouvant affecter la pathogénèse et le devenir de la maladie. Indépendamment de sa localisation, le CCA représente le 2ème cancer primitif du foie après le carcinome hépatocellulaire (CHC) et environ 3% des néoplasies gastro-intestinales. Le CCA est principalement dû à la transformation maligne des cellules épithéliales biliaires, appelées également cholangiocytes, bien qu'il puisse être également généré à partir de cellules souches hépatiques ou de cellules progénitrices des glandes péri-biliaires [14].

Globalement, il s'agit d'une tumeur peu fréquente avec une incidence ne dépassant pas 6 cas pour 100 000 habitants mais celle-ci est exceptionnellement élevée en Asie du Sud-Est, pouvant dépasser 80% des cas pour 100 000 habitants notamment en Thaïlande. Ceci s'explique principalement par les infections parasitaires endémiques causées par les douves *Opisthorchis viverrini* et *Clonorchis sinensis* [13]. Dans les pays occidentaux, bien que

l'incidence du CCA soit beaucoup plus faible que celle des pays d'Asie du Sud-Est, l'incidence globale, notamment du CCAi, semble augmenter [15]. En France par exemple, on compte 1,3 cas pour 100 000 habitants [16]. Quant au développement de cette pathologie, il existe une prédominance masculine et l'âge moyen du diagnostic est d'environ 70 ans [13, 17] (Figure 5).



Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology

Figure 5 : Incidence mondiale du cholangiocarcinome au cours de la période 1971-2009. Les pays avec la plus faible incidence sont en vert (<6/100 000 cas, cancer rare), alors que les pays avec la plus forte incidence sont en rose (>6/100 000 cas). La forme avec la plus forte incidence (intrahépatique (IH) versus extrahépatique (EH)) et la tendance de l'incidence (↑ augmentation, ↓ stabilité, ↓ diminution) sont indiquées si les données sont disponibles [13].

1.3.2 Classification

À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus concernant la classification du CCA et celle-ci est devenue un sujet de débat intense. En effet, considérant les différents aspects de ces tumeurs, plusieurs classifications ont été proposées. La classification la plus contemporaine est basée sur la localisation anatomique de la tumeur et classe le CCA en trois entités distinctes, d'étiologie et pathogénie différentes citées précédemment : les CCAi, CCAp ou tumeur de Klastkin et CCAe. Les CCAi se localisent dans les petits canaux biliaires du foie juste avant d'atteindre les canaux biliaires hépatiques droit et gauche. Les CCAp incluent la voie biliaire hépatique principale et les voies biliaires hépatiques droite et gauche, et les CCAe se situent dans la voie biliaire principale, au-delà de l'insertion du canal cystique, à l'extérieur du foie (Figure 6) [18]. À côté de cette classification anatomique, le groupe japonais du cancer du foie (Japanese Liver Cancer Group) a identifié trois formes morphologiques distinctes selon l'aspect macroscopique de ces tumeurs : a) exophytique (*mass forming* ou *exophytic*) formant une masse de cellules tumorales affectant à la fois le canal biliaire et le parenchyme hépatique, b) péricanalaire (*periductal* ou *infiltrating*) dans laquelle les cellules cancéreuses se développent à l'intérieur du canal biliaire et infiltrent la paroi du canal et c) endocanalaire (*intraductal* ou *polypoid*) présentant une croissance tumorale papillaire dans le canal biliaire [19-21]. La plupart des CCA présentent une croissance « mass-forming », bien que les CCAp présentent généralement une croissance péricanalaire (Figure 6) [20].

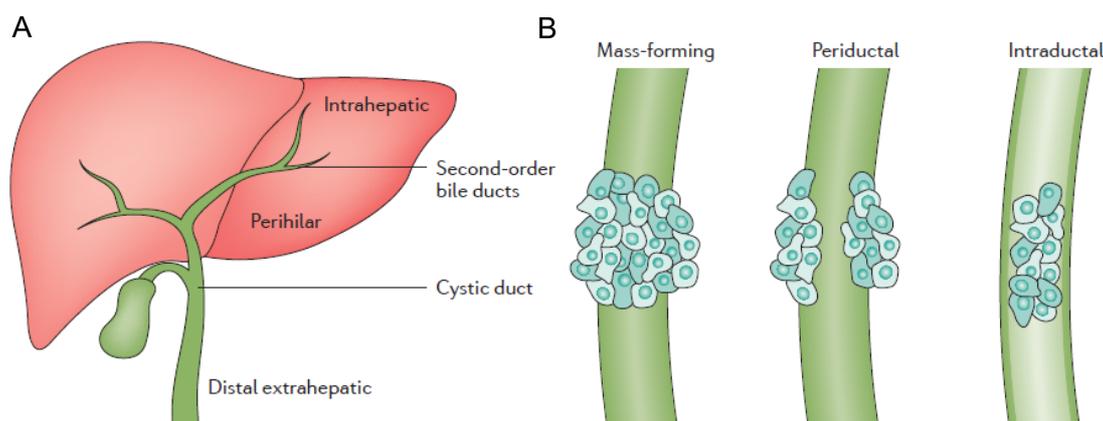


Figure 6 : Classification du cholangiocarcinome. A) Classification anatomique des différents CCAs. B) Différents types de CCAi basés sur leurs aspects macroscopiques [13].

Concernant les caractéristiques histologiques des différents CCAs, les CCAp et CCA_d sont généralement caractérisés comme étant des adénocarcinomes mucineux. Contrairement aux autres CCA, les CCA_i sont des tumeurs très hétérogènes, présentant deux sous-types histologiques principaux, reflétant leur origine anatomique le long de l'arbre biliaire intrahépatique : le type mixte, provenant de petits canaux biliaires intrahépatiques et le type mucineux, provenant de gros canaux biliaires intrahépatiques [18, 19, 22-24]. Cette sous-classification histologique correspond à différentes caractéristiques clinico-pathologiques. Les CCA_i de type mixte présentent presque exclusivement un schéma de croissance « mass-forming », sont fréquemment associés à des maladies hépatiques chroniques (hépatite virale ou cirrhose) [18] et ne sont pas précédés de lésions pré-néoplasiques [18, 22-24]. D'autre part, les CCA_i de type mucineux peuvent présenter tous les types de croissance : « masse-forming », infiltration périductale, croissance intracanalair. Ils sont plus fréquemment associés à une cholangite sclérosante primitive (CSP) que les CCAs de type mixte et peuvent être précédés de lésions pré-néoplasiques telles que le néoplasme intraépithélial biliaire ou le néoplasme papillaire intracanalair. [18, 19, 22, 23] [24].

1.3.3 Facteurs de risque

La plupart des CCA ont une étiologie inconnue [9, 13, 17]. Cependant, plusieurs facteurs de risque prédisposent à son développement, tels que les infections parasitaires hépatiques, la présence de pathologies hépatiques telles que la cirrhose ou des pathologies biliaires telles que la cholangite sclérosante primitive (CSP), les malformations congénitales du canal biliaire (maladie de Caroli et kystes biliaires), la présence de calculs biliaires (la lithiase biliaire), les infections virales chroniques [hépatite virale B (VHB) ou C (VHC)], le syndrome métabolique (syndrome X) ou encore l'exposition à certaines substances toxiques (alcool, tabac, amiante, nitrosamines, etc.) (Tableau 1) [13]. Les infections parasitaires par les douves *Opisthorchis viverrini* et *Clonorchis sinensis* sont un facteur de risque important pour le développement du CCA_i dans les régions d'Asie de l'Est, où cette tumeur a une incidence élevée et constitue le principal cancer primitif du foie [13].

L'association du CCA à la CSP est bien établie, surtout en Europe, mais la CSP reste une maladie rare pour laquelle le risque de développer un CCA chez les patients atteints de CSP est de 10 à 15% (incidence mondiale : environ 1/100 000), [25, 26], tandis qu'il est de 6 à 30% dans le cas de la maladie de Caroli, une pathologie congénitale rare affectant les voies biliaires

intrahépatiques [27]. D'autres études démontrent également une association entre le syndrome métabolique et le CCA, ce qui pourrait entraîner une augmentation de l'incidence dans les pays occidentaux compte tenu de la prévalence croissante de l'obésité [28, 29]. D'autres pathologies, telles que la lithiase biliaire, prédisposent également au développement du CCAi d'environ 7% [30]. Toutes ces pathologies sont généralement liées à des processus inflammatoires chroniques associés à une fibrose et à une réaction ductulaire en tant que mécanismes de réponse aux lésions tissulaires [13], qui favorisent à leur tour la transformation néoplasique des cholangiocytes [31].

Facteurs de risque du cholangiocarcinome
Généraux Age >65 ans Obésité Diabète
Maladies inflammatoires Cholangite sclérosante primitive Lithiase hépatique (Cholangiohépatite orientale) Calculs de l'arbre biliaire Anastomose bilio-digestive Cirrhose hépatique
Maladies infectieuses <i>Opisthorchis viverrini</i> (douve du foie) <i>Clonorchis sinensis</i> (douve du foie) Hépatite B Hépatite C Infection VIH
Drogues, toxines et produits chimiques Alcool Tabac Thorotraste Dioxine Vinyl chloride Nitrosamines Asbestose Pilule contraceptive orale Isoniazide
Congénitaux Kystes du cholédoque (type I, solitaire, extrahépatique ; type IV, extrahépatique et intrahépatique) Maladie de Caroli Fibrose hépatique congénitale

Tableau 1 : Facteurs de risque du cholangiocarcinome [13].

1.3.4 Mécanismes moléculaires de carcinogenèse du CCA

Les modifications cellulaires nécessaires au développement et à la progression du cancer sont multiples, hétérogènes et complexes [32]. C'est pourquoi une meilleure connaissance et une meilleure compréhension des mécanismes de la carcinogenèse biliaire sont nécessaires. Celles-ci permettraient en premier lieu d'expliquer l'existence de facteurs communs aux CHC et aux CCA. En effet, les CCA proviennent classiquement de la transformation maligne des cholangiocytes. Néanmoins, certains CCA pourraient résulter de la transformation de cellules

progénitrices bipotentes (pouvant se différencier en hépatocytes ou en cholangiocytes) [33]. Cette hypothèse est renforcée par l'existence de signatures génomiques communes entre le CCA et le CHC [34] et permet d'expliquer la survenue de formes mixtes (Hepato-Cholangiocarcinome) ou l'association du CHC au CCA est de plus en plus souvent observée. Pour l'activation des mécanismes de carcinogenèse (prolifération continue, de survie cellulaire, d'angiogenèse et d'invasion [31, 32] des modifications génétiques, épigénétiques et moléculaires sont nécessaires au sein des cellules tumorales et certaines ont été décrites dans le CCA [13].

1.3.4.1 Altérations génétiques et épigénétiques

Plusieurs études ont montré l'hétérogénéité génomique présente dans le CCA. Bon nombre de ces altérations génétiques rencontrées dans le CCA affectent des gènes clés impliqués dans la promotion de la croissance cellulaire (*KRAS*, *BRAF*, *SMAD4*, *FGFR2*, *EGFR*, *PTPN3*, *NOTCH*, *WNT*) [35], le contrôle et le maintien de la stabilité génomique (*TP53*) [35-39] et le remodelage de la chromatine (*KMT2C*, *ARID1A*, *PBRM1* et *BAP1*) [38, 40]. Cependant, les mutations les plus fréquemment observées sont les mutations activatrices du gène *KRAS* (5-54 % des cas) associées à un phénotype plus agressif [41]. Des fusions de gènes codant pour des protéines tyrosines kinases, telles que *FGFR2* (récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGF)) sont décrites dans 20% des cas [42]. De plus, des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*, qui codent respectivement les isoformes de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2, identifiées exclusivement dans 10-23% des CCAi [43], participent au changement de profil de méthylation de la cellule [44-46] et affectent des voies de signalisation importantes telles que celle de Wnt [47], du facteur de croissance transformant bêta (TGF β) [47, 48] ou de PI3K [47]. Par conséquent, *IDH1* et 2 représentent des cibles thérapeutiques prometteuses en cours d'exploration dans le CCAi [49] (Tableau 2).

Cibles moléculaire	Rôles fonctionnels	Caractéristiques cliniques éventuelles
Altérations génétiques		
<i>TERT</i>	Stabilité des télomères	Activation (associée à la signalisation Wnt dans le CHC)
<i>TP53</i>	Cycle cellulaire	Inhibition (réponse aux dommages de l'ADN)
<i>WNT</i> ou <i>CTNNB1</i>	Développement et différenciation	Activation (stabilité génomique)
<i>KRAS, BRAF, SMAD4, FGFR2</i>	Signalisation récepteur tyrosine kinase	Activation (survie et prolifération)
Altérations épigénétiques		
<i>IDH1, IDH2</i>	Maintenance du génome (épigénétique, méthylation de l'ADN)	Statut de méthylation altéré, survie
Complexe <i>SWI-SNF (ARID1A, PBRM1, BAP1)</i>	Remodelage de la chromatine	Activation (mauvais pronostic)
<i>Mixed-lineage leukaemia 3 (MLL3 ou KMT2C)</i>	Méthyltransférase ou remodelage de la chromatine	Activation
<i>HDAC6</i>	Régulation de la morphologie ou de la fonctionnalité du cil primaire	Surexprimé

Tableau 2 : Altérations génétiques et épigénétiques présent dans le cholangiocarcinome [13].

Il est également important de noter qu'il existe des distinctions dans la prévalence des altérations selon le type de CCA (intra ou extrahépatique), impliquant des différences dans les processus d'oncogenèse (Tableau 3).

Mutations génétiques	Fréquence des mutations dans les tumeurs (%)	
	CCA intrahépatique	CCA extrahépatique
IDH 1/2	14%-36%	0
BAP 1	9%-25%	4%-10%
KRAS	9%-24%	40%-47%
TP53	3%-38%	18%-45%
PBRM1	11%-17%	4%-11%
ARID1A	11%-36%	5%-16%
Amplification de EGFR	7%	0%
HER2	0%-2%	0%-20%
Surexpression de VEGF	42%	31%
PIK3CA	4%-6%	9%
BRAF	4%-22%	6%
Translocation de FRGR	6%-50%	0%-5%
Amplification de MCL1	16%-21%	PR%
PTEN	1%-11%	4%
FBXW7	1%-6%	4%-15%
CDK6	7%	PR%
CDKN2A	7%	15%
BRCA 1/2	4%	PR%
SMAD4	1%-4%	11%-25%
mTOR	26%	40%

Tableau 3 : Fréquence des mutations dans les cholangiocarcinomes intra et extrahépatiques [43].

1.3.4.2 Facteurs et voies de signalisation

De nombreuses voies de signalisation favorisent le développement et la progression du CCA lorsqu'elles sont régulées. Ces voies comprennent divers facteurs endocriniens et neuroendocriniens, des facteurs de croissance, des composés biliaires et parmi elles des voies impliquées dans le développement ou des voies pro-inflammatoires (Figure 7).

1.3.4.2.1 Facteurs endocriniens et neuroendocriniens

Plusieurs hormones et facteurs de croissance favorisent la croissance et la survie des cellules tumorales, tels que les œstrogènes qui favorisent la prolifération cellulaire [50] et l'expression de facteurs pro-tumoraux clés comme l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) [51, 52]. Des facteurs tels que la sérotonine, la dopamine, la

leptine, les opioïdes et le 2-arachidonoylglycérol favorisent également la prolifération des cellules tumorales [53-57].

Parmi les facteurs neuroendocriniens qui inhibent la prolifération ou induisent l'apoptose, la sécrétine, la gastrine, l'acide γ -aminobutyrique, l'endothéline-1 et l'endocannabinoïde anandamide ont été décrits [13].

1.3.4.2 Facteurs de croissance

Des études ont montré une surexpression du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) dans des échantillons humains de CCA, qui est associée à un mauvais pronostic dans le CCA [58-60]. L'activation d'EGFR déclenche la voie de signalisation MAPK/ERK dans les cellules de CCA et contribue à la mise en place d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), faisant de ce récepteur une cible thérapeutique potentielle de choix [58, 59]. La TEM sera définie et étudiée dans la troisième partie de l'introduction. De plus, des mutations et des amplifications du gène *EGFR* ont été trouvées dans 15% et 5% des CCA, respectivement [61]. Le rôle de la voie EGFR dans le CCA sera abordé en détail dans la deuxième partie de l'introduction.

D'autre part, il existe une dérégulation de la voie HGF/MET. L'expression du récepteur du HGFR (Hepatocyte Growth Factor) est également augmentée et associée à un mauvais pronostic dans le CCA [62]. L'activation de ces récepteurs favorise la prolifération cellulaire, la dédifférenciation et les métastases tumorales [59].

Des dérégulations des voies VEGF et WNT/ β -caténine ont également été décrites [63].

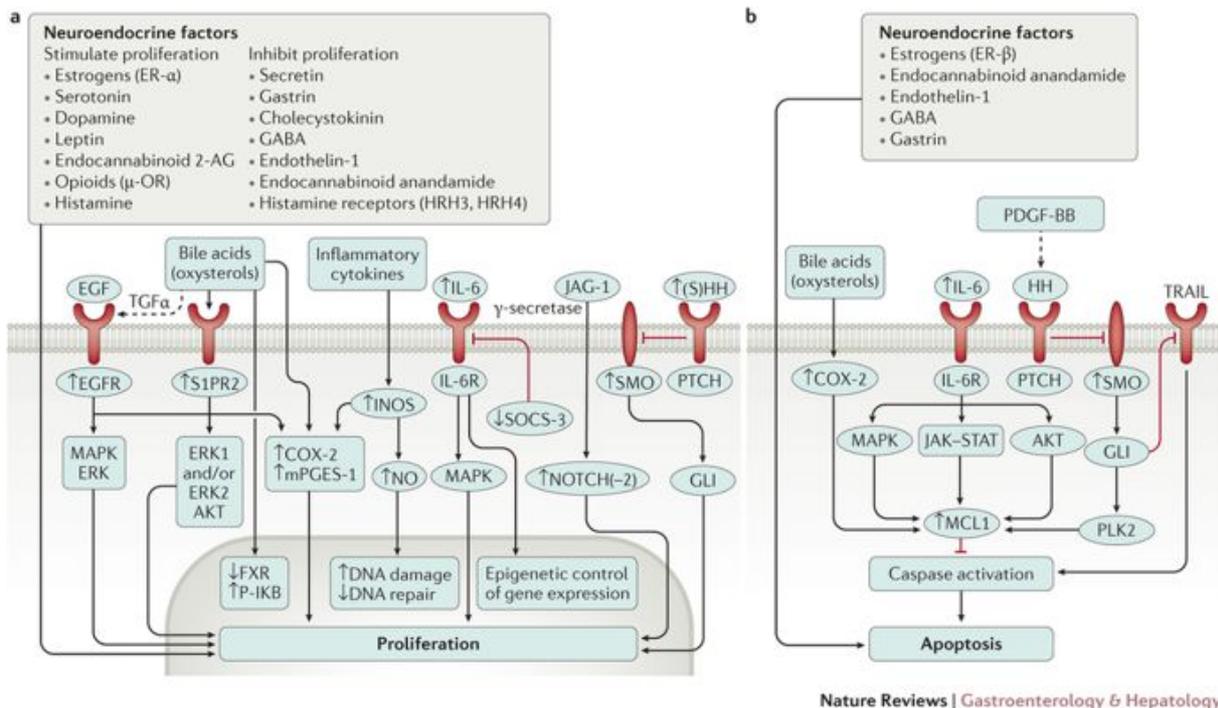


Figure 7 : Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la prolifération et l'apoptose dans le cholangiocarcinome. 2-AG: 2-arachidonylglycerol; COX-2: Cyclooxygenase 2; EGF: Epidermal Growth Factor; EGFR: Epidermal Growth Factor receptor; ER: Estrogen Receptor; FXR: Farnesoid X Receptor; GABA: γ -Aminobutyric Acid; IL-6R: Interleukin-6 Receptor; JAG-1: Jagged 1; JAK: Janus Kinase; iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase; NO: Nitric Oxide; OR: Opioid Receptor; mPGES-1: microsomal Prostaglandin E Synthase-1; P-IKB: Phosphatidylinositol Kinase; PLK2: Polo Kinase 2; PTCH: Patched; S1PR2: Sphingosine-1-Phosphate Receptor; (S)HH: Sonic Hedgehog; SMO: Smoothed, Frizzled class receptor SOCS-3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3; TGF: Transforming Growth Factor; TRAIL: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand [13].

1.3.4.2.3 Composés biliaries

Les conditions cholestatiques sont des facteurs de risque bien connus dans le développement du CCA. Les acides biliaries ne sont pas génotoxiques en soi, mais ils favorisent la prolifération cellulaire, l'inflammation et la croissance tumorale comme cela a été démontré dans des modèles expérimentaux de rats dans le CCA [64]. En effet les acides biliaries sont capables d'activer la voie EGFR et de stimuler ainsi la prolifération cellulaire [65]. D'autre part, les acides biliaries conjugués tels que le glychénodésoxycholique inhibe l'expression du récepteur des acides biliaries (FXR) et favorise ainsi la croissance tumorale in vivo [66]. De plus, l'activation du récepteur 2 de la sphingosine-1-phosphate (S1PR2) via les acides biliaries conjugués a été décrite comme promouvant la croissance du CCA [67, 68].

1.3.4.2.4 Voies de signalisation du développement embryonnaire

Plusieurs voies de signalisation jouant un rôle majeur dans le développement embryonnaire sont activées et impliquées dans le développement et la progression du CCA. Celles-ci comprennent les voies Notch et Hedgehog (Hh), qui participent à la croissance, à la survie et à la dissémination du CCA [69-72].

1.3.4.2.5 Facteurs inflammatoires

Selon la classification de Sia et *al.* datant de 2013, deux sous-types de CCAi ont été identifiés grâce à une analyse du profil génomique et des mutations à partir d'une cohorte de 119 cas de CCAi : l'un caractérisé par l'activation de signaux pro-inflammatoires et l'autre associé à des voies de signalisation prolifératives (Figure 8) [73]. La classe « proliférative » est plus agressive et de plus mauvais pronostic. En effet, celle-ci présente un enrichissement de voies de signalisation oncogéniques comme RAS, EGF, HGF/MET qui sont des altérations semblables au CHC. La classe « inflammatoire » est de meilleur pronostic avec un enrichissement des voies de signalisation de la réponse immunitaire telles que STAT3 menant à la surexpression de cytokines.

La cytokine IL-6 sécrétée par les cellules de CCA favorise la croissance et la survie cellulaire [74]. Une autre cytokine importante dans la biologie du CCA est le TGF β 1 qui stimule l'invasion et la migration des cellules en induisant la TEM dans les cellules tumorales [75]. D'autre part, l'enzyme cyclooxygénase-2 (COX2), responsable de la synthèse de prostaglandine, peut être activée par les acides biliaires et les oxystérols, promouvant la carcinogenèse du CCA [76]. En effet, plusieurs travaux ont montré que l'inhibition de l'activité de COX2 par un inhibiteur spécifique, le celecoxib, entraîne une baisse de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des cellules de CCA [77-79]. Comme autre facteur pro-inflammatoire, l'activation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), enzyme qui produit l'oxyde nitrique, peut également stimuler l'expression de COX2 et favoriser la carcinogenèse biliaire en inhibant les mécanismes de réparation de l'ADN [13].

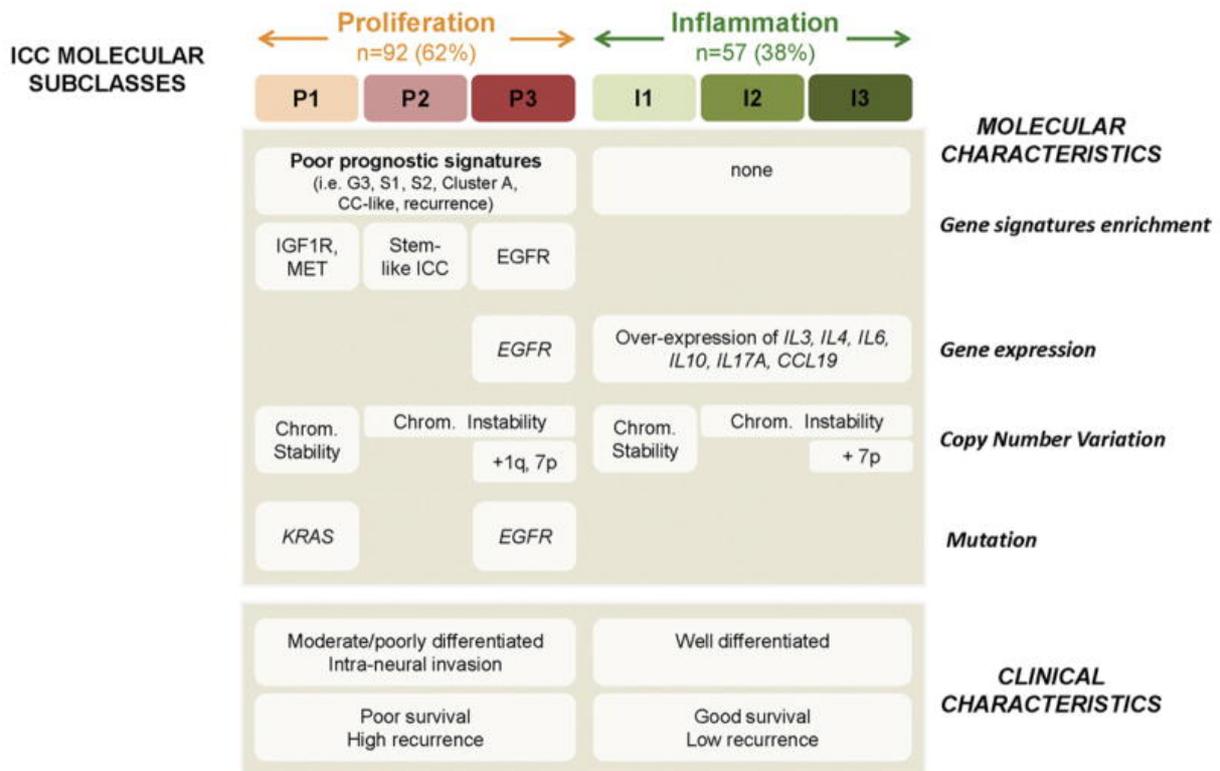


Figure 8 : Résumé des classes de CCAi. Les caractéristiques moléculaires et cliniques spécifiques diffèrent entre les classes de CCA [73].

1.3.4.3 Microenvironnement tumoral

Le CCA est caractérisé par un important stroma fibreux, dit desmoplasique [80]. Celui-ci se compose principalement de fibroblastes associés au cancer (CAF) exprimant l'actine-alpha de type musculaire lisse (α -SMA), d'une proportion moindre de macrophages associés à la tumeur (TAM) et de cellules vasculaires. Ces cellules stromales interagissent avec les cellules de CCA, stimulant ainsi le développement de la tumeur et conditionnant la réponse aux traitements [80-82]. Au cours de la cholangiocarcinogenèse, le stroma subit de profonds changements dans sa composition ; notamment une surexpression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la génération de matrice extracellulaire ainsi que la régulation de la voie du TGF- β et des processus inflammatoires ont été mis en évidence. Ces changements sont corrélés à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCA [80, 83].

1.3.4.3.1 Fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Bien que leur origine n'ait pas été clairement identifiée dans le CCA, les CAFs dérivent probablement des cellules étoilées du foie, de fibroblastes portaux ou résidents [84]. Les CAFs, qui expriment l' α -actine de type musculaire lisse, sont capables de réguler plusieurs processus tels que la prolifération, la migration, l'invasion et la TEM des cellules tumorales biliaires,

notamment comme l'a démontré notre équipe [85] [58, 86-88]. De ce fait, les patients exprimant des taux élevés de α -SMA dans les échantillons histologiques de CCA présentent un très mauvais pronostic [89]. Des modèles expérimentaux *in vitro* de co-cultures de cellules de CCA avec les CAFs, ont montré que les principaux axes de signalisation impliquant les CAFs sont les suivants : PDGF/PDGFR [85], SDF-1/CXCR4 [86], HB-EGF/EGFR [58], CXCL5/CXCR2/IL-1 β [87] et Hh [88]. Au sein de notre équipe, nous avons montré dans le CCA que les CAFs sont capables de synthétiser le ligand HB-EGF, qui lorsqu'il se lie à son récepteur EGFR présent à la surface des cellules tumorales, l'active entraînant ainsi une perturbation des jonctions cellule-cellule et une augmentation du caractère invasif [58]. De plus, nous avons décrit une boucle paracrine réciproque dans laquelle les cellules CCA produisent du TGF- β 1, entraînant une stimulation de l'expression de HB-EGF par les CAFs. Ainsi, cette interaction réciproque entre les cellules tumorales et stromales contribue à la mise en place d'une TEM dans les cellules de CCA via une activation constante de la voie EGFR [58]. Par ailleurs, une étude a démontré une implication des CAFs, dans le traitement thérapeutique du CCA [90] : l'activation ou la transdifférenciation des cellules étoilées hépatiques en myofibroblastes augmente leur sensibilité à l'apoptose, ce qui en fait d'excellentes cibles pour altérer l'interaction réciproque avec les cellules de CCA. En utilisant l'agent cytotoxique, le navitoclax (un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL et Bcl-w) dans un modèle de CCA chez le rat syngénique, les chercheurs ont induit l'apoptose des CAFs, diminué l'expression des protéines de la matrice extracellulaire, inhibant ainsi la croissance tumorale [90].

Ces données soulignent le fort intérêt de cibler les CAFs du microenvironnement tumoral comme stratégie thérapeutique.

1.3.4.3.2 Cellules immunitaires

Les TAM sont les cellules immunitaires les plus représentatives du microenvironnement du CCA. Ces cellules proviennent principalement des monocytes circulants qui infiltrent les tissus tumoraux et se différencient en macrophages. L'expression d'une forte population de TAM chez les patients atteints de CCA est associée à un mauvais pronostic, à une baisse de la survie globale et de la survie sans progression, et à la présence de métastases témoignant ainsi du rôle de ces cellules dans la progression du CCA [91, 92]. Les TAMs sont capables de produire des ligands Wnt (Wnt3a et Wnt7b) [39, 93], et d'activer ainsi la voie canonique Wnt/ β -caténine dans les cellules tumorales afin de contribuer au développement du CCA. En outre, des études ont montré que l'inhibition de la voie Wnt par des inhibiteurs spécifiques, tant *in*

vitro que dans des modèles de CCA de souris (xénogreffes de cellules tumorales) et de rats (modèle au thioacétamide qui est un produit chimique cancérigène, permettant de créer une cirrhose qui peut aboutir à une tumeur biliaire), diminue considérablement la prolifération de la tumeur et augmente l'apoptose des cellules qui entraîne une régression de la tumeur [39].

1.3.5 Diagnostique du CCA

En 2014, l'European Association for the Study of the Liver a publié des recommandations pratiques sur le diagnostic et la prise en charge du CCA. La publication de recommandations était devenue nécessaire au vu de l'augmentation de la prévalence du CCAi dans les pays occidentaux, et de son pronostic si péjoratif [94].

Les patients atteints de CCA à un stade précoce sont généralement asymptomatiques et le diagnostic se fait alors tardivement, de manière fortuite dans 20 à 25% des cas. À un stade plus avancé, lorsque le CCA devient symptomatique, peuvent être observés chez les patients, une perte de poids, une altération de l'état général, des douleurs abdominales, un ictère, une hépatomégalie tumorale et de la fièvre (non infectieuse) avec des sueurs nocturnes [95].

Le diagnostic du CCA repose sur l'analyse histologique. La biopsie permet de diagnostiquer les formes mixtes (hépato-cholangiocarcinome) par l'utilisation de marqueurs hépatocytaires ou de marqueurs de cellules souches tels que la cytokératine 19 (qui n'est donc pas spécifique du CCA). Du fait de la difficulté à différencier formellement en histologie un CCA d'une tumeur secondaire hépatique, le diagnostic est généralement réalisé en combinant plusieurs techniques d'imagerie [Imagerie par résonance magnétique (IRM) ou cholangiopancréatographie rétrograde endoscopique (CPRE)], une analyse des niveaux sériques des principaux marqueurs tumoraux tels que l'antigène carbohydrate (CA) 19-9 et l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et l'étude de biopsie tumorale (Figure 9) [13]. Toutefois, les techniques de diagnostic actuelles (i.e. imagerie et dosage des marqueurs tumoraux sériques) présentent une faible sensibilité et spécificité au début de la maladie. Ce fait est particulièrement critique pour les groupes de patients à risque de développer un CCA. Lorsque l'on prend l'exemple de la CSP, environ la moitié des patients atteints de CSP développent un CCA dans les deux premières années suivant leur diagnostic et, à un stade précoce, ils ne présentent généralement pas d'élévation du niveau des marqueurs tumoraux et les techniques d'imagerie présentent des limites pour discerner une sténose biliaire, caractéristique des patients atteints de CSP, d'un CCA [26].

De plus, l'analyse des aberrations chromosomiques par hybridation de fluorescence in situ (FISH) des cellules du canal biliaire, obtenues par brossage biliaire per-endoscopique, présente une sensibilité limitée [96].

D'autres limitations importantes de ces techniques de diagnostic sont leur caractère invasif, la possibilité de leur utilisation à répétition pour surveiller la maladie dans le cas d'une biopsie du foie puis son coût élevé ou sa disponibilité dans le cas de l'imagerie par résonance magnétique.

Pour toutes ces raisons, il est nécessaire de rechercher de nouvelles méthodes de diagnostic efficaces, de nature peu invasive, d'un faible coût économique et d'une grande accessibilité. En ce sens, des chercheurs ont isolé des vésicules extracellulaires dont la majorité étaient des exosomes. L'analyse protéomique de ces exosomes a montré des signatures potentiellement utiles, à visée diagnostique pour différencier CCA, CHC et CSP de manière non invasive [97].

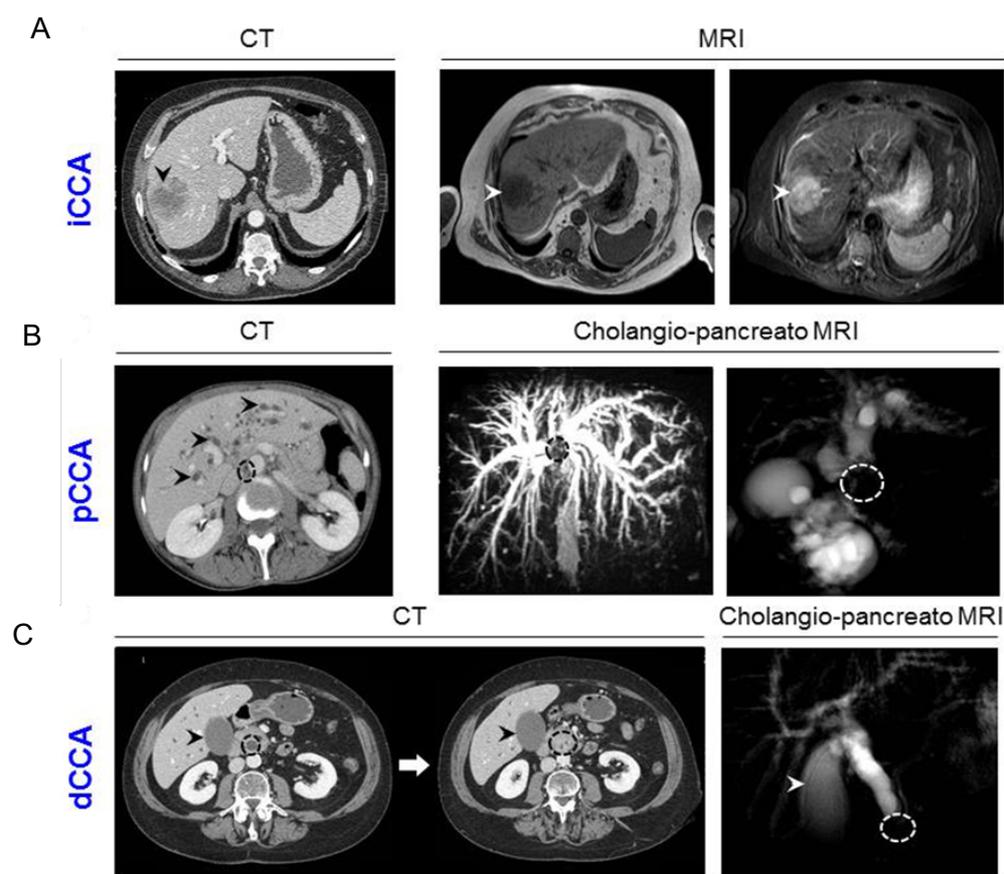


Figure 9 : Diagnostic du CCA par tomographie axiale informatisée (CT) et IRM. Images représentatives du A) CCAi (flèche), B) CCAp [cercle et dilatation des voies biliaires intrahépatiques (flèches)]. C) CCA_d [cercle et distension de la vésicule biliaire (flèche)] [31].

1.3.6 Traitement et pronostic

Le CCA se caractérise généralement par un type de cancer asymptomatique à un stade précoce, ce qui entraîne un diagnostic tardif et une forte probabilité de propagation à d'autres tissus et organes. Ce fait, conjugué à la chimiorésistance élevée de ces tumeurs, limite considérablement les options thérapeutiques possibles et rend cette tumeur de très mauvais pronostic à l'heure actuelle.

A ce jour, le seul traitement potentiellement curatif du CCA est la résection chirurgicale de la tumeur, qui n'est applicable que dans une faible proportion des cas (25%) et selon des critères cliniques stricts [98]. Ainsi, la résection chirurgicale de la tumeur est indiquée chez moins du tiers des patients en raison de la présence d'infiltration locale de la tumeur, d'invasion vasculaire ou lymphatique, de métastases, de difficultés pour la reconstruction postérieure des voies biliaires ou de lésions hépatiques pouvant compromettre la survie du patient pendant l'intervention [13]. En outre, les patients qui subissent un traitement chirurgical présentent une récurrence tumorale élevée, avec une survie à 5 ans comprise entre 22 et 44% pour le CCAi, entre 11 et 41% pour le CCAp et entre 27 et 37% pour le CCAa [99]. Lorsque le traitement chirurgical n'est pas possible, des traitements palliatifs basés sur la chimiothérapie et/ou la pose de prothèse biliaire sont généralement appliqués pour améliorer le flux biliaire, ce qui ne prolonge guère la survie du patient [100].

Actuellement, le traitement conventionnel de première ligne pour les patients atteints de CCA est l'association de gemcitabine et de sels de platine [101]. Les résultats de l'essai ABC-02 publiés en 2010 avaient montré une amélioration de la survie globale de 8,1 à 11,7 mois grâce à cette combinaison [102, 103]. Il n'existe pas encore de traitement de seconde ligne à l'efficacité clinique démontrée [104]. Cependant, un essai de seconde ligne de chimiothérapie intra-artérielle (gemcitabine et oxaliplatine) est en cours en France (GEMOXIA, FFCG 1606, clinicaltrials.gov : NCT03364530). Ces dernières années, le potentiel des thérapies locorégionales basées principalement sur la radioembolisation transartérielle, l'ablation par radiofréquence et la thérapie photodynamique en tant que traitement palliatif a été étudié [13]. En outre, plusieurs essais précliniques et cliniques portant sur des thérapies dirigées contre diverses mutations ou altérations moléculaires, tels que des mutations de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) [105], des miR [106, 107], et des gènes de fusion (dont *FGFR2*) sont en cours [108, 109], mais aussi des traitements dirigés contre le microenvironnement tumoral

[90]. Les différents essais de phase II et III ciblant VEGFR, EGFR, PDGFR et BRAF n'ont pas permis d'améliorer de façon significative la survie des patients [63]. En effet, concernant le récepteur de l'EGF, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase (ITK) spécifique nommé erlotinib, a été testé en phase III chez les patients atteints de CCA mais sans succès [110-112]. Cependant, une étude récente dans le CCA concernant l'essai BILCAP de phase III présenté au congrès annuel de l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) en 2017, a comparé l'effet de l'ajout de la capécitabine (médicament anticancéreux, anti-métabolite) en chimiothérapie adjuvante par rapport à la surveillance post-chirurgie, chez des patients opérés en résection radicale [113]. Ces travaux ont montré une amélioration significative de la survie globale et de la survie sans récurrence chez les patients traités par la capécitabine par rapport aux patients non traités. En sachant que jusqu'à présent aucun traitement adjuvant n'avait été validé après résection d'un CCA, ces résultats placent la capécitabine comme le nouveau standard en adjuvant des cancers des voies biliaires.

Des essais d'immunothérapie sont également en cours avec des anticorps monoclonaux anti-PD1, le nivolumab et le pembrolizumab (clinicaltrials.gov : NCT03364530), qui ont déjà montré leur efficacité notamment dans le traitement du mélanome [114].

1.4 Voie du récepteur de l'EGF (EGFR) dans le cholangiocarcinome

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle majeur du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor ou EGFR) dans la physiopathologie du CCA. L'expression de EGFR dans le CCA est augmentée et est associée à un mauvais pronostic pour le patient [58, 60]. La classification moléculaire de Sia et *al.* [73] a permis de mettre en évidence le groupe P3 qui rassemble les patients présentant une signature EGFR, des mutations du gène *EGFR*, et le plus mauvais pronostic avec la récurrence la plus précoce. Des travaux réalisés au sein de notre équipe ont montré que l'activation d'EGFR dans les cellules de CCA contribue à la migration et à l'invasion tumorale via l'induction d'un programme de TEM et via la communication intercellulaire entre les cellules tumorales et les myofibroblastes du stroma [58, 59, 115, 116].

1.4.1 Récepteur de l'EGF (EGFR)

EGFR appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase Human Epithelial growth factor Receptor (ErbB/HER), qui comprend 4 récepteurs : EGFR (ErbB1 ou HER1), ErbB2

(HER2/Neu), ErbB3 (HER3), ErbB4 (HER4) [117]. Le gène de l'EGFR est situé sur le bras court du chromosome 7, en position 7p12-13. Il contient 28 exons, s'étend sur 200 kb et code pour une glycoprotéine de 170 kDa. L'EGFR est synthétisé sous forme d'un précurseur de 1210 acides aminés (aa) [118]. Les modifications post-traductionnelles entraînent le clivage d'une séquence en N-terminal du polypeptide, conduisant à l'insertion, dans la membrane cellulaire, d'un peptide final de 1186 aa. L'EGFR est une protéine comportant 3 domaines (Figure 10) [119, 120]:

- un domaine extracellulaire N-terminal de liaison à son ligand extracellulaire, comprenant quatre sous-domaines,
- un domaine transmembranaire, servant d'ancrage à la membrane plasmique,
- un domaine intracellulaire C-terminal contenant l'activité catalytique tyrosine kinase. Il présente des résidus tyrosine qui jouent un rôle dans la transmission du signal après activation du récepteur, ainsi que des résidus sérine/thréonine, importants pour l'inhibition du récepteur et son endocytose.

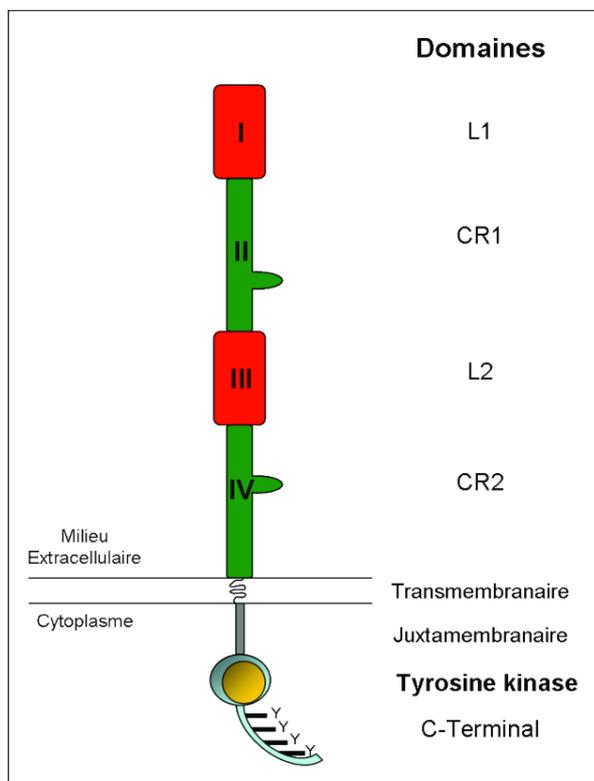


Figure 10 : Structure schématique d'EGFR. La partie extracellulaire est composée de quatre domaines, homologues deux à deux, appelés L1 et L2 puis CR1 et CR2. Suivent ensuite le domaine transmembranaire puis le domaine intracellulaire pouvant être phosphorylé sur plusieurs tyrosines.

De façon générale, les récepteurs de la famille ErbB partagent une forte homologie de structure primaire et jouent un rôle très important dans la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire (Figure 11). Cependant, aucun ligand n'a jamais été découvert

pour ErbB2 et ErbB3 ne possède aucune activité kinase [116, 119]. Ceux-ci sont capables de s'hétérodimériser avec d'autres membres de la famille ErbB afin d'être activé [116].

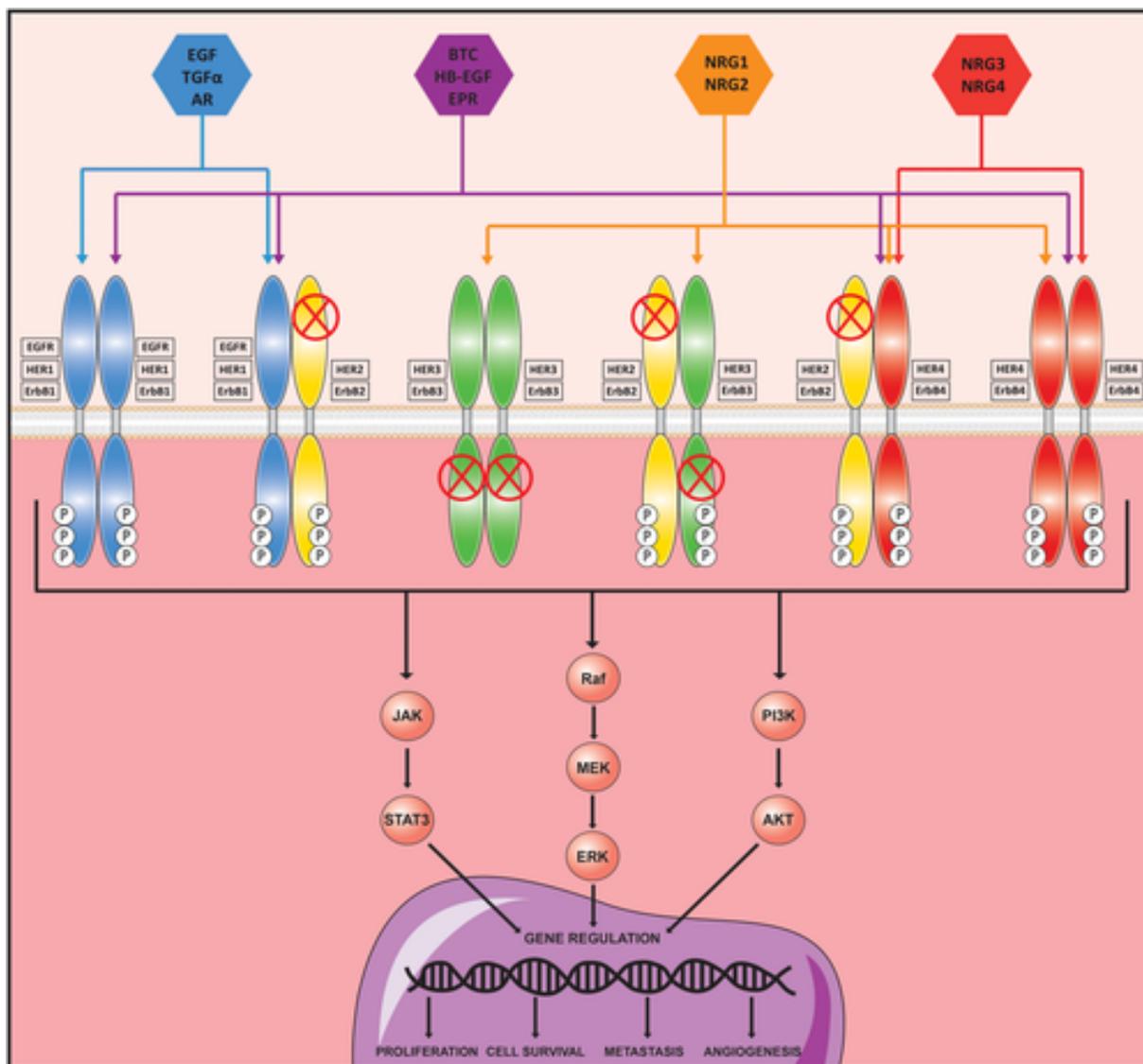


Figure 11 : Famille ErbB. La famille ErbB constitue une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase qui comprend quatre membres, EGFR / ErbB1 / HER1, ErbB2 / HER2, ErbB3 / HER3 et ErbB4 / HER4. Tous les récepteurs ErbB ont en commun un domaine de liaison au ligand extracellulaire, une région unique couvrant la membrane et un domaine intracellulaire TK. AR: Amphiréguline; BTC: Bétacelluline; EPR: Epireguline; JAK: Janus Kinase; NRG1-4: Neuréguline 1-4; STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3 [116].

L'EGFR quant à lui possède plusieurs ligands, dont l'EGF. Celui-ci est constitué de 53 aa avec trois ponts disulfures intramoléculaires qui augmentent considérablement sa stabilité. EGF est synthétisé sous forme d'un polypeptide précurseur transmembranaire et ses ectodomaines sont clivés par une métalloprotéine, qui libère l'EGF soluble sous forme de monomères.

La surexpression de EGFR dans le CCA a été décrite au sein de notre équipe, entre autres, et son expression est fréquemment associée à un mauvais pronostic dans le CCA [58, 59, 121].

En effet la dérégulation de ce récepteur a été rapportée dans 30 à 60% des échantillons de CCA [122]. ErbB2, a également été démontré comme étant surexprimé dans les échantillons de patients atteints de CCA associant son expression à un mauvais pronostic [116, 121, 122]. L'expression de ErbB3 est observée dans 11,8% à 39% des cas de CCA dans différentes études et est associée à des tumeurs très peu différenciées et à une diminution de la survie. ErbB4 quant à lui, est exprimé dans 39,5% à 63,1% des échantillons de CCA et son expression est associée à la présence de métastases ganglionnaires et à une meilleure survie dans les CCAi qui n'expriment pas EGFR. Bien que les récepteurs ErbB3 et ErbB4 soient exprimés dans le CCA, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à leurs rôles dans cette maladie restent inconnus [116].

1.4.2 Activation du récepteur et voie de signalisation

En l'absence de ligand, le récepteur de l'EGF est sous forme monomérique, inactif (Figure 12) [118]. La liaison avec son ligand entraîne le dépliement du récepteur (Figure 12). Ce changement conformationnel démasque le site de liaison avec une autre molécule de récepteur, permettant une homo- ou une hétéro-dimérisation (Figure 12). La dimérisation peut se faire avec le récepteur ErbB2, qui n'a pas de ligand, et est constamment dans une conformation dépliée, mais aussi avec les autres membres de la famille. La dimérisation met en contact les domaines tyrosine kinase des 2 récepteurs, ce qui conduit à une autophosphorylation croisée (dépendante de l'ATP) sur les résidus tyrosine C-terminaux, et donc à l'activation des récepteurs (Figure 12). Après activation, la tyrosine phosphorylée est reconnue par des protéines adaptatrices, permettant la transmission des signaux d'activation à 3 voies principales, via une cascade de phosphorylations : la voie RAS/RAF/MAP kinases, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie JAK/STAT mais également d'autres voies moins prédominantes comme PLC γ (Figure 6) [123]. Ces voies, interconnectées, sont connues pour favoriser la prolifération cellulaire, la survie, l'angiogenèse et le processus métastatique.

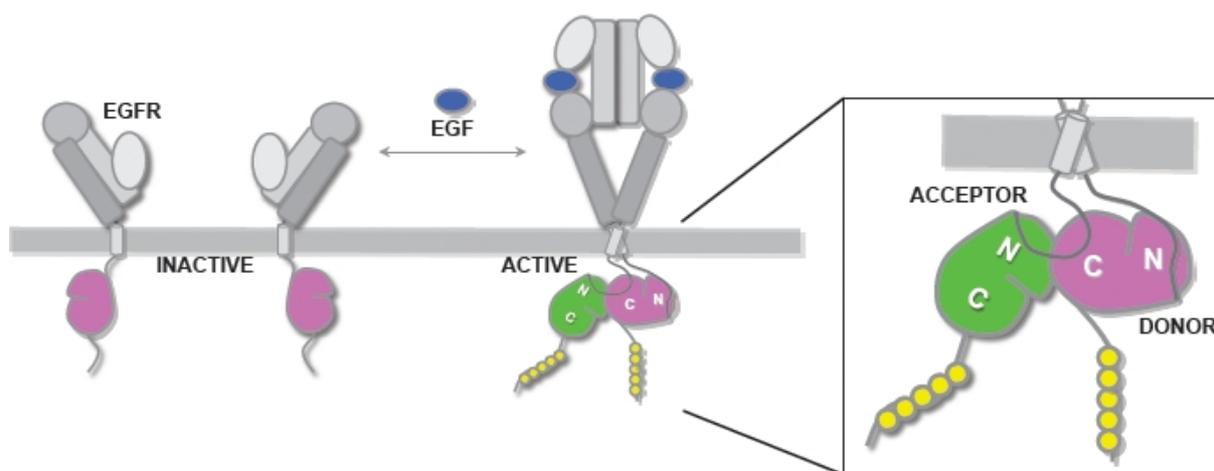


Figure 12 : Représentation schématique de l'activation de EGFR. En l'absence de ligand, EGFR se situe à la membrane plasmique de la cellule dans une conformation inactive/auto-inhibée (à gauche). Lors de la liaison du ligand (notamment EGF), cette conformation se libère, conduisant à une dimérisation du récepteur (à droite). Dans le cytoplasme, cette dimérisation entraîne la formation d'un homodimère de kinases dans lequel le lobe en position C-terminal de la kinase « donneuse » (colorée en rose) interagit avec le lobe en N-terminal de la kinase « acceptrice » (colorée en vert) permettant ainsi son activation allostérique. Le segment juxtamembranaire de la kinase « acceptrice » s'associe à son tour au lobe C-terminal de la kinase donneuse pour stabiliser le dimère (zoom de droite) [124].

1.4.2.1 Cascade des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)

Une fois le récepteur activé, la protéine adaptatrice Grb2 entre en jeu. Grb2 comporte 2 domaines SH2 et 1 domaine SH3. Elle reconnaît la tyrosine phosphorylée d'EGFR grâce à son domaine SH2, ce qui permet le recrutement à la membrane plasmique de la protéine SOS1, un facteur d'échange GDP-GTP, grâce à son domaine SH3 [117, 118]. SOS1 appartient à la famille des protéines GEF (Guanine Nucleotide Exchange), qui sont capables d'échanger le GDP pour du GTP. Le complexe Grb2/SOS1 se relocalise à la membrane plasmique, favorisant l'interaction entre RAS et SOS1. Cette interaction permet l'échange par SOS1 du GDP en GTP lié à RAS, provoquant son activation. C'est l'activité GTP-asiqne de RAS, stimulée par la protéine GAP, qui hydrolysera le GTP en GDP et inactivera RAS. La liaison au GTP entraîne un changement de conformation de RAS conduisant au recrutement à la membrane de la sérine/thréonine kinase RAF. RAS-GTP va alors changer de conformation et être phosphorylée, donc activée, par différentes kinases comme la protéine kinase A, ERK ou JAK. RAF phosphoryle MEK, une thréonine/tyrosine kinase, qui active les protéines ERK-1 et ERK-2, permettant leur translocation dans le noyau et l'activation par phosphorylation de facteurs de transcription (Jun, Myc...). L'activation de la voie des MAPK entraîne également un rétrocontrôle négatif permettant la dissociation du complexe Grb2/SOS1 [118].

1.4.2.2 Voie de la Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K)

L'activation de PI3K par EGFR activé se fait grâce à la sous-unité adaptatrice p85 de PI3K, qui lie la phosphotyrosine du récepteur EGFR grâce à son domaine SH2 (Src Homology 2), permettant ainsi l'activation de la sous-unité catalytique p110 de PI3K. La PI3K ainsi activée catalyse la synthèse de PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) et PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) en phosphorylant l'inositol en position 3. Ce phosphate est reconnu par des serine/thréonine kinases à domaine PH telles que PDK1 et AKT. PDK1 phosphoryle et active AKT, qui lui phosphoryle ensuite un certain nombre de protéines, qui seront activées ou inhibées. En particulier, la protéine TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2 ou Tubérine) va être phosphorylée et inhibée, ce qui va permettre la phosphorylation et l'activation de sa cible, la protéine RHEB (Ras Homolog Enriched in Brain). Celle-ci va pouvoir activer la protéine mTOR engagée dans les complexes mTORC 1 et 2. L'effet final de cette cascade de phosphorylation est une diminution de l'apoptose, une accélération du cycle cellulaire, et une stimulation de la traduction protéique et de l'angiogénèse.

1.4.2.3 Voie Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT)

Une autre voie de signalisation intracellulaire peut être mise en jeu par EGFR. La liaison du ligand au récepteur provoque des changements conformationnels de EGFR. Cette modification stérique du récepteur va rapprocher étroitement deux Janus kinases (JAK) qui lui sont associées, ce qui va permettre la transphosphorylation d'EGFR sur des tyrosines. Les JAKs activées provoquent ensuite la phosphorylation des transducteurs de signal et activateurs de transcription à domaines SH2 appelés STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Ces facteurs de transcription sont inactifs dans le cytoplasme jusqu'à la phosphorylation par les JAKs. Une fois que la tyrosine du domaine C-terminal de STAT a été phosphorylée, elle peut jouer le rôle d'interface de dimérisation en association avec les domaines SH2 d'une autre STAT. Ces dimères STAT activés sont ensuite transférés vers le noyau et se lient sur des motifs d'ADN spécifiques pour activer la transcription de gènes cibles. La voie JAK/STAT de signalisation est essentiellement impliquée dans l'inhibition de l'apoptose [125].

1.4.3 Rôle physiologique de EGFR

EGFR joue un rôle physiologique important dans le développement embryonnaire notamment dans le développement des tissus nerveux et musculaires squelettiques mais il joue également un rôle dans le fonctionnement physiologique des cellules. L'activation d'EGFR a pour conséquences une augmentation de la prolifération [126] et de la motilité cellulaires [118] ainsi qu'une diminution de l'apoptose [127]. EGFR joue également un rôle dans le phénomène de TEM, dans la régulation des métalloprotéases matricielles mais également dans les phénomènes d'angiogenèse [128]. Un autre mode de signalisation d'EGFR a été mis en évidence dans lequel EGFR est transporté après endocytose de la surface cellulaire vers le noyau, où il agit comme régulateur transcriptionnel, transmet des signaux et intervient dans de multiples fonctions biologiques, notamment dans la prolifération cellulaire, la réparation et la réplication de l'ADN [129].

1.4.4 Rôle de EGFR dans le cholangiocarcinome

La surexpression du récepteur ou ses mutations surviennent dans de nombreuses tumeurs épithéliales (poumon, sein, gliomes, ovaires...) [130]. Dans le CCA, nous avons démontré entre autres que EGFR contribue à la progression tumorale en induisant la TEM dans les cellules tumorales, régulant ainsi la migration et l'invasion des cellules. Nous avons ensuite validé ces travaux en observant une inhibition de ces phénomènes en présence de gefitinib, un inhibiteur spécifique d'EGFR [59].

De plus, l'implication du microenvironnement tumoral dans l'activation de EGFR dans le CCA a été également mis en évidence par notre équipe : il a été reporté que les CAFs expriment des ligands d'EGFR, dont HB-EGF, promouvant ainsi l'activation des voies dépendantes d'EGFR dans les cellules de CCA. A son tour, l'activation de l'EGFR induit la production de TGF β par les cellules CCA, générant ainsi un cercle vicieux entre les cellules tumorales et les CAFs [58].

Toujours au sein de notre équipe, nous avons mis en évidence le rôle de la protéine d'échafaudage sous-membranaire EBP50 (Ezrin-radixin-moesin-Binding Phosphoprotein 50) dans la carcinogenèse biliaire, via l'activation d'EGFR [115]. En effet, en conditions physiologiques, EBP50 se lie à EGFR au niveau de la membrane plasmique. Or dans le CCA, EBP50 est exprimée dans le cytoplasme des cellules tumorales dans 66% des cas, soulignant une perte d'interaction entre EBP50 et EGFR. Les travaux ont montré que la perte d'expression

sous-membranaire d'EBP50 entraînait une activation d'EGFR dans les cellules, induisant ainsi un phénotype de TEM qui favorise la progression cellulaire. Nous avons été capables de prévenir ces changements phénotypiques en inhibant EGFR par le gefitinib [115].

EGFR peut également être activé indirectement par divers composés connus pour participer à la pathogenèse du CCA, tels que les acides biliaires [121]. Cette activation du récepteur induit l'expression de COX-2 dans la cellule de CCA, contribuant ainsi à la carcinogenèse des cellules épithéliales en favorisant la croissance tumorale et l'angiogenèse, tout en inhibant l'apoptose [61].

1.4.5 Altérations de la voie EGFR dans la carcinogénèse du CCA

Trois types d'altérations peuvent conduire à l'activation de la voie EGFR dans les cellules cancéreuses. Il s'agit des amplifications, des surexpressions et surtout des mutations. L'ensemble des altérations de la voie EGFR sont mutuellement exclusives [131].

Des mutations d'EGFR sont rarement détectées dans le CCA, dans 0% à 15% des cas, principalement dans les exons 18-21 codant le domaine tyrosine kinase (Tableau 3) aboutissant à une activation des voies signalisation en aval [132, 133]. Dans des travaux menés par Gwak GY et al., des mutations d'EGFR décrites dans le cancer du poumon ont été identifiées dans le CCA [132]. Cependant, certaines mutations n'ont pas été décrites auparavant dans le CCA, empêchant ainsi de connaître leur rôle biologique ou leur impact sur la sensibilité aux traitements [134]. Parmi les mutations rencontrées, la mutation T790M dans l'exon 20 a été rapportée chez très peu de patients atteints de CCA [134, 135]. Il s'agit de la substitution d'une thréonine par une méthionine en position 790, ce qui aboutit à une augmentation de l'affinité du récepteur pour l'ATP, et/ou une augmentation de son niveau de phosphorylation et donc de son activité, et/ou une diminution de l'affinité des ITK pour l'EGFR. Cette mutation est impliquée dans la résistance acquise aux ITK ciblant EGFR dans d'autres cancers [136]. En outre, il a été démontré que les mutations d'EGFR sont plus fréquentes dans les CCA développés à partir des maladies chroniques du foie par rapport à ceux (ici CCA) développés à partir d'un foie normal [137]. De plus, certaines mutations d'EGFR se sont révélées des marqueurs de faible pronostic dans le CCA [73, 133]. Enfin, l'amplification d'EGFR analysée par FISH dans des échantillons humains de CCA est rarement détectée [135, 138, 139].

Etudes réalisées	Type de CCA	Nombres de cas avec des mutations de EGFR (%)	Exon muté
1	22 CCA	3 (13,6%)	19
2	22 CCA	0 (0%)	19,20,21
3	40 CCA dont 11 VB 15 CCAi 14 CCAe	6 (15%) 1 3 2	
4	142 CCAi	2 (2,4%)	21
5	153 CCA dont 26 VB 70 CCAi 57 CCAe	2 (1,3%) 1 (3,8%) 1 (1,7%)	20
6	51 CCA (VB)	2 (3,9%)	5, 21
7	81 CCAi 38 CCAi avec MCFA 43 CCAi avec un FN	6 (7,4%) 5 (13%) 1 (2%)	19
8	137 CCA dont 35 VB 45 CCAi 57 CCAe	13 (9,5%) 2 2 9	20, 21
9	116 CCA dont 34 VB 87 autres	2 (1,7%) 0 2	20

Tableau 3 : Fréquence des mutations de EGFR dans le CCA. Abréviations : CCAi : Cholangiocarcinome intrahépatique ; CCAe : Cholangiocarcinome extrahépatique ; FB : Foie normal ; MCFA : Maladie chronique du foie ; VB : vésicule biliaire [116].

1.4.6 Thérapies anti-EGFR dans le cholangiocarcinome

1.4.6.1 Inhibiteurs d'EGFR et leur mode d'action

Un inhibiteur de kinase est un traitement qui inhibe une ou plusieurs kinases intervenant dans les voies d'activation cellulaire utilisées préférentiellement par les cellules impliquées dans la pathologie à traiter (cancer, maladies auto-immunes ou inflammatoires). Parmi les thérapies qui ciblent EGFR, il existe deux classes majeures de médicaments : i) les anticorps monoclonaux qui bloquent le domaine extracellulaire du récepteur, empêchant ainsi la fixation du ligand, ce qui provoque son internalisation dans la cellule. ii) les inhibiteurs de

l'activité tyrosine kinase (ITK), qui sont de petites molécules qui inhibent la phosphorylation sur des tyrosines du domaine catalytique du récepteur. (Tableau 4).

Type	Molécules	Cibles
Anticorps Monoclonaux	Cetuximab	EGFR
	Panitumumab	EGFR
Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)	Erlotinib	EGFR
	Gefitinib	EGFR
	AZD9291	EGFR
	Vandetanib	EGFR
	AEE788	EGFR / ErbB2
	Lapatinib	EGFR / ErbB2
	Afatinib	EGFR / ErbB2
	Dacomitinib	EGFR / ErbB2
GW2974	EGFR / ErbB2	

Tableau 4 : Thérapies anti-EGFR dans le CCA [116].

1.4.6.2 Inhibiteurs d'EGFR testés dans le CCA

Etudes pré-cliniques

Des études précliniques dans le CCA ont montré que le traitement des cellules tumorales avec des thérapies anti-EGFR inhibe la prolifération cellulaire, induit un arrêt des cellules en phase G1 ainsi qu'une apoptose des cellules [116, 121]. Des études supplémentaires ont montré que la combinaison des inhibiteurs ciblant à la fois EGFR et ErbB2 était davantage efficace que les traitements ciblant seulement EGFR dans les lignées cellulaires de CCA [140]. De plus, la combinaison des anti-EGFR (gefitinib/erlotinib et lapatinib) avec des agents de chimiothérapies (gemcitabine) s'avère avoir des effets synergiques antiprolifératifs dans les lignées cellulaires de CCA permettant une diminution de la croissance tumorale *in vivo* [140, 141]. D'autres travaux combinant des anti-EGFR avec d'autres thérapies ciblées, telles que les anti-MEK (kinase de la voie des MAPK) [142], mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) [143], ou VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) [144] ont montré une inhibition de la croissance cellulaire dans plusieurs lignées de CCA ainsi qu'un effet anti-tumoral *in vivo*. Par ailleurs, dans le même contexte des travaux de notre équipe cités précédemment, le traitement des cellules de CCA par le gefitinib entraîne une inhibition du phénotype de TEM, diminuant ainsi leurs propriétés migratoires et invasives [59, 115]. L'administration de gefitinib dans un modèle murin de xénogreffe de CCA s'accompagne d'une réduction de la croissance tumorale et de la réversion du phénotype de TEM.

Etudes cliniques

Bien que les études précliniques aient démontré un potentiel effet inhibiteur des anti-EGFR sur la croissance tumorale dans les cellules de CCA, les essais cliniques réalisés chez les patients atteints de CCA avec des ITK (erlotinib, gefitinib) ou des anticorps monoclonaux (cetuximab, panitumumab), en combinaison ou non avec d'autres agents, n'ont pas réellement été bénéfiques. En effet, aucune amélioration significative de la survie globale n'est observée dans les phases II et III des essais cliniques [116] (Tableau 5). Un essai récent de phase II évaluant la combinaison de gemcitabine, de cisplatine et de panitumumab chez des patients atteints de CCA non mutés pour KRAS a révélé un bénéfice clinique prometteur, suggérant un potentiel bénéfice des traitements anti-EGFR chez des patients sélectionnés pour leur statut mutationnel KRAS [145]. La seule étude de phase III comparant l'administration du GEMOX (gemcitabine et oxaliplatine) et de l'erlotinib par rapport au GEMOX seul (chimiothérapie conventionnelle) n'a montré aucune différence significative au niveau de la médiane de survie. Des inhibiteurs irréversibles des récepteurs ErbB ont été mis au point et font actuellement l'objet d'essais cliniques [146]. En effet, un essai clinique de phase II a évalué l'efficacité du lapatinib dans le traitement du CCA avancé avec un taux de réponse de 0% [147]. Une étude récente en phase Ib a montré une médiane de survie plus longue chez les patients atteints de CCA, traités par administration pulsatile d'erlotinib combinée à la chimiothérapie conventionnelle par rapport aux patients traités seulement par chimiothérapie. Ces données suggèrent un effet bénéfique de l'administration pulsatile d'anti-EGFR sur la survie des patients [148] (Tableau 5). Néanmoins, les résultats des essais cliniques jugés décevants, suggèrent l'existence de mécanismes de résistance aux thérapies anti-EGFR dans le CCA.

Traitement	Phase clinique	Nombre de patients	RC (%)	RP (%)	TRO (%)	MS (%)	Médiane de survie (mois)
Erlotinib	II	42	0	8	8	43	7,5
Lapatinib	II	17	0	0	0	26	5,2
Erlotinib /Bevacizumab	II	53	0	12	12	51	9,9
GEMOX + cetuximab	II	30	10	53	63	17	15,2
GEMOX + erlotinib	III	135	0	30	30	36	9,5
- erlotinib		133	2	14	16	51	9,5
GEMOX + capecitabine + panitumumab	II	46	2,4	31	33	50	10
Gemcitabine + capecitabine + cetuximab	II	34	6	12	18		15,7
Gemcitabine + irinotecan + panitumumab	II	35	6	26	74	43	12,9
GEMOX + panitumumab		31	0	45	45	45	20,3
GEMOX + cetuximab	II	76	1	17	24	44	11
- cetuximab		74	2	15	23	31	12,4
Sorafenib + erlotinib	II	34	0	6	-	-	6
Vandetanib	II	59	-	-	4	-	7,6
Vandetanib + gemcitabine		58	-	-	19	-	9,5
Gemcitabine + placebo		56	-	-	14	-	10,2
GEMOX + cetuximab	II	62	-	24	27	55	10,6
- cetuximab		60	-	15	15	45	9,8
GEMOX + panitumumab	II	45	2	24	27	49	9,9
- panitumumab		44	2	16	18	50	10,2
Gemcitabine + cisplatine + panitumumab	II	46	2	30	-	41	30
GEMOX + erlotinib pulsatile	Ib	17	0	29	29	65	18

Tableau 5 : Essais cliniques des thérapies anti-EGFR dans le CCA. Abréviations : GEMOX : Gemcitabine + Oxaliplatine ; MS : Maladie stable ; RC : Réponse complète ; RP : Réponse Partielle ; TRO : Taux de réponse objective [116].

1.5 Résistance aux thérapies ciblant EGFR dans le cholangiocarcinome

Le manque d'efficacité des thérapies anti-EGFR a permis une étude approfondie des mécanismes mis en place par la cellule tumorale, afin d'échapper au traitement. Des travaux ont montré que plusieurs mécanismes moléculaires peuvent contribuer au développement d'une résistance aux thérapies anti-EGFR et permettent de distinguer la résistance primaire ou innée de la résistance secondaire ou acquise.

1.5.1 Résistance primaire

La résistance primaire résulte généralement de mutations primaires présentes dans les cellules tumorales et se définit comme une progression lente dans les 3 à 6 mois suivant l'initiation d'un traitement. Les mutations primaires comprennent les altérations génétiques du récepteur EGFR mais aussi des molécules de signalisation de la voie EGFR.

1.5.1.1 Altérations d'EGFR

Les insertions dans l'exon 20 du gène de l'EGFR sont une des principales causes de résistance primaire aux anti-EGFR. Des mutations primaires du domaine tyrosine kinase de EGFR ont été reportées dans le CCA et décrites précédemment dans la deuxième partie de l'introduction. Cependant, leur impact sur la sensibilité aux traitements anti-EGFR n'est pas connu. La résistance aux anti-EGFR dans le CCA peut également résulter de mutations primaires de protéines de signalisation en aval telles que KRAS ou BRAF. Des mutations de *KRAS* et de *BRAF* apparaissent respectivement dans 3 à 54% et dans 0% à 33% des CCA [149].

1.5.1.2 Altérations de KRAS

Le gène *KRAS* qui code la protéine KRAS est situé sur le chromosome 12 humain (12p12). Elle fait 21 kDa et 188 acides aminés, et joue un rôle majeur dans la transduction du signal relayée par EGFR, aboutissant à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse [150]. *KRAS* est muté dans 30% des cancers et une mutation gain de fonction de KRAS avec une fréquence de 9% à 40% a été

rapportée dans le CCA [151-153]. Les mutations surviennent sur les codons 12 et 13 de l'exon 2 dans 90% des cas [154]. Elles sont responsables d'une activation constitutive de la protéine KRAS, qui est insensible à l'inactivation par les protéines activatrices de GTPase (GAP), ce qui lui confère un pouvoir oncogénique. La présence d'une mutation de KRAS est associée à une invasion périneurale, à un stade avancé de la tumeur et à un mauvais pronostic dans le CCA [155]. Un essai clinique de phase II a montré des effets bénéfiques de la combinaison de gemcitabine, cisplatine et panitumulab chez des patients atteints de CCA et non mutés pour KRAS, suggérant le rôle des mutations de KRAS dans la résistance aux traitements anti-EGFR du CCA [145]. Malgré la fréquence reconnue des mutations de KRAS, le ciblage de cette voie reste difficile et aucune thérapie ciblant directement KRAS n'est actuellement en cours de développement. Une étude clinique dans le CCA testant l'effet du traitement combiné GEMOX associé au cetuximab par rapport au GEMOX seul, n'a montré aucun résultat chez les 14% patients mutés pour *KRAS* et qui surexpriment EGFR [156]. Cependant, ces données ont été interprétées avec prudence, notamment en raison du manque de statistiques (pas assez d'échantillons humains de tumeur non mutées pour KRAS disponibles)[156].

Le développement récent d'un modèle de xénogreffe dérivé d'un patient atteint de CCAi portant la mutation KRAS la plus fréquente (G12D) devrait apporter des réponses sur le rôle de cette mutation dans l'efficacité du traitement du CCA, notamment aux anti-EGFR [142].

1.5.1.3 Altérations de BRAF

BRAF est un proto-oncogène situé sur le chromosome 7 et responsable de la production de la protéine B-Raf. Tout comme la protéine KRAS, elle constitue un élément clé de la voie de signalisation de prolifération RAS/RAF/MEK/ERK. Une fois activée, elle se dimérise pour phosphoryler et activer MEK conduisant à l'activation des voies de signalisation majeures impliquées dans la prolifération, la différenciation et la régulation de la transcription. La mutation du gène *BRAF* la plus fréquente dans les cancers humains est V600E, avec une faible prévalence rapportée dans le CCA [157] et exclusivement dans le CCAi. Cependant elle présente un intérêt, car elle est potentiellement prédictive de la réponse clinique aux inhibiteurs de BRAF. Dans une récente étude de phase II portant sur un inhibiteur de BRAF, le vémurafénib, dans le traitement du CCAi, seulement un patient sur 12, porteur de la mutation BRAF V600E, a obtenu une réponse partielle durable de plus d'un an [158], témoignant ainsi d'une résistance primaire au vémurafénib observée chez les patients atteints de CCAi.

Conformément à ce modèle de résistance primaire, deux rapports indépendants ont décrit des réponses significatives et durables de la combinaison d'un inhibiteur de BRAF, le dabrafénib, et d'un inhibiteur de MEK, le tramétinib, chez trois patients atteints de CCAi et mutés pour BRAF (V600E), qui ont été assignés à ce protocole thérapeutique [159, 160]. Ainsi, le double blocage de BRAF et de MEK1/2, déjà approuvé pour le traitement du mélanome [161], mériterait d'être considéré comme une option thérapeutique pour le traitement du CCAi pour lequel les patients porteurs de la mutation BRAF V600E sont chimioréfractaires. De manière intéressante, un inhibiteur de MEK, le selumétinib a été testé dans un essai clinique de phase II chez des patients atteints de CCA, montrant un bénéfice clinique prometteur (prise de poids, réponse objective, critère maladie sans progression rallongé de 16 semaines, augmentation de la médiane de survie sans progression) et suggérant ainsi son association à d'autres thérapies ciblées pour le traitement du CCA [162, 163].

1.5.2 Résistance secondaire

Il s'agit de la reprise évolutive de la tumeur après une première phase de réponse au traitement d'au moins 6 mois. Elle survient sous traitement anti-EGFR à long terme, en médiane 10 à 12 mois environ après l'initiation du traitement. Plusieurs mécanismes expliquant l'émergence d'une résistance acquise aux anti-EGFR ont été décrits. Dans le cancer du poumon, la mutation secondaire de EGFR T790M induit une résistance aux traitements anti-EGFR [136]. Comme décrit précédemment, cette mutation a été rapportée chez très peu de patients atteints de CCA mais sans qu'elle soit associée à une résistance acquise. A ce jour, aucune mutation secondaire d'EGFR n'a été rapportée après traitement anti-EGFR dans le CCA.

1.5.2.1 Activation de voies de signalisation alternatives

Outre la résistance aux inhibiteurs d'EGFR acquise par les mutations, plusieurs autres mécanismes sont impliqués dans le maintien de la signalisation de EGFR malgré son inhibition et ce par l'activation de plusieurs processus cellulaires et voies de signalisation alternatives. Parmi les multiples voies alternatives principalement décrites :

1.5.2.1.1 Signalisation Hepatocyte Growth Factor Receptor /Hepatocyte Growth Factor (MET/HGF)

Le gène du récepteur MET est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) et code le récepteur du facteur de croissance des hépatocyte HGF (Hepatocyte Growth Factor). Il s'agit

d'un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase qui joue un rôle essentiel dans la cancérogenèse en favorisant l'angiogenèse et l'invasion tumorale. La liaison de ce récepteur par son ligand HGF, active de multiples voies de signalisation, notamment la cascade des protéines MAPK et les voies PI3K, EGFR et VEGF [164].

La surexpression de MET est associée à un mauvais pronostic dans le CCA et est observée dans 12–58% des CCAi [165] et 0–16% des CCAe [166]. Il a été démontré que l'activation de la voie HGF influence le potentiel métastatique du CCA *in vitro* via l'activation des voies AKT et ERK, stimulant ainsi l'invasion et la motilité cellulaires [167]. D'autre part, l'amplification de MET est rare dans le CCA, mais a été rapportée à une fréquence de 7% dans une étude portant sur 26 cas de CCAi analysés par séquençage de nouvelle génération (NGS) [168]. L'amplification de MET en tant que mécanisme moteur de la résistance à l'inhibition d'EGFR a été décrit entre autres dans le CCA et le cancer du poumon. En effet, un « cross-talk » a été mis en évidence entre la voie MET et d'autres voies telles que les voies EGFR et VEGFR dans d'autres types de tumeurs (Figure 13). Concernant EGFR, des chercheurs ont démontré que l'amplification de MET entraînait une résistance aux inhibiteurs de EGFR, notamment au gefitinib dans le cancer du poumon [169]. Plus précisément, ils ont constaté que l'amplification de MET stimule l'activation de la voie PI3K via l'activation du récepteur ErbB3, provoquant ainsi une résistance au gefitinib. L'inhibition de la voie MET permet de restaurer la sensibilité des cellules tumorales au gefitinib [169]. Ainsi, la double inhibition de MET et d'EGFR, pourrait être utilisée comme stratégie thérapeutique dans le CCA. Dans un essai clinique de phase II évaluant l'efficacité du cabozantinib, un ITK ciblant MET, VEGFR2 et AXL, chez des patients atteints de CCA avancé : les données préliminaires ont montré une activité minimale avec l'arrêt précoce de l'essai après que 12 patients sur 19 n'aient pas montré d'évolution de réponse au bout de 16 semaines [170]. Une étude de phase II randomisée portant sur le merestinib, un inhibiteur de MET, associé au traitement de première ligne, sels de platine/gemcitabine, est en cours (NCT02711553). Les inhibiteurs de MET constituent une thérapie pertinente et prometteuse pour le CCA en monothérapie et en association avec des inhibiteurs d'EGFR.

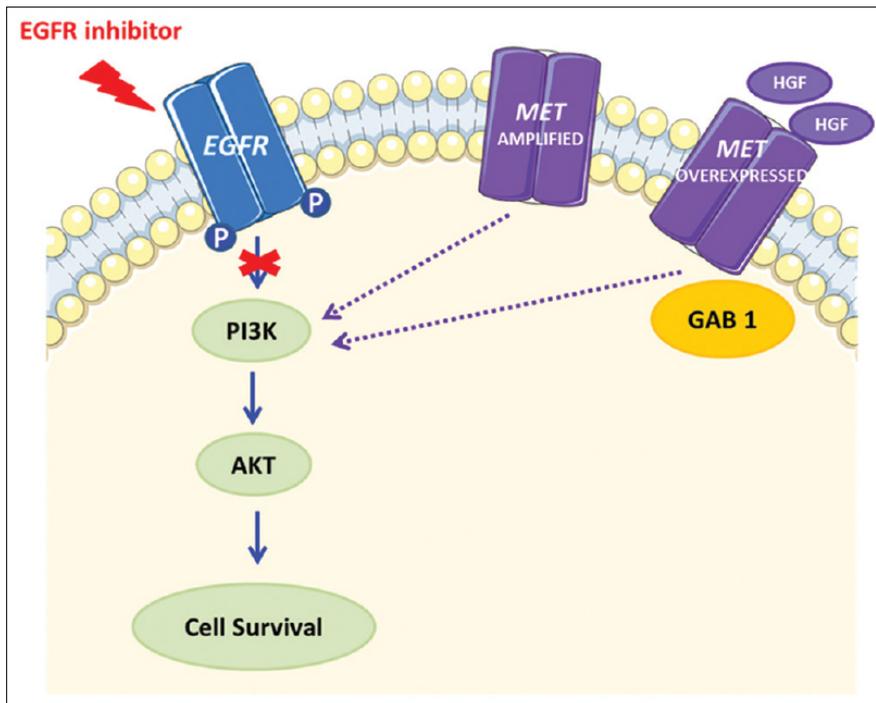


Figure 13 : Mécanisme d'échappement aux traitements des anti-EGFR. L'activation de HGF/MET entraîne une activation de la voie PI3K/AKT, indépendante de l'EGFR. Le ciblage combiné des deux voies améliore l'activité anti-tumorale en prévenant la résistance aux anti-EGFR. EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor, HGF : Hepatocyte Growth Factor, MET : Mesenchymal–Epithelial Transition factor, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, AKT : protéine kinase B, GAB1 : GRB2-associated-binding protein (Romano PM, Castanon E, Hollebecque A, et al. MET receptor amplification drives resistance to Anti-EGFR therapies. *J Immunother Precis Oncol*, 2019).

1.5.2.1.2 Signalisation IGF

Le récepteur de l'IGF1 (insulin-like growth factor 1), IGF1R, et ses ligands ont été impliqués dans de nombreux types de cancers (cancers du sein, prostate, côlon, poumon, thyroïde, glioblastomes, etc...) [171]. Ces cancers sont souvent associés à une surexpression et/ou à une suractivation d'IGF1R, ainsi qu'à une production anormale de ses principaux ligands (IGF1 et IGF2) [171, 172]. IGF1R fait partie de la famille du récepteur de l'insuline (IR), avec lequel il présente 60% d'homologie. IR possède deux isoformes, IR-A et IR-B, dont l'expression est différente selon les tissus : IR-A est exprimé majoritairement pendant la vie fœtale, tandis que IR-B est exprimé chez l'adulte. Cependant, une surexpression de IR-A est souvent observée dans les processus tumoraux [173, 174].

La liaison du ligand à son récepteur induit l'autophosphorylation du récepteur sur des tyrosines, ce qui stimule l'activité tyrosine kinase du récepteur envers des substrats intracellulaires (Figure 14). IR et IGF1R partagent plusieurs substrats (IRS1, Shc, ...) et plusieurs

voies de signalisation (voie de MAP kinases, voie PI3-kinase/PKB...). IGF1R est généralement considéré comme un récepteur contrôlant la croissance cellulaire, alors que IR est plutôt considéré comme un récepteur contrôlant le métabolisme énergétique. Cependant, les effets biologiques induits par ces récepteurs ne sont pas toujours clairement distincts : IGF1R a des effets métaboliques importants [175] alors que IR a, pour sa part, des effets bien documentés sur la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire [176]. Il apparaît en outre que IR puisse lui aussi jouer un rôle important dans certains processus de cancérogenèse [173, 174, 177]. Dans plusieurs tissus, il a été mis en évidence la présence de récepteurs hybrides constitués d'hétérodimères IR/IGF1R qui ont des effets biologiques se rapprochant plutôt de ceux d'IGF1R [178]. Ces hybrides semblent jouer un rôle majeur dans la signalisation par IGF1 dans certaines lignées dérivées de cancer du côlon [178], de la thyroïde [179] ou du sein [180] (Figure 14).

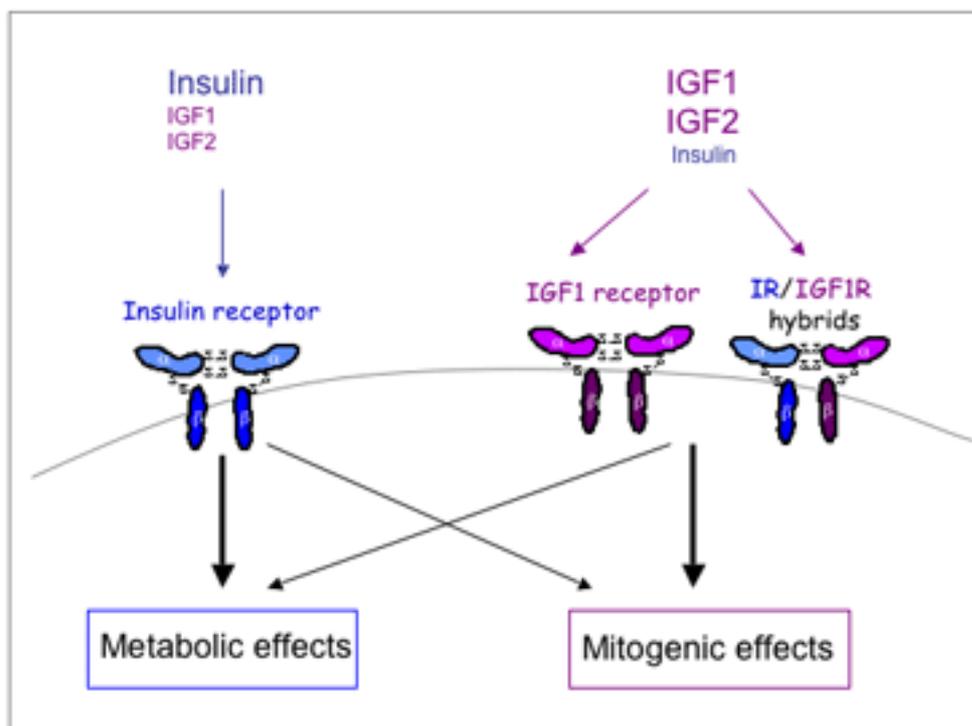


Figure 14 : Représentation schématique des récepteurs de la signalisation IGF : IR, IGF1R et récepteur hybride IR/IGF1R.

Le récepteur IGF1R est exprimé de manière omniprésente dans les cellules cancéreuses. Ce récepteur joue un rôle dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose et les métastases des cellules tumorales [181]. Il a été décrit comme étant impliqué dans la résistance acquise au gefitinib des lignées de carcinome à cellules squameuses. Dans ces études, les clones

résistants au gefitinib présentait une hyperphosphorylation d'IGF1R et une association constitutive du substrat 1 de IR, avec PI3K. Le blocage de la signalisation IGF1R entraîne une perturbation de ce complexe et restaure la capacité du gefitinib à réguler négativement la signalisation de la PI3K / AKT et la croissance cellulaire. Des travaux dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) ont montré que l'activation d'IGF1R permettait d'induire une TEM dans les cellules portant une délétion de l'exon 19 d'EGFR [182]. En réponse à l'inhibition d'EGFR par l'erlotinib ou le gefitinib, il a été démontré qu'une hétérodimérisation d'EGFR et d'IGF1R entraînait l'activation de mTOR, conduisant à la synthèse de novo d'EGFR et de la survivine, permettant ainsi la survie des cellules tumorales [183, 184]. Ce mécanisme de résistance est observé avec les inhibiteurs d'EGFR de la première [182, 183] [184], de la deuxième [185] et de la troisième génération [186]. Ainsi, une double inhibition des récepteurs EGFR et IGF1R permettrait de prévenir ou de contrecarrer cette résistance aux anti-EGFR [187, 188].

Dans le CCA, des travaux réalisés par notre équipe récemment ont mis en évidence l'implication de l'axe de signalisation IGF1R/IR dans la résistance secondaire à l'erlotinib [189]. Les résultats de ces travaux seront détaillés dans l'article 1 de la partie « Résultats ».

1.5.2.2 La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

1.5.2.2.1 Généralités

La TEM a été observée pour la première fois en 1980, dans une ligne primitive d'embryons de poulet. Il s'agit d'un processus dynamique complexe au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales afin d'acquérir de manière transitoire et réversible des propriétés de cellules mésenchymateuses, ce qui nécessite des modifications architecturales et fonctionnelles complexes (Figure 15) [190]. La TEM est caractérisée par une perte de la polarité cellulaire et une altération de l'organisation du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire (dérégulation des marqueurs épithéliaux E-cadhérine, β -caténine, etc.), permettant aux cellules d'acquérir une grande plasticité et des capacités migratoires et invasives (acquisition des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine, vimentine, etc.). En effet, les marqueurs communément utilisés afin de caractériser le processus de TEM incluent :

- la perte de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine au profit d'une augmentation de la N-cadhérine. La N-cadhérine (Neural-cadherin), comme son nom l'indique, est impliquée

dans la formation des jonctions intercellulaires dans le tissu nerveux, mais est aussi spécifique des cellules mésenchymateuses.

- la relocalisation nucléaire de la β -caténine. La fonction de la β -caténine dépend de sa localisation subcellulaire. Dans une cellule épithéliale, elle est sous-membranaire du fait de son interaction physique avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes. Par contre, dans une cellule mésenchymateuse, elle est dissociée des jonctions par la perte de l'expression de l'E-cadhérine. Elle se retrouve dans le cytoplasme où elle sera, soit dégradée, soit transloquée dans le noyau, afin d'induire ou de réprimer l'expression de gènes cibles.

- l'expression de facteurs de transcription tels que Snail1, Slug (Snail2), Twist, ZEB1 et ZEB2, qui peuvent inhiber la transcription de la E-cadhérine. Leurs fonctions seront détaillées ultérieurement.

- l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, un membre de la famille des filaments intermédiaires, importants pour la structure du cytosquelette. La vimentine est induite par la β -caténine.

- la production de protéines favorisant l'invasion telles que les MMPs (Matrix Metallo Proteinase) qui dégradent la matrice extracellulaire.

- les marqueurs fonctionnels : élongation des cellules, augmentation de la migration, l'invasion et la dissémination puis résistance à l'apoptose.

De manière importante, la TEM est réversible par le processus inverse de transition mésenchymo-épithéliale (MET), des cycles de TEM-MET étant à l'origine de la plasticité cellulaire.

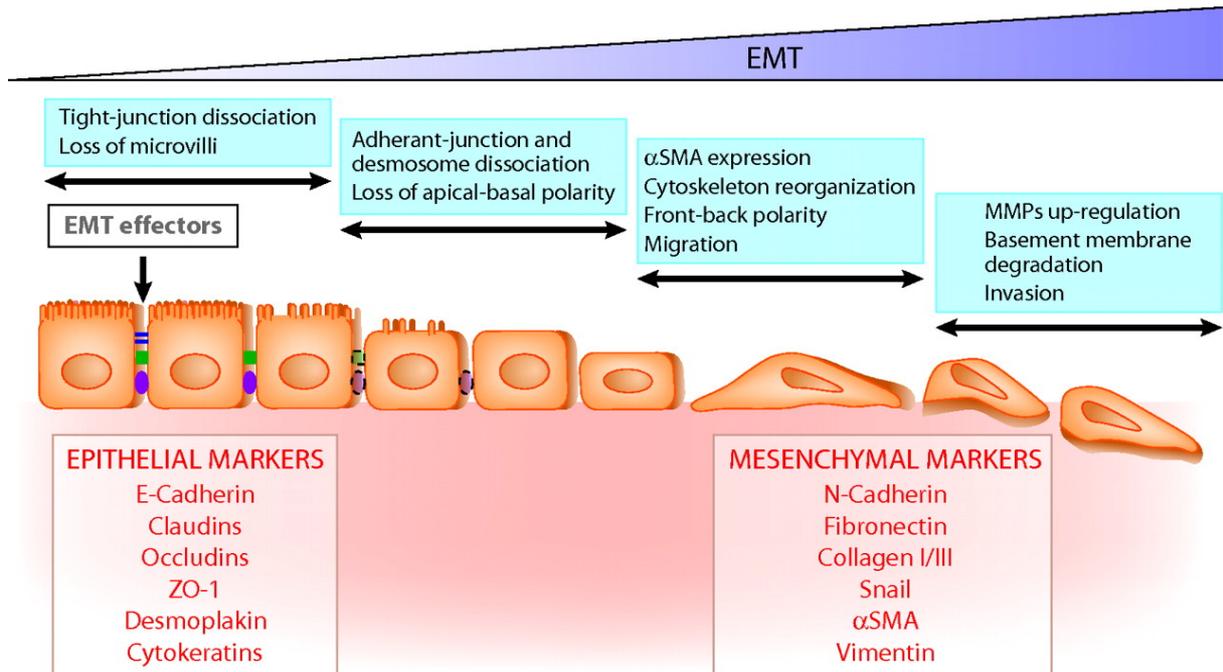


Figure 15 : Événements clés durant la TEM. Le schéma montre quatre étapes essentielles à la mise en place d'un programme de TEM ainsi que les marqueurs épithéiaux et mésenchymateux les plus couramment utilisés [191].

Il existe trois différents types de TEM dans les processus physiologiques et pathologiques (Figure 16). La TEM physiologique s'observe lors de l'embryogenèse et des processus de cicatrisation tandis que la TEM pathologique a été décrite lors de processus fibrotiques et de tumorigenèse [192, 193].

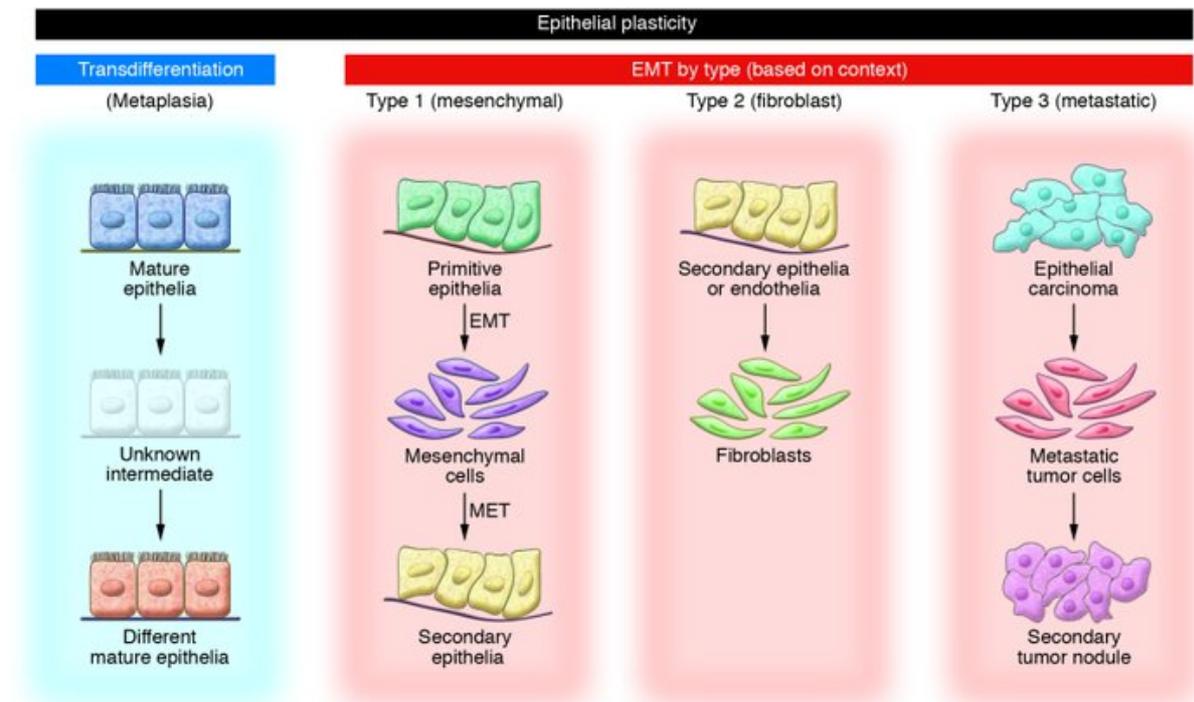


Figure 16 : Les trois différents types de TEM. La TEM de type 1 aboutit à la production de cellules mésenchymateuses multipotentes capables de former de multiples tissus épithéliaux secondaires par transition mésenchymo-épithéliale (MET). Lors de la TEM de type 2, les cellules produites sont des fibroblastes différenciés qui semblent revenir sous leur forme « originelle » en l'absence de signaux. La TEM de type 3 est impliquée dans la progression tumorale et l'invasion métastatique [194].

Type 1 (Embryogenèse)

La TEM constitue un processus essentiel au cours de l'embryogenèse. En effet, en son absence, le développement de l'organisme ne dépasse pas le stade de la blastula. La TEM est ainsi nécessaire au développement du mésoderme au cours de la gastrulation, mais aussi à la migration des cellules de la crête neurale, puis à la formation des valves cardiaques et au développement du palais [195]. Ce type de TEM se fait sous le contrôle de signaux locaux et aboutit à des phénotypes mésenchymateux transitoires et réversibles destinés à générer des épithéliums secondaires par réversion de la TEM, dans le cas d'une transition mésenchymo-épithéliale (TME). La TEM de type 1 permet également des étapes de morphogenèse pouvant intervenir dans l'homéostasie de certains tissus chez l'adulte (glande mammaire, utérus, néo-angiogenèse, etc.) [196].

Type 2 (Cicatrisation, Fibrose)

La TEM de type 2 est associée aux phénomènes de cicatrisation et de régénération tissulaire ainsi qu'aux pathologies fibrotiques. Cette TEM est initiée par des signaux moléculaires pro-inflammatoires sécrétés par les cellules inflammatoires recrutées en réaction à une lésion et cesse souvent dès que l'inflammation s'atténue. La TEM induite lors des processus de réparation cellulaire présente des mécanismes très similaires à ceux impliqués dans l'embryogenèse, mais les cellules générées sont des cellules non multipotentes dont la différenciation est très spécifique du tissu lésé. Contrairement à la TEM de type 1, les cellules qui se ré-épithélialisent reviennent à leur état d'origine sous forme d'un épithélium différencié [197, 198]. Le processus de cicatrisation peut aboutir à la production en excès du tissu conjonctif pour remplacer le tissu original et générer une dysfonction organique. Ainsi, la TEM aboutit à la fibrose dans certains organes possédant une organisation de type tubulo-lobulaire tels que le poumon, le foie, le rein et la glande mammaire [192]. Dans certains cas, la fibrose peut se prolonger et donner naissance à une inflammation continue, pouvant entraîner la destruction de l'organe ou une transformation tumorale [199].

Type 3 (Cancérogenèse)

La TEM de type 3 s'observe dans le contexte de la progression tumorale et l'invasion métastatique. Durant la TEM, les cellules cancéreuses perdent leurs propriétés adhésives et gagnent des propriétés migratrices et protéolytiques nécessaires à la formation de métastases. Au sein d'une même tumeur, le gain de marqueurs mésenchymateux et la perte de marqueurs épithéliaux sont corrélés avec la progression tumorale et à un mauvais pronostic [200]. En effet, différents travaux ont mis en évidence le rôle de la TEM au cours de la progression tumorale que ce soit dans des échantillons cliniques ou dans des modèles expérimentaux, dans le cancer colorectal ou dans le CCA par exemple [201, 202].

Voies de régulation de la TEM

La TEM est régulée à des niveaux multiples via l'activation d'une machinerie transcriptionnelle complexe, notamment des facteurs de transcription inducteurs de la TEM (TEM-TFs), mise en œuvre en réponse à des signaux du microenvironnement [190]. Une grande variété de signaux extracellulaires peuvent induire une TEM et la plupart des voies impliquées au cours du processus embryonnaire sont également connues pour être activées au cours de la progression tumorale [190, 193]. C'est le cas des voies Wnt, Hedgehog ou Notch, ainsi que des voies de signalisation des cytokines TGF- β (Transforming Growth factor- β), EGF, FGF (Fibroblast Growth Factor) et HGF. Le TGF- β est sans doute la cytokine dont le rôle au cours de la TEM est le mieux caractérisé [190, 203]. En effet, la liaison à son récepteur transmembranaire, induit une activation de cette signalisation afin d'activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la TEM [204]. Le TGF- β est également capable d'induire d'autres voies de signalisation impliquées dans l'induction d'une TEM, telles que les voies Notch et Wnt. Cette étape cruciale de l'activation de la voie Wnt conduit à la stabilisation et à la translocation dans le noyau de la β -caténine, où elle est capable d'induire l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'induction de la TEM [205].

Facteurs de transcription inducteurs de la TEM (TEM-TFs)

Parmi les TEM-TFs, je ne présenterai ici que les facteurs appartenant aux 3 principales familles, SNAIL, ZEB et TWIST, mais il est à noter que d'autres facteurs ont été décrits comme présentant de telles propriétés, tels que Gooseoid, FOXC2, SIX1 ou plus récemment encore Prrx1 [206]. Le rôle commun de Snail, Twist et ZEB est la répression transcriptionnelle de *CDH1* qui code la E-cadhérine. Celle-ci est une protéine essentielle au maintien de l'intégrité d'un épithélium. Par conséquent, l'inhibition de sa synthèse est une étape cruciale de la TEM.

Snail

Les gènes codant les facteurs de transcription Snail1, Snail2 et Snail3 ont été les premiers identifiés comme régulateurs de l'expression de la E-cadhérine [207]. Les différents membres de la famille Snail sont des facteurs de transcription à doigts de zinc (6 doigts de zinc de type C2H2 sont localisés dans la région C-terminale de la protéine), qui peuvent se lier à l'ADN au niveau de la séquence C/A(CAGGTG), appelée « E-boxe ». Snail1 et 2 sont essentiels pendant la gastrulation chez la souris, le développement des crêtes neurales chez l'embryon de poulet et de grenouille et jouent un rôle dans le mouvement et l'adhésion des cellules plutôt que dans la différenciation cellulaire [208].

Twist

D'autres répresseurs de la E-cadhérine incluent les facteurs de transcription à domaines basiques de type hélice-boucle-hélice (bHLH), tels que E47 et Twist. Les facteurs bHLH complexés en homo ou hétérodimères peuvent également se fixer à l'ADN au niveau des boîtes E, mais sur un consensus moins stringent, CANNTG, où N peut être l'une ou l'autre des 4 bases. Cette classe de protéines peut agir en tant qu'activateur ou répresseur transcriptionnel, via le recrutement d'enzymes modificatrices de la chromatine telles que l'histone acétyl-transférase (HAT) p300, ou bien par son interaction avec des corépresseurs tels que SIN3A. Les facteurs de transcription bHLH sont classés en 7 familles selon leur distribution tissulaire, leur dimérisation et leur spécificité de liaison à l'ADN. Dans le cadre de la TEM, les facteurs les plus représentatifs appartiennent à la classe I qui comporte TCF3 (isoformes E12 et E47), TCF4 codé par le gène E2A et TCF12 (isoformes α et β). Ils ont une expression ubiquitaire et agissent en tant qu'homodimères ou hétérodimères en association avec les facteurs de la classe II. La classe II comporte les facteurs Twist1 et Twist2, qui ont une spécificité tissulaire et sont toujours associés en hétérodimères avec des facteurs de la classe I [209]. Les facteurs bHLH sont impliqués dans la détermination du lignage cellulaire et le contrôle de la prolifération.

ZEB

Enfin, parmi les régulateurs de l'expression de la E-cadhérine, on compte les facteurs ZEB (Zinc finger E-box binding homeobox). Cette famille de facteurs de transcription comprend deux membres, ZEB1 (δ -EF1) et ZEB2 (SIP1 Smad Interacting Protein 1) codés par les gènes *ZEB1* ou *ZFHX1A* et *ZEB2* ou *ZFHX1B*, respectivement. Comme leur nom l'indique, ce sont des facteurs de transcription à plusieurs doigts de zinc (3 à 4 doigts de zinc de type C2H2 et C3H localisés dans un homéodomaine), par lesquels ils interagissent avec l'ADN au niveau de boîtes E dont

la séquence bipartite correspond à CACCT et CACCTG, comme celle retrouvée au niveau du promoteur de *CDH1* [210]. ZEB1 et ZEB2 peuvent transactiver la transcription de gènes cibles par leur interaction avec des co-activateurs, PCAF ou p300 pour ZEB1, ou des co-répresseurs, CtBP pour ZEB2. Ce sont des facteurs exprimés pendant l'embryogenèse dans le système nerveux central, le cœur, le muscle squelettique et les cellules hématopoïétiques. Un défaut d'expression de l'un des deux facteurs ZEB dans ces tissus peut être partiellement compensé par l'autre, ce qui indique un rôle commun de ZEB1 et de ZEB2. Cependant, l'extinction de ZEB2 chez la souris est létale pour l'embryon, avec des défauts de migration des cellules des crêtes neurales, qui ne peuvent pas être compensés par l'expression de ZEB1 [211].

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle de ZEB1 qui fait l'objet d'un chapitre dans la dernière partie de l'introduction.

La liste des divers acteurs ou stimuli activateurs de la TEM est très longue et tous n'ont pas été abordés tels que le rôle de l'hypoxie, d'autres voies de signalisation du microenvironnement et des miR, entres autres, dans la régulation de la TEM [212] (Figure 17).

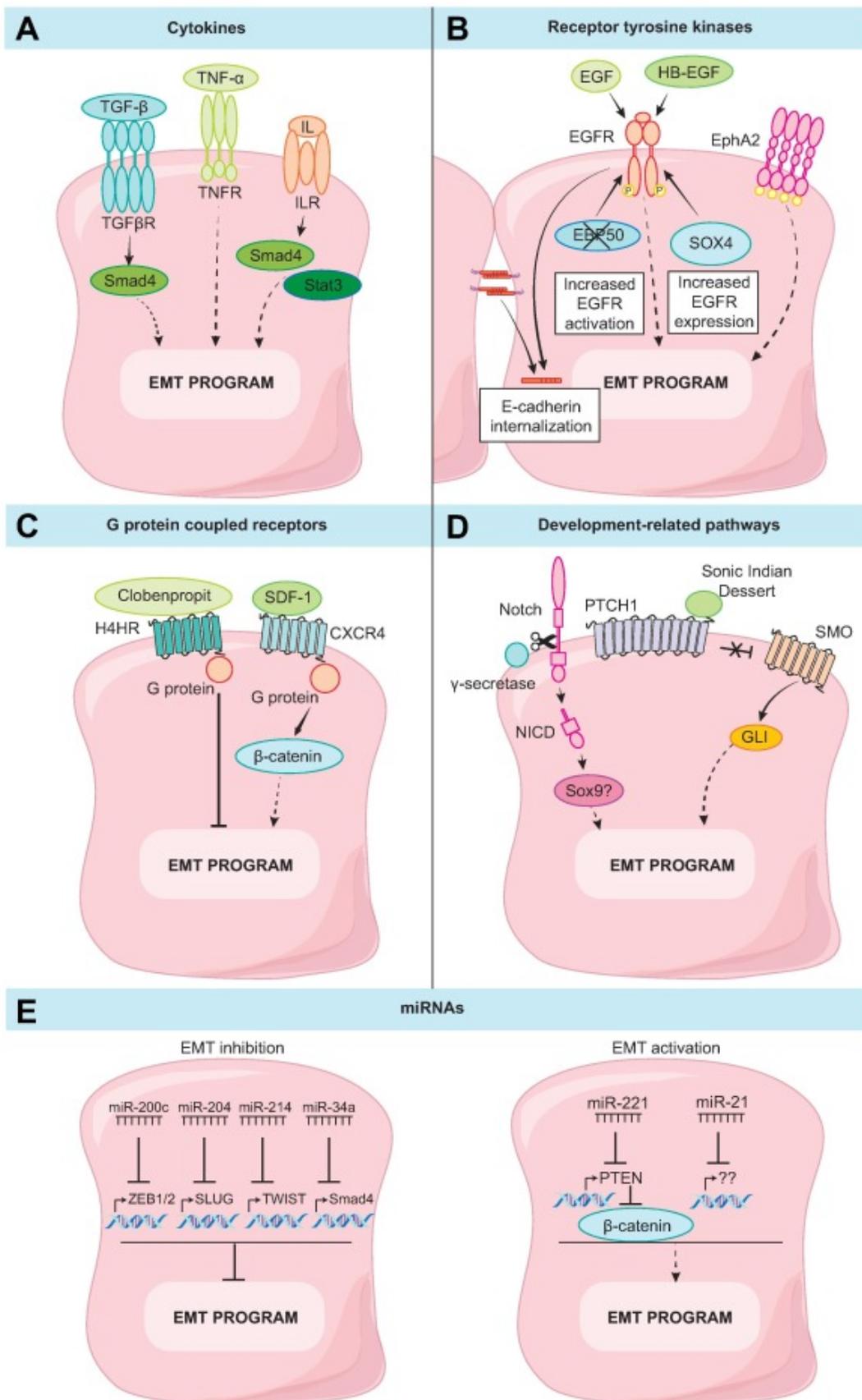


Figure 17 : Voies de signalisation et acteurs impliqués dans la régulation de la TEM dans le CCA. Les cytokines (A), les récepteurs à activité tyrosine kinase (B), les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (C) et les récepteurs impliqués dans les processus

de développement (D) jouent un rôle dans l'induction de la TEM en activant les voies de signalisation intracellulaires dans les cellules tumorales biliaires. Les miR ciblent plusieurs protéines régulatrices de la TEM (E). CXCR4, chemokine receptor type 4; EBP50, ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; EMT, epithelial-mesenchymal transition; EphA2, ephrin type-A receptor 2; GLI, glioma-associated oncogene; H4HR, H4 histamine receptor; HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; IL, interleukin; ILR, interleukin receptor; miR, microRNA; NICD, notch intracellular domain; PTCH, patched receptor; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; SMO, smoothed; SOX4, sex determining region Y box 4; SOX9, sex determining region Y box 9; Sp1, specificity protein 1; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TGF- β , transforming-growth factor- β ; TGF β R, transforming-growth factor- β receptor; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TNFR, tumor necrosis factor receptor; ZEB, zinc finger E-box binding homeobox 1 [202].

1.5.2.2.2 Lien entre la TEM et l'acquisition de propriétés de CSC

Les récentes avancées dans le domaine de l'oncologie ont démontré l'existence d'une population cellulaire, les cellules souches cancéreuses (CSC), ayant un rôle central dans la propagation et la résistance tumorales. Les CSC sont une population de cellules au sein de la tumeur, qui possèdent une capacité d'auto-renouveau et capables de générer des lignées hétérogènes. Les CSC sont hautement tumorigènes et sont responsables de la chimio/radio-résistance et de la récurrence tumorale [213]. En effet, les CSC sont liées au développement de la tumeur, aux métastases et à la résistance thérapeutique, et influencent donc directement le pronostic clinique. Cela a été démontré dans de nombreux cancers. Par exemple, les CSC sont capables d'échapper aux régimes chimiothérapeutiques actuels en expulsant les médicaments administrés [214]. Il a été souligné que certaines populations de CSC expriment préférentiellement à leur surface cellulaire des transporteurs du type ABC (ATP binding cassette) qui confèrent une imperméabilité aux médicaments en les expulsant continuellement dans le milieu extracellulaire [214].

De plus en plus de travaux décrivent que les cellules ayant subi une TEM sont dotées de capacités migratoires et invasives se calquant sur les caractéristiques de CSC, conférant ainsi aux cellules tumorales une résistance aux chimiothérapies [212, 215, 216]. Plusieurs études ont mis en évidence la relation complexe entre la TEM et le phénotype de CSC. Deux groupes de chercheurs, Morel et *al.* et Mani et *al.*, ont montré notamment à l'aide d'un modèle de progression tumorale mammaire que la population CD44^{high}/CD24^{low} (caractéristique d'une population de CSC) de cellules saines et transformées possède un phénotype associé à la TEM en comparaison à la population CD44^{low}/CD24^{high}. Ils ont ainsi montré que les caractères

souches et tumorigènes des cellules étaient dépendantes de la TEM. Plus précisément, ils ont évalué la capacité d'auto-renouveau des cellules CD44^{high}/CD24^{low} qui s'est avérée corrélée à un phénotype de TEM dans les cellules. De plus, ils ont constaté que l'induction de la TEM par le TGF- β permettait la génération de cellules CD44^{high}/CD24^{low} [215, 216]. De façon similaire, la signature moléculaire CD44^{high}/CD24^{low} a été associée à un phénotype de TEM et de CSC dans le carcinome épidermoïde oral [217]. En utilisant une méthode sensible pour marquer et suivre les cellules épithéliales pancréatiques dans un modèle murin de cancer du pancréas, Rhim et *al.* ont découvert que les cellules tumorales disséminées présentaient un phénotype mésenchymateux et présentaient des propriétés de CSC [218]. Le rôle des TEM-TFs classiques, tels que Snail/Slug, Twist ou Zeb1/2, dans l'acquisition des propriétés de CSC a également été démontré notamment dans le cancer du sein [216], du pancréas [219] et du foie [220]. Des travaux réalisés par Shuang et *al.* ont montré que la TEM induite par TGF- β dans les cellules de CCA entraînait la génération de CSC ALDH (Aldéhyde déshydrogénase) positives, un marqueur de CSC [221]. Enfin, toujours dans le CCA, nous avons montré que les cellules ayant subi la TEM expriment les marqueurs de CSC et sont capables d'auto-renouveau. Cela sera détaillé ultérieurement dans l'article 1.

Ces données confortent l'idée selon laquelle il existe un lien entre la TEM et le phénotype souche. Néanmoins ce lien est complexe et sa pertinence dans le processus métastatique reste controversé dans la tumorigénèse.

1.5.2.2.3 TEM et CSC dans le CCA

TEM

Le rôle de la TEM dans le CCA a récemment fait l'objet d'une revue par notre équipe [202]. La présence de cellules subissant la TEM dans les tumeurs est corrélée à un mauvais pronostic et à la présence de métastases à distance. Au cours de la TEM, la E-cadhérine est dérégulée aux dépens de l'expression de la N-cadhérine, normalement exprimée par les cellules mésenchymateuses. Ce « switch » d'expression a été reporté dans le CCA, dans lequel une augmentation de l'expression de la N-cadhérine est observée et associée à une baisse de la survie globale [222].

Concernant les facteurs de transcription impliqués dans l'activation de la TEM, la famille Snail a été largement étudiée dans le CCA. La forte expression des transcrits de Snail dans les cellules de CCA est corrélée à la présence de métastases et, la surexpression de la protéine Snail dans le noyau est associée à un mauvais pronostic (28,6 à 48,6% des cas dans le CCAi et

38–54% des cas dans le CCAe) [202]. L'expression de Slug décrite dans 72,2% des CCAi, est associée à une invasion lympho-vasculaire et à la présence de métastases distantes.

La surexpression de Twist dans les tumeurs CCA est associée également de manière significative à un mauvais pronostic, et significativement corrélée à une forte expression de la N-cadhérine [202]. Des travaux dans le CCA ont mis en évidence une forte expression de ZEB1 dans les cellules tumorales comparées aux cellules non néoplasiques était associée à des paramètres agressifs et à une faible survie globale. De plus, l'expression de ZEB1 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCA [223]. Concernant ZEB2, une forte expression est retrouvée dans 51% des cas de CCA et corrélée également à la présence de métastases et à un mauvais pronostic [202].

Concernant la régulation de la TEM dans le CCA, la signalisation dépendante du TGF- β est l'inducteur prototypique de la TEM dans plusieurs cancers et cela a été démontré dans le CCA [224]. L'expression de TGF- β 1 et de ses récepteurs TGF- β RI et RII a été rapportée à la fois dans les cellules tumorales et les cellules stromales environnantes dans le CCA [202]. De plus, l'expression de TGF- β 1 est significativement corrélée aux métastases ganglionnaires, aux métastases à distance et aux récurrences tumorales dans le CCAi et à une survie globale plus courte, aussi bien dans le CCAi que dans le CCAe [221, 225].

Nitta et *al.* ont souligné une corrélation entre le niveau d'expression des protéines de la TEM et le devenir clinique des patients atteints de CCAe. En effet, ils ont montré entre autres que le switch de l'expression de la E-cadhérine en N-cadhérine était associé à un mauvais pronostic [226]. D'autres études menées dans le CCA ont montré le rôle de l'ubiquitine ligase FBXW7 considéré comme un suppresseur de tumeur, dans la présence de métastases et d'un phénotype de CSC, via la régulation de la TEM [227].

Par ailleurs, notre équipe a montré une induction de la TEM via l'activation de l'axe EGF/EGFR qui joue un rôle majeur dans la progression du CCA. Nous avons démontré *in vivo* dans des échantillons humains de patients et dans des xénogreffes de tumeurs que la perte d'expression de la E-cadhérine était corrélée à la surexpression de EGFR. *In vitro*, nous avons montré que la diminution de l'expression de la E-cadhérine était inversement corrélée à une augmentation de l'expression des TEM-FT et des marqueurs mésenchymateux dans les cellules de CCA traités par EGF. Tous les effets observés se sont avérés inhibés par le gefitinib [59].

Du point de vue thérapeutique, la première idée comme stratégie serait d'agir sur les répresseurs de la E-cadhérine. Cependant, les régulateurs principaux de la TEM sont des facteurs de transcription, ce qui les rend assez difficiles à cibler. La stratégie alternative la plus utile serait donc l'utilisation d'agents chimiques régulant négativement la TEM, bien que peu d'études dans le CCA aient été menées dans ce sens [202]. Des études utilisant le paclitaxel, un agent chimiothérapeutique qui stabilise les microtubules et arrête le cycle cellulaire, ont montré qu'à faible dose, il inhibe la TEM induite par le TGF- β dans les cellules de CCA [228]. D'autres travaux ont été réalisés avec un immunosuppresseur synthétique de la sphingosine, FTY720. Ce médicament inhibe la TEM et favorise la réversion de celle-ci appelée MET dans les cellules CCA puis empêche la formation de métastases in vivo après l'implantation de cellules CCA dans la cavité péritonéale de souris immunodéprimées [229]. Enfin, comme indiqué ci-dessus, la TEM est fortement régulée par un grand nombre de voies de signalisation. Celles-ci peuvent être ciblées par des médicaments actuellement testés dans le cadre d'études précliniques ou d'essais cliniques dans le traitement du CCA, tels que l'erlotinib, l'inhibiteur d'EGFR [212, 230].

CSC

Bien que dans la plupart des cancers solides, les CSC représentent moins de 3% de la population cellulaire totale, dans le CCA, plus de 30% de la masse tumorale expriment des marqueurs CSC, ce qui souligne le rôle potentiel des CSC dans la tumorigenèse du CCA [231]. L'expression de plusieurs marqueurs de CSC a été relevée dans le CCA [232], notamment CD133, molécule d'adhésion des cellules épithéliales (EpCAM), CD44, CD13, SOX2, CD90 et Nanog entre autres, et leur expression est corrélée avec un mauvais pronostic [232].

1.5.2.3 TEM et CSC dans la résistance aux anti-EGFR

La chimiorésistance est un défi constant pour les cliniciens concernant l'utilisation d'agents antitumoraux chez les patients. En ce qui concerne la résistance aux anti-EGFR, l'acquisition de la résistance à l'inhibition d'EGFR est l'un des événements tumorigènes au cours desquels la TEM et le phénotype de CSC semblent jouer un rôle majeur. Dans le CCA, seule notre équipe a mis en évidence le rôle de la TEM et du phénotype de CSC dans la résistance aux anti-EGFR. Ces travaux sont détaillés ultérieurement dans l'article 1 de la partie « Résultats ». Néanmoins, ces processus ont été identifiés comme un mécanisme de résistance aux anti-EGFR dans d'autres types de cancer, en particulier chez les patients atteints d'un cancer du poumon par

exemple. Ainsi, chez ces patients présentant une résistance acquise à l'inhibition d'EGFR, 30 à 80% présentent des tumeurs avec un phénotype mésenchymateux, bien que la plupart des études varient entre 30 et 40% [233-235]. Dans d'autres cancers, tel que le cancer de la tête et du cou, l'administration de cetuximab chez les patients, entraîne une diminution de l'expression de la E-cadhérine et une augmentation de l'expression des marqueurs ZEB1, TWIST et de la vimentine dans les tumeurs. De manière intéressante, il a été rapporté que 11 échantillons tumoraux des 15 patients analysés présentaient un phénotype mésenchymateux. [235].

Les CSC sont liées au développement de la tumeur, aux métastases et à la résistance thérapeutique, et influencent donc directement le pronostic clinique. Cela a été démontré dans de nombreux cancers. Par exemple, les CSC sont capables d'échapper aux régimes chimiothérapeutiques actuels en expulsant les médicaments administrés [214]. Il a été souligné que certaines populations de CSC expriment préférentiellement à leur surface cellulaire des transporteurs du type ABC (ATP binding cassette) qui confèrent une imperméabilité face aux médicaments en les expulsant continuellement dans le milieu extracellulaire [214]. Afin de soutenir le lien existant entre la TEM et le phénotype de CSC, il a été identifié chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules une sous-population CD44^{high}/CD24^{low} résistante à l'erlotinib et présentant un phénotype de TEM, avec une augmentation de l'expression de TGF- β 1, d'IL-6 et de la vimentine et, une diminution de l'expression de la E-cadhérine [236]. De plus, le marqueur de CSC, ALDH1A1, est surexprimé dans certaines tumeurs de patients atteints de cancer du poumon et présentant une résistance acquise au gefitinib. La plupart de ces tumeurs présentent également un phénotype mésenchymateux associé à une forte expression de la vimentine [237].

Une stratégie thérapeutique intéressante serait d'agir au niveau de la différenciation des CSC afin de les forcer à se différencier puis les sensibiliser à nouveau aux thérapies conventionnelles (Figures 18 B et C). Toutes ces observations démontrent que les CSC composent une population de cellules très spécifiques capables de survivre dans l'environnement tumoral même lorsque celui-ci est sous thérapie actuelle (Figure 18 A).

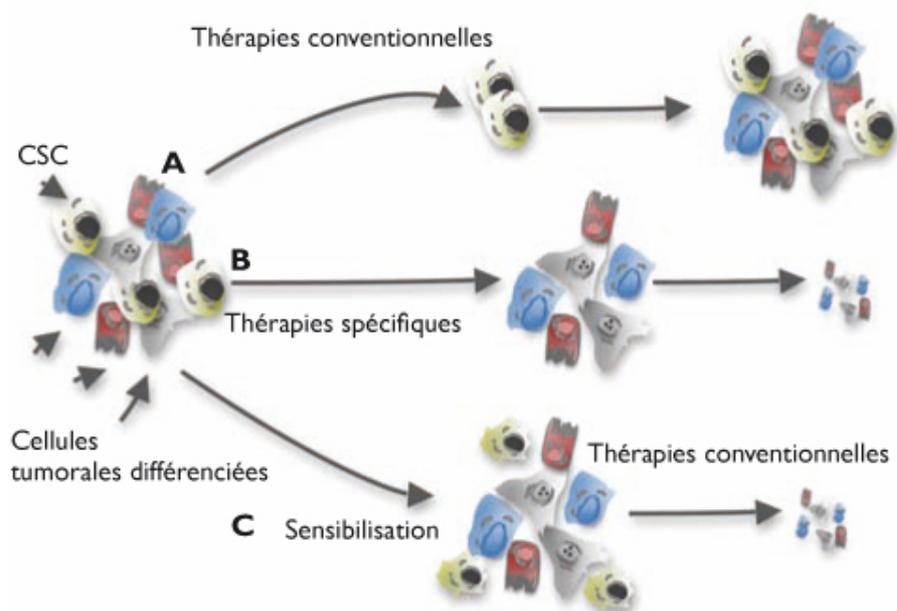


Figure 18 : Perspectives de stratégie thérapeutique ciblant les CSC. (A) Les CSC face aux thérapies conventionnelles et peuvent reformer la tumeur provoquant la rechute du patient ; (B) Des thérapies spécifiques ciblant les CSC directement ou induisant une différenciation (C) de ces dernières pourraient être les futures modes de traitements.

Ces études témoignent de l'implication de la TEM et du phénotype de CSC dans la résistance aux traitements anti-tumoraux, notamment aux inhibiteurs d'EGFR.

1.5.2.4 Rôle du microenvironnement tumoral dans la résistance aux anti-EGFR

Le microenvironnement tumoral est un important facteur déterminant de l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs d'EGFR dans plusieurs études, notamment dans le cancer du poumon [238, 239] et de la tête et du cou [240]. Par ailleurs, le CCA est caractérisé par un stroma qui se compose majoritairement de CAFs et TAMs. De plus, le microenvironnement tumoral constitue une niche spécialisée de CSC, contribuant au maintien du phénotype souche et de la chimiorésistance [241].

Le rôle des CAFs dans la résistance acquise aux anti-EGFR dans le CCA a seulement été décrit récemment par notre équipe, dont les travaux sont détaillés ultérieurement dans l'article 1 de la partie « Résultats ». Cependant leur rôle a été mis évidence dans d'autres types de tumeurs. Dans le cancer de la tête et du cou, une autre étude a montré qu'en présence de milieu conditionné des CAF, les cellules tumorales développaient une résistance acquise au cetuximab [242]. Des co-cultures CAF/cellules tumorales montrent une augmentation de l'expression de MMP-1 dans les deux types cellulaires, favorisant ainsi l'invasion de la tumeur

et la résistance au cetuximab. Cette résistance est en partie abolie avec un inhibiteur de MMP-1. Une étude supplémentaire de Choe C. et *al.* dans le cancer du poumon non à petites cellules a mis en évidence l'acquisition d'une résistance à l'erlotinib des cellules tumorales via l'activation d'une TEM induite par les CAFs. En effet, lors de co-cultures, les CAFs produisent des cytokines capables d'induire la TEM dans les cellules tumorales, entraînant la progression de la tumeur et la résistance aux traitements [243].

En conclusion, l'utilisation de thérapies ciblées pour le traitement des patients atteints de CCA reste difficile en raison de mécanismes de résistance innés et acquis. De nouvelles thérapies et des régimes de traitement combinés doivent être développés pour améliorer le traitement du CCA. Pour cela, il faut prendre en compte non seulement les cellules cancéreuses mais aussi des cellules stromales qui jouent un rôle fondamental dans la progression du CCA et la résistance aux traitements.

1.6 Facteur de transcription ZEB1

1.6.1 Généralités

ZEB1 (Zinc Finger E-box binding homeobox 1), autrement appelé TCF8 (Transcription Factor 8) ou δ EF1 (δ -crystallin Enhancer Factor 1), a été initialement identifié chez l'embryon de poulet, comme une protéine nucléaire capable d'entrer en compétition avec le facteur bHLH E47 pour la liaison au motif E-box présent dans la région promotrice du gène codant la « δ 1- crystallin » (protéine spécifique du cristallin et de la cornée) [244, 245]. ZEB1 est une protéine codée par le gène *ZEB1* situé sur le chromosome 10p11.2 chez l'homme. Comme décrit précédemment, ZEB1 est un facteur de transcription qui appartient à une famille de deux membres : ZEB1 et ZEB2. Tout comme la famille Snail, ces facteurs sont des protéines à doigts de zinc qui peuvent spécifiquement se fixer sur l'ADN au niveau d'éléments de réponse appelés E-boxes (5'-CANNTG-3') présents sur le promoteur de nombreux gènes [246]. De cette façon, ZEB1 est capable de réprimer l'expression des marqueurs épithéliaux tels que, la protéine assurant les jonctions cellulaires E-cadhérine, la molécule épithéliale d'adhésion moléculaire (EpCAM), les protéines épithéliales ESRP1 (Epithelial Splicing Regulatory Protein 1) et ST14 (Suppression of Tumorigenicity 14), en se fixant sur le promoteur de leur gène, au niveau des séquences E-

boxes [246]. La perte fonctionnelle de la E-cadhérine est une étape cruciale pour l'activation de la TEM dans les cellules [247].

ZEB1 possède deux séquences situées à chaque extrémité de la protéine, en C- et en N-terminale, contenant de multiples structures en doigts de zinc. ZEB1 se caractérise par deux domaines spécifiques : d'une part le domaine SID (SMAD Interacting Domain) qui lui permet de se lier aux protéines SMAD et ainsi d'interagir avec la voie de signalisation du TGF- β et d'autre part l'homéodomaine (HD) localisé dans la partie centrale, qui est le domaine d'interaction protéine-protéine permettant le recrutement des partenaires de régulation de la transcription. Ainsi le recrutement des co-activateurs comme CBP (CREB-binding protein) ou la protéine p300 favorise l'expression de gènes cibles, alors que le recrutement de corépresseurs tel que CtBP (C-terminal binding protein) favorise une répression transcriptionnelle [248] (Figure 19).

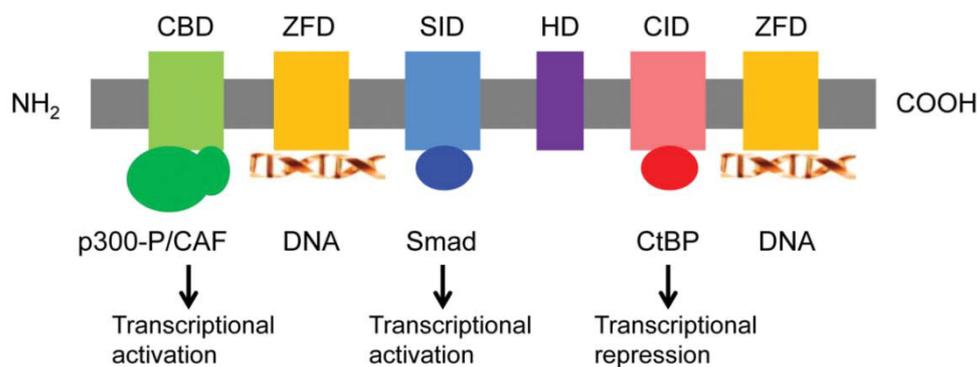


Figure 19 : Représentation schématique de la protéine ZEB1. Représentation des domaines à doigts de zinc permettant la fixation de ZEB1 à l'ADN et d'autres domaines ayant des activités répressives ou activatrices [248].

L'étude de l'inactivation de ZEB1 dans des modèles murins a permis une meilleure compréhension de ses différentes fonctions *in vivo*. Chez la souris, ZEB1 est exprimé au niveau des notochordes, des somites, des membres ainsi que dans les dérivés de la crête neurale. Les souris invalidées pour ZEB1 meurent juste après la naissance pour cause de déficiences respiratoires. Elles présentent entre autres de multiples malformations de l'ossature, des anomalies crâno-faciales et une déficience dans la génération des lymphocytes T [247, 248]. Ces résultats corroborent l'analyse montrant le rôle de ce facteur dans le mésoderme, précurseur des tissus conjonctifs et des os [248].

Bien qu'une analyse *in situ* détaillée de ZEB1 n'ait pas encore été réalisée dans les tissus humains adultes, il est connu que le niveau d'expression d'ARNm de ZEB1 varie de manière significative entre les tissus [247].

1.6.2 ZEB1 dans l'initiation et la progression tumorale

ZEB1 est un moteur essentiel de la progression tumorale : il est impliqué dans l'activation de la TEM et dans la tumorigenèse aux métastases avancées, en régulant directement ou indirectement l'expression de ses protéines cibles.

1.6.2.1 ZEB1 et voies de signalisation

ZEB1, en aval de plusieurs voies de signalisation classiques, est impliqué dans l'oncogenèse, telles que celles du TGF- β , PI3K/Akt, NF- κ B, Wnt/ β -caténine, RAS/ERK. L'activation ou l'inhibition de ces voies favorise ou inhibe le processus de TEM et d'autres mécanismes cellulaires importants dans les cellules tumorales.

1.6.2.1.1 Voie Wnt/ β -caténine

Dans le cancer du poumon, il a été décrit que l'expression de la E-cadhérine dans l'invasion tumorale et la TEM est régulée négativement par la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Lorsque la protéine Wnt se lie à son récepteur, la β -caténine se dissocie de son complexe dégradant puis se transloque dans le noyau pour activer la transcription de ZEB1 [249]. Dans la progression tumorale, ZEB1 qui est fortement exprimé au niveau du front invasif des carcinomes pour induire un programme de TEM dans les cellules, est une cible cruciale de Wnt [250]. En effet, cela a été démontré dans les métastases osseuses du cancer du poumon, dans lequel ZEB1 inhibe la E-cadhérine et conduit à la TEM par le biais de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine [251]. Une autre étude dans le cancer du poumon a montré que l'expression élevée de ZEB1 inhibe l'expression de la E-cadhérine et active la transcription de gènes mésenchymateux favorisant ainsi l'invasion de la tumeur. Ces gènes incluent de nombreuses cibles de Wnt telles que la laminine gamma 2 (LAMC2) et l'urokinase (uPA) [252]. L'uPA est une cible en aval de la voie Wnt (β -caténine/TCF4), impliquée dans le remodelage de la matrice [253]. Cela a été décrit dans le cancer colorectal, dans lequel l'expression de ZEB1 est essentielle pour l'expression de uPA qui est induite par Wnt. En effet, ZEB1 active son expression en se liant à son promoteur et favorisant ainsi le caractère invasif de la tumeur [254].

1.6.2.1.2 Voie RAS/ERK

RAS est une petite protéine G qui joue un rôle important dans la signalisation cellulaire et il est un élément clé de la voie régulatrice RAF/MEK/ERK. Cette voie joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire et la carcinogenèse [255]. Han *et al.* ont montré que la TEM induite par HGF augmentait le caractère invasif des cellules cancéreuses de la prostate en activant les voies de signalisation ERK/MAPK et en contribuant à la surexpression des TEM-TFs, incluant ZEB1 [256]. Une étude a montré que dans les cancers induits par l'oncogène KRAS, celui-ci active la voie RAF/ERK, ce qui inhibe directement l'expression de miR-200 et stabilise l'expression de ZEB1 afin d'induire la TEM des cellules [257]. La restauration de l'expression de miR-200 conduit à une inhibition de l'expression de ZEB1, de la transformation cellulaire maligne induite par l'oncogène KRAS *in vitro* et de la formation de la tumeur *in vivo*. En outre, les chercheurs ont constaté que l'expression forcée de miR-200 inhibait l'induction de TEM induite par KRAS muté.

1.6.2.1.3 Voie TGF- β

Le TGF- β est une cytokine multifonctionnelle qui induit entre autres la TEM des cellules. Il est produit par les cellules cancéreuses pour activer l'expression de divers facteurs de transcription, tels que ZEB1. L'expression du TGF- β augmente souvent dans les cellules tumorales et peut agir de manière paracrine et autocrine dans le microenvironnement tumoral afin de favoriser le développement du cancer [258]. Il est décrit que le TGF- β augmente l'expression de SMAD2 phosphorylée (pSMAD2) et de ZEB1 pour induire un phénotype mésenchymateux dans le glioblastome. pSMAD2/3 forme alors un complexe avec SMAD2, permettant sa translocation dans le noyau où il se lie au promoteur ZEB1 activant ainsi sa transcription [259]. De manière intéressante, une étude dans le cancer du sein a montré que le TGF- β régule positivement l'expression de la tyrosine kinase PEA1 (Pseudopodium Enriched Atypical Kinase 1). Selon la base de données Scansite, les chercheurs ont identifié le facteur ZEB1 comme partenaire de PEA1. Ils ont ainsi suggéré que PEA1 est capable d'interagir avec ZEB1 afin d'induire la TEM des cellules tumorales via la signalisation TGF- β [260]. Enfin, dans le cancer du poumon, Larsen J.E. *et al.* ont montré que ZEB1 induisait la TEM des cellules en réponse aux signaux du microenvironnement incluant le facteur TGF- β [261].

1.6.2.1.4 Voie PI3K/Akt

L'activation de la voie PI3K/Akt dans les cellules tumorales est essentielle à la prolifération cellulaire, la survie, l'invasion, la formation de métastases ainsi qu'à l'inhibition de l'apoptose en modulant de multiples signaux extracellulaires [262]. La GSK-3 β est un facteur clé de la signalisation Wnt/ β -caténine et lorsque ce facteur est phosphorylé par Akt, cela inactive son activité kinase inhibant ainsi la dégradation de la β -caténine dans le cytoplasme. Dans le cancer de la vessie, il a été décrit que lors du processus de colonisation des cellules cancéreuses métastatiques dans l'os, la voie PI3K est activée de manière aberrante, ce qui active la transcription de ZEB1 via la cascade de signalisation GSK3/ β -caténine. Cette voie peut être inactivée une fois la colonisation achevée [263]. Des travaux dans le CCAi, ont montré que la tyrosine phosphatase PTP4A1 (Protein tyrosine phosphatase 4A1) induit l'invasion des cellules tumorales via l'activation de la signalisation PI3K/Akt. En effet celle-ci régule positivement l'expression des EMT-TFs, ZEB1 et Snail qui induisent la TEM des cellules [264]. Dans cette étude, l'expression de PTP4A1 a été associée de manière significative à un mauvais pronostic et à une récurrence tumorale chez les patients atteints de CCAi [264].

1.6.2.2 ZEB1 dans la régulation de la TEM

L'activation de la plasticité des cellules cancéreuses est considérée comme une caractéristique importante de la progression tumorale. La plasticité cellulaire peut dépendre de ZEB1, un régulateur clé de la TEM en raison du rôle pivot de ZEB1 dans l'inhibition de l'expression de marqueurs épithéliaux [248, 265]. Le mécanisme de l'induction de la TEM induite par ZEB1 réside entre autres dans le fait que ce facteur se lie à la région promotrice de la E-cadhérine, puis inhibe son expression transcriptionnelle. La E-cadhérine, une importante molécule d'adhésion cellule-cellule, a été reconnue comme une protéine suppresseur de tumeur [266]. La perte de la E-cadhérine entraîne la dissociation des cellules tumorales et leur confère une capacité à migrer, envahir les tissus et former des métastases, qui est associée à un mauvais pronostic dans les cancers [206].

L'expression aberrante de ZEB1 a été observée dans de nombreux cancers, tels que le cancer de l'utérus [248], du pancréas [267, 268], l'ostéosarcome [269], du poumon [270, 271], du foie [272], de l'estomac [273, 274], du côlon [275] et du sein [276]. Dans ces tumeurs, l'expression de ZEB1 est corrélée à la perte d'expression de la E-cadhérine et à la présence de métastases,

indiquant ainsi la pertinence de l'induction de la TEM par ZEB1 et de son rôle dans la progression tumorale.

Dans le modèle Hs578T de cellules cancéreuses du sein triple-négatives, l'analyse génomique a montré que ZEB1 se lie à près de 2000 gènes, représentant de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la migration des cellules tumorales, la régulation de la polarité cellulaire et la capacité de croissance indépendante de l'ancrage [277]. Toujours dans le cancer du sein il a été décrit que ZEB1 se lie aux promoteurs des gènes de polarité épithéliale, tels que *Crumbs3*, *HUGL2* et *PATJ* et réprime leur transcription, conduisant ainsi à une baisse d'adhérence et une augmentation du pouvoir invasif des cellules [265].

De plus, ZEB1 est capable d'augmenter la tumorigénicité des cellules cancéreuses du pancréas en inhibant l'expression des microARN (miR), de forts inducteurs de la différenciation épithéliale et inhibiteurs du phénotype souche, incluant miR-203 et la famille des miR-200 [219, 278]. Les miR seront définis par la suite dans la sous-partie 1.4.2.3.

Concernant le rôle de ZEB1 dans la dissémination métastatique, il est fortement exprimé dans les tumeurs mésenchymateuses (par exemple dans le gliome, le cancer du poumon, le cancer du sein et du pancréas) et son expression est corrélée positivement avec le caractère invasif de la tumeur [279-281]. De plus, ZEB1 est décrit comme un oncogène dans les cellules cancéreuses métastatiques et invasives du cancer du poumon. Dans ces cellules, la TEM induite par ZEB1 favorise la perte d'adhésion et de polarité des cellules épithéliales, entraînant la croissance, le remodelage, la migration cellulaires ainsi que la présence de métastases [248]. Des travaux dans le carcinome rénal ont montré que ZEB1 est très exprimé dans les cellules malignes situées au front d'invasion et que cette expression est corrélée à une diminution de l'expression membranaire de la E-cadhérine [282]. Contrairement aux autres types de carcinomes du sein, l'expression nucléaire de ZEB1 est augmentée dans les cancers du sein triple-négatifs et les cancers du sein de type basal, associant son expression à un phénotype tumoral agressif [283]. Il a été décrit que ZEB1 contrôle l'expression de nombreux miR oncogènes et suppresseurs de tumeurs, y compris le miR-34a. Dans les cancers du poumon et du sein, ZEB1 inhibe l'expression de miR-34a entraînant ainsi le remodelage du cytosquelette d'actine afin que les cellules tumorales acquièrent des capacités invasives et métastatiques [278].

Par ailleurs, ZEB1 promeut l'invasion tumorale, ce qui active non seulement la mobilité des cellules cancéreuses via la dissolution de l'adhésion intercellulaire, mais permet également la

migration des cellules en altérant le microenvironnement de la tumeur. Dans le cancer colorectal, il a été rapporté que le facteur de transcription MEF2D (Myocyte enhancer factor 2D) est capable de répondre aux stimuli du microenvironnement en régulant l'expression de ZEB1 transcriptionnellement, afin d'induire la TEM et l'invasion des cellules [284].

Ces résultats soulignent l'importance du rôle fonctionnel de ZEB1 dans la plasticité cellulaire.

1.6.2.3 ZEB1 dans la régulation du phénotype de CSC

Il a longuement été décrit que le programme TEM mis en place par les cellules tumorales permet l'acquisition par celles-ci de propriétés de CSC [215, 216].

Une étude réalisée par Weinberg et ses collègues dans le cancer du sein de type basal a démontré que les cellules cancéreuses peuvent facilement passer d'un état de cellules cancéreuses non souches à un état de CSC en réponse à des stimuli du microenvironnement tels que le TGF- β ; une telle conversion a été observée grâce à l'expression de ZEB1 activé dans les cellules.

Des travaux ont montré que ZEB1 régule le phénotype de CSC en inhibant l'expression des miR. Les miR sont de petites molécules d'ARN simple brin non codantes d'une longueur d'environ 22 nucléotides qui sont codées par un gène endogène et régulent l'expression du gène après la transcription [285]. L'expression altérée des miR est étroitement liée au développement tumoral et aux métastases. Des découvertes récentes ont montré que les miR contrôlent l'expression de ZEB1 en ciblant les ARNm de ZEB1. ZEB1, grâce à sa boucle de rétrocontrôle avec la famille miR-200, active la plasticité cellulaire en réponse à des signaux extracellulaires [286]. Les miR incluant les miR-200, les miR-203 et les miR-184 sont des répresseurs des propriétés de cellules souches [247] [219]. En effet, les marqueurs souches tels que BMI1, SOX2 et KLF4 qui sont des gènes impliqués dans le développement et le maintien des cellules souches sont la cible de ces miR [219]. Des travaux dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) ont montré que l'expression ectopique de miR-200b dans les cellules entraînait l'inhibition drastique de ZEB1 et une diminution des marqueurs de CSC parallèlement à une augmentation du marqueur épithélial EpCAM. Inversement, des données cliniques ont montré que l'inhibition de miR-200b était couplée à une surexpression de ZEB1 dans environ deux tiers des patients atteints de CHC et l'expression de ZEB1 était positivement corrélée à l'expression de marqueurs de CSC [287]. Une autre étude dans le cancer colorectal a montré que la signalisation Fas (Apoptosis Stimulating Fragment), impliquée dans la

régulation de l'apoptose, entraîne la dissémination métastatique via l'induction de la TEM et l'acquisition d'un phénotype de CSC via la modulation de l'expression BMI1. Celle-ci est dépendante de l'axe ERK1/2 /GSK-3 β / β -caténine/ZEB1/miR-200c dans lequel le ligand FasL active la voie de signalisation ERK1/2 et inhibe la GSK-3 β , ce qui permet la translocation nucléaire de la β -caténine. Une fois dans le noyau, celle-ci active la transcription de ZEB1, ce qui va inhiber l'expression de miR-200c puis lever ainsi la répression exercée par miR-200c sur BMI1 [288].

Indépendamment des miR, des chercheurs ont montré que l'expression de ZEB1 dans les cellules épithéliales mammaires était suffisante pour induire des propriétés de CSC et prévenir la formation de lésions de l'ADN en réponse à une activation oncogénique. Son effet protecteur repose sur l'activation d'un système antioxydant conduit par la méthionine sulfoxide réductase MSRB3, cible transcriptionnelle de ZEB1. En prévenant la formation de cassures de l'ADN, l'expression de ZEB1 et de MSRB3 empêche l'activation de la voie dépendante de p53 et donc l'induction d'une apoptose ou d'une sénescence prématurée, facilitant ainsi la transformation maligne sur la base d'une faible instabilité génomique [289]. Enfin, Preca BT et al. ont mis en évidence le rôle d'une boucle de régulation entre le marqueur de CSC, CD44s (forme standard de CD44), et ZEB1 dans l'acquisition des propriétés de TEM et de CSC, dans les cellules cancéreuses notamment du sein et du pancréas [290]. Les travaux ont montré que lors de l'induction de la TEM des cellules, ESRP1 qui est responsable de l'épissage alternatif de CD44, est réprimé par ZEB1. Cette répression se traduit par un « switch » de l'isoforme CD44v (forme variante de CD44) vers l'isoforme CD44s, qui associé à un important potentiel métastatique [290, 291] (Figure 20).

En résumé, ces données démontrent l'étroite implication de ZEB1 dans l'acquisition des propriétés de CSC dans les cellules tumorales subissant une TEM.

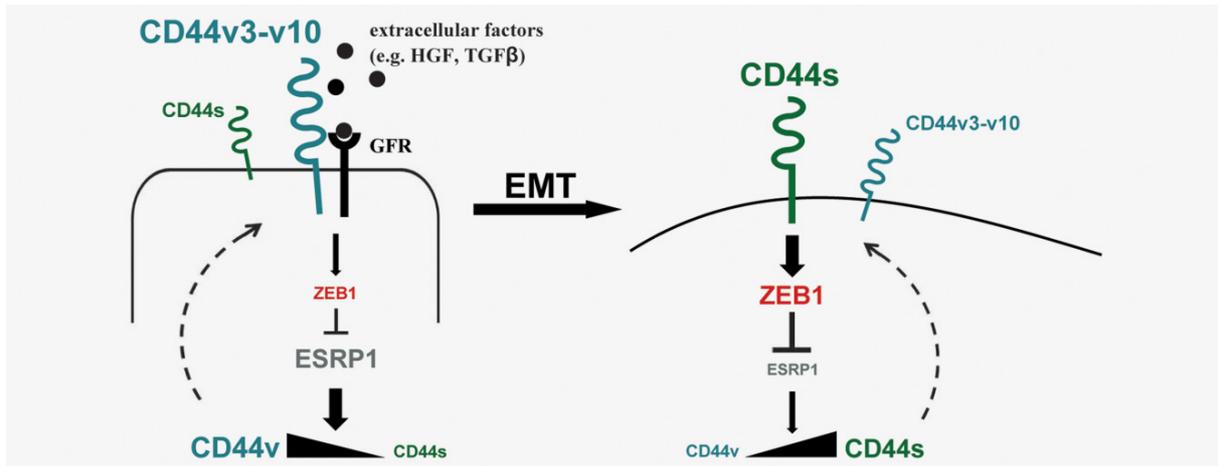


Figure 20 : Représentation schématique du lien entre l'expression de ZEB1 et de CD44s. Dans les cellules épithéliales, l'expression de CD44s est régulée négativement par l'activité de ESRP1 (à gauche). Les signaux extracellulaires tels que TGFβ ou HGF activent l'expression de ZEB1 dans les cellules tumorales, induisant ainsi un phénotype de TEM et de CSC. À son tour, ESRP1 est inhibée par ZEB1 en interagissant directement avec les E-box de son promoteur. La faible expression de ESRP1 entraîne l'absence d'épissage de CD44v et le renforcement de celui de CD44s, qui stimule davantage l'expression de ZEB1 (à droite). Une fois la boucle établie, elle est auto-suffisante et devient indépendante des stimuli extracellulaires, ce qui stabilise la motilité des cellules tumorales ainsi que les phénotypes TEM et CSC [290].

1.6.2.4 ZEB1 dans la régulation épigénétique

L'épigénétique est un phénotype héréditaire stable causé par des modifications chromosomiques sans altération des séquences d'ADN, incluant un remodelage chromosomique, des modifications d'histones, une méthylation de l'ADN et une régulation via les ARN non codants [292]. L'activité transcriptionnelle de ZEB1 est relayée par le recrutement de co-activateurs et de co-inhibiteurs, en fonction du gène et du tissu cible. Pour l'activation des gènes, ZEB1 active son gène cible en recrutant des histones acétyltransférases (HAT) et les protéines partenaires p300, Tip60 et PCAF [293]. En revanche, ZEB1, en tant que répresseur, interagit avec CtBP [294] et recrute les histones désacétylases HDAC1 et HDAC2 dans les tumeurs pancréatiques afin d'inhiber le gène de la E-cadhérine, *CDH1* [295]. Des travaux ont montré que l'expression élevée de ZEB1 et l'hypoacétylation du promoteur de la E-cadhérine sont associées de manière significative à un épissage anormal dans le cancer du poumon [296]. ZEB1 interagit avec divers facteurs de régulation épigénétique. Au cours de la TEM, dans le cancer du poumon, ZEB1 inhibe l'expression des marqueurs épithéliaux ESRP1, EpCAM, de RAB25 (petite protéine G) et ST14 en se liant directement sur le promoteur de ces gènes. Parallèlement à cela, il a été constaté une inhibition de l'acétylation des histones H3 et H4 sur

la lysine 9 (H3K9) et 27 (H3K27) au niveau du site de liaison de ZEB1 sur ces gènes [297]. De plus, il a été décrit que la diminution de l'expression du récepteur d'oestrogène- α (ER- α) conduit à une résistance aux œstrogènes et constitue un problème majeur pour la thérapie endocrine dans les cancers du sein. Plus précisément, ZEB1 inhibe la transcription de ER- α en formant un complexe ZEB1/HDAC1/DNMT3B (l'ADN méthyltransférase 3B) sur le promoteur de ER- α , ce qui entraîne son hyperméthylation, empêchant ainsi ER- α d'être exprimé [298]. Comme il a été décrit, hTERT (human Telomerase Revers Transcriptase) induit l'activation de la télomérase, ce qui favorise la transformation maligne en stabilisant les télomères. Il a été démontré que ZEB1 peut recruter hTERT et se lier à la région -1959 pb à -1954 pb du promoteur de la E-cadhérine afin d'inhiber son expression et de contribuer ainsi à la mise en place de la TEM [299]. Enfin, dans les cellules du cancer de la prostate, des travaux ont montré que SET8, une méthyltransférase spécifique de l'histone H4K20, est recrutée sur le promoteur de la E-cadhérine via ZEB1 pour réprimer sa transcription et sur le promoteur de la vimentine par son activité de monométhylation H4K20 pour activer sa transcription [300].

1.6.2.5 Autres fonctions de ZEB1

Parmi les multiples fonctions de ZEB1 [247], ce facteur joue un rôle essentiel dans la régulation des principales caractéristiques cellulaires, notamment la sénescence et l'apoptose, deux barrières essentielles au développement de la tumeur. En effet, il a été démontré que ZEB1 affecte profondément les voies oncosuppressives dépendantes de p53 et de Rb et empêche ainsi la sénescence et l'apoptose des cellules tumorales. Il a été décrit que les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) de souris KO ZEB1 subissent une sénescence répllicative précoce [247]. De plus, des travaux ont montré que ZEB1 est capable de réprimer les inhibiteurs de la kinase dépendant de la cycline, CDKN1A (mieux connu sous le nom de p21waf1) et INK4B (mieux connu sous le nom de p15ink4b), permettant ainsi la progression du cycle cellulaire [247, 301]. Gao et al. ont montré dans le cancer du sein qu'une faible expression de la protéine arginine méthyltransférase 1 (PRMT1) est capable de bloquer la croissance cellulaire en phase G1. PRMT1 active la transcription de ZEB1 par régulation épigénétique, favorisant ainsi la mise en place de la TEM et la prévention de la sénescence cellulaire. En effet, PRMT1 active la transcription de ZEB1 en favorisant la diméthylation de l'arginine 3 sur l'histone H4 (H4R3me2as) au niveau de son promoteur, indiquant notamment le rôle crucial du contrôle épigénétique de ZEB1 dans les processus de TEM et de sénescence

[302]. Dans les carcinomes colorectaux mutés pour *TP53*, ZEB1 inhibe l'expression de gènes liés à la sénescence tels que macroH2A1 (variante de l'histone H2A) et SAHF (Senescence-Associated Heterochromatic Foci) en activant l'expression de DKK1 (Dickkopf-related protein 1), TP53, MDM2 (Murine Double Minute 2) et CtBP, ce qui bloque la sénescence tumorale *in vivo* et réduit ainsi le taux de survie [303]. L'expression de p53 régule négativement l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, cyclines, CDK et de ZEB1, ce qui induit l'arrêt des cellules G0/G1, inhibe la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses de la vessie chez l'homme [304]. Une étude a montré que ZEB1 favorise la tumorigenèse en échappant à la sénescence provoquée par la surexpression de EGFR dans les cellules épithéliales de l'œsophage humain. Ceci via la répression de l'expression de p16ink4a et de p15ink4b [305]. De plus, il a été rapporté que l'expression de ZEB1 augmente la résistance aux médicaments dans les cellules cancéreuses du pancréas [219], ce qui corrobore les données montrant que ZEB1 confère des propriétés anti-apoptotiques aux cellules tumorales [247].

Zhang J. et al. ont récemment mis en évidence le rôle de ZEB1 dans la régulation du métabolisme énergétique des cellules tumorales. Ils ont démontré que l'enzyme FBP1 (fructose-1, 6-bisphosphatase) est fréquemment inhibée dans les tissus et les cellules du cancer du poumon, et que son inhibition était associée à un mauvais pronostic chez les patients. Les chercheurs ont mis en évidence la liaison de ZEB1 sur le promoteur de FBP1 entraînant ainsi son inhibition via des mécanismes de méthylation, avec comme conséquences : une augmentation de l'absorption de glucose et de la production de lactate, et une diminution de la consommation d'oxygène. De plus, ils ont montré que la restauration de l'expression de FBP1 inhibait ces phénomènes observés mais aussi la prolifération et l'invasion des cellules tumorales *in vitro* ainsi que la croissance tumorale *in vivo* [306].

Enfin, des travaux ont souligné le rôle de ZEB1 dans l'immunité tumorale. Les cellules cancéreuses mésenchymateuses sont capables de détourner les défenses immunitaires induites par les lymphocytes NK (Natural Killer) et les lymphocytes T cytotoxiques. Les fonctions de ces lymphocytes sont capables d'être inhibées par les points de contrôles immunitaires. Ceux-ci incluent la voie PD1 (Program Cell Death 1) dont l'interaction avec un de ses ligands, PD-L1, entraîne des réponses anti-tumorales. Il a récemment été démontré dans le cancer du poumon que miR-200 cible PD-L1 en l'inhibant. L'expression de ZEB1 dans la tumeur lève la répression de l'expression de PD-L1 exercée par miR-200, conduisant à une

immunosuppression des cellules TCD8⁺ et la formation de métastases [307]. De plus, les cellules tumorales sont capables de favoriser la progression tumorale en recrutant un microenvironnement immunitaire pro-tumoral via la production et la libération de cytokines inflammatoires [247]. Dans les lignées cellulaires de cancer du sein, des travaux ont permis d'identifier un phénotype inflammatoire régulé par ZEB1 [308]. Plus précisément, il a été démontré que ZEB1 activait la transcription des gènes IL6 et IL8 de manière directe, conduisant au recrutement de cellules myéloïdes suppressives, favorisant ainsi la progression de la tumeur.

Ces études combinées témoignent des fonctions multiples de ZEB1 et de son rôle majeur dans la tumorigenèse et la dissémination métastatique.

1.6.3 ZEB1 dans la résistance aux traitements

La résistance thérapeutique dans le cancer, incluant la radiorésistance et la chimiorésistance, est un défi majeur dans la recherche sur le cancer et le traitement [309, 310]. La résistance aux médicaments est devenue un obstacle majeur à la mise en place de thérapies ciblées et entraîne une efficacité limitée de ces thérapies dans le traitement des patients cancéreux [310-312]. L'acquisition de la résistance aux traitements contribue à l'invasion des cellules tumorales, à la TEM et à l'acquisition de propriétés de CSC qui sont associées en partie à la radiorésistance, la chimiorésistance et la résistance aux thérapies ciblées telles que EGFR par exemple. ZEB1 est un déterminant crucial dans cette résistance thérapeutique [248, 313]. Cependant, il réside une ambiguïté dans le fait que la résistance aux traitements induite par ZEB1 est dépendante ou non de la TEM.

1.6.3.1 Radiorésistance

Récemment, plusieurs groupes de chercheurs ont signalé le rôle critique de ZEB1 dans la régulation de la radiosensibilité des tumeurs [314, 315]. En effet, les travaux ont montré que l'inhibition de ZEB1 dans les cellules cancéreuses du sein SUM159-P2, U2OS d'ostéosarcome (U2OS), et du poumon non à petites cellules (lignées H460 et H1299) engendrait une augmentation de la radiosensibilité ; tandis que l'expression ectopique de ZEB1 dans les lignées épithéliales mammaires radiosensibles HMLE et MCF7, conduisait à une radiorésistance élevée [314, 315]. Il a été décrit que ZEB1 régule la radiosensibilité des cellules

cancéreuses en favorisant la réparation des lésions de l'ADN par recombinaison homologue (HR) et l'élimination des cassures de l'ADN [314]. Expérimentalement, les rayonnements ionisants causent des dommages de l'ADN qui entraînent une surexpression de ZEB1 dans les cellules cancéreuses du sein puis une activation des kinases ATM et ATR. Ainsi, Zhang et al. ont montré que l'expression de la kinase mutée dans le syndrome d'ataxie télangiectasie (ATM, en anglais *ataxia telangiectasia mutated*), activée par ZEB1 via la formation du complexe ZEB1/p300/PCAF sur son promoteur, entraîne une radiorésistance en augmentant la réparation des lésions de l'ADN par recombinaison homologue [316]. Parallèlement, la kinase ATM suractivée phosphoryle et stabilise ZEB1, ce qui lui permet d'interagir avec l'ubiquitine USP7 (ubiquitin specific protease 7) et d'améliorer sa capacité à désubiquitinyler et à stabiliser la protéine CHK1 (Checkpoint Kinase 1), favorisant ainsi la réparation de l'ADN et la radiorésistance tumorale [314]. CHK1 est une protéine kinase impliquée dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire [317]. De même, d'autres travaux ont également montré une augmentation de l'expression de ZEB1 en réponse aux rayonnements dans les lignées cellulaires du cancer du poumon A549 [318] et du cancer du nasopharynx CNE1 et CNE2 [319]. Ces résultats permettent une meilleure compréhension du rôle de ZEB1 dans la radiorésistance, notamment via l'activation de l'axe ATM/ZEB1/CHK1. D'autres études ont montré que les cellules cancéreuses résistantes aux traitements, sont les plus susceptibles d'être la source de récurrence tumorale. En effet, dans une cohorte de 286 patientes atteintes de cancer du sein (87% des patientes ont été traitées par radiothérapie), les patientes avec une expression faible de ZEB1 dans leur tumeur mammaire avaient une meilleure survie en comparaison à celles ayant une forte expression ZEB1 [314].

Après avoir démontré que l'inhibition de l'expression de ZEB1 dans les cellules entraînait une augmentation de la radiosensibilité de la tumeur *in vitro* et *in vivo* [314, 315], il a été rapporté que les miR ciblant ZEB1, tels que miR-205 et la famille miR-200, pouvaient potentiellement être utilisés comme radiosensibilisateurs dans le traitement du cancer. En effet, des chercheurs ont constaté que miR-205 peut entraîner une radiosensibilisation des lignées cellulaires SUM159-P2 et MDA-MB-231 (cancer du sein), A549 (cancer du poumon) et U2OS (ostéosarcome) en ciblant ZEB1, conduisant ainsi à l'inhibition de la réparation des dommages de l'ADN. Ce même groupe a également démontré l'utilité thérapeutique de miR-205 en tant que radiosensibilisateur de la tumeur dans un modèle préclinique. De même, un autre groupe a signalé que la délivrance thérapeutique d'un membre de la famille miR-200, miR-200c,

pourrait sensibiliser les cellules du cancer du poumon aux rayonnements dans des modèles de xéno greffe [320].

Par conséquent, ces études mettent en évidence l'importance des miR ciblant ZEB1 tels que les miR-205 et miR-200c dans le traitement par radiothérapie dans lequel ceux-ci pourraient représenter une nouvelle classe de radiosensibilisateurs.

1.6.3.2 Résistance aux chimiothérapies conventionnelles

Des travaux ont montré que ZEB1 contribue à la résistance au docétaxel en induisant la TEM via la répression de la E-cadhérine, dans les lignées du cancer de la prostate PC-3 et DU145 négatives pour le récepteur des androgènes [321]. Dans le cancer du pancréas, une forte expression de ZEB1 à l'origine d'une TEM a été observée dans la lignée cellulaire BxPC3a entraînant une résistance à la gemcitabine. Inversement, il a été observé qu'une déplétion en ZEB1 favorisait la ré-différenciation des cellules tumorales et la re-sensibilisation à la gemcitabine dans la lignée résistante Panc1 [322]. Des travaux menés dans le glioblastome (GBM), ont montré que ZEB1 est préférentiellement exprimé au niveau du front d'invasion dans un modèle de xéno greffes orthotopiques réalisées avec des lignées cellulaires dérivées de GBM humains. L'inactivation de ZEB1 dans ces lignées réduit à la fois l'invasion et la résistance au témozolomide (TMZ), un médicament standard de chimiothérapie utilisé pour le traitement du GBM [323]. Expérimentalement, ZEB1 régule l'expression du gène *MGMT* (O6 méthyl-guanine méthyl-transférase), promouvant la résistance au TMZ, à travers la régulation de la boucle ZEB1-miR-200c-c-MYB [323]. Dans les cellules tumorales pancréatiques, des chercheurs ont corrélé le phénotype de TEM (vérifié par analyse des niveaux d'expression de la E-cadhérine et de la vimentine) et le niveau d'expression de ZEB1 à la résistance aux agents chimiothérapeutiques, incluant la gemcitabine, le 5-fluorouracile (5-FU) et le cisplatine [324]. De manière intéressante, l'inhibition de ZEB1 dans ces cellules pancréatiques mésenchymateuses entraîne une réversion du phénotype TEM, mais également une re-sensibilisation des cellules à la gemcitabine, au 5-FU et au cisplatine [324]. De façon similaire, ZEB1 est surexprimé dans les cellules humaines d'adénocarcinome pulmonaire, résistantes au docétaxel (agent chimiothérapeutique) [325]. Les travaux ont montré que l'expression ectopique de ZEB1 conférait une résistance au docétaxel dans les cellules humaines d'adénocarcinome pulmonaire SPC-A1 tandis que l'inactivation de ZEB1 dans les cellules mésenchymateuses SPC-A1 résistantes au docétaxel entraînait une réversion de la TEM et de

la chimiorésistance [325]. Ces résultats ont amené les auteurs à conclure que la TEM induite par le facteur ZEB1 dans les cellules tumorales contribuait à la résistance au traitement.

1.6.3.3 Résistance aux thérapies ciblées

Dans le cancer du sein HER2-positif, des travaux ont montré que la dérégulation de miR-200c entraîne la suppression de son inhibition exercée par l'expression de ZEB1, ce qui engendre une résistance au trastuzumab (inhibiteur de HER2) et la présence de métastases [326].

Des études récentes ont mis en évidence la réponse des cellules de cancer du pancréas au mocétinostat, un inhibiteur spécifique d'histones désacétylases (HDAC) de classe I. Par régulation épigénétique, il est capable de réprimer la fonction ZEB1, ce qui restitue l'expression de miR-203 et inhibe le phénotype de TEM et de CSC. Par conséquent, le mocétinostat rétablit la sensibilité des cellules à la chimiothérapie [327]. Ces travaux pourraient faire du mocétinostat une cible de choix dans les nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer. D'autres études réalisées par Haddad et al. ont montré que l'inhibition de ZEB1 dans les lignées cellulaires du carcinome épidermoïde de la tête et du cou résistantes à l'erlotinib, 1386LN et UMSCC1, engendrait une augmentation de la sensibilité à l'erlotinib d'une manière dépendante de la E-cadhérine indiquant l'implication de la TEM via l'expression de ZEB1 dans la résistance acquise à l'erlotinib [328]. Richard G. et al. ont mis en évidence l'implication de ZEB1 dans la résistance aux inhibiteurs de MAPK (MAPKi) des cellules et des tumeurs de mélanome portant la mutation V600 de BRAF. En effet, ils ont montré que la surexpression de ZEB1 était suffisante pour induire une plasticité cellulaire tumorale via un phénotype tumorigénique et de CSC. De plus, l'inhibition de ZEB1 dans ces tumeurs a permis de prévenir la tumorigénicité des cellules *in vivo* mais aussi d'inhiber la différenciation cellulaire, de sensibiliser les cellules naïves de mélanome au MAPKi et d'entraîner la mort des cellules résistantes [329].

Ces résultats ont permis de souligner le rôle majeur de ZEB1 dans la résistance aux thérapies.

1.6.4 Schéma récapitulatif des différentes fonctions oncogéniques de ZEB1

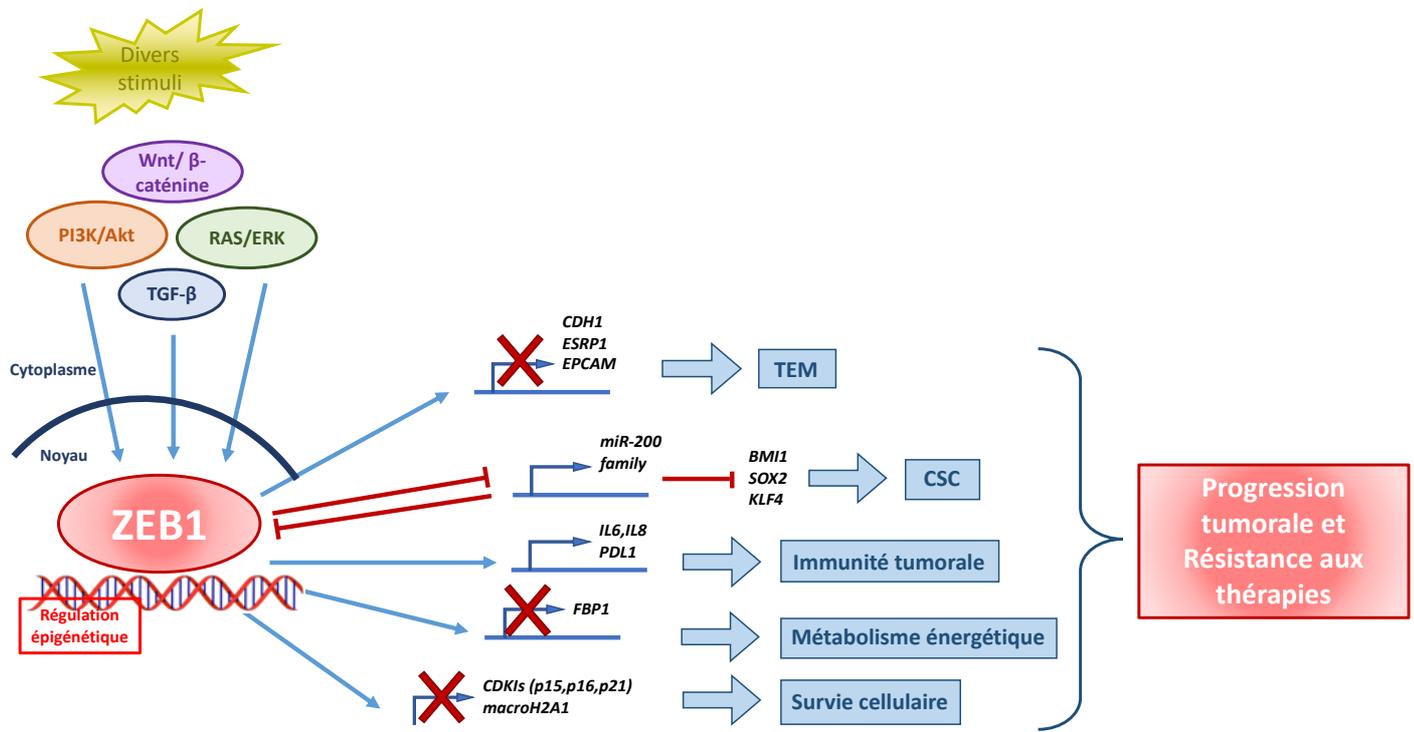


Figure 21 : Fonctions oncogéniques du facteur de transcription ZEB1. ZEB1 est un moteur essentiel de la progression tumorale dès les premières étapes. Son activation, sous l'action de divers stimuli, lui permet de réguler de manière transcriptionnelle les facteurs impliqués dans la différenciation, la prolifération, la motilité et la survie cellulaire. Son expression favorise la plasticité des cellules tumorales, l'échappement au contrôle du système immunitaire, la dérégulation du métabolisme énergétiques des cellules et la survie cellulaire. Dans ce sens, ZEB1 contribue au processus tumorigène et est un déterminant crucial dans la résistance thérapeutique.

1.6.5 ZEB1 dans le CCA

Dans le CCA, une étude clinique réalisée par Terashita K. et al. dans le CCAi a montré que l'expression de ZEB1 chez les patients était corrélée à une progression tumorale et à un mauvais pronostic chez les patients [223]. En revanche dans le CCAe dans lequel ZEB1 est exprimé dans 66% des cas, aucune corrélation n'a été retrouvée [226]. Cependant au regard de la littérature, l'implication de ZEB1 dans la progression de nombreux cancers a été démontrée mais aucune documentation permet d'expliquer les mécanismes cellulaires par lesquels ZEB1 seraient impliqué dans le CCA.

2 Objectifs de la thèse

Le CCA est un cancer de mauvais pronostic, avec un arsenal thérapeutique limité. A ce jour, le seul traitement curatif est la résection chirurgicale et les patients non admissibles en raison d'un diagnostic tardif, sont peu répondeurs aux traitements de chimiothérapie actuels [9, 13]. Durant mes quatre années de thèse, mes travaux se sont portés sur deux projets distincts : Le premier a porté sur l'implication de l'axe de signalisation IGF2/IR/IGF1R et des CAFs dans la non-réponse au traitement anti-EGFR dans le CCA et le deuxième sur le rôle de ZEB1 dans la progression et la chimiorésistance du cholangiocarcinome.

Première étude : Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans le CCA soient encore mal connus, des travaux antérieurs réalisés au sein de notre équipe, ont mis en évidence le rôle majeur d'EGFR dans la carcinogenèse du CCA [58, 59, 115, 330]. Des essais cliniques ont été menés avec l'erlotinib, un ITK d'EGFR, chez les patients atteints de CCA mais aucune amélioration de la survie n'a été observée [110-112]. Le manque d'efficacité des traitements anti-EGFR chez ces patients a suggéré l'existence de mécanismes de résistance. A ce jour, peu d'études ont été entreprises afin de comprendre les mécanismes biologiques et moléculaires responsables de la résistance aux thérapies anti-EGFR chez les patients atteints de CCA à la suite d'essais cliniques. Dans ce contexte, l'objectif de la première étude consiste à élucider les mécanismes par lesquels les cellules tumorales échappent aux traitements anti-EGFR dans le CCA.

Pour la réalisation de ce projet les travaux ont été menés *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines de CCA, et *in vivo* sur des modèles murins de xénogreffes de cellules de CCA, ainsi qu'à partir d'échantillons tumoraux issus de patients atteints de CCA.

Deuxième étude : En raison de la chimiorésistance élevée du CCA, il n'existe pas de traitement de seconde ligne approuvé en cas de propagation de la tumeur, malgré des essais cliniques prometteurs. C'est pourquoi il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients. Comme il a été décrit en introduction, une étude récente réalisée dans le CCAi a montré une corrélation étroite entre l'expression de la protéine ZEB1, la progression tumorale et un mauvais pronostic chez les patients, sans que les mécanismes sous-jacents ne soient connus [223]. A ce jour, il n'existe pas d'études dans la littérature ayant évalué le rôle direct de ZEB1 dans la physiopathologie du CCA, ce qui nous a

conduit à étudier son rôle dans le CCA, en particulier dans les cellules tumorales. L'objectif de la deuxième étude consiste à l'évaluation des différentes fonctions de ZEB1 dans les cellules de CCA, afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la progression et la chimiorésistance du CCA.

Afin de mener à bien ce projet les travaux ont été réalisés *in vitro* sur des modèles cellulaires de CCA dans lesquels l'expression de ZEB1 a été invalidée ou forcée. Les études *in vivo* seront menées ultérieurement sur des modèles murins de xénogreffes de ces modèles, ainsi qu'à partir d'échantillons tumoraux issus de patients atteints de CCA.

3 Résultats

3.1 Article 1 : The IGF2/IR/IGF1R Pathway in Tumor Cells and Myofibroblasts Mediates Resistance to EGFR Inhibition in Cholangiocarcinoma

Publié dans Clinical Cancer Research

L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes par lesquels les cellules tumorales échappent aux traitements anti-EGFR dans le CCA. L'analyse de l'enrichissement des gènes a révélé que les cellules de CCA résistantes à l'erlotinib, un anti-EGFR présentent une signature métastatique, associée à un remaniement de la plasticité cellulaire s'accompagnant ainsi d'un phénotype de transition-épithélio-mésenchymateuse (TEM) et de cellules souches cancéreuses (CSC). Par ailleurs, les résultats ont montré une augmentation de l'expression et de l'activation des récepteurs de l'insuline (IR) et de l'insulin-like growth factor 1 (IGF1R) ainsi qu'une augmentation de celle d'IGF2 dans les cellules résistantes à l'erlotinib. L'inhibition pharmacologique d'IR/IGF1R a entraîné une diminution de la plasticité cellulaire. Dans un modèle murin de xénogreffe, les travaux ont montré que les tumeurs développées à partir de cellules de CCA résistantes à l'erlotinib étaient plus grandes et présentaient un stroma plus important, enrichi en fibroblastes associés au cancer (CAF), que les tumeurs contrôles. La co-inhibition pharmacologique d'EGFR et d'IR/IGF1R a eu pour effet de réduire la croissance tumorale et le compartiment stromal dans les tumeurs résistantes. *In vitro*, la modélisation de la communication réciproque cellules de CCA-CAFs, a montré que les CAFs exprimaient IGF2, et que IGF2 stimulait la signalisation IR/IGF1R des cellules résistantes à l'erlotinib. De plus, nous avons montré que la voie IR/IGF1R régula la prolifération et l'activation des fibroblastes. En conclusion, nous avons démontré que les cellules tumorales de CCA développent un mécanisme adaptatif pour échapper au traitement anti-EGFR en subissant un switch phénotypique qui dépend de la signalisation IR/IGF1R, impliquant une contribution des CAFs du microenvironnement.

The IGF2/IR/IGF1R Pathway in Tumor Cells and Myofibroblasts Mediates Resistance to EGFR Inhibition in Cholangiocarcinoma

Javier Vaquero^{1,2,3}, Cindy Lobe¹, Sylvana Tahraoui¹, Audrey Clapéron¹, Martine Mergey¹, Fatima Merabtene¹, Dominique Wendum^{1,4}, Cédric Coulouarn⁵, Chantal Housset^{1,6}, Christèle Desbois-Mouthon¹, Françoise Praz¹, and Laura Fouassier¹



Abstract

Purpose: Cholangiocarcinoma (CCA) is a desmoplastic tumor of the biliary tree in which epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed and contributes to cancer progression. Although EGFR has been envisaged as a target for therapy, treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as erlotinib did not provide therapeutic benefit in patients with CCA, emphasizing the need to investigate resistance mechanisms against EGFR inhibition.

Experimental Design: Resistant CCA cells to EGFR inhibition were obtained upon long-time exposure of cells with erlotinib. Cell signaling, viability, migration, and spheroid growth were determined *in vitro*, and tumor growth was evaluated in CCA xenograft models.

Results: Erlotinib-resistant CCA cells displayed metastasis-associated signatures that correlated with a marked change in cell plasticity associated with an epithelial–mesenchymal transition (EMT) and a cancer stem cell (CSC)–

like phenotype. Resistant cells exhibited an upregulation of insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor (IGF) 1 receptor (IGF1R), along with an increase in IGF2 expression. IR/IGF1R inhibition reduced EMT and CSC-like traits in resistant cells. *In vivo*, tumors developed from resistant CCA cells were larger and exhibited a more prominent stromal compartment, enriched in cancer-associated fibroblasts (CAF). Pharmacological coinhibition of EGFR and IR/IGF1R reduced tumor growth and stromal compartment in resistant tumors. Modeling of CCA-CAF crosstalk showed that IGF2 expressed by fibroblasts boosted IR/IGF1R signaling in resistant cells. Furthermore, IR/IGF1R signaling positively regulated fibroblast proliferation and activation.

Conclusions: To escape EGFR-TKI treatment, CCA tumor cells develop an adaptive mechanism by undergoing an IR/IGF1R-dependent phenotypic switch, involving a contribution of stromal cells. *Clin Cancer Res* 24(17): 4282–96. ©2018 AACR.

Introduction

Cholangiocarcinoma (CCA) is a heterogeneous group of malignancies that displays a biliary epithelial cell phenotype (1). CCA can emerge at every point of the biliary tree, from the canals of Hering to the main bile duct, and thereby is classified as intrahepatic, perihilar, and distal CCA, which share some similarities but also present important intertumor and intratumor differences affecting the pathogenesis and outcome (1). The overall prognosis

is very poor due to late clinical presentation and the ability of the tumor to develop chemoresistance (1, 2). Late diagnosis compromises the only effective therapeutic option, surgical resection, that is applicable in 20% of cases. Patients ineligible for surgery undergo a palliative treatment with a combination of gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX; refs. 1, 3). In case of tumor progression after this first line of chemotherapy, there is no other treatment approved despite the identification of potential therapeutic targets.

Epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a critical role in oncogenesis, which places it as one of the promising targets for therapeutic inhibition. Several studies, including ours, have shown the major contribution of EGFR to CCA cell proliferation, migration, and invasion (4–6). In addition, dysregulations of EGFR expression and signaling have been associated with tumor progression and poorer prognosis in CCA patients (7, 8). However, despite EGFR attractive position as a molecular target for therapy, several independent clinical trials have reported very poor responses in patients with CCA treated with different small tyrosine kinase inhibitors (TKI) and monoclonal antibodies designed to specifically target EGFR (9–14).

CCA is characterized by a dense desmoplastic stroma rich in alpha-smooth muscle actin (α -SMA)-positive cells known as cancer-associated fibroblasts (CAF), which have been shown to participate in cancer progression (15). In this context, CAFs are

¹Sorbonne University, INSERM, Saint-Antoine Research Center (CRSA), Paris, France. ²Fondation ARC, Villejuif, France. ³LPP, CNRS, Ecole Polytech, Univ. Paris-Sud, Observatoire de Paris, Univ. Paris-Saclay, Sorbonne University, PSL Research University, Paris, France. ⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, Department of Pathology, Paris, France. ⁵INSERM, INRA, Univ Rennes 1, Univ Bretagne Loire, Nutrition Metabolism and Cancer (NuMeCan), Rennes, France. ⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, Hepatology Department, Paris, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Laura Fouassier, INSERM, 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France. Phone: 33-6-98-77-40-01; E-mail: laura.fouassier@inserm.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3725

©2018 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Cholangiocarcinoma is a devastating desmoplastic cancer of the biliary tree, for which no targeted therapies have been approved so far. Although EGFR contributes to cholangiocarcinoma progression, treatment with EGFR inhibitors such as erlotinib has not provided therapeutic benefit in patients with cholangiocarcinoma. In this study, we identify cellular mechanisms by which cholangiocarcinoma cells escape EGFR inhibition. We demonstrate that treatment with an EGFR inhibitor leads to the development of adaptive mechanisms by cholangiocarcinoma cells that include a phenotypic switch toward mesenchymal and cancer stem cell phenotypes. This cell plasticity is driven by an upregulation of insulin-like growth factor 2 (IGF2)-dependent cell signaling, comprising the activation of insulin and IGF1 receptors (IR/IGF1R). In addition, we identify a cross-talk between cancer-associated fibroblasts (CAF) and tumor cells in response to EGFR inhibition that relays on IGF2-dependent cell signaling pathway. These novel insights provide rational basis for testing combined therapies against EGFR and IR/IGF1R.

known to influence the sensitivity of tumor cells to anti-EGFR treatment in other cancers (16, 17).

Unfortunately, little is known about the factors that limit anti-EGFR responsiveness in CCA. Besides genetic modifications, such as *KRAS* mutations that determine the lack of response to EGFR TKI, no other mechanisms that could explain the ability of CCA tumor cells to develop adaptive behavior to escape from anti-EGFR treatment have been investigated (14). Thus, in the present work, we aimed to decipher the molecular mechanisms underlying the nonresponse of CCA cells to prolonged EGFR inhibition.

Here, we show that, *in vitro*, the adaptive response of CCA cells to EGFR TKI erlotinib involved an upregulation of the insulin-like growth factor 2/insulin receptor/insulin-like growth factor 1 receptor (IGF2/IR/IGF1R) signaling axis, that in turn regulated CCA cell plasticity, including epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell (CSC) characteristics. *In vivo*, in a subcutaneous xenograft model, erlotinib-resistant CCA cells showed increased tumorigenicity and their tumors exhibited a more prominent stromal compartment. In addition, *in vitro* modeling of CCA-CAF cross-talk showed that stromal fibroblasts expressed IGF2 that boosted IR/IGF1R signaling in CCA-resistant cells to protect them against the deleterious effect of erlotinib. Finally, we show a potential role for IR/IGF1R signaling in the regulation of fibroblast proliferation and activation. Thus, our data strongly suggest that the IGF axis is responsible for the adaptive response against erlotinib in CCA tumor cells with a contribution of stromal cells, providing a rationale for testing combined therapies against EGFR and IR/IGF1R.

Materials and Methods

Reagents

Erlotinib was purchased from LC Laboratories. BMS-536924 and linsitinib were obtained from Tocris and Selleckchem, respectively. IGF2 was purchased from PreproTech.

Cell culture and treatment

HuCC-T1 cells, derived from intrahepatic biliary tract, were kindly provided by Dr. G. Gores (Mayo Clinic, MN), EGI-1 cells, derived from extrahepatic biliary tract, were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Germany), and SK-ChA-1 and Mz-ChA-1 cells, derived from extrahepatic biliary tract, were obtained from Dr. A. Knuth (Zurich University, Switzerland). Cells were cultured in DMEM supplemented with 1 g/L glucose, 10 mmol/L HEPES, 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin), and antimycotic (0.25 µg/ml amphotericin B; Invitrogen). All cell lines expressed higher levels of EGFR than nonmalignant biliary epithelial cells (Supplementary Fig. S1A). CCA cells resistant to erlotinib were generated through a process of slowly escalating exposure to erlotinib (from 1 to 20 µmol/L). EGFR inhibition and reduced sensitivity to erlotinib of resistant cells were then determined (Supplementary Fig. S1B and S1C). Resistant cells were maintained in culture in the presence of the last well-tolerated concentration of erlotinib (i.e., 20 µmol/L for HuCC-T1 and EGI-1, and 5 µmol/L for SK-ChA-1 and Mz-ChA-1).

The cell lines hTERT-HSC and LX2, derived from human activated hepatic stellate cells, were kindly provided by Dr. L. Aoudjehane (ICAN, Paris, France). hTERT-HSC and LX2 were cultured in DMEM supplemented with 4.5 g/L glucose, antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin), antimycotic (0.25 µg/ml amphotericin B), and 10% FBS and 2% FBS, respectively.

Cell lines were routinely screened for the presence of mycoplasma and authenticated for polymorphic markers to prevent cross-contamination.

Conditioned media

hTERT-HSC cells were grown to confluence, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and 0% FBS DMEM (supplemented as above) was added for 48 hours. Conditioned media were centrifuged to remove cell debris and stored at -80°C until use. 0% FBS DMEM was used as control.

Microarray hybridization, processing, and data analysis

RNA quality was verified in an Agilent Bioanalyzer and quantified with a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Microarray experiments were performed on Illumina humanWG-6 BeadChip (Post-genomics platform P3S, Sorbonne Université, Paris, France). Data were quantile normalized using BeadStudio software. The working lists were created by filtering probes with detection *P* values <0.05 for all the chips. Each dataset was derived from three biologically independent replicate samples. Statistical analysis of microarray data was performed using R-based BRB-ArrayTools as previously described (18). Briefly, genes differentially expressed between control and erlotinib-resistant cell lines were identified by a two-sample univariate *t* test and a random variance model. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed by using the Java-tool developed at the Broad Institute (Cambridge, MA) and the G2 collection of curated gene sets as previously described (18).

Viability assay

Cells were plated in 96-well plates. Twenty-four hours later, the medium was replaced by fresh culture medium or hTERT-HSC-conditioned medium with or without the corresponding concentrations of TKI, IGF2, and/or IGF2-neutralizing

Vaquero et al.

antibody. Cells were then incubated for 72 hours before determining the viability by the crystal violet method. Absorbance was quantified with a spectrophotometer (Tecan) at 595 nm.

RNA and reverse transcription-PCR

Total RNA extraction and RT-qPCR was performed as previously described (5). Primer sequences are provided in Supplementary Tables S1 and S2. Gene expression was normalized to GAPDH mRNA content for human genes and to Hprt mRNA content for mouse genes and was expressed relatively to the control condition of each experiment. The relative expression of each target gene was determined from replicate samples using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Qualitative evaluation of IR isoforms expression was conducted by PCR analysis using primers for the flanking exons 10 and 12 (Supplementary Table S3) and analyzed on 2% agarose gels (19).

Immunoprecipitation and Western blot analysis

For immunoprecipitation, cells were harvested in a buffer containing NP-40 (1%) supplemented with 1 mmol/L orthovanadate and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and subjected to centrifugation for 15 minutes at 4°C at 13,000 ×g. For obtaining whole-cell lysates, cell cultures were lysed in RIPA buffer supplemented with 1 mmol/L orthovanadate and a cocktail of protease inhibitors. Proteins were quantified using a BCA kit (Pierce). Immunoprecipitation and Western blot analysis were performed as previously described (5). Primary antibodies are provided in Supplementary Table S4.

Phospho-receptor tyrosine kinase (RTK) screening assay

A Human Phospho-RTK Array Kit (Catalog Number ARY001; R&D Systems) was used to measure the relative level of tyrosine phosphorylation of 49 distinct RTK. Six hundred micrograms of proteins were used, and the array was handled according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence

Immunofluorescence assays were performed as previously described (5). Primary antibodies are provided in Supplementary Table S4. Cells were observed with a SP2 confocal microscope (Leica).

Migration assay

Migration was analyzed in 6.5 mm Transwell with 8- μ m pore polycarbonate membrane inserts (Corning). Cells were plated in 0% FBS culture medium in the upper chamber and 10% FBS culture medium as a chemoattractant and the corresponding combination of TKIs was added in the lower chamber. After 24 hours (HuCC-T1 and SK-ChA-1) or 72 hours (EGI-1 and Mz-ChA-1) of incubation, migrated cells on the lower surface were enumerated by microscopy following fixation by 4% paraformaldehyde for 15 minutes and nucleic acid staining with DAPI. Four random fields were counted per insert.

Flow cytometry analysis

For the determination of the CD44/CD24 phenotype, cells were washed with PBS, detached with accutase treatment, and resuspended in PBS supplemented with 0.5% BSA. Combinations of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies against human CD44 (FITC) and CD24 allophycocyanin (APC) were obtained from Beckman Coulter. Specific antibodies or the respec-

tive isotype controls were added to the cell suspension, as recommended by the manufacturer, and incubated at 4°C for 20 minutes. Cells were washed with PBS containing 0.5% BSA, centrifuged, and resuspended in PBS with 2% paraformaldehyde. The labeled cells were analyzed with a Gallios flow cytometer (Beckman-Coulter).

Sphere formation assay

Cells were plated in 6-well ultralow attachment plates (Greiner Bio One) in serum-free DMEM/F12 medium, supplemented with 100 mg/mL gentamycin (Sigma-Aldrich), B27 (Life Technologies), 20 ng/mL human epidermal growth factor (EGF, Life Technologies), 20 ng/mL human basic fibroblast growth factor (bFGF, Life Technologies), and 1% antibiotic-antimycotic solution (Life Technologies) at a density of 4×10^4 cells/well. Fresh sphere medium was added to plates after 4 days. After 7 days, spheres were counted on EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Results are expressed as a percentage of sphere-forming units (%SFU) from the total number of cells plated.

Xenograft tumor model

Animal experiments were performed in accordance with the French Animal Research Committee guidelines and all procedures were approved by a local ethic committee (No 01346.02). Cells (2×10^6) suspended in 60 μ L of PBS were mixed with 60 μ L of Matrigel growth factor reduced (Corning) and implanted subcutaneously into the flank of 5-week-old female NMRI-nu (nu/nu) mice (Envigo). Mice were housed under standard conditions in individually ventilated cages enriched with a nesting material and kept at 22°C on a 12-hour light/12-hour dark cycle with *ad libitum* access to food and tap water. Tumor growth was followed with a caliper, and tumor volume (V) was calculated as follows: xenograft volume = $xy^2/2$ where x is the longest and y , the shortest of two perpendicular diameters. In a first set of experiments, HuCC-T1 and EGI-1 control and erlotinib-treated cells were injected and the mice were maintained until tumors started to show signs of necrosis. In a second set of experiments, mice were injected with EGI-1 control and erlotinib-treated cells following the same protocol. When tumor volume reached approximately 300 mm³, erlotinib (75 mg/kg; 5 days per week) alone or in combination with linsitinib (30 mg/kg; 5 days per week), both dissolved in DMSO 5% (vehicle) were administered by gavage for 15 days. During the 14 days of treatment animals showed no sign of toxicity, such as body weight loss (>15%), decreased food intake, or diarrhea.

The day of the sacrifice, a slice of the tumor was fixed in 10% formalin and embedded in paraffin, and the rest was cut in pieces and frozen in liquid nitrogen.

CCA specimens

Human intrahepatic CCA tumors ($n = 10$) were obtained from untreated patients who underwent liver resection in Saint-Antoine Hospital (AP-HP, Tumor bank HUEP, "Tumeur Est") in accordance with the French laws and regulations (CNIL, registration No. ckT0915543z). Characteristics of patients with CCA are provided in Supplementary Table S5. Adjacent non-tumor liver tissue of patients with CCA showed no significant fibrosis except in 1 patient who had chronic hepatitis B with few fibrous septa.

Immunohistochemical analysis

For immunohistochemistry, formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples from mice xenografts or human CCA were cut in 4- μ m sections and antigens were unmasked as indicated in Supplementary Table S4. Sections were incubated sequentially with H₂O₂ for 5 minutes, with Protein Block (Novolink Polymer Detection System; Novocastra Laboratories Ltd.) for 5 minutes, and with primary antibodies for 30 minutes (IGF1R overnight). Novolink Post Primary was applied for 15 minutes. Sections were finally washed and incubated with Novolink Polymer for 15 minutes. An automated staining system (Autostainer Plus, Dakocytomation) was used to perform immunostaining. The color was developed using amino-ethyl-carbazole (AEC peroxidase substrate kit; Vector Laboratories). Sections were counterstained with hematoxylin and mounted with glycerol (Dako).

Statistical analysis

Results were analyzed using the GraphPad Prism 5.0 statistical software. Data are shown as means \pm standard error of the mean (SEM). For comparisons between two groups, parametric Student *t* test or nonparametric Mann-Whitney test were used. For comparisons between more than two groups, parametric one-way ANOVA test followed by a posteriori Bonferroni test was used.

Results

CCA cells undergo a phenotypic switch to escape EGFR inhibition

We first observed that long-term treatment of four CCA cell lines (HuCC-T1, EGI-1, SK-ChA-1, and Mz-ChA-1) with the EGFR TKI erlotinib caused a phenotypic switch with elongated fibroblast-like morphology and decreased cell-cell contacts while control cells appeared cuboidal and cobblestone-like (Fig. 1A). None of the CCA cell lines had mutations in the tyrosine kinase domain of *EGFR* gene before treatment and no secondary mutation was identified during treatment (data not shown). To identify adaptive mechanisms to EGFR inhibition in CCA cells, we performed a gene expression analysis at a pan-genomic scale. GSEA revealed metastasis-associated signatures in CCA cells chronically treated with erlotinib that were different for each cell line (Fig. 1B). Together, the marked phenotypic switch between untreated and treated cells associated with the identification of metastasis signatures suggested that cells had undergone EMT, a biological process involved in metastasis.

To investigate this possibility, we examined by immunofluorescence the expression and localization of E-cadherin and β -catenin, two components of epithelial cell adherens junctions that are downregulated during EMT. Resistant CCA cells exhibited a downregulation of both proteins at the plasma membrane (Fig. 1C). The downregulation of E-cadherin protein was confirmed by Western blot and correlated with an increased protein expression of the EMT-inducing transcription factors (EMT-TF) ZEB1, SLUG, and SNAIL in resistant cells compared with control cells (Fig. 1D). No expression of ZEB2 or TWIST1/2 was found in any cell line (data not shown). Resistant cells also overexpressed mesenchymal markers among MMP1, MMP3, vimentin, S100A9, and fibronectin (Fig. 1E). Of note, the EMT-TF and mesenchymal markers upregulated in resistant cells were different depending on the cell line, as noticed for the metastasis-associated signatures

(Fig. 1B and E). To evaluate if all these molecular changes were associated with differences in migratory function, we performed transwell chamber assays. This analysis showed a significant increase in the migratory capacities of HuCC-T1-, SK-ChA-1-, and Mz-ChA-1-resistant cells (Fig. 1F). Because in EGI-1-resistant cells we did not find differences compared with the controls, migratory function was measured by another approach. Time-lapse microscopy showed, indeed, an increase in EGI-1-resistant cell motility (Supplementary Fig. S2). Collectively, these data demonstrate that, despite the heterogeneity of the molecular markers modified in resistant cells, CCA cells develop a common adaptive mechanism in response to chronic EGFR inhibition by undergoing EMT.

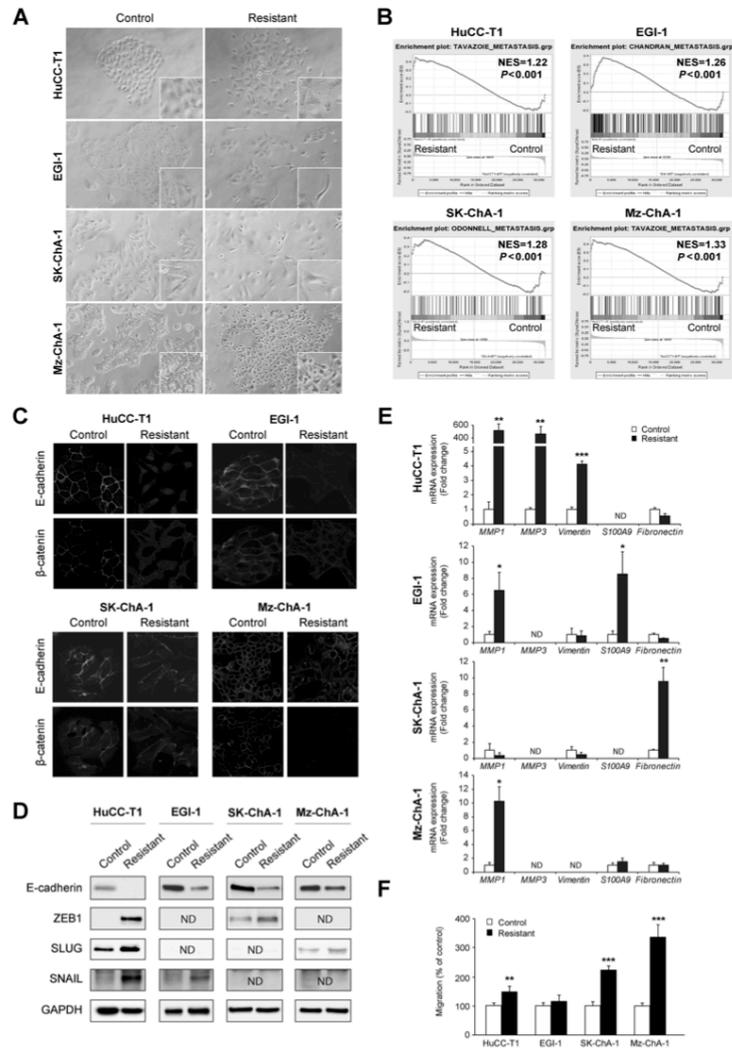
CCA cells exhibit stemness features to escape EGFR inhibition

Increasing evidence suggests that EMT is associated with the acquisition of cancer stem cell (CSC)-like features (20), thereby conferring resistance to chemotherapies in cancer cells. Accordingly, GSEA showed signatures associated with stemness in all CCA cells resistant to EGFR inhibition (Supplementary Table S6). These signatures were confirmed by gene expression analysis of a panel of well-known CSC markers. Depending upon the cell line, ALDH isoforms, CD61, CD133, SOX9, or IGF1R were increased in resistant cells (Fig. 2A). Once more, the signatures and CSC markers modified in erlotinib-resistant cells were specific for each cell line. In addition, flow cytometry analysis on CD44/CD24 expression, two well-established CSC markers, showed in all CCA cell lines a shift from the CD44^{high}/CD24^{high} to the CD44^{high}/CD24^{low} quadrant, a signature (CD44^{high}/CD24^{low}) that is characteristic of a population with both EMT and CSC features (ref. 21; Fig. 2B). Sphere formation evaluation showed a higher number of spheres in HuCC-T1 and EGI-1-resistant cells, but not in SK-ChA-1 (Fig. 2C). The number of Mz-ChA-1 spheres was impossible to count due to giant sphere aggregates, which were bigger in erlotinib-resistant cells (Fig. 2C). These observations provide further evidence that CCA cells acquire certain attributes of CSC during adaptive mechanisms to EGFR inhibition.

IGF2/IR/IGF1R axis is upregulated in CCA cells resistant to EGFR inhibition

Activation of bypass signaling pathways is part of the adaptive mechanisms that determine nonresponse of tumor cells to anti-EGFR therapy in cancer (22, 23). To investigate whether activation of other RTK may compensate EGFR inhibition, we screened the total tyrosine phosphorylation of 49 RTK by antibody array. The common change observed between control and resistant cells in the four cell lines was a differential phosphorylation status of IR and/or IGF1R (Fig. 3A; Supplementary Fig. S3A), two related RTK with high structural and functional homologies. The increased phosphorylation of these RTK in resistant cells was confirmed by Western blot (Fig. 3B) without or after immunoprecipitation of individual receptors (Supplementary Fig. S3B). In addition, changes in IR/IGF1R tyrosine phosphorylation were accompanied by changes in the total expression (Fig. 3B), indicating that this mechanism may rely more on RTK upregulation than receptor activation. Increment in IR/IGF1R phosphorylation was accompanied by an increase in AKT phosphorylation in all resistant cell lines, compared with their control counterparts, while ERK signaling was also enhanced in EGI-1- and SK-ChA-1-resistant cells,

Vaquero et al.

**Figure 1.**

CCA cells undergo a phenotypic change to evade EGFR inhibition. **A**, Representative phase-contrast photographs of control and erlotinib-resistant CCA cells showing a scattered phenotype. Magnification, $\times 10$ and $\times 20$ (insets). **B**, Enrichment of metastatic signatures in CCA cells resistant to EGFR inhibition as compared with control cells. Normalized enrichment scores (NES) were determined by GSEA algorithm ($P < 0.05$). **C**, Representative images of E-cadherin and β -catenin expression in CCA cells analyzed by immunofluorescence with a confocal microscope. Magnification, $\times 20$. **D**, Representative images of Western blot analysis of E-cadherin and EMT-TF expressed by CCA cells. **E**, Changes in mRNA expression of mesenchymal markers in CCA cells analyzed by RT-qPCR. **F**, Cell migration toward a chemoattractant (serum) was measured by Transwell chamber assay. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, as compared with control cells. ND, not detected.

Resistance Mechanisms to Erlotinib in Cholangiocarcinoma

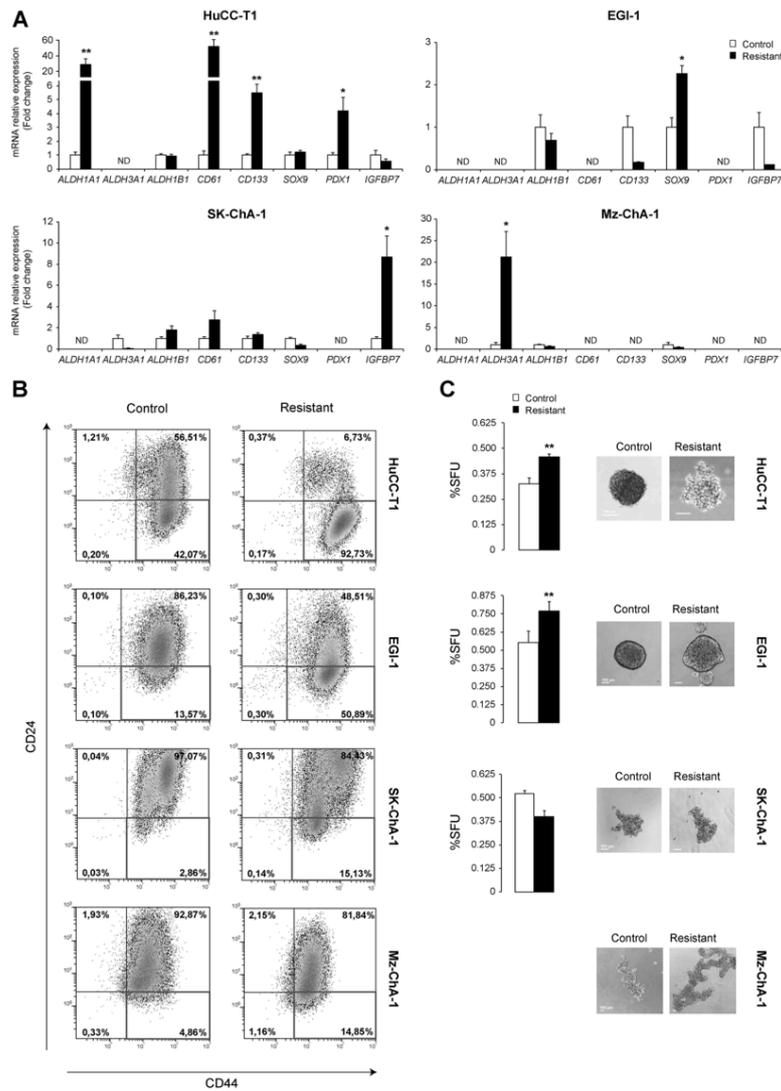
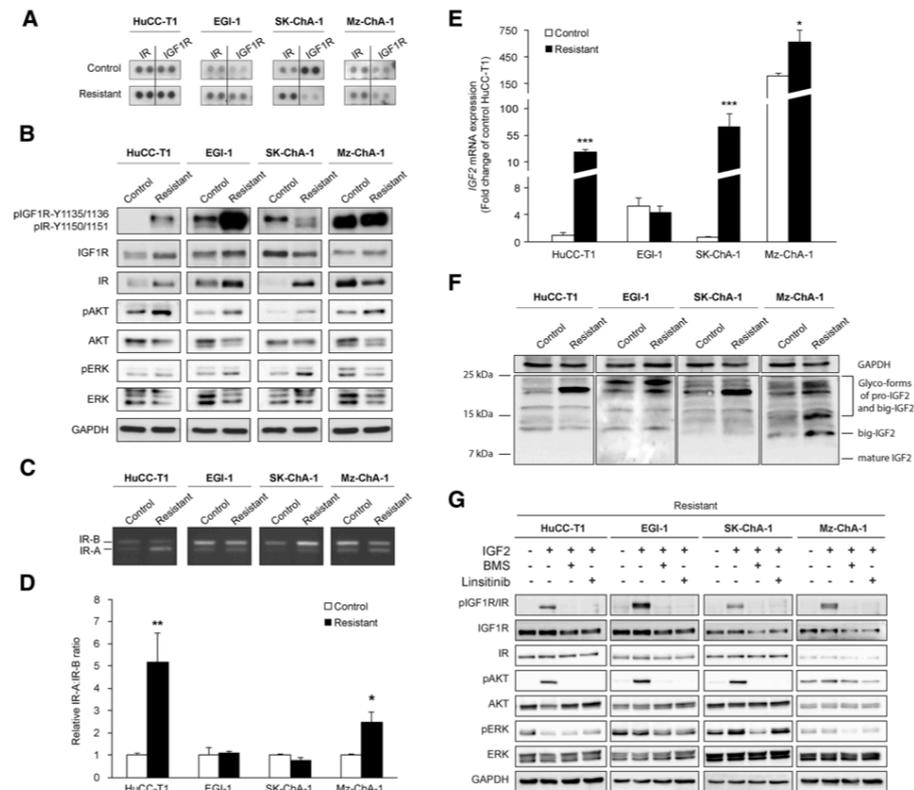


Figure 2. CCA cells exhibit stemness features to escape EGFR inhibition. **A**, Changes in mRNA expression of CSC markers analyzed by RT-qPCR in control and CCA cells resistant to EGFR inhibition. **B**, CD44 and CD24 expression profile was assessed by flow cytometry using APC-conjugated anti-CD24 and FITC-conjugated anti-CD44 antibodies. Gates are based on the isotype controls. The numbers indicate the percentage of cells present in each quadrant. **C**, Sphere formation assay after 7 days in culture. Right, Representative pictures of control and resistant spheres. Scale, 100 μ m. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, as compared with control cells.

Vaquero et al.

**Figure 3.**

The IGF2/IR/IGF1R axis is an escape route upregulated in CCA cells resistant to EGFR inhibition. **A**, Representative images of human phospho-RTK array of IR and IGF1R total tyrosine phosphorylation in control and resistant CCA cells. **B**, Representative images of Western blot analysis of IR, IGF1R, AKT, and ERK total expression and phosphorylation state in control and resistant CCA cells. **C** and **D**, Analysis of IR-A and IR-B mRNA expression by gel electrophoresis (**C**) and RT-qPCR (**D**). RT-qPCR results are represented as ratio of IR-A/IR-B (**D**). **E** and **F**, Analysis of IGF2 mRNA (**E**) and protein (**F**) expression in control and resistant CCA cells. **G**, Representative images of Western blot analysis of IR, IGF1R, AKT, and ERK total expression and phosphorylation state in control and resistant cells treated with IGF2 in the absence or presence of IR/IGF1R inhibitors, BMS536924 or linsitinib. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, as compared with control cells.

unchanged in HuCC-T1-resistant cells, and decreased in Mz-ChA-1-resistant cells (Fig. 3B). Furthermore, IR is expressed as two isoforms, IR-A and IR-B, as a result of alternative splicing of exon 11. This structural feature confers specific functional properties to IR-A, such as higher affinity for IGF2 and oncogenic properties, compared with IR-B that is involved in the regulation of the metabolic functions (24). Both isoforms were detected in all cells, with an increase in IR-A:IR-B ratio in two resistant cell lines, HuCC-T1 and Mz-ChA-1 (Fig. 3C and D). The following step was to analyze the expression of IR/IGF1R ligands, IGF-1, IGF-2, and insulin. Only IGF2, the ligand that displays high affinity for both IR-A and IGF1R, was detectable at

mRNA level, and its expression was enhanced in resistant cells compared with control cells (Fig. 3E). This increase was validated at the protein level by Western blot. While mature form of IGF2 was not detected, levels of the unprocessed forms, pro- and big- forms, of IGF2 were enhanced (Fig. 3F). It should be noted that unprocessed forms of IGF2 possess similar binding potential for IR/IGF1R as mature IGF2, but show impaired ternary complex formation, which allows them to exhibit higher bioavailability than the mature form (25). We did not identify epigenetic modifications such as methylation that could explain the increase in IGF2 production (data not shown). To further clarify the intracellular signaling elicited

by this ligand, resistant cells were starved and exposed to IGF2 in the absence or presence of two dual IR/IGF1R inhibitors, BMS536924 and linsitinib. As expected, IGF2 was able to activate IR/IGF1R, and this effect was followed by the activation of AKT in all resistant cell lines, while ERK was activated only in SK-ChA-1 resistant cells (Fig. 3G). Both BMS536924 and linsitinib exert their inhibitory effect over IR/IGF1R, which was followed by the inhibition of AKT signaling (Fig. 3G). Similar inhibitory effects of both BMS536924 and linsitinib were observed on IR/IGF1R and AKT phosphorylation, but not over ERK signaling, in conditions of culture activation (10% FBS; Supplementary Fig. S3C).

These results suggest that CCA resistance to erlotinib may depend on the upregulation of an alternative signaling pathway driven by IGF2/IR/IGF1R and by intracellular AKT signaling.

IR/IGF1R blockage regulates viability and cell plasticity of CCA cells resistant to EGFR inhibition

Given IR/IGF1R upregulation in CCA cells resistant to EGFR inhibition, we decided to test, on the parameters analyzed so far, the effect of the combination of erlotinib with BMS536924 and linsitinib. Both compounds were able to promote a strong decrease of resistant cell viability, but had little or no effect on control cells (Fig. 4A; Supplementary Fig. S4A). Consistently, IR/IGF1R TKI reduced EMT/CSC features, observed as a reduction of EMT-TFs expression, cell migration (Fig. 4B and C; Supplementary Fig. S4B and S4C) and sphere formation (Fig. 4D; Supplementary Fig. S4D) of resistant cell lines.

siRNA knockdown of IR and IGF1R was performed to analyze their relative role in resistant cell lines. Western blot analysis showed a compensatory upregulatory effect of IR and IGF1R knocking down on each other, while dual siRNA knock down caused a profound downregulation of both receptors (Supplementary Fig. S5A). Functional tests showed (i) no evidence for a prominent role of one receptor over the other (Supplementary Fig. S5B–S5D) and that (ii) consistent with the effect of BMS536924 and linsitinib, dual downregulation of IR/IGF1R significantly reduced the viability (Supplementary Fig. S5B), migratory capacities (Supplementary Fig. S5C) and sphere formation (Supplementary Fig. S5D) of all resistant cell lines.

Altogether, these results indicate that during adaptation to EGFR inhibition, an alternative IGF2/IR/IGF1R pathway is upregulated, which contributes to regulate CCA cell plasticity.

In vivo, CCA cells resistant to EGFR inhibition show increased tumorigenic potential and higher tumor stroma content

To compare the tumorigenicity of control and resistant cells, subcutaneous xenografts in immunocompromised mice were performed with HuCC-T1 and EGI-1 cells. Subcutaneous injection of CCA cell lines demonstrated that resistant cells to erlotinib presented a higher tumorigenic potential compared with control cells (Supplementary Fig. S6A). When tumor histology was analyzed, it was evidenced that resistant tumors were less differentiated, with less glandular formation and the presence of marked cellular atypia (Supplementary Fig. S6B). In addition, resistant tumors displayed a higher stromal area than control tumors (Supplementary Fig. S6B). Because CCA stroma predominantly consists in CAFs, we evaluated the expression of well-established markers of fibro-

blast activation (α -SMA) and extracellular matrix production (collagens I and IV; ref. 26) and found an increment of these markers in resistant tumors compared with controls (Supplementary Fig. S6C).

IR/IGF1R blockage decreases tumor growth and stroma content of xenograft CCA tumors resistant to EGFR inhibition

To evaluate the effect of IR/IGF1R inhibition *in vivo*, EGI-1 cells were chosen because the tumors developed from these cells arose earlier in time with higher tumor burden than those from HuCC-T1 cells (Supplementary Fig. S6A). Thus, once tumors from EGI-1 control and resistance cells were well established and reached a similar volume (approximately 300 mm³), mice were treated with erlotinib alone or in combination with linsitinib (the most efficient IR/IGF1R inhibitor in the *in vitro* experiments). As expected, erlotinib significantly inhibited growth of tumors developed from control cells without affecting resistant tumors (Fig. 5A–C). In contrast, combined treatment with erlotinib and linsitinib drastically reduced the growth of tumors developed from resistant cells to levels comparable with control tumors (Fig. 5A–C), indicating a role of IR/IGF1R blockage in overcoming tumor resistance to EGFR inhibition.

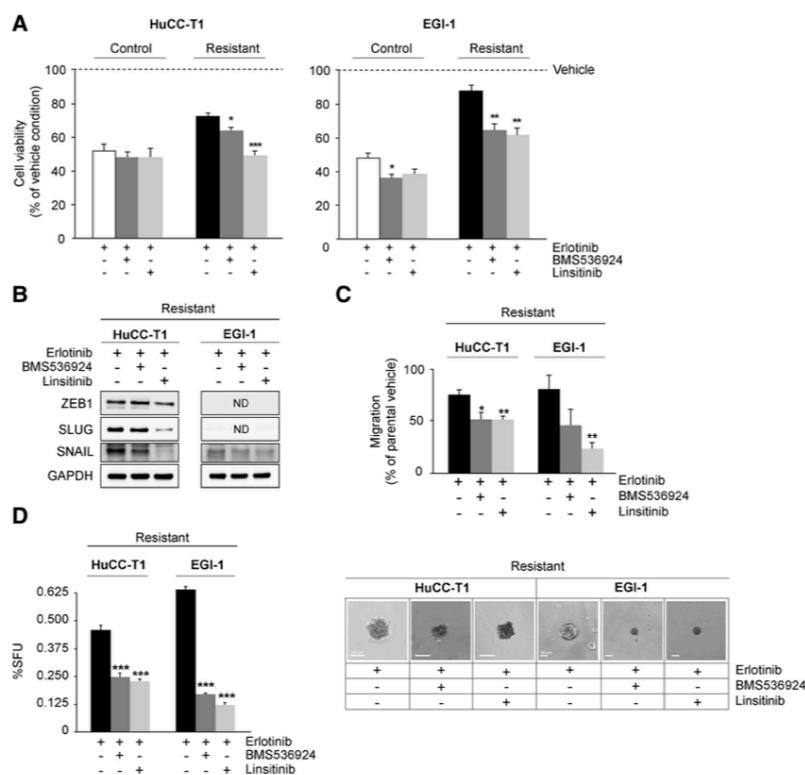
Based on the histologic analysis that showed a stronger desmoplastic reaction in tumors developed from resistant cells (Supplementary Fig. S6B and S6C), we analyzed the effect of IR/IGF1R inhibition on this aspect of tumor biology. To quantify the content of stroma, we performed immunohistochemistry (IHC) to detect α -SMA-positive cells (e.g., CAFs), and Picro-Sirius Red staining to evaluate the amount of collagen produced. An increased staining of α -SMA and collagens was found in resistant tumors compared with the controls, that was not modified upon erlotinib treatment but markedly reduced in animals that received combined treatment (Fig. 5D and E).

CAFs by producing IGF2 support IR/IGF1R signaling in CCA cells resistant to EGFR inhibition

Because stromal compartment was affected in tumors from mice under linsitinib treatment, we decided to look more closely at the IGF2/IR/IGF1R pathway in CAFs. We first analyzed by IHC the expression of IGF2 and IGF1R in mice tumors. IR expression was not analyzed due to unavailable antibodies for IHC. First, we confirmed that cancer cells from both control and resistant CCA tumors expressed IGF2 and IGF1R (Fig. 6A). Furthermore, we observed for the first time an expression of IGF2 and IGF1R in CAFs from xenograft CCA tumors (Fig. 6A). In human, because CCA samples from patients treated with erlotinib were not available, we performed an IHC analysis of IGF2 and IGF1R in intrahepatic CCA samples. This analysis showed IGF2 and IGF1R expression in CCA cells and CAFs, confirming our results from mice xenografts (Supplementary Fig. S7).

Because CAFs from CCA express IGF2, we next aimed at evaluating the contribution of CAFs in the activation of the IR/IGF1R pathway in resistant CCA cells. To model the cross-talk between CAFs and CCA cells, we performed *in vitro* experiments by using the established human liver-derived myofibroblast cell line hTERT-HSC (that showed higher IGF2 expression than LX2, Fig. 6B). Incubation of EGI-1 cells with conditioned medium from hTERT-HSC led to an increase in cell viability only in

Vaquero et al.

**Figure 4.**

IR/IGF1R blockade regulates viability and cell plasticity of CCA cells resistant to EGFR inhibition. **A**, Effect of IR/IGF1R inhibitors on the viability of control and resistant CCA cells. Cell viability was measured after incubation for 72 hours with erlotinib in the absence or presence of IR/IGF1R inhibitors, BMS536924 or linsitinib. The dotted line (vehicle) indicates the viability of the cells cultured in the absence of erlotinib. **B**, Representative images of Western blot analysis of the EMT-TF expressed by CCA cells after 48 hours under the indicated treatment. **C**, Cell migration toward a chemoattractant (serum) was measured by Transwell chamber assay. **D**, Sphere formation assay after 7 days under the indicated treatment. Right, Representative pictures of the largest spheres found for resistant cells under each treatment. Scale, 100 μ m. In all cases, the concentrations of inhibitors were 20 μ mol/L erlotinib, 1 μ mol/L BMS536924, and 10 μ mol/L linsitinib for HuCC-T1; and 20 μ mol/L erlotinib, 0.5 μ mol/L BMS536924, and 5 μ mol/L linsitinib for EGI-1. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, comparing cells treated with BMS536924 or linsitinib with untreated cells. ND, not detected.

resistant CCA cells, that was abolished by the addition of an IGF2-neutralizing antibody but not by an irrelevant IgG isotype (Fig. 6C). Accordingly, hTERT-HSC-conditioned medium was able to activate IR/IGF1R only in resistant cells (Fig. 6D). These results were validated in CCA cells upon IGF2 treatment alone or in combination with IGF2-neutralizing antibody. Stimulation with IGF2 promoted a small increase in control cell viability, while in resistant cells, it had a more pronounced effect (Fig. 6E). These results correlated again with a much higher activation of IR/IGF1R in resistant cells compared with controls upon IGF2 treatment (Fig. 6F). As expected, the addition of IGF2-neutralizing

antibody abolished the effect of IGF2 (Fig. 6E), confirming the role of the IGF2/IR/IGF1R pathway in the resistance of CCA cells to EGFR inhibition.

Altogether, these results suggest the implication of a cross-talk between CAFs and tumor cells in the adaptive mechanism of CCA cells to EGFR inhibition through IGF2 originating from CAFs.

IR/IGF1R blockade downregulates hepatic myofibroblast proliferation, activation, and extracellular matrix synthesis

Given IGF2 production by the CCA cells and stromal myofibroblasts, we wondered if the IGF2/IR/IGF1R signaling

Resistance Mechanisms to Erlotinib in Cholangiocarcinoma

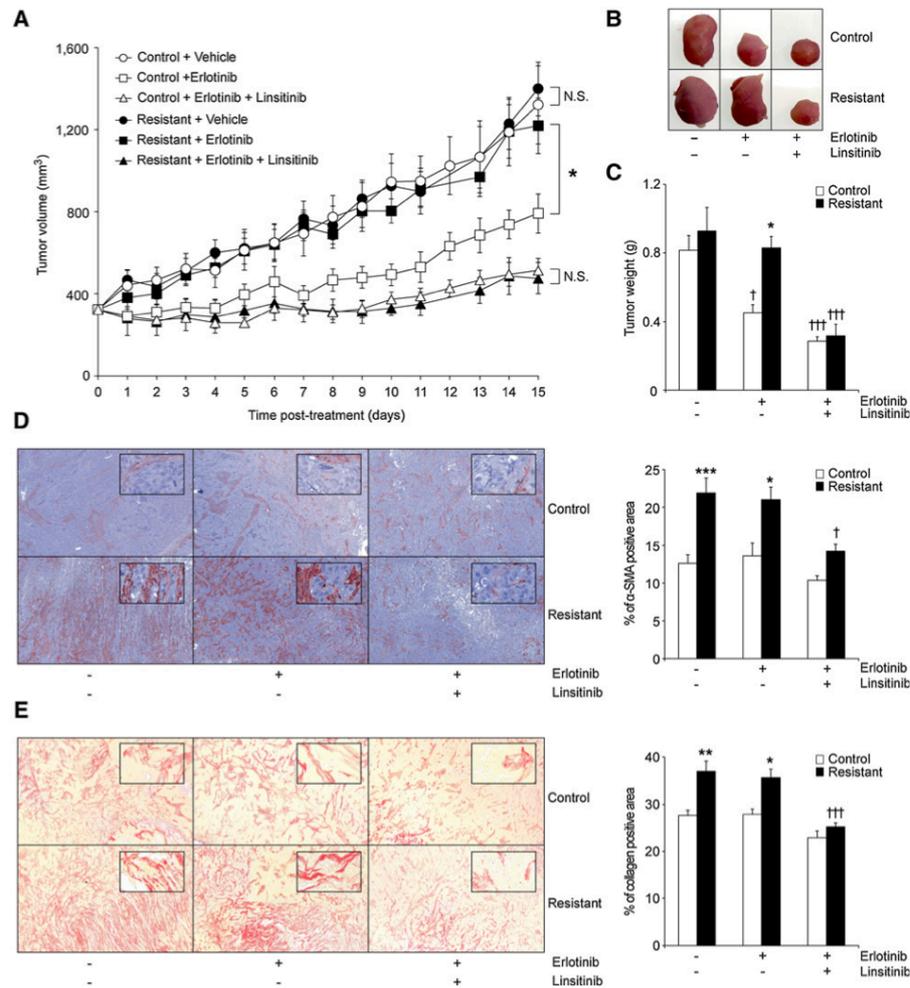


Figure 5. IR/IGF1R blockage decreases tumor growth and stroma content of xenograft CCA tumors resistant to EGFR inhibition. **A**, Tumor volume of mice bearing control (white) or erlotinib-resistant (black) EGI-1 cells treated with vehicle (circles), erlotinib (squares, 75 mg/kg/day), or erlotinib/linsitinib (triangles, 75/30 mg/kg/day) for 15 days (5 days per week). **B**, Representative images of a tumor from each group at sacrifice. **C**, Tumor weight at sacrifice. **D** and **E**, Representative IHC of α -SMA (**D**) and Picro-Sirius Red (**E**) staining in mice CCA tumors and quantification of positive area with ImageJ (on the right). Magnification, $\times 5$ and $\times 40$ (insets). Values are expressed as means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, as compared resistant with control tumors. †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$; †††, $P < 0.001$, as compared with untreated tumors of each group ($n = 7$).

pathway had a role in the latter cell type. Both hepatic myofibroblast cell lines, hTERT-HSC and LX2, expressed IR and IGF1R at the protein level, and both receptors were responsive

to IGF2 (Fig. 7A). In these cells, IGF2 was able to promote proliferation (Fig. 7B). In addition, IR/IGF1R inhibition by linsitinib decreased cell viability in a dose-dependent manner

Vaquero et al.

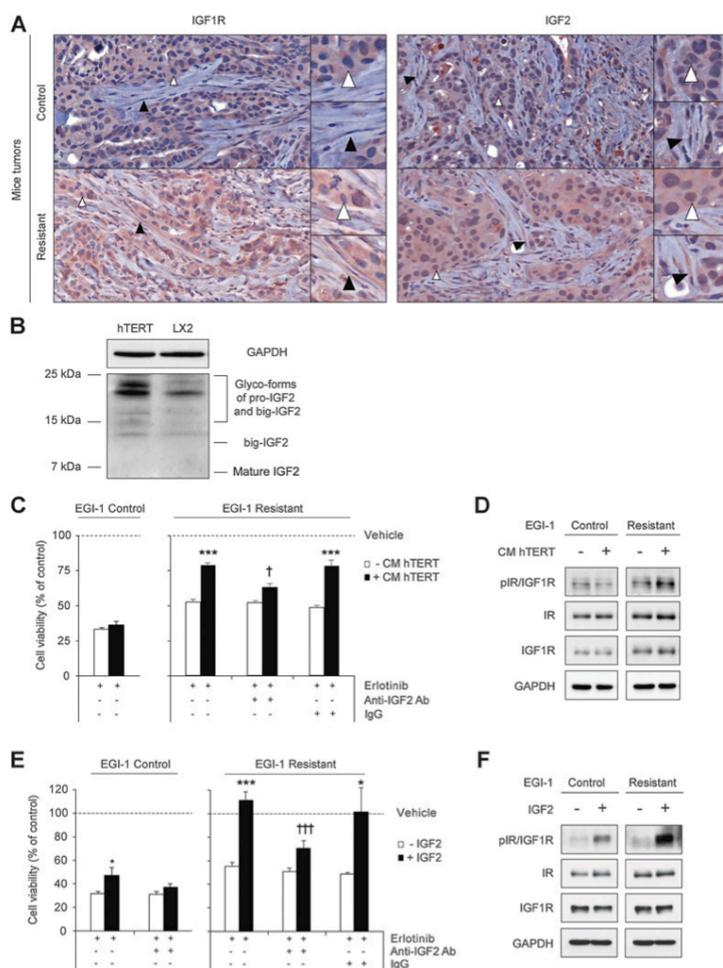


Figure 6. CAFs support IR/IGF1R signaling in CCA cells resistant to EGFR inhibition by producing IGF2. **A**, Representative IHC staining of IGF1R and IGF2 in xenograft tumors from control and resistant CCA cells. White and black arrowheads indicate tumor cells and CAFs, respectively. Magnification, $\times 5$ and $\times 40$ (insets). **B**, Representative images of Western blot analysis of IGF2 expression in human liver-derived myofibroblasts cell lines (hTERT and LX2). **C**, Effect of erlotinib on the viability of control and resistant CCA cells. Cell viability was measured after 72 hours of incubation with the indicated compounds and/or medium (20 $\mu\text{mol/L}$ erlotinib, 2 mg/mL IGF2-neutralizing antibody or an irrelevant IgG isotype, in the absence (white bars) or presence (black bars) of hTERT-HSC conditioned medium). The dotted line (vehicle) indicates the viability of the cells cultured in the absence of erlotinib. **D**, Representative images of Western blot analysis of IR and IGF1R total expression and phosphorylation state in EGI-1 control and resistant cells treated or not with hTERT-HSC-conditioned medium. **E**, Effect of erlotinib on the viability of control and resistant CCA cells. Cell viability was measured after 72 hours of incubation with the indicated compounds (20 $\mu\text{mol/L}$ erlotinib, 2 mg/mL IGF2-neutralizing antibody or an irrelevant IgG isotype, in the absence (white bars) or presence (black bars) of 100 ng/mL IGF2). **F**, Representative images of Western blot analysis of IR and IGF1R total expression and phosphorylation state in EGI-1 control and resistant cells treated or not with IGF2. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, comparing cells treated with IGF2 with untreated cells. †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$; †††, $P < 0.001$, comparing cells treated with IGF2-neutralizing antibody with untreated cells of each group.

Resistance Mechanisms to Erlotinib in Cholangiocarcinoma

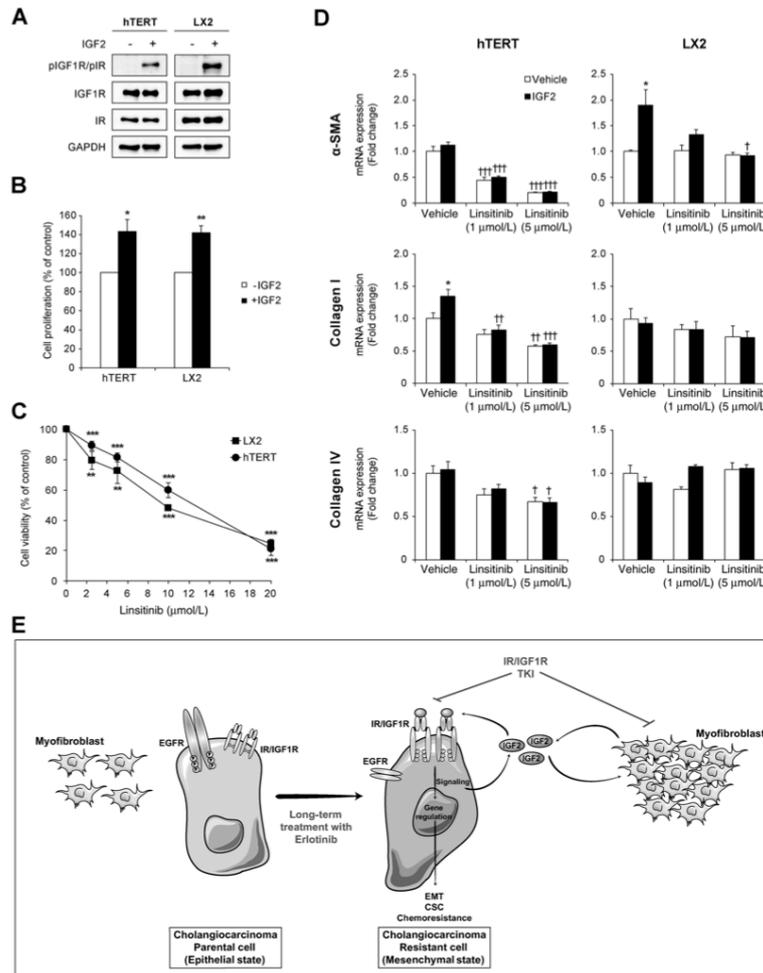


Figure 7.

IGF2/IR/IGF1R signaling regulates proliferation and activation of hepatic myfibroblasts. **A**, Representative images of Western blot analysis of IR and IGF1R total expression and phosphorylation state in hTERT-HSC and LX2 myfibroblastic cells. **B** and **C**, Effect of 100 ng/mL IGF2 (**B**) and linsitinib (**C**) on the proliferation of hTERT-HSC and LX2 cells. Cell viability was measured after 72 hours of incubation with IGF2 (in 0% FBS) or the indicated concentrations of linsitinib (in 10% FBS). **D**, mRNA expression analysis by RT-qPCR of α -SMA, collagens I and IV in hTERT-HSC, and LX2 cells. Cells were incubated for 48 hours with the indicated concentrations of linsitinib in the absence (white bars) or presence (black bars) of 100 ng/mL IGF2. **E**, Model depicting the adaptive mechanisms of CCA to EGFR inhibition. Chronic treatment with an EGFR inhibitor, erlotinib, promotes the overexpression of IGF2, IR, and IGF1R in CCA cells. IGF2/IR/IGF1R overexpression leads to the induction of a mesenchymal state in erlotinib-resistant CCA cells characterized by the adoption of EMT/CSC traits and chemoresistance. Resistant CCA cells to EGFR inhibition promote CAFs proliferation by unknown mechanisms. In the tumor microenvironment, CAFs produce IGF2 that contributes to chemoresistance of CCA cells by a paracrine loop. Thus, addition of IR/IGF1R inhibitor linsitinib reverses chemoresistance by acting on tumor cells and on CAFs proliferation/activation. CAFs, cancer-associated fibroblasts; CCA, cholangiocarcinoma; TKI, tyrosine kinase inhibitor. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, comparing cells treated with IGF2 with untreated cells. †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$; †††, $P < 0.001$, comparing cells treated with linsitinib with cells incubated with vehicle of each group.

Vaquero et al.

(Fig. 7C). Similarly, IGF2 siRNA knockdown reduced hTERT-HSC proliferation (Supplementary Fig. S8A). Furthermore, the IGF2/IR/IGF1R pathway was able to regulate myofibroblast activation and collagen synthesis. IGF2 induced the expression of α -SMA in LX2 cells, which was abolished upon the addition of linsitinib (Fig. 7D). In contrast, the addition of exogenous IGF2 or inhibition of endogenous IGF2 by siRNA had no effect on α -SMA expression in hTERT-HSC cells, but again linsitinib was able to strongly inhibit the basal mRNA levels of α -SMA (Fig. 7D; Supplementary Fig. S8B). Regarding collagen synthesis, IGF2 induced the expression of collagen I and had no effect on collagen IV synthesis in hTERT-HSC cells. Linsitinib, but not IGF2 knockdown, reduced the expression of both collagens (Fig. 7D; Supplementary Fig. S8B). Contrarily, there was no visible effect of IGF2 or linsitinib on the expression of collagen variants in LX2 cells (Fig. 7D).

These observations provide further evidence of the role of the IGF2/IR/IGF1R signaling pathway on the regulation of stromal myofibroblasts biology and the therapeutic potential of linsitinib on these cells.

Discussion

Treatment of CCA patients remains challenging despite the identification of molecular pathways with high therapeutic potential such as EGFR (5–7, 27). Although antibodies or TKI against EGFR have shown efficacy in preclinical studies (27–29), they did not provide significant improvement of global survival in clinical trials in CCA (9–14). Here, we highlight resistance mechanisms whereby CCA cells evade EGFR inhibition. These include the adoption of EMT/CSC features that are regulated by the IGF2/IR/IGF1R signaling axis. In addition, we uncover a role of stromal CAFs on boosting IR/IGF1R signaling by producing IGF2 that could impair responsiveness to EGFR inhibition. Finally, we provide evidence that inhibition of IR/IGF1R combined with anti-EGFR in a preclinical model overcomes erlotinib resistance in CCA cells (Fig. 7E).

EMT is a developmental program strongly regulated by EMT-TF that allows cells to acquire mesenchymal properties at the expense of their epithelial characters conferring invasiveness and drug resistance capacities (20). We show a phenotypic switch from an epithelial to a mesenchymal phenotype in CCA cells subjected to chronic EGFR inhibition. The EMT-undergoing cells express higher levels of EMT-TF and mesenchymal markers, lower levels of E-cadherin compared with untreated cells, and display increased cell migratory capacity. Previous reports have shown a direct contribution of EMT-TF to the resistance to EGFR TKI in cancer (30, 31). In addition, we cannot exclude other described actions of EMT-TF, including upregulation of survival and anti-apoptotic signals rendering the cells less responsive to treatment (32). Moreover, a link between EMT and CSC generation and maintenance has been established in cancer (33). Indeed, cells presenting both EMT and CSC characteristics have been described in a malignant context (21). More specifically, EMT-TFs have been directly related to the induction of stemness by several mechanisms (21, 34, 35). Furthermore, EMT and CSC phenotypes have been shown to be regulated by the IGF signaling axis (24), a pathway that we found upregulated in erlotinib-resistant CCA cells. Interestingly, the specific molecular alterations among the four CCA cell lines were different regarding the upregulation of EMT-TF, mesenchymal, and CSC markers. Accordingly, GSEA

showed enrichment in signatures associated with metastasis and stemness that were specific for erlotinib-resistant cells derived from each cell line. These differences are most probably accounted for the high heterogeneity of CCA (36, 37). Nevertheless, in spite of these molecular differences, the four CCA-resistant cell lines, with different origins along the biliary tree (i.e., intrahepatic or extrahepatic CCA), behaved phenotypically and, more importantly, functionally, in a similar way, by displaying higher migratory and tumorigenic properties, both under the regulation of an IGF2/IR/IGF1R signaling pathway.

A surprising fact is that, despite the rising interest of targeting EGFR in CCA and the increasing number of clinical trials testing different types of anti-EGFR therapies (i.e., erlotinib, lapatinib, cetuximab, and panitumumab), so far few studies have dedicated efforts into the understanding of mechanisms involved in anti-EGFR therapy resistance (14, 29, 38). Here, we identified the IGF axis as an alternative activated pathway in erlotinib-resistant CCA cells, and more specifically an upregulation of IR and IGF1R associated with increased expression of IGF2. This signaling pathway, described here for the first time as an adaptive mechanism to EGFR inhibition in CCA, has been implicated in resistance to EGFR targeting agents in other cancers, including glioblastoma (39), hepatocellular carcinoma (40), pancreatic (41), lung (23), and colorectal cancers (42). While the role of IR is currently unknown in CCA cells, IGF1R is involved in cholangiocyte proliferation and its expression is associated with an aggressive phenotype (43, 44). Consistent with the role of IR/IGF1R in erlotinib resistance in CCA cells, blockage of these receptors with the dual TKI linsitinib overcame erlotinib resistance and decreased EMT/CSC features. Interestingly, the involvement of IGF signaling axis in resistance to anti-EGFR has been shown in other tumors in response to not only erlotinib (23) but also lapatinib (45) and cetuximab (46). Thus, we could speculate that the IGF2/IR/IGF1R signaling pathway may play a more prominent role in the adaptive response to anti-EGFR therapy in CCA.

The tumor microenvironment plays a role not only in cancer progression but also in therapeutic response (47). In addition, cetuximab has been shown to induce CAFs activation in head and neck cancer patients, although whether these effects are mediated by directly acting on CAFs or indirectly through interactions with tumor cells is still unknown (48). Here, we show that erlotinib-resistant CCA tumors exhibited a higher stromal component, i.e., α -SMA-positive cells, than control CCA tumors, suggesting an impact of resistant tumor cells on CAFs proliferation by yet unidentified mechanisms. More importantly, we identified CAFs as IGF2-producing cells in mice xenograft and human CCA tumors, in accordance with previous studies in non-small cell lung (49), colon (25), and pancreatic cancers (41). In this context, we uncovered a potential role for IGF2 in the CAFs-CCA cross-talk by increasing erlotinib resistance in tumor cells. Furthermore, we confirmed the function of IR/IGF1R as inducers of fibroblast proliferation, as previously described in hepatic stellate cells from fibrotic liver settings and CAFs from other cancers (25, 50). Consequently, IR/IGF1R blockage showed inhibitory effects not only on erlotinib-resistant CCA cells but also on the stromal content of CAFs in mouse CCA tumors. Interestingly, siRNA knockdown experiments revealed a role of IGF2 in fibroblast proliferation but not in their myofibroblastic phenotype, suggesting an IGF2-independent effect for IR/IGF1R in fibroblast activation. Perhaps IR/IGF1R

heterodimerization with other RTK, a well-described phenomenon (51), could have taken part in this process. Collectively, our results argue for a wider role of the IGF system in the cross-talk between cancer cells and CAFs in resistance to erlotinib in CCA.

Altogether, the upregulation of IGF signaling pathway in our preclinical models of erlotinib resistance, together with the fact that all protagonists of the IGF axis are expressed by both tumor cells and CAFs in human CCA, may revive the interest of using combinatorial therapies with anti-EGFR together with anti-IR/IGF1R inhibitors as potential treatment for CCA patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: J. Vaquero, A. Clapéron, L. Fouassier
Development of methodology: J. Vaquero, C. Lobe, S. Tahrouri, M. Mergéy, F. Merabtene, L. Fouassier
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): J. Vaquero, C. Lobe, D. Wendum, L. Fouassier
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): J. Vaquero, C. Lobe, D. Wendum, C. Coulouam, C. Desbois-Mouthon, F. Praz, L. Fouassier
Writing, review, and/or revision of the manuscript: J. Vaquero, A. Clapéron, D. Wendum, C. Coulouam, C. Housset, C. Desbois-Mouthon, F. Praz, L. Fouassier

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): S. Tahrouri, M. Mergéy, F. Merabtene, C. Housset, L. Fouassier
Study supervision: J. Vaquero, L. Fouassier

Acknowledgments

We acknowledge Wassila Carpentier from Sorbonne Université, Inserm, UMS Omique, Plateforme Post-génomique de la Pitié-Salpêtrière (P3S), Nicolas Cagnard, Plateforme Bio-informatique Paris Descartes, Hôpital Necker, Tatiana Ledent from Housing and experimental animal facility (HEAF), Centre de recherche Saint-Antoine (CRSA), Annie Munier and Romain Morichon from the Flow cytometry-imaging platform UMS_30 LUJMIC, CRSA, and Claire Calmel from CRSA for help in genotyping CCA cells. We also thank Ester Gonzalez-Sanchez and Ander Arbelaiz for technical assistance and discussion of the manuscript, and Yves Le Bouc, Laurence Perin, and Patricia Leneuve for their advice on IGF2 protein detection.

L. Fouassier is supported by grants from Fondation de France (No. 2011 25574 and 2014 47502), La Ligue Nationale contre le Cancer (No. RS14/75-112), GEFLUC (2013), and ANR (ANR-17-CE14-0013-01). J. Vaquero is a recipient of the following postdoctoral fellowships from the Spanish Association for the Study of the Liver (AEEH), the Fondation ARC (No. PDF2014601431) and the LABEX PLAS@PAR (reference ANR-11-IDEX-0004-02). C. Lobe is recipient of a fellowship from la Ligue Nationale contre le Cancer (No.13014).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received December 14, 2017; revised April 3, 2018; accepted April 27, 2018; published first May 1, 2018.

References

- Banales JM, Cardinale V, Carpino C, Marziani M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Expert consensus document: cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:261–80.
- Marin JJC, Lozano E, Herrera E, Asensio M, Di Giacomo S, Romero MR, et al. Chemoresistance and chemosensitization in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2018;1864:1444–53.
- Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1273–81.
- Andersen JB, Spee B, Blechacz BR, Avital I, Komuta M, Barbour A, et al. Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors. *Gastroenterology* 2012;142:1021–31e15.
- Clapéron A, Mergéy M, Nguyen Ho-Bouloires TH, Vignjevic D, Wendum D, Chretien Y, et al. EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition. *J Hepatol* 2014;61:325–32.
- Yoon JH, Gwak CY, Lee HS, Bronk SF, Werneburg NW, Gores CJ. Enhanced epidermal growth factor receptor activation in human cholangiocarcinoma cells. *J Hepatol* 2004;41:808–14.
- Sia D, Hoshida Y, Villanueva A, Roayaie S, Ferrer J, Tabak B, et al. Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes. *Gastroenterology* 2013;144:829–40.
- Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2008;98:418–25.
- Chen JS, Hsu C, Chiang NJ, Tsai CS, Tsou HH, Huang SF, et al. A KRAS mutation status-stratified randomized phase II trial of gemcitabine and oxaliplatin alone or in combination with cetuximab in advanced biliary tract cancer. *Ann Oncol* 2015;26:943–9.
- Gruenberger B, Schueller J, Heubrandtner U, Wiba F, Tamandl D, Kaczirek K, et al. Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 2010;11:1142–8.
- Lee J, Park SH, Chang HM, Kim JS, Choi HJ, Lee MA, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012;13:181–8.
- Leone F, Marino D, Cereda S, Filippi R, Belli C, Spadi R, et al. Panitumumab in combination with gemcitabine and oxaliplatin does not prolong survival in wild-type KRAS advanced biliary tract cancer: A randomized phase 2 trial (Vecti-BIL study). *Cancer* 2016;122:574–81.
- Malka D, Cervera P, Foulon S, Traubach T, de la Fouchardiere C, Boucher E, et al. Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15:819–28.
- Pellat A, Vaquero J, Fouassier L. Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology. *Hepatology* 2017;doi:10.1002/hep.29350.
- Brivio S, Cadamuro M, Strazzabosco M, Fabris L. Tumor reactive stroma in cholangiocarcinoma: the fuel behind cancer aggressiveness. *World J Hepatol* 2017;9:455–68.
- Choe C, Shin YS, Kim C, Choi SJ, Lee J, Kim SY, et al. Crosstalk with cancer-associated fibroblasts induces resistance of non-small cell lung cancer cells to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *Oncotargets Ther* 2015;8:3665–78.
- Johansson AC, Ansell A, Jerhammar F, Lindh MB, Grenman R, Munck-Wikland E, et al. Cancer-associated fibroblasts induce matrix metalloproteinase-mediated cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2012;10:1158–68.
- Allain C, Angenard G, Clement B, Coulouam C. Integrative genomic analysis identifies the core transcriptional hallmarks of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2016;76:6374–81.
- Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Wendum D, Clapéron A, Chretien Y, et al. Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors. *Cancer Res* 2013;73:3974–86.

Vaquero et al.

20. Thiery JP, Aclouque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–90.
21. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
22. Fong JT, Jacobs RJ, Moravec DN, Uppada SB, Botting GM, Niend M, et al. Alternative signaling pathways as potential therapeutic targets for overcoming EGFR and c-Met inhibitor resistance in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013;8:e78398.
23. Suda K, Mizuuchi H, Sato K, Takemoto T, Iwasaki T, Mitsudomi T. The insulin-like growth factor 1 receptor causes acquired resistance to erlotinib in lung cancer cells with the wild-type epidermal growth factor receptor. *Int J Cancer* 2014;135:1002–6.
24. Malaguarnera R, Belfiore A. The emerging role of insulin and insulin-like growth factor signaling in cancer stem cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014;5:10.
25. Unger C, Kramer N, Unterleuthner D, Scherzer M, Burian A, Rudisch A, et al. Stromal-derived IGF2 promotes colon cancer progression via paracrine and autocrine mechanisms. *Oncogene* 2017;36:5341–55.
26. Cadamuro M, Stecca T, Brivio S, Mariotti V, Fiorotto R, Spirli C, et al. The deleterious interplay between tumor epithelia and stroma in cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2018;1864:1435–43.
27. Pignochino Y, Sarotto L, Peraldo-Neia C, Penachioni JY, Cavalloni G, Migliardi G, et al. Targeting EGFR/HER2 pathways enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in biliary tract and gallbladder carcinomas. *BMC Cancer* 2010;10:631.
28. Herberger B, Berger W, Puhalla H, Schmid K, Novak S, Brandstetter A, et al. Simultaneous blockade of the epidermal growth factor receptor/mammalian target of rapamycin pathway by epidermal growth factor receptor inhibitors and rapamycin results in reduced cell growth and survival in biliary tract cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1547–56.
29. Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Amador ML, Oppenheimer D, Bouraoud N, Kulesza P, et al. Epidermal growth factor receptor dynamics influences response to epidermal growth factor receptor targeted agents. *Cancer Res* 2005;65:3003–10.
30. Yoshida T, Song L, Bai Y, Kinose F, Li J, Ohaegbulam KC, et al. ZEB1 mediates acquired resistance to the epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2016;11:e0147344.
31. Chang TH, Tsai MF, Su KY, Wu SG, Huang CP, Yu SL, et al. Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1071–9.
32. Tiwari N, Gheldof A, Tatar M, Christofori G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2012;22:194–207.
33. Fabregat I, Malfetone A, Soukupova J. New insights into the crossroads between EMT and stemness in the context of cancer. *J Clin Med* 2016;5. pii: E37. doi: 10.3390/jcm5030037.
34. Preca BT, Bajdak K, Mock K, Sundararajan V, Pfannstiel J, Maurer J, et al. A self-enforcing CD44s/ZEB1 feedback loop maintains EMT and stemness properties in cancer cells. *Int J Cancer* 2015;137:2566–77.
35. Tang B, Qi C, Tang F, Yuan S, Wang Z, Liang X, et al. Aberrant JMJD3 expression upregulates slug to promote migration, invasion, and stem cell-like behaviors in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2016;76:6520–32.
36. Brandi G, Farioli A, Astolfi A, Biasco G, Tavorali S. Genetic heterogeneity in cholangiocarcinoma: a major challenge for targeted therapies. *Oncotarget* 2015;6:14744–53.
37. Komuta M, Covaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberghe W, Verslype C, et al. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* 2012;55:1876–88.
38. Jimeno A, Kulesza P, Kincaid E, Bouaroud N, Chan A, Forastiere A, et al. C-fos assessment as a marker of anti-epidermal growth factor receptor effect. *Cancer Res* 2006;66:2385–90.
39. Ma Y, Tang N, Thompson RC, Mobley BC, Clark SW, Sarkaria JN, et al. InsR/IGF1R pathway mediates resistance to EGFR inhibitors in glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2016;22:1767–76.
40. Desbois-Mouthon C, Cacheux W, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Barbu V, Fartoux L, Poupon R, et al. Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer* 2006;119:2557–66.
41. Ireland L, Santos A, Ahmed MS, Rainer C, Nielsen SR, Quaranta V, et al. Chemoresistance in pancreatic cancer is driven by stroma-derived insulin-like growth factors. *Cancer Res* 2016;76:6851–63.
42. Vigneri PG, Tirro E, Pennisi MS, Massimino M, Stella S, Romano C, et al. The insulin/IGF system in colorectal cancer development and resistance to therapy. *Front Oncol* 2015;5:230.
43. Alvaro D, Barbaro B, Franchitto A, Onori P, Glaser SS, Alpini G, et al. Estrogens and insulin-like growth factor 1 modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2006;169:877–88.
44. Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, Taniguchi H, Noshio K, Suzuki H, et al. Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci* 2012;103:252–61.
45. Corcoran C, Rani S, Breslin S, Gogarty M, Chobrial IM, Crown J, et al. miR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer. *Mol Cancer* 2014;13:71.
46. Li X, Xu L, Li H, Zhao L, Luo Y, Zhu Z, et al. Cetuximab-induced insulin-like growth factor receptor I activation mediates cetuximab resistance in gastric cancer cells. *Mol Med Rep* 2015;11:4547–54.
47. Cadamuro M, Brivio S, Spirli C, Joplin RE, Strazzabosco M, Fabris L. Autocrine and paracrine mechanisms promoting chemoresistance in cholangiocarcinoma. *Int J Mol Sci* 2017;18. pii: E149. doi: 10.3390/jms18010149.
48. Schmitz S, Bindea G, Albu RI, Mlecnik B, Machiels JP. Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer. *Oncotarget* 2015;6:34288–99.
49. Chen WJ, Ho CC, Chang YL, Chen HY, Lin CA, Ling TY, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat Commun* 2014;5:3472.
50. Svegliati-Baroni C, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, et al. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* 1999;29:1743–51.
51. Liefers-Visser JAL, Meijering RAM, Reyners AKL, van der Zee AGJ, de Jong S. IGF system targeted therapy: therapeutic opportunities for ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2017;60:90–9.

Clinical Cancer Research

The IGF2/IR/IGF1R Pathway in Tumor Cells and Myofibroblasts Mediates Resistance to EGFR Inhibition in Cholangiocarcinoma

Javier Vaquero, Cindy Lobe, Sylvana Tahraoui, et al.

Clin Cancer Res 2018;24:4282-4296. Published OnlineFirst May 1, 2018.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-17-3725](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3725)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2018/05/01/1078-0432.CCR-17-3725.DC1>

Cited articles This article cites 48 articles, 9 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/24/17/4282.full#ref-list-1>

Citing articles This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles. Access the articles at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/24/17/4282.full#related-urls>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/24/17/4282>.
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Supplementary information

IGF2/IR/IGF1R pathway in tumor cells and myofibroblasts mediates resistance to EGFR inhibition in cholangiocarcinoma

Javier Vaquero^{1, 2, 3}, Cindy Lobe¹, Sylvana Tahraoui¹, Audrey Clapéron¹, Martine Mergey¹, Fatiha Merabtene¹, Dominique Wendum^{1, 4}, Cédric Coulouarn⁵, Chantal Housset^{1, 6}, Christèle Desbois-Mouthon¹, Françoise Praz¹, Laura Fouassier¹

1 Sorbonne University, INSERM, Saint-Antoine Research Center (CRSA), Paris, France

2 Fondation ARC, Villejuif, France

3 LPP, CNRS, Ecole Polytech., Univ. Paris-Sud, Observatoire de Paris, Univ. Paris-Saclay, Sorbonne University, PSL Research University, Paris, France.

4 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, Department of Pathology, Paris, France

5 INSERM, INRA, Univ Rennes 1, Univ Bretagne Loire, Nutrition Metabolisms and Cancer (NuMeCan), F-35033, Rennes, France

6 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, Hepatology Department, Paris, France

Running title

Resistance mechanisms to erlotinib in cholangiocarcinoma

Supplementary Materials and Methods

Time-lapse microscopy

Cell motility was evaluated by time-lapse microscopy. Cells were plated in 24-well plates (TPP) and cultured for 24h. Then, medium was replaced for culture medium containing the corresponding combination of TKI and images were collected every 20 min for 24h with an Olympus Bx 61 microscope (Olympus). During the entire experiment, cells were kept at 37°C under 5% CO₂. Cell trajectories were traced using the center of the nucleus as a reference point and were used to calculate the mean speed of the cells with ImageJ software.

RNA silencing

IR, IGF1R and IGF2 expression was silenced by using a pool of four small interfering RNAs (siRNA) (On-Targetplus SMARTpool, Dharmacon). Control siRNA was a pool from Dharmacon (siGENOME nontargeting siRNA Pool 2). Transient transfections were performed with 100 nM siRNA using DharmaFECT 4 (Thermo Scientific). Cells were plated in 6-well plates and after 24 h they were transfected with the corresponding siRNA. 24 h after transfection, cells were plated and incubated the appropriate time before development of the different types of experiment (viability assay, reverse transcription-PCR and western blot analysis, migration assay and sphere formation assay).

Supplementary Table 1. Human primers used for quantitative real-time PCR.

Gene	Protein	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Accession Number
<i>ACTA2</i>	α -SMA	GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA	CTGTGCTTCGTCACCCACGTA	NM_001141945.1
<i>ALDH1A1</i>	ALDH1A1	CCAAAGACATTGATAAAGCCATAA	CACGCCATAGCAATTCACC	NM_000689.4
<i>ALDH3A1</i>	ALDH3A1	GTACATGATCCAGAAGC	ATGGTGAGGTTGAAGG	NM_001135168.1
<i>ALDH1B1</i>	ALDH1B1	ACCCAAGCGTGATCCTGA	CCTGCCCTGGAGGCTAAG	NM_000692.4
<i>CDH1</i>	E-cadherin	AAGAAGCTGGCTGACATGTACGGA	CCACCAGCAACGTGATTTCTGCAT	NM_004360.4
<i>COL1A1</i>	Collagen I	AGTTCGAGTATGGCGG	CAGTGACGCTGTAGGT	NM_000088.3
<i>COL4A1</i>	Collagen IV	CCGCTGCGAAGGGTGG	CCCTTTTGTCTGGTGGTCCC	NM_001845.5
<i>FN1</i>	Fibronectin	CCAGCAGAGGCATAAGGT	TTCCCACTCATCTCCAACG	NM_212482.2
<i>GAPDH</i>	GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	NM_002046.5
<i>IGF2</i>	IGF2	CGTCGCAGCCGTGGCATCGTTGA	GCCCACGGGGTATCTGGGGAAG	NM_000612.5
<i>IGFBP7</i>	IGFBP7	TGTCCTCATCTGGAACAAGGT	TCTGAATGGCCAGGTTGTC	NM_001553.2
<i>INSR</i>	IR-A	GTTTTCGTCCCCAGGCCAT	CCACCGTCACATTCCCAAC	NM_001079817.2
<i>INSR</i>	IR-B	TTTCGTCCCCAGAAAAACCTCT	CCACCGTCACATTCCCAAC	NM_000208.3
<i>ITGB3</i>	CD61	CAAGATTGGAGACACGGTGA	CGGGCTTTATGGTAAAGGACT	NM_000212.2
<i>MMP1</i>	MMP1	GAGCAAACACATCTGACCTAC	CCGATGATCTCCCCTGACA	NM_002421.3
<i>MMP3</i>	MMP3	GCAGTTTGCTCAGCCTATCC	TTTCTCCTAACAACTGTTTCACATC	NM_002422.4
<i>PROM1</i>	CD133	TTTCAAGGACTTGCGAACTCTCTT	GAACAGGGATGATGTTGGGTCTCA	NM_006017.2
<i>S100A9</i>	S100A9	ACGCAACATAGAGACCATCATC	GACCTTTTCATTCTTATTCTCCTTCTT	NM_002965.3
<i>SOX9</i>	SOX9	GTACCCGCACTTGCAACAAC	TCTCGCTCTCGTTTCAGAAGTC	NM_000346.3
<i>VIM</i>	Vimentin	CCCTGCAATCTTTCAGACAG	ATCTGAGCCTGCAGCTCCT	NM_003380.3

Supplementary Table 2. Mouse primers used for quantitative real-time PCR.

Gene	Protein	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Accession Number
<i>Acta2</i>	α -SMA	CTGTCAGGAACCCTGAGACGCT	TACTCCCTGATGTCTGGGAC	NM_007392.3
<i>Col1a1</i>	Collagen I	GAAACCCGAGGTATGCTTGA	GACCAGGAGGACCAGGAAGT	NM_007742.4
<i>Col4a1</i>	Collagen IV	ATTTCCAGGCGTGTTCATTGC	AGCTCTCTCCTTTCTGACCTT	NM_009931.2
<i>Hprt</i>	Hprt	TCAGTCAACGGGGGACATAA	TGCTTAACCAGGGAAAGCAAA	NM_013556.2

Supplementary Table 3. Human primers used for analysis of IR-A and IR-B isoforms by PCR visualized on gel electrophoresis.

Gene	Protein	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Accession Number
<i>INSR</i>	IR-A/IR-B	ACTCTCAGATCCTGAAGGAG	GACTCCTTGTTCCACCAC	NM_001079817.2 NM_000208.3

Supplementary Table 4. Primary antibodies used for immunodetection.

Name	Species	Manufacturer	Reference	Dilution	Antigen unmasking
α -SMA	M	Dako	M851	1:300 (IHC)	NONE
pAKT	R	Cell Signaling	#4060	1/1000 (WB)	
AKT	R	Cell Signaling	#4691	1/1000 (WB)	
β -catenin	M	BD Transduction Lab	610154	1/1000 (WB)	
β -catenin	R	Cell Signaling	#9562	1:500 (IF)	
E-cadherin	M	Abcam	ab1416	1:5000 (WB) / 1:250 (IF)	
pEGFR	R	Cell Signaling	#3777	1:500 (WB)	
EGFR	R	Santa Cruz	sc-03	1:500 (WB)	
pErbB2	R	Cell Signaling	#2243	1:500 (WB)	
ErbB2	R	Cell Signaling	#2165	1:500 (WB)	
pErbB3	R	Cell Signaling	#4791	1:500 (WB)	
ErbB3	R	Cell Signaling	#4754	1:500 (WB)	
pErbB4	R	Abcam	ab61059	1:500 (WB)	
ErbB4	R	Santa Cruz	sc-283	1:500 (WB)	
pERK	M	Santa Cruz	sc-7383	1:250 (WB)	
ERK 1	R	Santa Cruz	sc-93	1:500 (WB)	
GAPDH	M	Santa Cruz	sc-32233	1:5000 (WB)	
IGF2	R	Abcam	Ab9574	1:1000 (WB) / 1:100 (IHC)	Citrate pH6
IGF1R	R	Cell Signaling	#3027	1:500 (WB) / 1:50 (IHC) / (IP)	EDTA pH9
pIR/IGF1R	R	Cell Signaling	#3024	1:500 (WB)	
IR	R	Cell Signaling	#3025	1:1000 (WB)	
IR	R	Santa Cruz	sc-711	(IP)	
SLUG	R	Cell Signaling	#9585	1:500 (WB)	
SNAIL	R	Cell Signaling	#3879	1:250 (WB)	
ZEB1	R	Santa Cruz	Sc-25388	1:500 (WB)	

M, mouse; R, rabbit; WB, western blot; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; IP, immunoprecipitation.

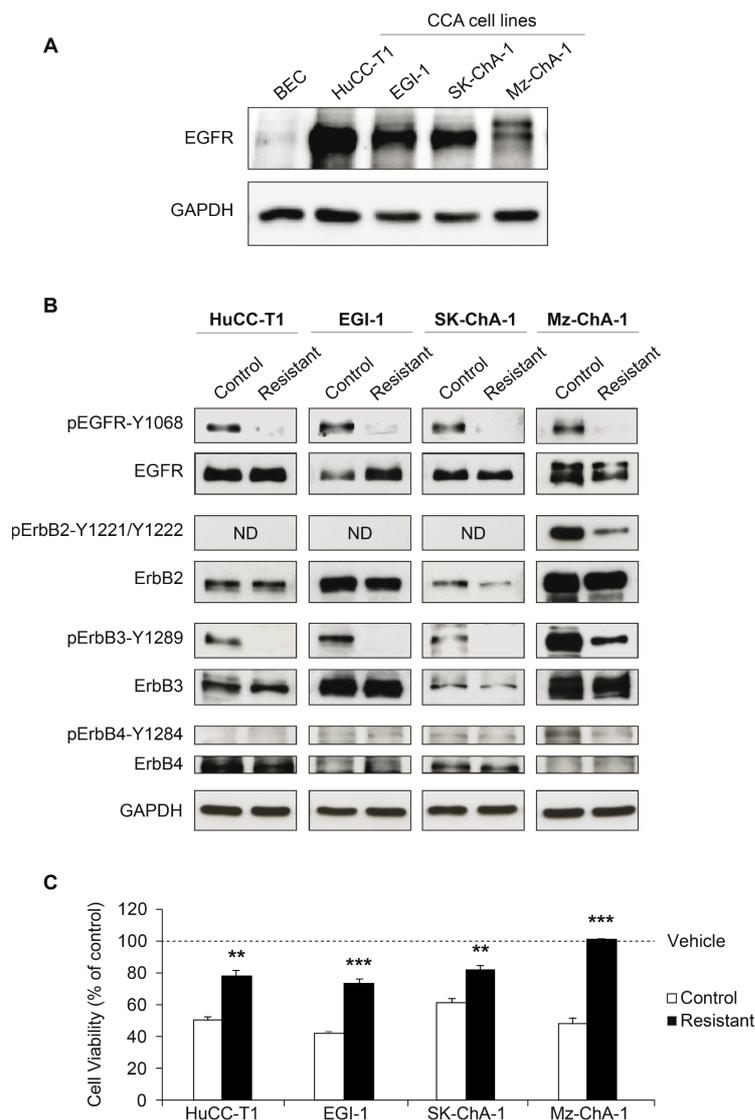
Supplementary Table 5. Clinical and pathological characteristics of patients with CCA (n=10)

Age (years)	
Mean (\pm SD)	67.5 (\pm 3.9)
Sex ratio (M/F)	1 (5/5)
Tumor size (mm)	
Mean (\pm SD)	(75.5 \pm 16)
Tumor grade	
Well differentiated	3 (30%)
Moderately differentiated	6 (60%)
Poorly differentiated	1 (10%)
pTNM (7 th edition)	
T1	3 (30%)
T2a	1 (10%)
T2b	6 (60%)
Vascular invasion	6 (60%)
Perineural invasion	2 (20%)
Lymph node metastasis	1 (10%)

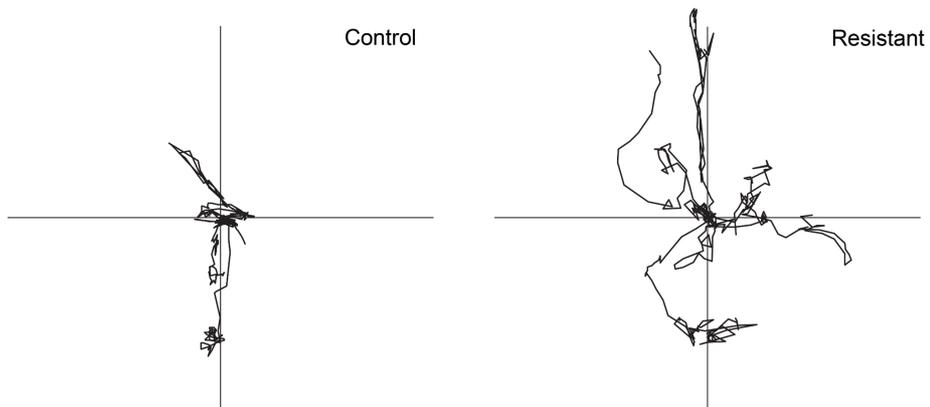
Supplementary Table 6. Cancer stem cell-associated gene sets significantly enriched in the gene profiles of erlotinib-resistant cell lines.

A) Gene sets significantly enriched in HuCC-T1 resistant cells (p<0.05)			
Name	Size	ES	NES
PARK_HSC_VS_MULTIPOTENT_PROGENITORS_UP	18	0.55	1.25
PARK_HSC_AND_MULTIPOTENT_PROGENITORS	47	0.46	1.24
KORKOLA_EMBRYONAL_CARCINOMA_UP	39	0.60	1.11
PECE_MAMMARY_STEM_CELL_UP	139	0.37	1.10
B) Gene sets significantly enriched in EGI-1 resistant cells (p<0.05)			
Name	Size	ES	NES
GUENTHER_GROWTH_SPHERICAL_VS_ADHERENT_UP	21	0.53	1.63
C) Gene sets significantly enriched in SK-ChA-1 resistant cells (p<0.05)			
Name	Size	ES	NES
YAMASHITA_LIVER_CANCER_STEM_CELL_UP	47	0.56	1.27
ENGELMANN_CANCER_PROGENITORS_UP	47	0.73	1.23
CAIRO_HEPATOBLASTOMA_UP	198	0.49	1.22
LIM_MAMMARY_STEM_CELL_UP	483	0.40	1.16
D) Gene sets significantly enriched in Mz-ChA-1 resistant cells (p<0.05)			
Name	Size	ES	NES
WONG_EMBRYONIC_STEM_CELL_CORE	327	0.62	1.37
EPPERT_PROGENITOR	133	0.64	1.37
BHATTACHARYA_EMBRYONIC_STEM_CELL	86	0.56	1.33
ZHANG_BREAST_CANCER_PROGENITORS_UP	414	0.57	1.32
IVANOVA_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL_SHORT_TERM	32	0.57	1.31
BENPORATH_ES_CORE_NINE_CORRELATED	99	0.45	1.19

Size: number of genes in the gene set; ES: Enrichment Score; NES: Normalized Enrichment Score (as defined by GSEA).



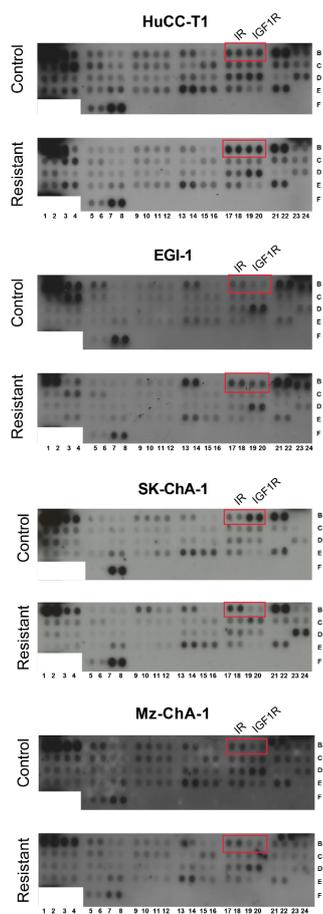
Supplementary Figure S1. Resistant CCA cells to EGFR inhibition display a down-regulation of activated EGFR and a lower sensitivity to erlotinib. (A) Representative images of western blot analysis of EGFR in human CCA cell lines and non-malignant biliary epithelial cells (BEC). (B) Representative images of western blot analysis of EGFR, ErbB2, ErbB3 and ErbB4 total expression and phosphorylation state in control and resistant CCA cells. (C) Effect of erlotinib on the viability of control and resistant CCA cells. Cell viability was measured after 72h of incubation with erlotinib (i.e. 20 μ M for HuCC-T1 and EGI-1, and 5 μ M for SK-ChA-1 and Mz-ChA-1). Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; comparing resistant with control cells. ND, not detected.



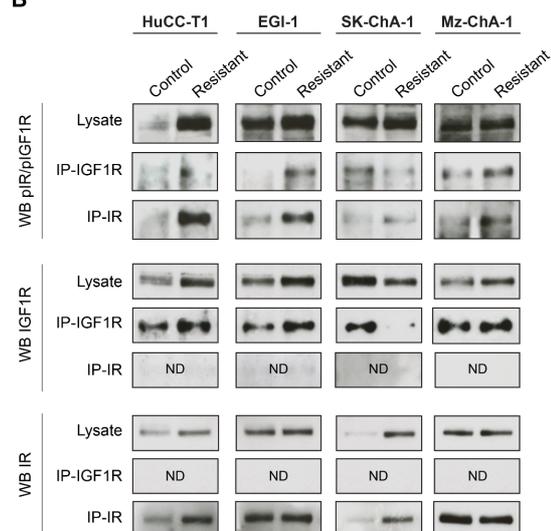
Supplementary Figure S2. EGI-1 cells resistant to EGFR inhibition display increased migratory properties. Cell tracking analyzed by time-lapse microscopy during a 24-h long time-lapse experiment. Tracks of 5 representative cells for each condition are shown.

A

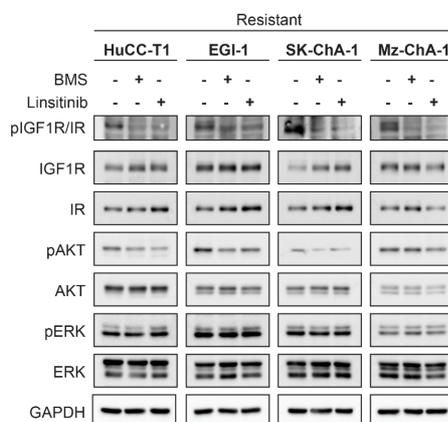
Coordinate	Receptor Family	RTK/Control
A1, A2	Reference Spots	—
A23, A24	Reference Spots	—
B1, B2	EGF R	EGF R
B3, B4	EGF R	ErbB2
B5, B6	EGF R	ErbB3
B7, B8	EGF R	ErbB4
B9, B10	FGF R	FGF R1
B11, B12	FGF R	FGF R2a
B13, B14	FGF R	FGF R3
B15, B16	FGF R	FGF R4
B17, B18	Insulin R	Insulin R
B19, B20	Insulin R	IGF-1 R
B21, B22	Axl	Axl
B23, B24	Axl	Dlx
C1, C2	Axl	Mer
C3, C4	HGF R	HGF R
C5, C6	HGF R	MSP R
C7, C8	PDGF R	PDGF R α
C9, C10	PDGF R	PDGF R β
C11, C12	PDGF R	SCF R
C13, C14	PDGF R	FH-3
C15, C16	PDGF R	M-CSF R
C17, C18	RET	c-RET
C19, C20	ROR	ROR1
C21, C22	ROR	ROR2
C23, C24	Tie	Tie-1
D1, D2	Tie	Tie-2
D3, D4	NGF R	TrkA
D5, D6	NGF R	TrkB
D7, D8	NGF R	TrkC
D9, D10	VEGF R	VEGF R1
D11, D12	VEGF R	VEGF R2
D13, D14	VEGF R	VEGF R3
D15, D16	MuSK	MuSK
D17, D18	Eph R	EphA1
D19, D20	Eph R	EphA2
D21, D22	Eph R	EphA3
D23, D24	Eph R	EphA4
E1, E2	Eph R	EphA6
E3, E4	Eph R	EphA7
E5, E6	Eph R	EphB1
E7, E8	Eph R	EphB2
E9, E10	Eph R	EphB4
E11, E12	Eph R	EphB6
E13, E14	Insulin R	ALK
E15, E16	—	DOR1
E17, E18	—	DOR2
E19, E20	Eph R	EphA5
E21, E22	Eph R	EphA10
F1, F2	Reference Spots	—
F5, F6	Eph R	EphB3
F7, F8	—	RYK



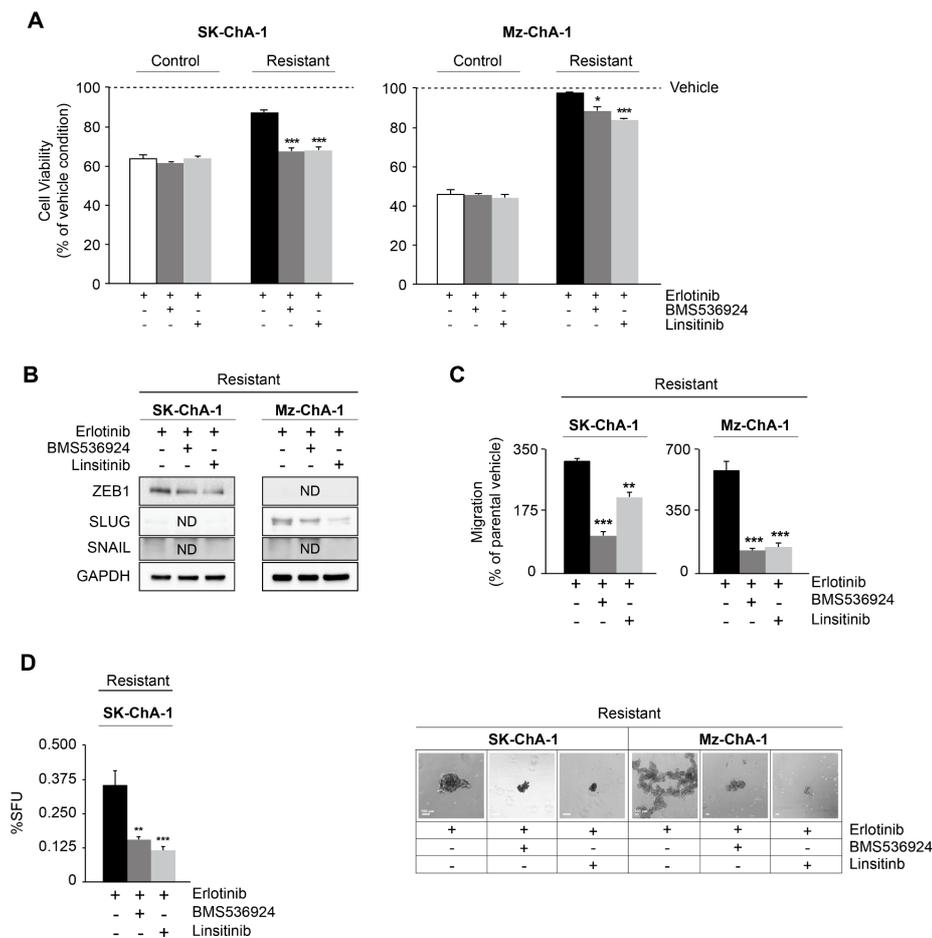
B



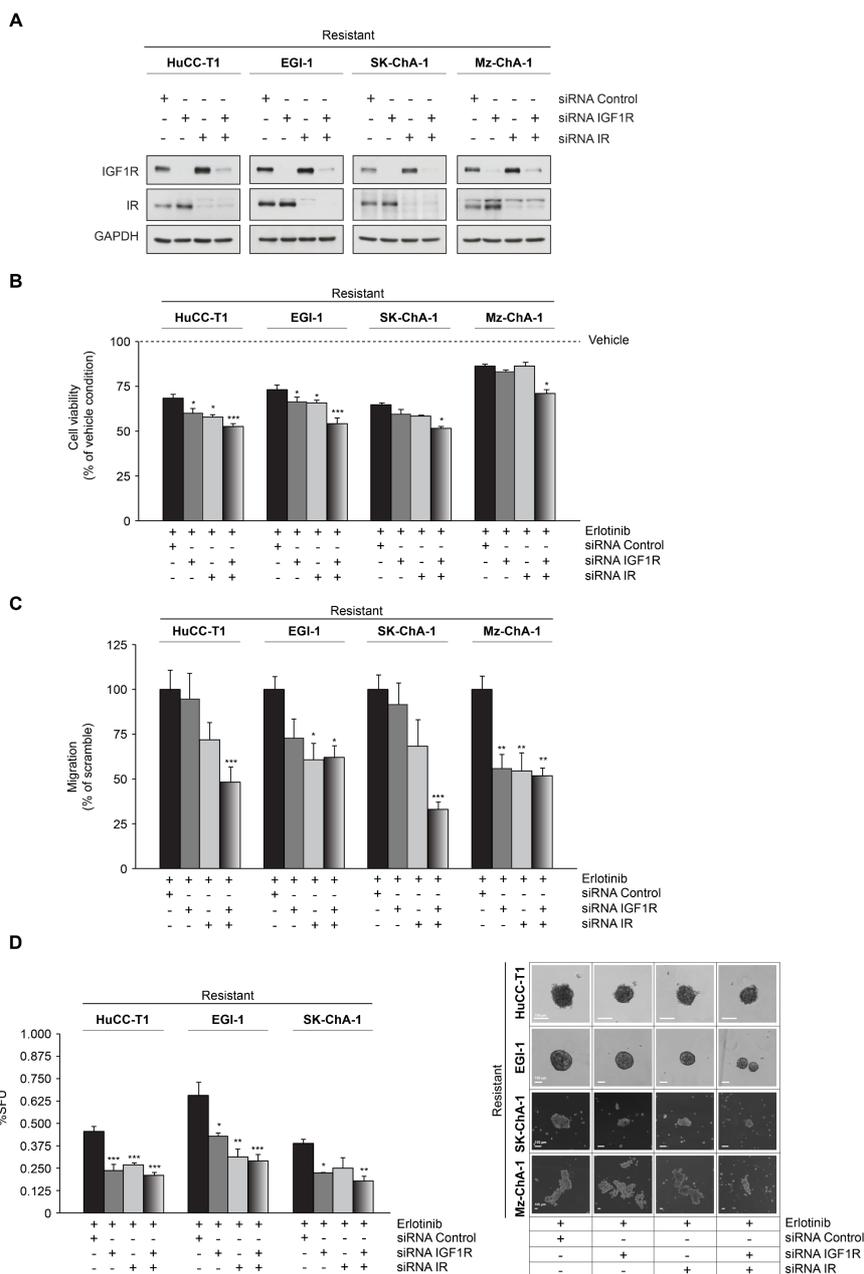
C



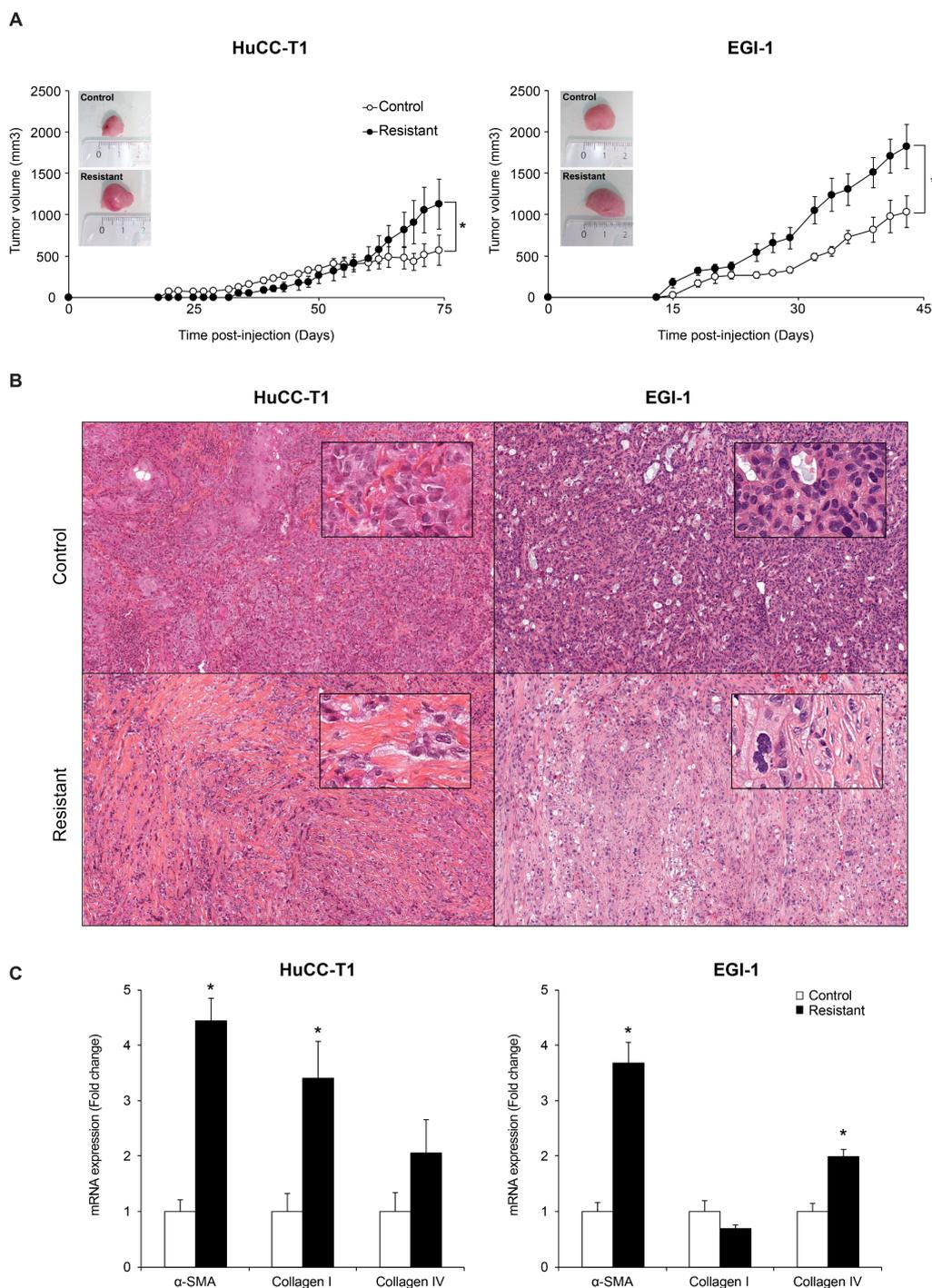
Supplementary Figure S3. IGF2/IR/IGF1R axis is an escape route upregulated in CCA cells resistant to EGFR inhibition. (A-B) Representative images of human phospho-RTK array (A) and western blot (B) analysis of IR and IGF1R total expression and phosphorylation state. Western blots were carried out with proteins extracted from total lysate (Lysate) or after immunoprecipitation of IGF1R (IP-IGF1R) or IR (IP-IR). (C) Representative images of western blot analysis of IR, IGF1R, AKT and ERK total expression and phosphorylation state in resistant cells treated with IR/IGF1R inhibitors, BMS536924 or linsitinib. ND, not detected.



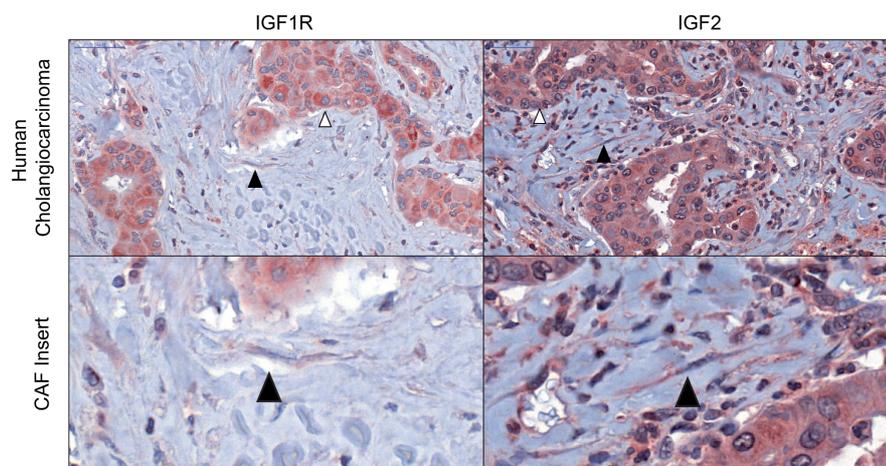
Supplementary Figure S4. IR/IGF1R blockage regulates viability and cell plasticity of cholangiocarcinoma cells resistant to EGFR inhibition. (A) Effect of erlotinib on the viability of control and resistant CCA cells. Cell viability was measured after incubation of the cells with the indicated treatments for 72h. The dotted line (vehicle) indicates the viability of the cells cultured in absence of erlotinib. (B) Representative images of western blot analysis of the EMT-TF expressed by CCA cells after 48 h under the indicated treatment. (C) Cell migration towards a chemoattractant (serum) was measured by transwell chamber assay. (D) Sphere formation assay after seven days under the indicated treatment. Right panels show representative pictures of the largest spheres found for resistant cells under each treatment Scale 100 μ m. In all cases, the concentrations of TKI were 5 μ M erlotinib, 2.5 μ M BMS536924 and 10 μ M linsitinib for SK-ChA-1; and 5 μ M erlotinib, 2.5 μ M BMS536924 and 20 μ M linsitinib for Mz-ChA-1. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 cultures. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; comparing cells treated with BMS-536924 or linsitinib with untreated cells. ND, not detected.



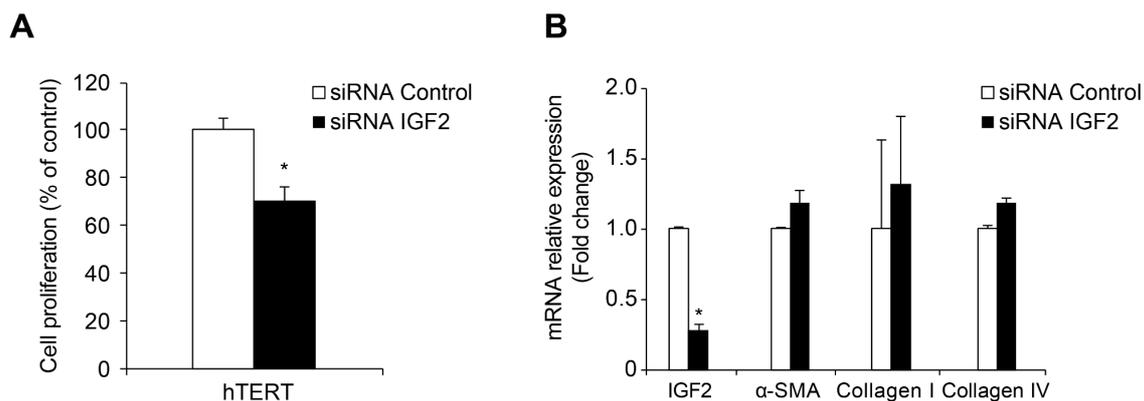
Supplementary Figure S5. IR/IGF1R downregulation regulates viability and cell plasticity of cholangiocarcinoma cells resistant to EGFR inhibition. (A) Representative images of western blot analysis of IGF1R and IR expression 72 h after transfection with a control siRNA or siRNAs against IGF1R, IR or a combination of both. (B) Effect of erlotinib on the viability of control and resistant CCA cells. Cells were transfected and 24 h later they were plated. 24 h later erlotinib was added to the plates and cells were incubated for another 72 h before viability was measured. The dotted line (vehicle) indicates the viability of the cells cultured in absence of erlotinib. (C) Cell migration towards a chemoattractant (serum) was measured by transwell chamber assay. Cells were transfected and 24 h later they were plated on chamber inserts and incubated with erlotinib. (D) Sphere formation assay. Cells were transfected and 24 h later they were plated and incubated during seven days with erlotinib. Right panels show representative pictures of the largest spheres found for resistant cells under each siRNA condition. Scale 100 μ m. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 cultures. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; comparing cells transfected with siRNA against IGF1R, IR, and the combination of both, with cells transfected with control siRNA.



Supplementary Figure S6. Cholangiocarcinoma cells resistant to EGFR inhibition show increased tumorigenic potential and higher tumor stroma content. (A) Tumor volume of mice bearing control (white) or resistant (black) HuCC-T1 (left panel) and EGI-1 (right panel) cells. (B) Representative HE staining in control and resistant HuCC-T1 and EGI-1 xenograft tumors. Magnification x5 and x40 (inserts). (C) Changes in mRNA expression of mouse α -SMA, collagen I and collagen IV in control and resistant tumors analyzed by RT-QPCR. Values are expressed as means \pm SEM. *, $p < 0.05$; comparing resistant with control tumors ($n=5$).



Supplementary Figure S7. Tumor cells and CAFs express IGF2 and IGF1R in human intrahepatic CCA. Representative IHC staining of IGF2 and IGF1R in human CCA. White and black arrowheads indicate tumor cells and CAFs, respectively. Magnification x5 (upper panel) and x40 (lower panel).



Supplementary Figure S8. IGF2/IR/IGF1R signaling regulates proliferation of hepatic myofibroblasts. (A) Impact of IGF2 downregulation by siRNA on the proliferation of hTERT-HSC cells. Cells were transfected and 24 h later they were plated and incubated for 72 h before measuring the proliferation. (B) mRNA expression analysis by RT-QPCR of IGF2, α -SMA, collagens I and IV in hTERT-HSC cells transfected with a control siRNA (white bars) or a siRNA against IGF2 (black bars). Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures. *, $p < 0.05$; comparing IGF2 siRNA with control siRNA transfected cells.

3.2 Editorial: Unveiling resistance mechanisms to EGFR inhibitors in cholangiocarcinoma

Editorial publié dans Oncotarget

Après la publication de l'article 1, un éditorial a été rédigé traitant des mécanismes de résistance aux inhibiteurs d'EGFR dans le cholangiocarcinome.

Unveiling resistance mechanisms to EGFR inhibitors in cholangiocarcinoma

Javier Vaquero, Cindy Lobe and Laura Fouassier

Cholangiocarcinoma (CCA) is a very aggressive cancer of the biliary tract. The only curative treatment currently offered to CCA patients is the surgical resection, which is limited to a minority of them (~35 %) [1]. For patients diagnosed at late stages with inoperable CCA, the sole validated chemotherapy is based on gemcitabine and platinum salt regimen [2]. After this first-line of treatment, there are no other approved therapies for CCA treatment. Although knowledge on signaling pathways involved in CCA progression has significantly advanced allowing the discovery of actionable targets, there are still no approved targeted therapies for CCA treatment. Failure in using targeted therapies in CCA cure is partly explained by the high therapeutic resistance of biliary tumors, which molecular mechanisms remain fragmented [3].

Among signaling pathways, numerous studies including ours have highlighted a role of tyrosine kinase receptor EGFR (epidermal growth factor receptor or HER1) and its related members HER2, 3 and 4 in CCA progression [4]. Although preclinical studies have demonstrated a potential inhibitory effect of anti-EGFR drugs on CCA growth, none of these drugs, comprising either small molecules (erlotinib, gefitinib) or monoclonal antibodies (cetuximab, panitumumab), have shown a real benefit once tested in patients with advanced CCA, questioning the use of anti-EGFR in the treatment of CCA. Despite the disappointing results, drugs targeting EGFR are still being tested in clinical trials in patients with advanced biliary tract cancer without knowing the cause of anti-EGFR ineffectiveness.

Resistance mechanisms to anti-EGFR have been extensively studied in other cancers and several tracks have been proposed to explain the therapeutic failure of anti-EGFR. The most frequent mechanism of primary resistance is the presence of mutations in EGFR downstream pathway genes such as *KRAS*, which are common in CCA (22 to 42%) depending on tumor localization. Although not formally demonstrated, *KRAS* mutations do not appear to be involved in the lack of response to anti-EGFR [5]. In another study where only CCA patients without *KRAS* mutation were selected, anti-EGFR therapy did not add any benefit in survival to chemotherapy alone [6]. Further studies are now required and preclinical investigations using patient-derived xenograft (PDX) model of CCA bearing *KRAS* mutation could bring a valuable tool to deciphering resistance

mechanisms to targeted therapies [7]. Additionally, mutations in *NRAS*, *BRAF*, *PI3KCA* and even in *EGFR* do not seem to play a role in the inefficiency of anti-EGFR treatment in CCA patients [8].

Activation of alternative signaling pathways in response to treatment is one of the mechanisms involved in resistance to targeted therapies, and in this case, it is named secondary (or acquired) resistance. No study had been conducted so far to understand the mechanisms underlying secondary resistance to anti-EGFR treatment in CCA. Our recent preclinical study helped to clarify this point [9]. In order to mimic *in vitro* long-term treatment of CCA with anti-EGFR, human CCA cell lines were treated with erlotinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor, for several weeks. During treatment, a drastic phenotypic change of the cells was observed, with the acquisition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell properties. Interestingly, the phenotypic switch was confirmed in resistant cells irrespective of their mutational status in EGFR pathway; some had *KRAS* or *BRAF* and none had *EGFR* mutations in the tyrosine kinase domain. As EGFR pathway was well inhibited, an alternative signaling pathway was reported to be upregulated in resistant CCA cells, comprising insulin-like growth factor (IGF) 1 receptor (IGF1R), insulin receptor (IR), and IGF2, a ligand of IGF1R/IR. Then, a direct link was established between the activation of IGF2/IGF1R/IR pathway and EMT and stemness in resistant CCA cells. Using dual tyrosine kinase inhibitor (linsitinib) or siRNA strategy to block IGF1R/IR, we were able to demonstrate that these receptors were at the origin of the phenotype switch of erlotinib-resistant CCA cells.

To go further, *in vivo* investigations were undertaken in nude mice, a mice strain allowing engraftment of human cells and recapitulating the microenvironment of human tumors [10]. Surprisingly, tumors developed from resistant cells had a microenvironment enriched in α -SMA-positive cells, *i.e.* cancer-associated fibroblast (CAF), compared to parental cells, suggesting a potential education of stromal cells (originating from mice) by resistant tumor cells. This aspect of research would deserve to be investigated in a deeper way knowing the importance of microenvironment in tumor progression and therapeutic resistance. Cotreatment of the mice bearing resistant tumors with anti-EGFR and anti-IGF1/IR had not only a drastic inhibitory effect on tumor growth but

also on stroma by decreasing its amount with less collagen deposition and α -SMA-positive cells.

One major feature of CCA is its dense desmoplastic stroma consisting predominantly of CAF. CAF can contribute in several ways to therapeutic resistance. In the case of anti-EGFR resistance in CCA, an expression of IGF2 in CAF was highlighted in erlotinib-resistant tumors. With the non-access of CCA samples from patients treated with anti-EGFR drug, the expression of IGF2 in human was checked and confirmed only in non-treated patients. By producing IGF2, CAF may target IGF1R/IR axis in a paracrine manner supporting resistance to anti-EGFR in CCA. But IGF2 may act also in an autocrine way on CAF because they express IGF1R. Indeed, IGF2 was able to stimulate hepatic myofibroblast proliferation, an effect inhibited by linsitinib [9].

In conclusion, the use of targeted therapies for the treatment of CCA patients remains challenging because of innate and acquired resistance mechanisms. Nevertheless, new generation of EGFR tyrosine kinase inhibitors are currently being tested to bypass this resistance. However, most recent studies have already suggested the emergence of new resistance mechanisms for these last generation of drugs. Therefore, new therapies and combinatory regimens must be developed to improve CCA treatment, a highly chemoresistant tumor. In order to success in this endeavor, it is mandatory to consider not only cancer cells but also stromal cells that have a fundamental role in CCA progression and drug resistance.

Laura Fouassier: Sorbonne Université, INSERM, Saint-Antoine Research Center, Paris, France

Correspondence to: Laura Fouassier,
email laura.fouassier@inserm.fr

Keywords: EGFR; cholangiocarcinoma

Received: November 13, 2018

Published: December 18, 2018

REFERENCES

1. Banales JM, et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016; 13:261-80. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.51>.
2. Valle J, et al. *N Engl J Med.* 2010; 362:1273-81. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908721>.
3. Marin JGG, et al. *Curr Drug Targets.* 2017; 18:889-900. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150223121508>.
4. Pellat A, et al. *Hepatology.* 2017. <https://doi.org/10.1002/hep.29350>.
5. Chen JS, et al. *Ann Oncol.* 2015; 26:943-9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv035>.
6. Vogel A, et al. *Eur J Cancer.* 2018; 92:11-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.12.028>.
7. Cavalloni G, et al. *BMC Cancer.* 2016; 16:90.
8. Peraldo-Neia C, et al. *PLoS One.* 2018; 13:e0191593.
9. Vaquero J, et al. *Clin Cancer Res.* 2018; 24:4282-96. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-17-3725>.
10. Nicolle R, et al. *Cell Rep.* 2017; 21:2458-70.

Copyright: Vaquero et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

3.3 Article 2 : Role of transcription factor ZEB1 in cholangiocarcinoma progression and chemoresistance

Article en préparation

L'objectif de cette étude est d'évaluer les différentes fonctions de ZEB1 dans les cellules de cholangiocarcinome (CCA). Les données cliniques à compléter par la suite, ont révélé une expression de ZEB1 dans les échantillons tumoraux de patients atteints de CCA. Pour les études *in vitro*, différents modèles d'études cellulaires ont été réalisés dans lesquels l'expression de ZEB1 a été soit invalidée soit forcée. Les résultats ont montré l'implication de ZEB1 dans la plasticité cellulaire caractérisée par la mise en place d'un phénotype de transition-épithélio-mésenchymateuse (TEM) et de cellules souches cancéreuses (CSC) dans les cellules exprimant ZEB1 par rapport aux cellules contrôles. Les modèles d'inactivation de ZEB1 ont montré une inhibition de ces processus. Par ailleurs, les analyses de viabilité cellulaire ont permis d'identifier ZEB1 comme un facteur de résistance au traitement anti-EGFR dans les modèles de CCA. Ces données ont été confirmées par des tests de clonogénicité dans les cellules, en présence d'erlotinib, un anti-EGFR. Les modèles d'inactivation de ZEB1 ont montré une sensibilisation des cellules au traitement anti-EGFR.

En conclusion, nous avons démontré que ZEB1 contribuerait à la plasticité cellulaire et à la chimiorésistance des cellules de CCA. Cependant les études *in vitro* restent à compléter et les études *in vivo* sont en cours de réalisation.

Pour la rédaction de ma thèse, seules la partie « Matériels et méthodes », les figures et leur légende sont rédigées en anglais. J'ai rédigé le reste en français dans un premier temps, mais la version définitive de l'article sera rédigée en anglais.

Role of transcription factor ZEB1 in cholangiocarcinoma progression and chemoresistance

Cindy Lobe¹, Javier Vaquero (co-first author)^{1, 2, 3}, Ander Arbelaiz¹, Cédric Coulouarn⁵, Marie Vallette¹, Anne Stary¹, Nathalie Guedj⁴, Valérie Paradis⁴, Chantal Housset^{1,7}, Laura Fouassier¹

1 Sorbonne Université, INSERM, Centre de recherche Saint-Antoine (CRSA), UMRS 928, F-75012 Paris, France

2 Fondation ARC, F-Villejuif, France

3 LPP, CNRS, Ecole Polytech., Univ. Paris-Sud, Observatoire de Paris, Univ. Paris-Saclay, Sorbonne Université, PSL Research University, Paris, France.

4 Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Beaujon, F-92110 Clichy, France; INSERM, UMR 1149, Centre de Recherche sur l'Inflammation, F-75018 Paris, France.

5 INSERM, INRA, Univ Rennes 1, Univ Bretagne Loire, Nutrition Metabolisms and Cancer (NuMeCan), F-35033 Rennes, France

7 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, Hepatology Department, Paris, France

Keywords

ZEB1, Cholangiocarcinoma, epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells, resistance

Running title

ZEB1 in human cholangiocarcinoma

Financial Support

LF is supported by grants from Fondation de France (N° 2011 25574 & 2014 47502), La Ligue Nationale contre le Cancer (N°RS14/75-112), GEFLUC (2013) and ANR (ANR17-CE14-0013-01.

CL is recipient of a fellowship from la Ligue Nationale contre le Cancer (N°13014). JV is recipient of the following postdoctoral fellowships from the Spanish Association for the Study

of the Liver (AEEH), the Fondation ARC (N°PDF2014601431) and the LABEX PLAS@PAR (Reference ANR-11-IDEX-0004-02).

Corresponding author

Laura Fouassier, Ph.D.

INSERM Sorbonne Université, UMRS_938

Centre de Recherche Saint-Antoine

27 rue Chaligny

75012 Paris France

+33 6 98 77 40 01

laura.fouassier@inserm.fr

Conflict of interest

The authors declare that they do not have any competing financial interest in relation to the present work.

Acknowledgments

We acknowledge Annie Munier and Romain Morichon from the Flow cytometry-imaging platform UMS_30 LUMIC, Centre de recherche Saint-Antoine (CRSA), and Claire Calmel from CRSA for help in genotyping CCA cells.

INTRODUCTION

Le cholangiocarcinome (CCA) constitue un groupe hétérogène de tumeurs malignes, pouvant émerger en tout point de l'arbre biliaire [13]. Il se caractérise par la transformation oncogénique des cellules épithéliales biliaires, également appelées cholangiocytes. En fonction de leur localisation anatomique, on distingue les CCA intrahépatique (CCAi), péri-hilaire (CCAp) et distal (CCAd), qui présentent des similitudes particulières, mais également des différences importantes inter et intra-tumorales pouvant affecter la pathogenèse et le devenir de la maladie [13, 19]. Indépendamment de sa localisation, le CCA représente le 2ème cancer primitif du foie le plus fréquent et environ 3% des néoplasies gastro-intestinales ; son incidence globale et sa mortalité semblent augmenter [13]. Le CCA étant généralement asymptomatique à ses premiers stades de développement, il est souvent diagnostiqué à des stades tardifs avec la présence de métastases. Ce caractère agressif de la tumeur compromet la seule option thérapeutique efficace à ce jour, l'ablation chirurgicale mais qui n'est réalisable que dans 25% des cas [9, 13]. Les patients non admissibles à la chirurgie sont traités en première ligne par des chimiothérapies palliatives, associant la gemcitabine à l'oxaliplatine (GEMOX) [9]. En raison de la chimiorésistance élevée de ce cancer, il n'existe pas de traitement de seconde ligne approuvé en cas de propagation de la tumeur, malgré des essais cliniques prometteurs. C'est pourquoi il est nécessaire à l'heure actuelle d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients.

ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding homeobox 1) est un facteur de transcription qui appartient à une famille de deux membres, ZEB1 et ZEB2. ZEB1 est un régulateur clé de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), de la progression tumorale et de la résistance au traitement [331]. La TEM est un processus biologique caractérisé par des modifications moléculaires et morphologiques distinctes au cours desquelles les cellules épithéliales perdent leur polarité apico-basale et leur adhésion intercellulaire, afin d'acquérir une plasticité et des capacités migratoires et invasives accrues [212, 332]. Au cours de ce programme, l'expression des marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine est induite tandis que celle des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine, essentielle à l'intégrité structurelle de l'épithélium est réprimée, perturbant ainsi l'architecture globale des tissus. De nombreuses études ont décrit la TEM comme un mécanisme souvent activé lors de l'invasion tumorale et la dissémination métastatique [212, 332]. ZEB1 est un facteur inducteur de la TEM et est capable de se fixer sur l'ADN de ses gènes cibles, tels que la E-cadhérine au niveau

d'éléments de réponses appelés E-box (5'-CANNTG-3') afin de réprimer ou d'induire leur expression [246]. Outre son rôle inducteur de la TEM, ZEB1 réprime également l'expression de certains microARN (miRs), y compris la famille miR-200, qui fonctionnent comme de puissants inducteurs de la différenciation épithéliale et également comme des inhibiteurs des propriétés des cellules souches [219, 286]. L'expression aberrante de ZEB1 dans de nombreux cancers est associée à l'agressivité de la maladie, la formation de métastases et à la résistance aux traitements. Ce dernier aspect a été notamment mis en évidence dans nos précédents travaux, dans lesquels nous avons montré que les cellules de CCA résistantes à l'erlotinib, un anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), présentaient des signes d'activation de la TEM, accompagnés d'une forte induction de ZEB1 [189]. A ce jour, il n'existe pas d'études dans la littérature ayant évalué le rôle direct de ZEB1 dans la physiopathologie du CCA, ce qui nous a conduit à étudier son rôle dans le CCA, en particulier dans les cellules tumorales. Une étude récente réalisée dans le CCAi a mis en évidence une corrélation étroite entre l'expression de la protéine ZEB1, la progression tumorale et un mauvais pronostic chez les patients, sans que les mécanismes sous-jacents ne soient connus [223].

Dans cette étude, nous avons évalué les différentes fonctions de ZEB1 dans les cellules de CCA, afin de mieux comprendre par les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la progression et la chimiorésistance du CCA.

MATERIELS ET METHODES

Reagents

Erlotinib was purchased from LC Laboratories.

Cell culture

SK-ChA-1 cells, derived from extrahepatic biliary tract, were obtained from Dr. A. Knuth (Zurich University, Switzerland) and HuCCT1 cells, derived from intrahepatic biliary tract, were kindly provided by Dr. G. Gores (Mayo Clinic, MN). Cells were cultured in DMEM supplemented with 1 g/L glucose, 10 mmol/L HEPES, 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (100 UI/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) and antimycotic (0.25 µg/mL amphotericin B) (Invitrogen). HuCCT1 cells resistant to erlotinib (HuCCT1R) were generated through a process of slowly escalating exposure to erlotinib (from 1 to 20 µmol/L). Resistant cells were maintained in culture in the presence of the last well-tolerated concentration of erlotinib, 20mmol/L. CCA Cell lines were routinely screened for the presence of myco-plasma and authenticated for polymorphic markers to prevent cross-contamination.

Lentiviral and retroviral infection

In order to obtain a stable inhibition of ZEB1 in SK-ChA-1 and HuCCT1R cells, we opted for a transduction technique with a ΔU3 SIN lentivirus. Plasmids containing either a shRNA-ZEB1 sequence targeting ZEB1 or a shRNA-scramble sequence (control) designed by Genecopoeia™ (Maryland,USA). To overexpress ZEB1 in HuCCT1 cells, we opted for a retroviral transduction technique with a retrovirus generated from plasmids containing either a murine ZEB1 sequence (mZEB1) or a scramble sequence (control), generously donated by Dr Julie Caramel. To evaluate transduction, the vectors contained a mCherry sequence for detecting positive cells. Each plasmid also included a puromycin resistance gene to select positive cells. All the lentiviruses and the retroviruses were produced by the Viral and Gene Transfer Vectors Platform of Necker (Paris, France) according to the regulations. The cell transduction was carried out with level 2 precautions according to biosafety regulation standard ISO 15190:2003. Cells were treated with puromycin for 72h hours to eliminate non-infected cells. Then clones were generated by limited dilutions.

Viability assays

Cells were plated in 24-well plates for SK-ChA-1 cells and in 96-well plates for HuCCT1 cells. 24 h later cells were treated with or without erlotinib at 5, 10 or 20 $\mu\text{mol/L}$ and DMSO was used as vehicle. Cells were then incubated for 72 h before determining the viability by staining the cell with crystal violet. Absorbance was quantified with a spectrophotometer (Infinite 200 PRO, TECAN) at 595 nm.

RNA and reverse transcription-PCR

Total RNA extraction and RT-QPCR was performed as previously described [59]. Primer sequences are provided in Supplementary Tables 1. Gene expression was normalized to GAPDH mRNA content and was expressed relatively to the control condition of each experiment. The relative quantity of each target gene was determined from replicate samples using the formula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Western blot analysis

For obtaining whole-cell lysates, cell cultures were lysed in RIPA buffer supplemented with 1 mM orthovanadate and a cocktail of protease inhibitors and subjected to centrifugation for 15 min at 4 °C at 13,000xg. Proteins were quantified using a BCA kit (Pierce). Western blot analysis was performed as previously described [59]. The blots were blocked with Tris-buffered saline, 0.1% Tween-20 containing 5% bovine serum albumin, and incubated with primary antibodies (Supplementary Table 2) overnight at 4 °C and with secondary horseradish peroxidase-linked antibody (1:2000; Cell Signaling) for 1 h at room temperature. Signals were revealed by chemiluminescence and quantified using a ChemiDoc bioimaging system (Bio-rad) with the Image Lab software (Bio-rad).

Immunofluorescence

Immunofluorescence stainings were performed as previously described [59]. Briefly, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized in 0.1% Surfact-Amps X100 (Thermo Scientific) for 10 min and blocked with 1% albumin and 10% goat serum for 1 h at room temperature. The cells were incubated overnight with the appropriate antibodies (Supplementary Table 2) and then for 1 h at room temperature with secondary fluorescent antibodies (Invitrogen). Finally, to label nuclei, cells were counterstained with DAPI (Invitrogen) for 10 min during the final wash before mounting (Vectashield mounting medium,

Vector Laboratories). Cells were observed with an epifluorescence or an SP2 confocal microscope (Leica). The scaling range was adjusted manually allowing identical settings for each image.

Time-lapse microscopy

Cell motility was evaluated by time-lapse microscopy. Cells were plated in 24-well plates (TPP) and cultured for 24h. Then, images were collected every 20 min for 24h with an Olympus Bx 61 microscope (Olympus). During the entire experiment, cells were kept at 37°C under 5% CO₂. Cell trajectories were traced using the center of the nucleus as a reference point and were used to calculate the mean speed of the cells with ImageJ software (National Institute of mental Health Image).

Flow cytometry analysis

For the determination of CD44/CD24 phenotype, cells were washed with PBS, detached with trypsin and re-suspended in PBS supplemented with 0.5% BSA. Combinations of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies against human CD44 (FITC) and CD24 (APC) were obtained from Beckman Coulter. Specific antibodies or the respective isotype controls were added to the cell suspension, as recommended by the manufacturer, and incubated at 4°C for 20 min. Cells were washed with PBS containing 0.5% BSA, centrifuged two times and re-suspended in PBS with 2% paraformaldehyde. The labeled cells were analyzed with a Gallios flow cytometer (Beckman-Coulter). Data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter).

Sphere formation assay

Cells were seeded in a 6-well ultra-low attachment plate (Greiner Bio One) in serum-free DMEM/F12 medium, supplemented with 100 mg/mL gentamycin (Sigma-Aldrich), B27 (Life Technologies), 20 ng/mL human epidermal growth factor (EGF, Life Technologies), 20 ng/mL human basic fibroblast growth factor (bFGF, Life Technologies) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Life Technologies) at a density of 4×10^4 cells/well. Fresh sphere medium was added to plates after four days. After seven days, spheres were counted on EVOS™ FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Results are expressed as a percentage of control from the total number of spheres counted.

Colony formation Assay

Cells were seeded at 500 cells/well in a 6-well plates in duplicates, then cultured at 37°C for 10 days in presence or not of erlotinib 5 $\mu\text{mol/L}$. Colonies were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with 1% crystal violet and counted, knowing that a colony is defined as a cluster of at least 50 cells.

Statistical analysis

Results were statistically analyzed using the GraphPad Prism 5.0 statistical software. Data are shown as means \pm standard error of the mean (SEM). For comparisons between two groups, parametric t-Student test or non-parametric Mann-Whitney test were used.

RESULTATS

Expression de ZEB1 dans les échantillons humains de patients atteints de CCA

Des analyses transcriptomiques réalisées dans un ensemble de 39 patients atteints de CCAi, ont montré qu'une faible expression de ZEB1 était associée à une meilleure survie globale (OS) et une meilleure survie sans maladie (DFS) chez les patients par rapport à ceux qui expriment fortement ZEB1. Cependant ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs (Supplementary Figure 1). Ces données transcriptomiques ont également montré une corrélation inverse entre l'expression de ZEB1 et ses marqueurs épithéliaux cibles, E-cadhérine, ESRP1 (Epithelial splicing regulatory protein 1) et EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) (Supplementary Data 1). En revanche les données n'ont été significatives que pour ESRP1 et EpCAM. Ces résultats restent à compléter pour le marqueur mésenchymateux la vimentine (Supplementary Data 1). Des données chez le même groupe de patients ont montré une corrélation non significative entre l'expression de ZEB1 et celle du marqueur de CSC CD44. Ces résultats sont également à compléter pour le marqueur de CSC, CD24 (Supplementary Data 1). De plus, des travaux d'immunohistochimie nous ont permis de constater que ZEB1 est exprimé dans les cellules de CCA (résultats non montrés) mais les analyses de semi-quantification et de corrélations avec les paramètres clinico-pathologiques sont en cours. Ces données cliniques dépendent de notre collaboration avec le département de Pathologie de Bichat-Beaujon à l'hôpital Beaujon et seront complétées ultérieurement.

Ces résultats cliniques sont à compléter afin de pouvoir conclure, néanmoins l'expression de ZEB1 semble associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCA et à un phénotype mésenchymateux dans les tumeurs.

Profil d'expression de ZEB1 dans les lignées cellulaires de CCA

Nous avons tout d'abord étudié l'expression protéique de ZEB1, de la E-cadhérine et de la vimentine dans huit lignées humaines de CCA. Nous avons constaté que quatre lignées expriment ZEB1 (SK-ChA-1, SG231, CCLP1 et HuH28) contrairement aux quatre autres qui ne l'expriment pas ou très peu (Mz-ChA-1, TFK1, CCLP1 et HuCCT1) (Figure 1A). Nous pouvons également noter que l'expression de ZEB1 dans les cellules est corrélée à l'absence/faible expression du marqueur épithélial, E-cadhérine, et à l'expression du marqueur mésenchymateux, la vimentine (Figure 1A). Ces résultats ont été validés au niveau

transcriptionnel (Supplementary Fig 2) dans lesquels la forte expression génique de ZEB1 dans les lignées est associée à une perte d'expression génique des marqueurs épithéliaux tels que E-cadhérine, EpCAM et ESRP1, et à une augmentation d'expression génique des marqueurs mésenchymateux incluant les autres facteurs inducteurs de la TEM, ZEB2, SNAIL, SLUG, TWIST1 et TWIST2 (Supplementary Fig 2). Il est à noter que l'expression des ARNm de ZEB2, SNAIL et TWIST1 n'est pas détectée dans la lignée SK-ChA-1 et celle de SLUG dans les lignées SG231 et CCLP1. Quant au niveau d'expression des ARNm de TWIST1 et de TWIST2, ils sont détectés seulement dans les lignées SG231 et HuH28, respectivement. Ces résultats soulignent le phénotype mésenchymateux des cellules qui expriment fortement ZEB1.

Afin d'étudier le rôle de ZEB1 dans les cellules de CCA, nous avons développé 3 modèles d'étude cellulaire :

1. La lignée SK-ChA-1 dans laquelle nous avons invalidé l'expression de ZEB1. Dans ce modèle, nous avons comparé les cellules invalidées pour ZEB1 SK-ChA-1 sh-ZEB1 par rapport aux cellules contrôles SK-CHA-1 sh-Ctrl. Il est à noter que nous avons invalidé son expression dans les trois autres lignées de CCA qui l'expriment (SG231, CCLP1 et HuH28). Cependant nous avons choisi la lignée SK-ChA-1 comme modèle car nous avons constaté que parallèlement à l'expression de ZEB1, les trois autres lignées exprimaient d'autres facteurs inducteurs de la TEM, pouvant donner lieu à des phénomènes compensatoires.

2. La lignée HuCCT1 dans laquelle nous avons forcé l'expression de ZEB1. Dans ce modèle, nous avons comparé les cellules qui surexpriment ZEB1 HuCCT1 mZEB1 par rapport aux cellules contrôles HuCCT1 Ctrl. ZEB1 a été également surexprimé dans deux autres lignées qui ne l'expriment pas (Mz-ChA-1, EGI-1) mais l'infection n'a pas fonctionné dans les deux autres lignées. La lignée TFK1 n'a pas été infectée car ces cellules ne forment pas de tumeurs chez les souris immunodéprimées, rendant impossible le développement *in vivo* d'un modèle préclinique pour la poursuite du projet.

3. Nous avons décrit précédemment que la lignée HuCCT1 ayant acquis une résistance à l'erlotinib, appelée HuCCT1R présentait un phénotype mésenchymateux (Figure 1B), associé à une augmentation significative de ZEB1 par rapport aux cellules parentales (Figure 1C) [189]. Afin d'évaluer le rôle de ZEB1 dans la résistance acquise à l'erlotinib, nous avons invalidé son expression dans les cellules HuCCT1R. Dans ce modèle, nous avons comparé les cellules invalidées pour ZEB1 HuCCT1R sh-ZEB1 par rapport aux cellules contrôles HuCCT1R sh-Ctrl.

Après observation des cellules au microscope à contraste de phase, nous avons constaté un changement phénotypique des cellules SK-ChA-1 et HuCCT1R sh-ZEB1 comparé aux cellules contrôles (Figure 1B). Les cellules sh-ZEB1 présentent une morphologie plus compacte et apparaissent moins fibroblastiques que les cellules contrôles. Ces observations sont associées à une diminution significative des niveaux d'expression génique et protéique de ZEB1 dans les cellules SK-ChA-1 et HuCCT1R sh-ZEB1 comparé aux contrôles (Figure 1C). Le phénomène inverse est observé dans les cellules HuCCT1 mZEB1 (Figure 1B). En effet, l'expression ectopique de ZEB1 entraîne une diminution des contacts intercellulaires et une morphologie de type fibroblastique. Ces observations sont corrélées à une augmentation significative des niveaux d'expression génique et protéique de ZEB1 dans les cellules HuCCT1 mZEB1 (Figure 1C)

Ces résultats témoignent de l'efficacité de la stratégie d'inhibition et de surexpression de ZEB1 dans les cellules de CCA, permettant ainsi la validation des modèles d'études.

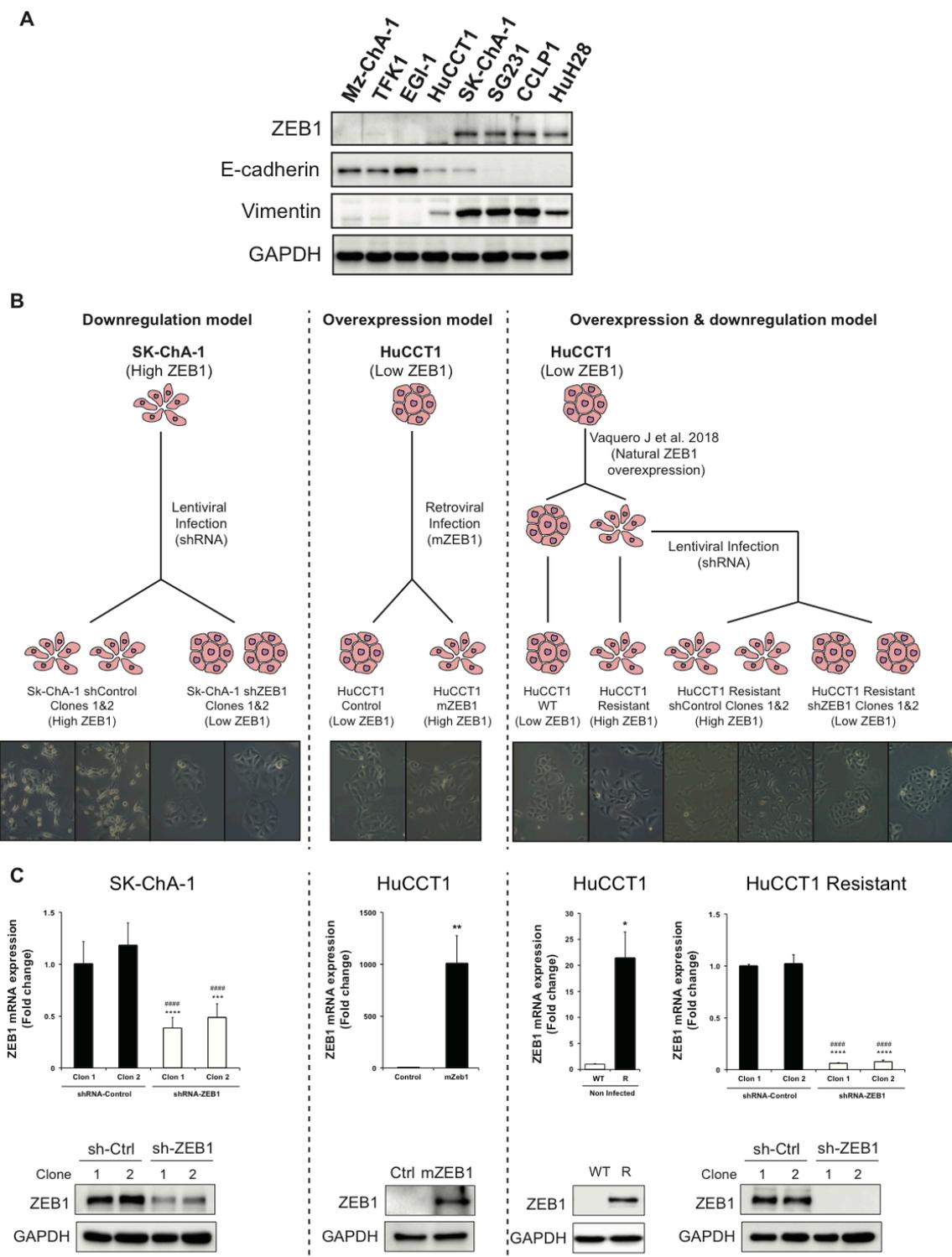


Figure 1: ZEB1 expression in CCA cells and validation of experimental cell models. (A) Representative images of western blot analysis of ZEB1 expressed by different human CCA cell lines. (B) Schematic representation of experimental cell models and representative phase-contrast photographs of CCA cells (x10). (C) ZEB1 expression in all three CCA models analyzed by RT-qPCR and western blot. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 1 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells and with control cells for HuCCT1 cells.

#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$; ####, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 2 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells.

ZEB1 est à l'origine d'un programme de transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules de CCA

Suite aux résultats obtenus précédemment, nous avons voulu caractériser le phénotype de TEM dans les trois modèles d'étude. La TEM se caractérise par la perte des propriétés épithéliales et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux. Pour cela, nous avons analysé l'expression de certains marqueurs épithéliaux, cibles de ZEB1, tels que E-cadhérine, ESRP1 (Epithelial splicing regulatory protein 1), et EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), et l'expression du marqueur mésenchymateux, la vimentine. Dans les cellules invalidées pour ZEB1, nous avons observé une augmentation significative de l'expression génique des marqueurs épithéliaux E-cadhérine, ESRP1 et EpCAM par rapport aux cellules contrôles, que ce soit dans les cellules SK-ChA-1 (Figure 2A) ou HuCCT1R sh-ZEB1 (Figure 2C). Cette augmentation est corrélée à une diminution significative de l'expression des ARNm de la vimentine. Ces résultats ont été validés par western blot et par immunofluorescence dans les cellules SK-ChA-1 (Figure 2A) et HuCCT1R sh-ZEB1 (Figure 2C), dans lesquelles nous avons observé une relocalisation de l'expression de la E-cadhérine à la membrane. Au contraire, lorsque ZEB1 est surexprimé dans les cellules HuCCT1, nous avons constaté une diminution de l'expression des marqueurs E-cadhérine, ESRP1 et EpCAM associée à une augmentation de l'expression de la vimentine et à une perte de l'expression membranaire de la E-cadhérine, comparée aux cellules contrôles (Figure 2B).

Collectivement, ces résultats indiquent que ZEB1 est responsable de la mise en place d'un programme de TEM dans les cellules de CCA.

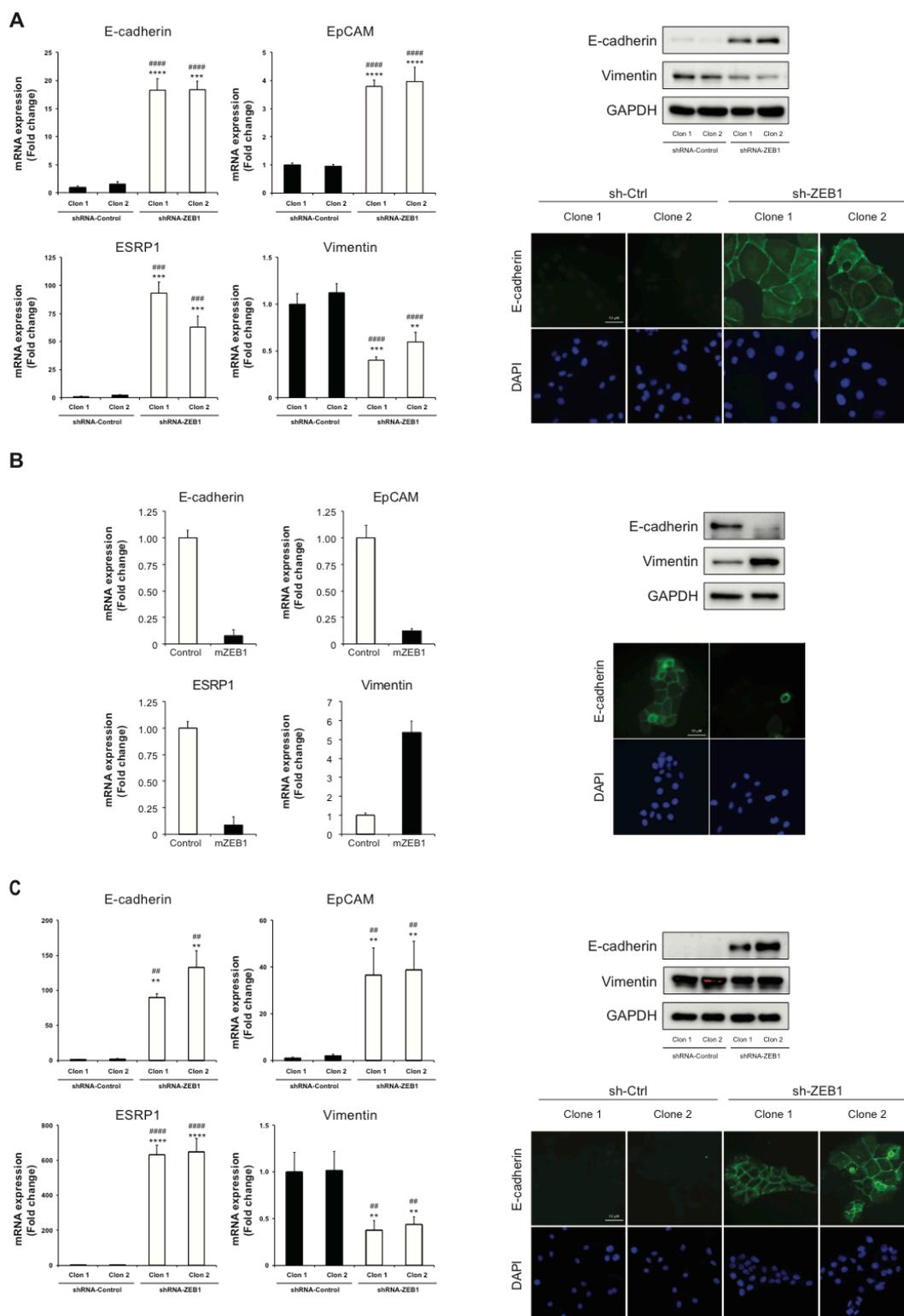


Figure 2 : Role of ZEB1 in EMT markers expression of CCA cells. E-cadherin, EpCAM ESRP1 and vimentin expression analyzed by RT-qPCR (left panels), E-cadherin and vimentin expression analyzed by western blot (right upper panel), and E-cadherin expression analyzed by immunofluorescence with a confocal microscope (right lower panel), in (A) sh-ZEB1 SK-ChA-1 model, (B) mZEB1 HuCCT1 model and (C) sh-ZEB1 HuCCT1R model. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 1 for SK-ChA-1 et HuCCT1R

cells and with control cells for HuCCT1 cells. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$; ####, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 2 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells.

ZEB1 permet aux cellules d'acquérir des propriétés de cellules souches cancéreuses dans les cellules de CCA

D'après la littérature, un lien entre la TEM et l'acquisition d'un phénotype de cellule souche a été décrit. Des études ont montré que les cellules ayant subi la TEM peuvent acquérir des propriétés migratoires et invasives calquées sur les propriétés de CSC [215, 216] et l'expression de ZEB1 a été corrélée à l'acquisition d'un phénotype de CSC dans les cellules tumorales [247]. Afin d'évaluer le rôle de ZEB1 dans l'acquisition d'un phénotype de CSC dans les cellules de CCA, nous avons dans un premier temps identifié la présence ou non d'une population cellulaire ayant des caractéristiques de CSC. Celle-ci est basée sur l'expression des marqueurs de cellules souches CD44 et CD24, pour lesquels la signature moléculaire CD44+/CD24- a été associée à un phénotype de TEM et de CSC [217]. Dans les cellules SK-ChA-1 (Figure 3A) et HuCCT1R (Figure 3C) sh-ZEB1 comparé aux cellules contrôles, nous avons remarqué que l'expression du marqueur CD44 n'est pas modifiée. En revanche, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression du marqueur CD24 dans ces cellules. Les analyses de cytométrie en flux ont permis d'observer une diminution drastique de la population CD44+/CD24- dans les cellules SK-ChA-1 sh-ZEB1 par rapport aux contrôles (Figure 3A). Quant aux cellules HuCCT1R sh-ZEB1, les analyses de cytométrie en flux sont en cours de réalisation. Dans les cellules HuCCT1 mZEB1, nous avons constaté une diminution significative de l'expression de CD24 et pas de variation de l'expression de CD44, comparé aux cellules contrôles (Figure 3B). Ces données ont été validées par cytométrie en flux, dans laquelle nous avons observé une augmentation significative de la population CD44+/CD24- (Figure 3B).

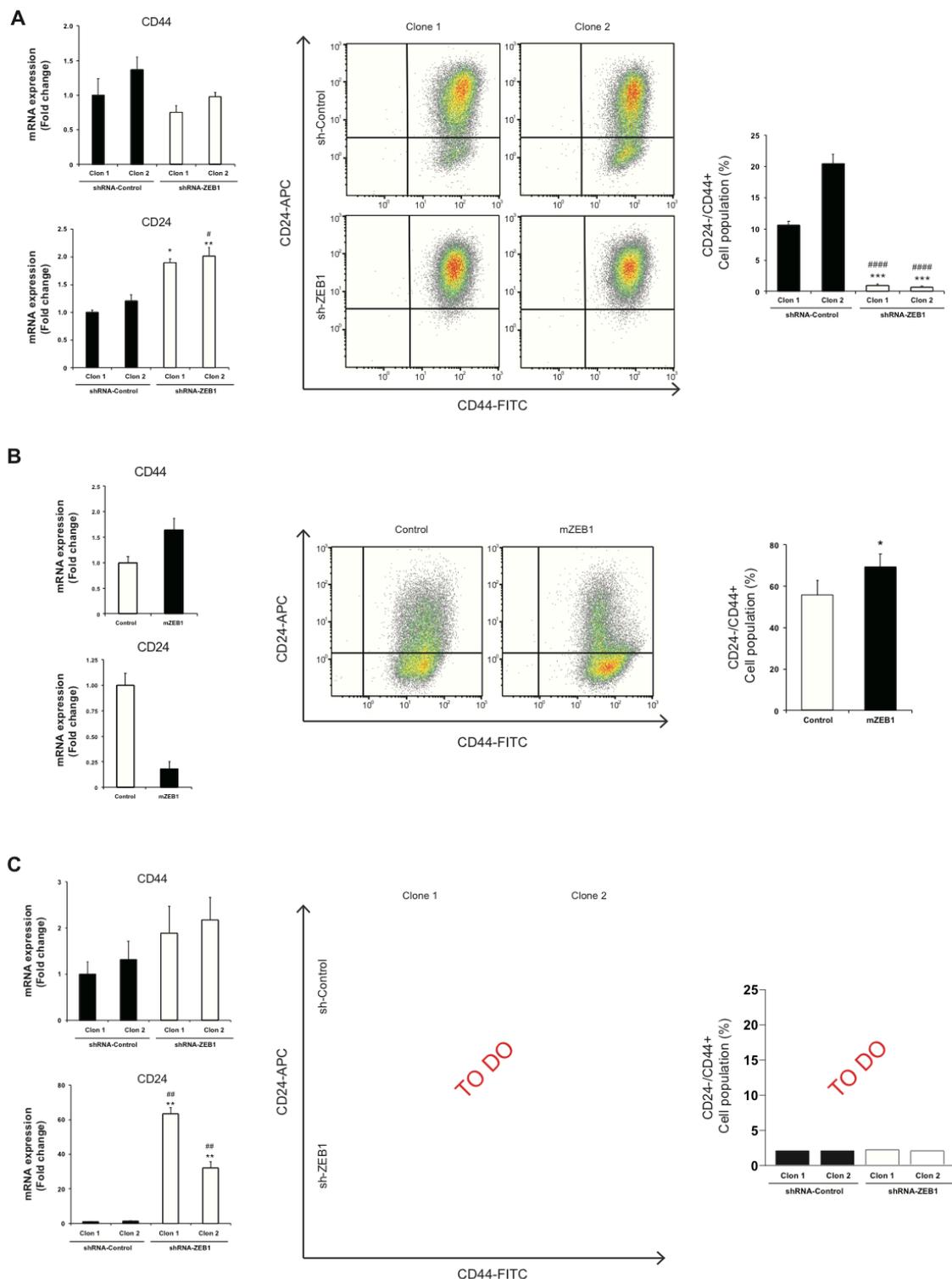


Figure 3 : Role of ZEB1 in stemness features of CCA cells. CD24 and CD44 expression analyzed by RT-qPCR (left panels) and by flow cytometry (middle panel) using APC-conjugated anti-CD24 and FITC-conjugated anti-CD44 antibodies in (A) sh-ZEB1 SK-ChA-1 model, (B) mZEB1 HuCCT1 model and (C) sh-ZEB1 HuCCT1R model. Results were quantified (right panel) and gates were based on the isotype controls. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 1 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells and with control cells for HuCCT1 cells.

#, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$; ####, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 2 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells.

D'autre part, nous avons étudié l'effet de l'inactivation ou de la surexpression de ZEB1 sur les propriétés fonctionnelles des CSC, qui possèdent des capacités migratoires et d'auto-renouveau accrus [333]. A partir des données de vidéomicroscopie, nous avons constaté que les cellules SK-ChA-1 (Figure 4A) et HuCCT1R (Figure 4G) sh-ZEB1 migrent moins comparées aux contrôles tandis que les cellules HuCCT1 mZEB1 migrent plus par rapport aux contrôles (Figure 4D). Nous avons ensuite évalué la capacité des cellules à former des colonies, qui est une caractéristique des cellules souches, par des tests de clonogénicité. Nous avons observé que les cellules SK-ChA-1 (Figure 4B) ou HuCCT1R (Figure 4H) shZEB1 forment significativement moins de colonies que les cellules contrôles tandis que les cellules HuCCT1 mZEB1 en forme plus, de manière significative comparée aux contrôles (Figure 4E). De manière intéressante, la coloration au crystal violet permet de bien visualiser la perte des interactions cellules-cellules dans les cellules avec une forte expression de ZEB1 par rapport aux cellules qui l'expriment peu. Ces résultats ont été validés dans les cellules HuCCT1 mZEB1 en étudiant la capacité d'auto-renouveau des cellules via le test de formation de sphères. En corrélation avec le test de clonogénicité, nous avons constaté que les cellules HuCCT1 mZEB1 forment significativement un plus grand nombre de sphères, qui sont de plus grande taille par rapport aux cellules contrôles (Figure 4F). Cependant, ces expériences d'auto-renouveau dans les cellules SK-ChA-1 n'ont pas été quantifiées (Figure 4C) car nous n'avons pas constaté de différence entre les cellules contrôles et sh-ZEB1 et les agrégats de cellules observés nous laisse supposer que ces cellules ne forment pas de sphères. Ces mêmes expériences sont en cours au laboratoire dans les cellules HuCCT1R. Ces résultats suggèrent que ZEB1 joue un rôle dans l'acquisition d'un phénotype de CSC dans les cellules de CCA qui l'expriment bien que des expériences complémentaires soient nécessaires.

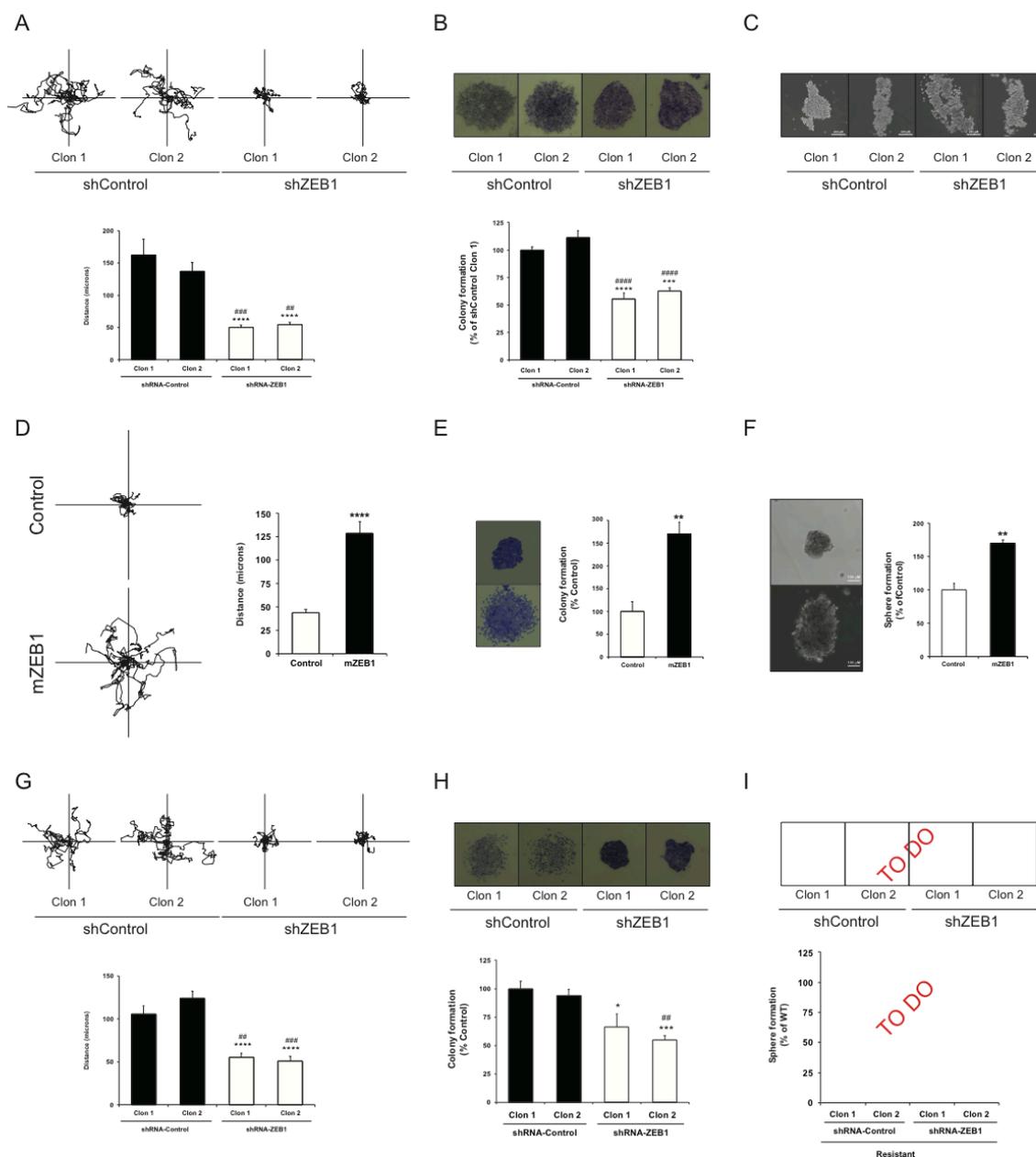


Figure 4 : Role of ZEB1 in stemness functional features of CCA cells. Migratory properties studied by cell tracking, analyzed by time-lapse microscopy during a 24-h long time-lapse experiment in (A) sh-ZEB1 SK-ChA-1 model, (D) mZEB1 HuCCT1 model and (G) sh-ZEB1 HuCCT1R model. Tracks of 5 representative cells for each condition are shown with representative quantification of traveled distance. Colony formation assay after 10 days in culture and representative pictures of colonies formed by (B) sh-ZEB1 SK-ChA-1 model, (E) mZEB1 HuCCT1 model and (F) sh-ZEB1 HuCCT1R model. Sphere formation assay after 7 days in culture and representative pictures of spheres formed by (C) sh-ZEB1 SK-ChA-1 model, (F) mZEB1 HuCCT1 model and (I) sh-ZEB1 HuCCT1R model. Scale, 100 μ m. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 1 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells and with control cells for HuCCT1 cells. #, $P < 0.05$; ###, $P < 0.01$; ####, $P < 0.001$; #####, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 2 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells.

ZEB1 entraîne une chimiorésistance au traitement anti-EGFR dans les cellules de CCA

De nombreuses études ont démontré le rôle de ZEB1 dans la résistance aux traitements anti-EGFR [247, 248, 313]. Nous avons étudié son implication dans la résistance primaire et secondaire (acquise) des cellules de CCA à l'erlotinib, un anti-EGFR. Plusieurs études, dont les nôtres, ont mis en évidence le rôle majeur de EGFR dans la physiopathologie du CCA [59, 115, 116] .

Les expériences de viabilité cellulaire ont montré que l'inactivation de ZEB1 dans les cellules SK-ChA-1 (Figure 5A) et HuCCT1R (Figure 5E) sh-ZEB1 entraîne une sensibilisation des cellules à l'erlotinib par rapport aux cellules contrôles et cela de manière dose-dépendante tandis que la surexpression de ZEB1 dans les cellules HuCCT1 mZEB1 entraîne une résistance à l'erlotinib (Figure 5C). Afin de souligner ces résultats, des expériences supplémentaires de formation de colonies ont montré qu'en présence d'erlotinib, les cellules HuCCT1 mZEB1 (Figure 5D) forment significativement plus de colonies, comparé aux contrôles tandis que les cellules SK-ChA-1 (Figure 5B) et HuCCT1R (Figure 5F) sh-ZEB1 en forment significativement moins par rapport aux contrôles. Ces mêmes expériences sont à compléter dans les cellules SK-ChA-1. Ces données témoignent du rôle de ZEB1 dans la résistance primaire et secondaire à l'erlotinib.

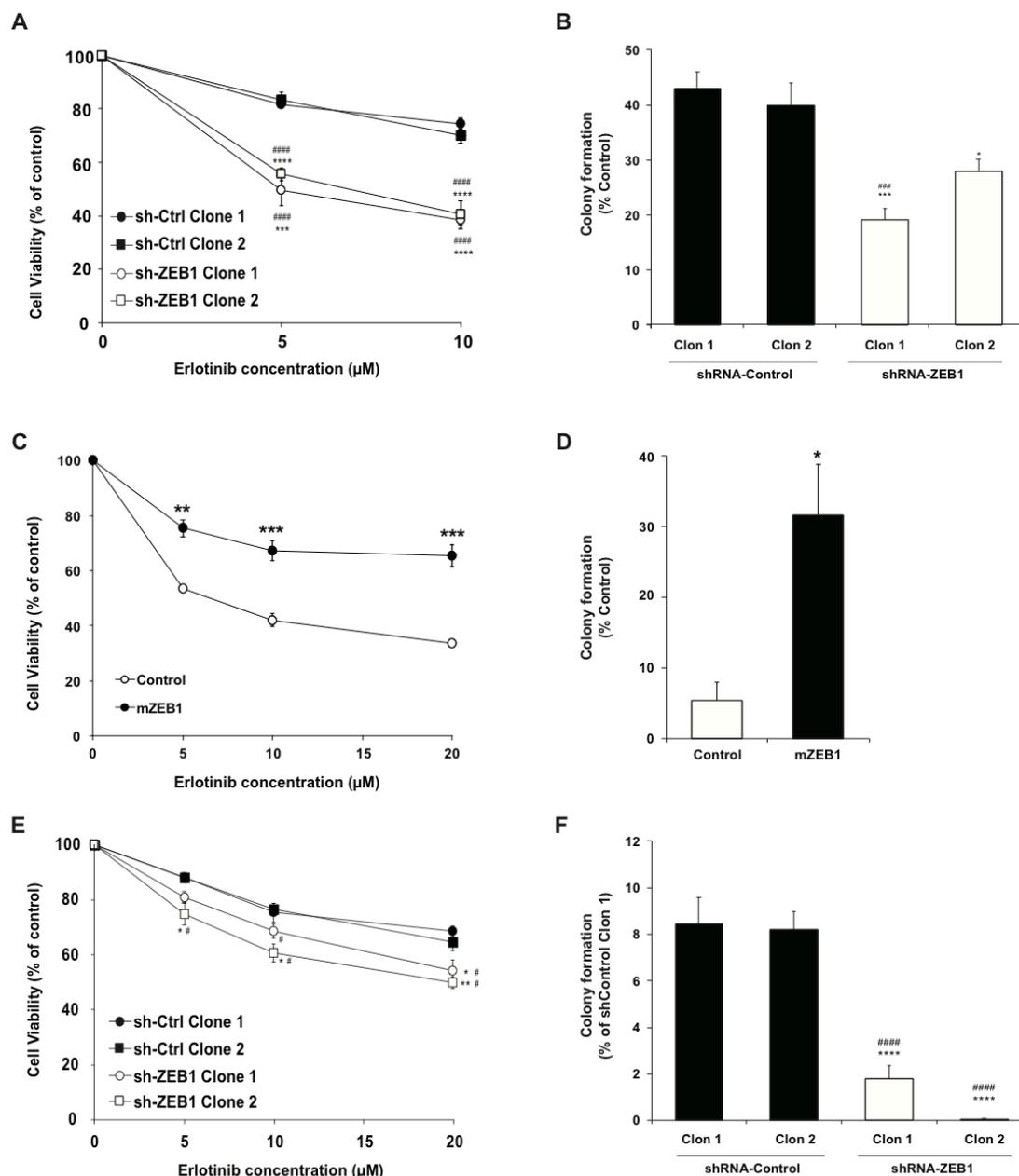


Figure 5 : Role of ZEB1 in therapeutic response to erlotinib of CCA cells. Cell viability was measured after 72 hours of incubation with or without erlotinib (5, 10 and 20 μM) in (A) sh-ZEB1 SK-ChA-1 model, (C) mZEB1 HuCCT1 model and (E) sh-ZEB1 HuCCT1R model. Colony formation assay after 7 days of incubation with or without erlotinib (10 μM) in (B) sh-ZEB1 SK-ChA-1 model, (D) mZEB1 HuCCT1 model and (F) sh-ZEB1 HuCCT1R model. Values are expressed as means ± SEM from at least 3 independent cultures *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001 as compared with control cells clone 1 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells and with control cells for HuCCT1 cells. #, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001; ####, P < 0.0001 as compared with control cells clone 2 for SK-ChA-1 et HuCCT1R cells.

CONCLUSION

Le CCA est une tumeur agressive, pour laquelle les options thérapeutiques sont très limitées. C'est pourquoi l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques demeure un enjeu important pour le traitement du CCA. Dans cette étude, nous avons mis en évidence le rôle de ZEB1 dans la progression et la chimiorésistance du CCA via l'activation de la TEM et l'acquisition d'un phénotype de CSC dans les cellules tumorales. La TEM a été décrite comme une étape clé de la progression tumorale et de la formation de métastases, avec pour caractéristique principale la perte d'expression des marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux. ZEB1 est un régulateur transcriptionnel qui fonctionne comme un inducteur de la TEM dans les cellules tumorales. Nos travaux ont montré que ZEB1 induit la TEM dans les cellules par la perte d'expression des marqueurs épithéliaux E-cadhérine, EpCAM et ESRP1, et l'augmentation de l'expression du marqueur mésenchymateux, la vimentine. De plus nous avons constaté que les cellules qui expriment fortement ZEB1 présentaient un phénotype mésenchymateux avec un aspect type fibroblastique, s'accompagnant d'une perturbation des jonctions cellules-cellules et de la perte d'expression membranaire de la E-cadhérine. Plusieurs études ont décrit que la TEM permettait la génération de CSC dotées de capacités migratoires et invasives [215, 216]. Nous avons donc étudié le rôle de ZEB1 dans la génération d'un phénotype de CSC dans les cellules de CCA. Nous avons constaté que ZEB1 permettait aux cellules d'acquérir un phénotype de CSC caractérisé par l'augmentation de l'expression de marqueurs souches tels que CD24 et CD44 et par l'acquisition de capacités migratoires et d'auto-renouveaulement par les cellules avec une forte expression de ZEB1.

La résistance thérapeutique dans le cancer, représente un défi majeur dans la recherche sur le cancer et le traitement. [309, 310]. Des études ont montré que l'expression de ZEB1 était associée à la résistance aux thérapies dans de nombreux cancers [247, 248, 313] et à un mauvais pronostic chez les patients de CCA [223]. Dans nos travaux nous avons montré que ZEB1 était impliqué dans la chimiorésistance primaire et secondaire des cellules de CCA à l'erlotinib, un inhibiteur de EGFR, dont l'expression a été retrouvée aberrante dans le CCA. Ces résultats *in vitro* restent à compléter mais permettent dans un premier temps une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels ZEB1 serait impliqué dans la progression et la chimiorésistance du CCA. Cependant des expériences *in vivo* sont cruciales

et sont à venir à partir d'échantillons humains de CCA et dans des modèles murins de xénogreffes de cellules de CCA.

Il est tout de même important de savoir que plusieurs autres fonctions de ZEB1 ont été décrites dans la littérature, soulignant son implication dans la cancérogenèse et la progression tumorale. Des fonctions notamment dans la sénescence, l'apoptose, le métabolisme ou encore l'immunité tumorale, qui toutes, favorisent la progression de la tumeur [247, 306].

A terme, ce projet permettra de mieux comprendre la physiopathologie du CCA, dans le but d'améliorer la prise en charge des patients en suggérant le facteur de transcription ZEB1 comme cible potentielle de choix dans le traitement de la tumeur.

Supplementary Information

Role of transcription factor ZEB1 in cholangiocarcinoma progression and chemoresistance

Cindy Lobe¹, Javier Vaquero (co-first author)^{1, 2, 3}, Ander Arbelaiz¹, Cédric Coulouarn⁵, Marie Vallette¹, Anne Stary¹, Nathalie Guedj⁴, Valérie Paradis⁴, Chantal Housset^{1,7}, Laura Fouassier¹

1 Sorbonne Université, INSERM, Centre de recherche Saint-Antoine (CRSA), UMRS 928, F-75012 Paris, France

2 Fondation ARC, F-Villejuif, France

3 LPP, CNRS, Ecole Polytech., Univ. Paris-Sud, Observatoire de Paris, Univ. Paris-Saclay, Sorbonne Université, PSL Research University, Paris, France.

4 Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Beaujon, F-92110 Clichy, France; INSERM, UMR 1149, Centre de Recherche sur l'Inflammation, F-75018 Paris, France.

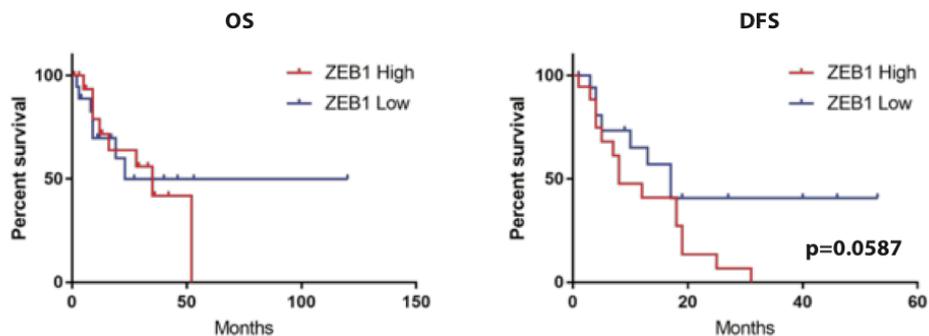
5 INSERM, INRA, Univ Rennes 1, Univ Bretagne Loire, Nutrition Metabolisms and Cancer (NuMeCan), F-35033 Rennes, France

7 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, Hepatology Department, Paris, France

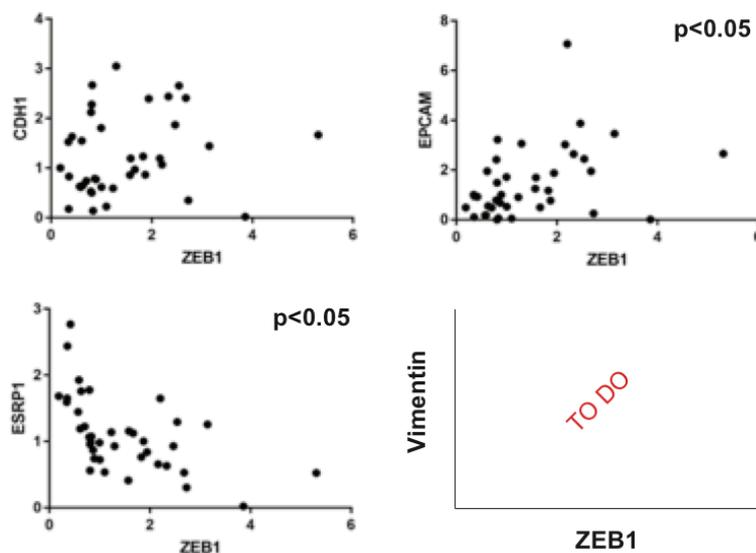
Running title

ZEB1 in human cholangiocarcinoma

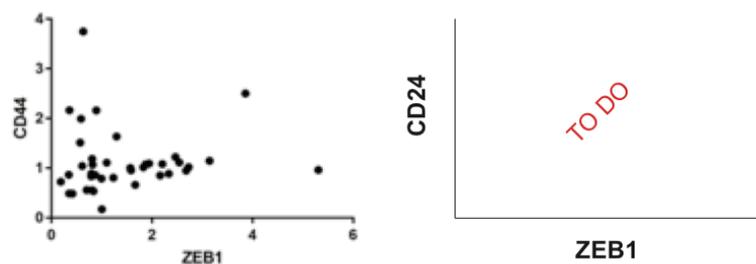
A-



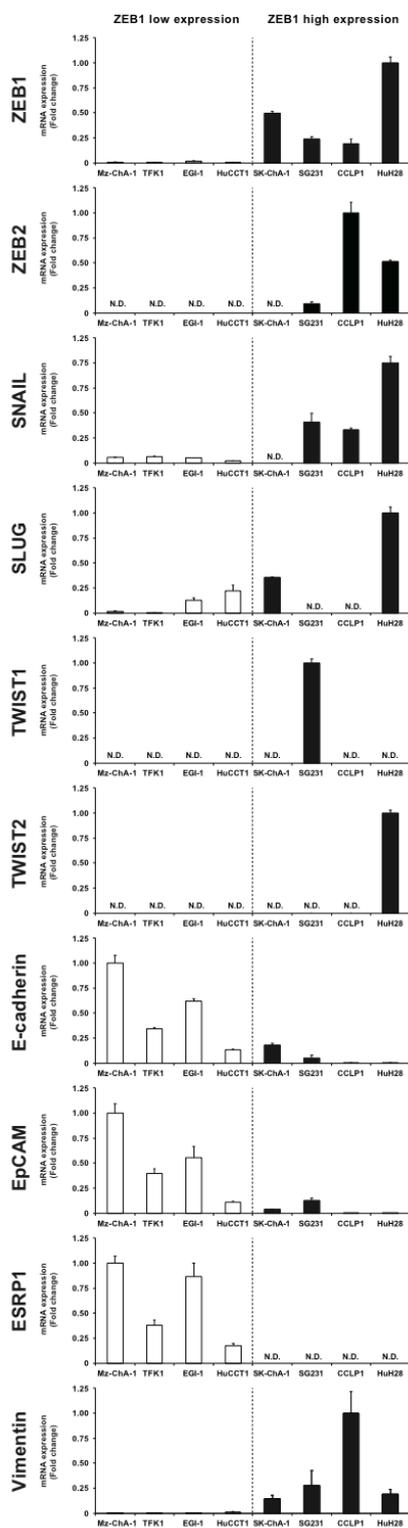
B-



C-



Supplementary Figure 1: ZEB1 expression in intrahepatic CCA human samples. (A) Kaplan–Meier curves of overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) illustrating ZEB1 mRNA expression in patients with intrahepatic CCA. Correlation plots from transcriptomic analysis, between ZEB1 expression and (B) EMT markers expression CDH1, EpCAM, ESRP1 and vimentin (C) stemness markers expression CD44 and CD24.



Supplementary Figure 2 : EMT markers expression in CCA cell lines. ZEB1, ZEB2, SNAIL, SLUG, TWIST1, TWIST2, E-cadherin, EpCAM, ESRP1 and vimentin expression in CCA cell lines analyzed by RT-qPCR .

Supplementary Table 1. Primers used for quantitative real-time PCR.

Gene	Protein	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Accession Number	Species
<i>CD24A</i>	CD24	CTCCTACCCACGCAGATTTATTC	AGAGTGAGACCACGAAGAGAC	NM_013230.3	Human
<i>CD44</i>	CD44	TGCAGTCAACAGTCGAAGAAG	CTGTCCTCCACAGCTCCATT	NM_000610.4	Human
<i>CDH1</i>	E-cadherin	AAGAAGCTGGCTGACATGTACGGA	CCACCAGCAACGTGATTTCTGCAT	NM_004360.4	Human
<i>EPCAM</i>	EpCAM	CCATGTGCTGGTGTGTGAA	TGTGTTTTAGTTCAATGATGATCCA	NM_002354.2	Human
<i>ESRP1</i>	ESRP1	CCCACCGCCATGTAAGTT	GCAGGAGCTGGAAATGTGTAG	NM_017697.4	Human
<i>GAPDH</i>	GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	NM_002046.5	Human
<i>SNAI1</i>	SNAIL	CCAGAGTTTACCTTCCAGCAGCC	CAGGACAGAGTCCCAGATGAGCAT	NM_005985.3	Human
<i>SNAI2</i>	SLUG	ATCTCCGGAGGTGGGATG	GAGAGACATTCTGGAGAAGG	NM_003068.4	Human
<i>TWIST1</i>	TWIST1	AGCTACGCCTTCTCGGTCT	CCTTCTCTGGAAACAATGACATC	NM_000474.3	Human
<i>TWIST2</i>	TWIST2	GCAAGAAGTCGAGCGAAGAT	GCTCTGCAGCTCCTCGAA	NM_001271893.4	Human
<i>VIM</i>	Vimentin	CCCTGCAATCTTTCAGACAG	ATCTGAGCCTGCAGCTCCT	NM_003380.3	Human
<i>ZEB1</i>	ZEB1	ACAATCGTGGCCATTGCTGA	TGGTTCTTGGACTGCAGGGCT	NM_001128128.2	Human
<i>ZEB1</i>	ZEB1	GCCAGCGTCATGATGAAAA	TATCACAATACGGGCAGGTG	NM_011546.3	Mouse
<i>ZEB2</i>	ZEB2	AGGGACAGATCAGCACCAAATGCTA	GGCACTCGTAAGGTTTTTCACCACTG	NM_001171653.1	Human

Supplementary Table 2. Primary antibodies used for immunodetection.

Name	Species	Manufacturer	Reference	Dilution	Antigen unmasking
E-cadherin	M	Abcam	ab1416	1:5000 (WB) / 1:250 (IF)	
GAPDH	M	Santa Cruz	sc-32233	1:5000 (WB)	
Vimentin	M	Sigma	V6630	1:5000 (WB)	
ZEB1	R	Santa Cruz	Sc-25388	1:500 (WB)	

M, mouse; R, rabbit; WB, western blot; IF, immunofluorescence

4 Conclusion générale et discussion

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ces quatre années de doctorat ont eu pour objectif d'élucider les mécanismes par lesquels les cellules tumorales échappent aux traitements anti-EGFR et d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le traitement du CCA. En effet l'utilisation d'anticorps ou d'ITK contre EGFR lors des essais cliniques n'ont pas montré d'amélioration significative de la survie globale chez les patients atteints de CCA [111, 156, 334-336], rendant crucial la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces contre cette maladie.

De manière surprenante, malgré l'intérêt croissant que suscite le ciblage de la voie EGFR dans le CCA et le nombre croissant d'essais cliniques portant sur différents types de traitements anti-EGFR (erlotinib, lapatinib, cetuximab et panitumumab), peu d'études ont été consacrées à ce jour à la compréhension des mécanismes de résistance au traitement anti-EGFR dans le CCA [330, 337]. Dans le premier projet auquel je me suis consacrée, nous avons démontré le rôle de la voie de signalisation IGF2/IGF1R/IR et des CAFs dans la résistance à l'erlotinib. Nous avons par ailleurs montré dans un modèle préclinique que l'inhibition de cette voie par des inhibiteurs spécifiques d'IGF1R/IR combinés avec l'erlotinib, sensibilise les cellules de CCA au traitement anti-EGFR. Plus précisément, dans cette première étude nous avons mis en évidence l'induction d'une TEM dans les cellules ayant acquis une résistance à l'erlotinib, se traduisant par une dérégulation des propriétés épithéliales et l'acquisition de propriétés mésenchymateuses. Des travaux ont montré que la TEM confère aux cellules tumorales des propriétés invasives leur permettant de former des métastases et de résister aux traitements, notamment à l'erlotinib dans le cancer du poumon non à petites cellules [212, 338]. De nombreuses études ont souligné le rôle crucial de la TEM dans la génération de CSC. Au cours de cette dernière décennie s'est confirmée l'hypothèse de l'existence d'une sous-population de cellules aux caractéristiques proches des cellules souches capables de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier afin de maintenir les tumeurs. Ces cellules, qualifiées de CSC, contribuent à la croissance tumorale, possèdent un fort potentiel invasif et métastatique, et sont réfractaires aux traitements anti-cancéreux [339]. La suractivation de voies de

signalisation impliquées dans le maintien et la différenciation des CSC pourrait expliquer la résistance des tumeurs aux traitements anti-EGFR [339], tout comme leur fort potentiel à exprimer des transporteurs de la famille ABC (ATP-Binding Cassette) qui permettent l'exclusion des médicaments anti-tumoraux hors de la cellule [215, 340, 341]. Nos travaux ont montré que parallèlement à la TEM, les cellules résistantes à l'erlotinib avaient acquis des propriétés de CSC se traduisant par une augmentation des marqueurs de CSC et leur capacité à former des colonies en conditions non-adhérentes. De plus, les phénotypes de TEM et de CSC se sont avérés régulés par l'axe de signalisation IGF [342], une voie que nous avons identifiée comme étant activée dans les cellules résistantes à l'erlotinib. En effet, nous avons montré une activation des récepteurs IR et IGF1R associée à une augmentation de l'expression de IGF2 dans les cellules de CCA résistantes à l'erlotinib. Cette voie a été décrite comme étant impliquée dans la résistance aux traitements anti-EGFR dans le glioblastome, le carcinome hépatocellulaire et les cancers pancréatique, du poumon et colorectal [343-346] et nous l'avons décrite pour la première fois dans le CCA [189]. Bien que le rôle de IR dans le CCA ne soit pas connu à ce jour, IGF1R a été décrit comme étant impliqué dans la prolifération des cholangiocytes et son expression est associée à un phénotype agressif dans le CCA [50, 347]. Nous avons mis en évidence le rôle de la signalisation IGF dans la résistance des cellules de CCA à l'erlotinib en montrant que son inhibition sensibilise les cellules au traitement anti-EGFR et entraîne une réversion du phénotype mésenchymateux et du caractère souche. De manière intéressante, l'implication de la signalisation IGF dans la résistance aux anti-EGFR dans d'autres tumeurs a été décrite non seulement en réponse à l'erlotinib [348], mais également au lapatinib [349] et au cetuximab [350]. Ce qui nous laisse supposer que l'axe de signalisation IGF2/IR/IGF1R pourrait jouer un rôle beaucoup plus important dans la réponse adaptative des cellules de CCA au traitement anti-EGFR. Enfin, nous avons démontré le rôle du microenvironnement tumoral dans la réponse des cellules résistantes à l'erlotinib. Il a été décrit que le microenvironnement contribue à la progression tumorale et altère la réponse thérapeutique des cellules tumorales [80-82]. Des travaux dans le cancer de la tête et du cou ont montré que le cetuximab induisait une activation des CAFs chez les patients, sans réellement savoir, si cela se traduit par une action directe sur les CAFs ou indirecte par le biais d'interactions avec les cellules tumorales [235]. Nos travaux ont montré un stroma plus important dans les tumeurs résistantes à l'erlotinib in vivo, suggérant l'implication des cellules résistantes de CCA dans la prolifération des CAFs. Par ailleurs, nous avons constaté que les

CAFs produisaient IGF2 dans les xénogreffes de tumeurs chez la souris mais aussi dans les tumeurs humaines de CCA. Ces données ont été également mises en évidence dans les cancers du poumon non à petites cellules, du colon et du pancréas [346, 351, 352], suggérant le rôle de IGF2 en tant que médiateur dans la communication entre les CAFs et les cellules tumorales résistantes à l'erlotinib. De plus, nous avons mis en évidence l'implication de IR et IGF1R dans la prolifération des myofibroblastes de CCA, comme il a été décrit pour les CAFs et les cellules étoilées du foie dans d'autres cancers [352, 353]. Nos travaux ont montré que le blocage des récepteurs IR et IGF1R avaient des effets inhibiteurs non seulement sur les cellules de CCA résistantes à l'erlotinib, mais également sur le contenu stromal en CAFs dans les xénogreffes de tumeurs de CCA chez la souris.

Pour conclure sur cette première partie, nous avons montré que l'activation de la signalisation IGF dans les cellules tumorales résistantes à l'erlotinib et dans les CAF pouvait témoigner du manque d'efficacité des traitements anti-EGFR chez les patients atteints de CCA, relevant l'intérêt d'utiliser des thérapies combinées anti-EGFR et anti-IR/IGF1R dans le traitement de cette maladie.

La deuxième étude porte sur le rôle du facteur de transcription ZEB1 dans le CCA. L'apparition de résistances chez les patients atteints de CCA, appellent à l'identification de nouvelles cibles visant à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques chez ces patients. Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle de ZEB1 dans la progression et la chimiorésistance du CCA via l'activation de la TEM et l'acquisition d'un phénotype de CSC dans les cellules tumorales. Dans les résultats issus de nos études cliniques, ZEB1 est exprimé dans des échantillons humains de CCAi et son expression accrue est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients. De plus, nos analyses de transcriptomique ont montré une corrélation inverse entre l'expression de ZEB1 et celle des marqueurs épithéliaux E-cadhérine, EpCAM et ESRP1. Cependant ces données cliniques restent à compléter. Des analyses de corrélations entre l'expression de ZEB1 et celle des marqueurs mésenchymateux et de CSC sont en cours, afin d'associer l'expression de ZEB1 à un phénotype de TEM et de CSC chez les patients atteints de CCAi. Par la suite nous avons étudié le profil d'expression de ZEB1 dans huit lignées humaines de CCA, dans lesquelles nous avons observé une forte expression de ZEB1 dans quatre lignées tandis que les autres ne l'exprimaient pas ou peu. Afin d'étudier son rôle direct dans le CCA, nous avons développé différents modèles d'études cellulaires dans lesquels nous

avons inhibé ZEB1 dans les lignées qui l'exprimaient de manière endogène puis nous avons forcé son expression dans les lignées qui ne l'exprimaient pas. Parmi les lignées qui exprimaient ZEB1, nous avons choisi la lignée SK-ChA-1 comme modèle car celle-ci présentait le plus de différence au niveau phénotypique et pour laquelle, il existait peu d'expression ou de variations des autres facteurs inducteurs de la TEM, permettant ainsi de nous affranchir de phénomènes compensatoires. Parmi les lignées qui n'exprimaient pas ZEB1, nous avons choisi comme modèle la lignée HuCCT1, seule lignée pour laquelle nous avons pu réaliser un modèle expérimental. Pour aller plus loin, nous avons invalidé l'expression de ZEB1 dans la lignée HuCCT1 ayant acquis une résistance à l'erlotinb (HuCCT1R), pour laquelle les travaux précédents ont montré une augmentation importante de son expression. Ceci dans le but d'étudier le rôle de ZEB1 dans la résistance acquise des cellules de CCA à l'erlotinb. Dans ces modèles expérimentaux, nous avons mis en évidence le rôle de ZEB1 dans la progression et la chimiorésistance du CCA via l'activation de la TEM et l'acquisition d'un phénotype de CSC dans les cellules tumorales. Différents travaux ont apporté des arguments solides soutenant le rôle de la TEM dans la progression tumorale et la cascade métastatique, que ce soit dans des échantillons cliniques ou dans des modèles expérimentaux. Ce processus dans lequel ZEB1 a une fonction régulatrice majeure, est caractérisé principalement par la perte d'expression des marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux dans les cellules tumorales. Nos travaux ont montré que ZEB1 induit la TEM dans les cellules par la perte d'expression des marqueurs épithéliaux E-cadhérine, EpCAM et ESRP1, et l'augmentation de l'expression du marqueur mésenchymateux, la vimentine. De plus nous avons constaté que les cellules qui expriment fortement ZEB1 présentait un phénotype mésenchymateux avec un aspect type fibroblastique, s'accompagnant d'une perturbation des jonctions cellules-cellules et de la perte d'expression membranaire de la E-cadhérine. De manière intéressante, nous avons montré que lorsque ZEB1 était inhibé, nous pouvions observer un switch du phénotype mésenchymateux vers un phénotype épithélial. Celui-ci s'est accompagné d'une augmentation de l'expression des marqueurs épithéliaux corrélée à une diminution de l'expression de la vimentine et d'une relocalisation à la membrane de la E-cadhérine, favorisant le contact entre cellules.

Plusieurs études ont permis de connecter la TEM à l'émergence de CSC dotés de capacités migratoires et invasives [215, 216], et ont démontré l'implication de ZEB1 dans l'acquisition de ces phénotypes [290, 291]. Nous avons ainsi étudié le rôle de ZEB1 dans la génération d'un

phénotype de CSC dans les cellules de CCA. Nous avons constaté que ZEB1 permettait aux cellules d'acquérir un phénotype de CSC caractérisé par l'augmentation de l'expression de marqueurs souches, tel que CD24, et par l'acquisition de capacités migratoires et d'auto-renouveaulement par les cellules avec une forte expression de ZEB1. De plus, l'inhibition de ZEB1 permettait d'observer les phénomènes inverses se définissant par une diminution des propriétés de CSC. Il est à noter tout de même que la TEM et l'état souche d'une cellule peuvent parfois être désynchronisés. C'est par exemple le cas pour le facteur de transcription Prrx1, récemment identifié comme un TEM-TF, dont l'inhibition par shARN induit une épithélialisation accompagnée d'une acquisition des caractères souches dans les cellules cancéreuses du sein BT-549 [354].

L'un des obstacles majeurs dans les thérapies anti-tumorales est le risque de rechute lié au fait que certaines cellules sont résistantes aux thérapies utilisées et notamment aux chimiothérapies [309, 310]. Des études ont montré que l'expression de ZEB1 était associée à la résistance aux thérapies dans de nombreux cancers, que ce soit à la radiothérapie, aux chimiothérapies conventionnelles ou encore aux thérapies ciblées [247, 248, 313]. Son rôle notamment dans la résistance aux anti-EGFR a été mis en évidence dans le cancer bronchique non à petites cellules [338] et le carcinome épidermoïde de la tête et du cou [328]. Dans nos travaux nous avons montré que ZEB1 entraînait une chimiorésistance primaire et secondaire des cellules de CCA à l'erlotinib, et que son inhibition permettait de re-sensibiliser les cellules au traitement. Il serait également intéressant d'évaluer le rôle de ZEB1 dans la réponse des cellules au GEMOX qui constitue le traitement conventionnel de première ligne administré aux patients atteints de CCA.

Ces résultats obtenus *in vitro* restent à compléter et sont en cours mais permettent dans un premier temps, une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels ZEB1 serait impliqué dans la progression et la chimiorésistance primaire et acquise des cellules de CCA. Cependant des expériences *in vivo* sont cruciales afin de valider les résultats observés *in vitro*. Ces travaux sont en cours d'une part dans les échantillons humains de CCA et d'autre part dans un modèle murins de xénogreffes de cellules de CCA, dans lesquelles nous étudierons la croissance tumorale et la réponse au traitement.

Outre le rôle de ZEB1 dans l'acquisition d'un phénotype de TEM et CSC, de nombreuses études ont souligné ses multiples fonctions dans la cancérogenèse et la progression tumorale. Parmi celles-ci, une de ses fonctions récemment découverte est celle dans le métabolisme

énergétique des cellules du cancer du poumon [306] . Plus précisément, lors de la mise en place d'un programme de TEM, ZEB1 est capable de réprimer l'expression de l'enzyme glycolytique Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1) entraînant de profonds remaniements métaboliques dans les cellules tumorales, se définissant par une augmentation de l'absorption de glucose et de la production de lactate et une diminution de la consommation d'oxygène. Ces données ont également été observées dans le cancer du sein « basal-like » [355], dans lequel le principal acteur n'est pas ZEB1 mais un autre TEM-TF, Snail. Les chercheurs ont montré que ces dérégulations métaboliques favorisaient l'acquisition de propriétés de CSC et la dissémination métastatique des cellules tumorales. Ces résultats nous ont permis de nous orienter vers le lien existant entre cancer et métabolisme. L'adaptation du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse à son profit s'insère dans les caractéristiques du cancer [32, 356]. De ce fait, plusieurs travaux portant sur la croissance tumorale et le métabolisme ont été publiés [357] mais il n'existe pas à ce jour de documentation sur le rôle de ZEB1 dans le métabolisme des cellules de CCA. Des données préliminaires dans les cellules SK-ChA-1 sh-ZEB1 ont montré une augmentation de l'expression de l'enzyme FBP1, cible de ZEB1, par rapport aux cellules contrôles (Figure 22A). Nous avons également observé une augmentation de l'absorption de glucose dans les cellules sh-ZEB1 (Figure 22B) qui s'accompagne d'une augmentation de la production de lactate (Figure 22C) d'autant plus observée en présence de glucose, comparé aux cellules contrôles. En revanche, nous n'avons pas observé de différence dans la production de pyruvate entre les cellules sh-ZEB1 et les cellules contrôles, en présence ou non de glucose. Ces observations se sont traduites par une augmentation du ratio lactate/pyruvate dans les cellules SK-ChA-1 shZEB1 par rapport aux cellules contrôles. Nous avons par ailleurs constaté une production accrue d'adénosine tri-phosphate (ATP) dans les cellules sh-ZEB1 (Figure 22D). Des études ont montré qu'une augmentation de la production de lactate accompagnée d'une augmentation de l'absorption de glucose est souvent observé dans les cellules et que le glucose n'est pas la seule source de ATP, mais aussi la glutamine [358]. En effet, nos travaux préliminaires ont montré une diminution de la production de ATP, en absence de glutamine (Figure 22D). D'après la littérature et les résultats préliminaires obtenus, il semblerait qu'un effet Warburg soit mis en place dans les cellules sh-ZEB1. Pour comprendre ce phénomène, il faut savoir que dans les cellules différenciées et en présence d'oxygène, le glucose absorbé se transforme en pyruvate (glycolyse aérobie) puis rentre dans le cycle de Krebs dans la mitochondrie afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP (36

molécules d'ATP). En parallèle, la production limitée de lactate est modérée. Cependant en l'absence d'oxygène, la cellule favorise la production de lactate (glycolyse anaérobie) avec une génération modeste mais rapide de l'ATP afin d'optimiser la réponse aux besoins énergétiques de la cellule. Toutefois, la cellule cancéreuse présente un profil métabolique différent, au cours duquel elle favorise la transformation du glucose en lactate avec une production rapide mais modérée d'ATP (2 molécules d'ATP) même en présence d'oxygène, ce qu'on appelle l'effet Warburg [359]. Dans notre cas, nous pouvons supposer que la forte absorption de glucose observée dans les cellules sh-ZEB1 comparée aux cellules contrôles entraîne une augmentation de la production de lactate accompagnée d'une production rapide d'ATP, également accentuée par la glutamine. Cependant, nous ne savons pas si cette augmentation d'ATP observée est liée à l'augmentation de sa production ou de son utilisation par les cellules. Cette modification du profil métabolique a pour but de fournir aux cellules cancéreuses une source rapide d'énergie et une biosynthèse efficace des macromolécules [359]. En effet, nous avons constaté une biosynthèse de protéines accrues dans les cellules sh-ZEB1 comparé aux contrôles (Figure 22E). De plus, nous avons constaté une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules sh-ZEB1 (Figure 22F), suggérant la mise en place d'un métabolisme oxydatif dans les cellules. Il est nécessaire de compléter ces analyses, notamment par des études de SeaHorse, qui sont en cours, qui permettent d'explorer la glycolyse et respiration cellulaire en temps-réel.

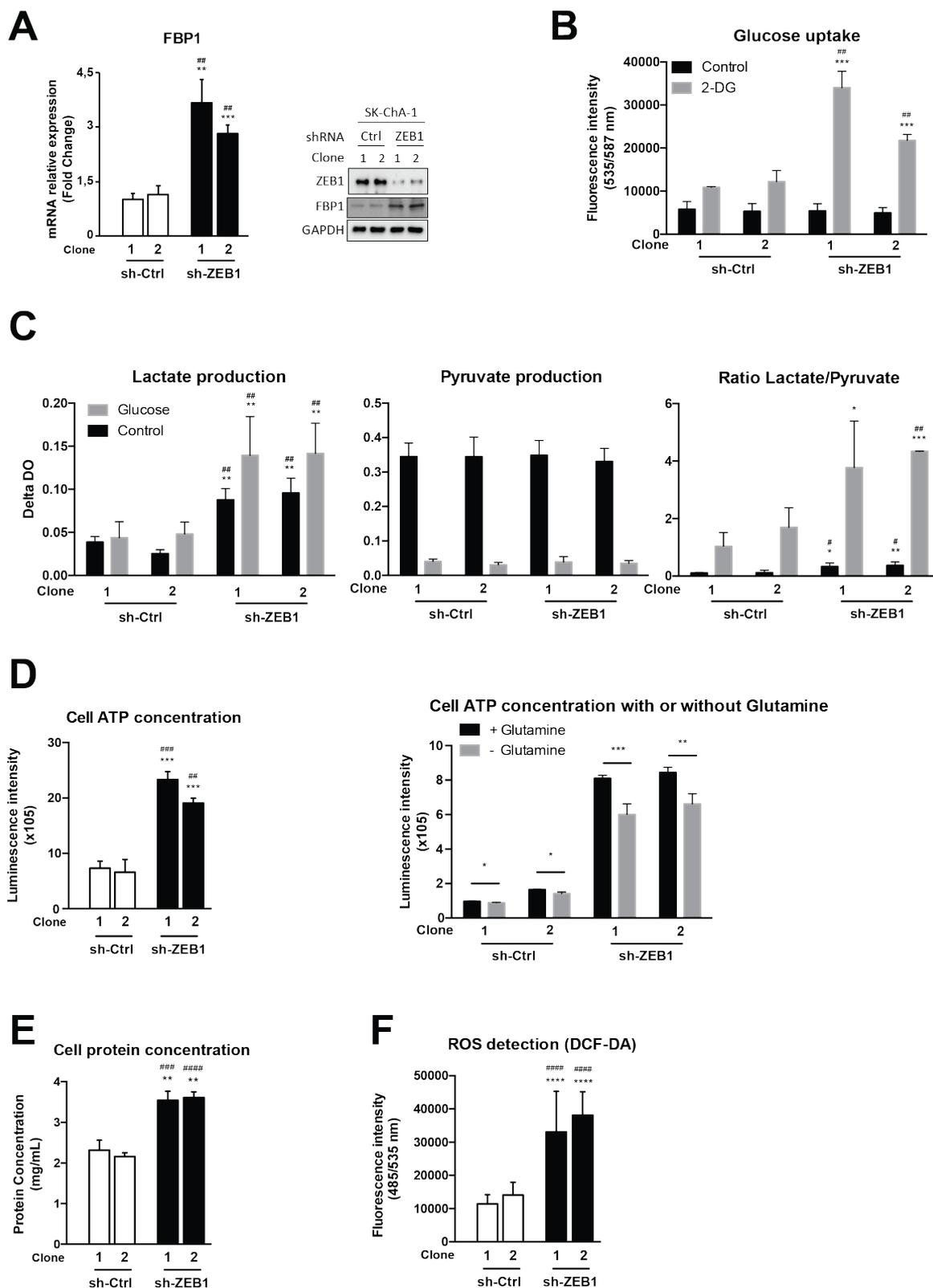


Figure 22 : Role of ZEB1 in metabolism dysregulation of CCA cells. (A) FBP1 expression analyzed by RT-qPCR and western blot in CCA cells. (B) Glucose absorption was measured based on Glucose Uptake Fluorometric Assay Kit (MAK084, Sigma) in CCA cells (C) Lactate and pyruvate production was measured after 2 hours of starvation then 3h of incubation with or

without glucose in CCA cells. It is the measurement NADH absorbance which is directly proportional to the amount of lactate in extracellular media. The ratio lactate/pyruvate was also measured. (D) ATP concentration was measured based on CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit (G7570, Promega) after 2 hours of starvation then 3h of incubation with or without glutamine in CCA cells. (E) Protein concentration was measured based on BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit (23225, ThermoFisher) in CCA. (F) ROS were detected using DCFDA/H2DCFDA-Cellular ROS Assay Kit (ab113851, Abcam) based on fluorescent DCF-DA detection in CCA cells. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent cultures *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001 as compared with control cells clone 1 and #, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001; ####, P < 0.0001 as compared with control cells clone 2.

Ces premières observations suggèrent une réelle implication de ZEB1 dans la dérégulation du métabolisme des cellules de CCA, cependant une réelle compréhension du métabolisme des cellules cancéreuses est requise, afin de pouvoir corréliser les résultats entre eux et d'expliquer les phénomènes observés. De manière intéressante et indépendamment du rôle de ZEB1, des travaux supplémentaires dans la lignée HuCCT1 ont également montré que les cellules ayant acquis une résistance à l'erlotinib produisent une plus grande quantité de lactate que les cellules contrôles (résultats de métabolomique non publiés, Fouassier et al.), faisant du métabolisme une piste d'intérêt à élucider dans la physiopathologie du CCA.

Il a précédemment été décrit que ZEB1 joue un rôle dans la sénescence et l'apoptose, notamment via la régulation du cycle cellulaire. Des travaux ont montré que ZEB1 est capable de réprimer les inhibiteurs de kinase cycline-dépendante, p21waf1 et p15ink4b, permettant ainsi la progression du cycle cellulaire [247, 301]. Des données préliminaires de l'étude du cycle cellulaire par cytométrie, nous ont permis d'observer dans les cellules SK-ChA-1 sh-ZEB1 un pourcentage de cellules plus élevé en phase G0/G1 que dans les cellules contrôles, corrélé à un pourcentage de cellules plus faible en phase S (Figure 23). Concernant la phase G2/M, nous n'avons pas observé de différence entre les deux conditions.

Afin de conclure sur cette deuxième partie ces études dans les cellules de CCA témoignent des fonctions multiples de ZEB1 et de son rôle majeur dans la tumorigenèse, la dissémination métastatique et la résistance à l'erlotinib.

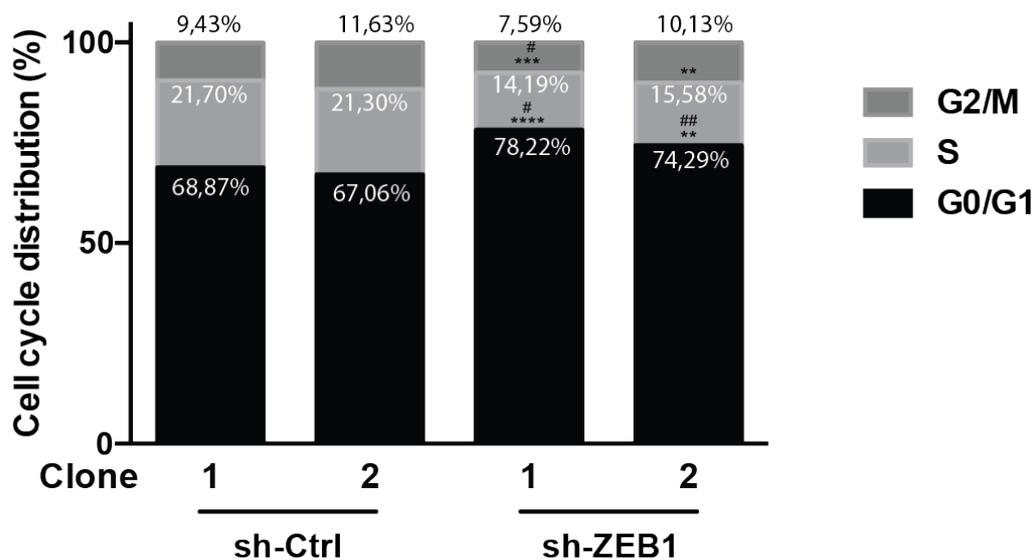


Figure 23 : Role of ZEB1 in cell cycle regulation of CCA cells. Cell cycle was analyzed by propidium iodide (PI) staining and assessed by flow cytometry. Values are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 1 and #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ###, $P < 0.001$; ####, $P < 0.0001$ as compared with control cells clone 2.

Au vu des résultats, il apparaît légitime de conceptualiser des molécules capables de cibler efficacement ZEB1. A ce jour il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de ZEB1 mais des études récentes ont mis en évidence les effets prometteurs du mocetinostat, un inhibiteur spécifique des histones désacétylases (HDAC) de classe I dans la réponse thérapeutique des cellules de cancer du pancréas. Par régulation épigénétique, il est capable de réprimer la fonction ZEB1, ce qui restitue l'expression de miR-203 et inhibe le phénotype de TEM et de CSC [327]. Ces travaux pourraient faire du mocetinostat une cible de choix dans les nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer. Par ailleurs, l'existence d'une boucle de régulation négative entre ZEB1 et les miR-200 a été établie. Une étude a montré qu'en inhibant l'expression des miR-200 dans les cellules tumorales du pancréas, ZEB1 permettait la désinhibition des facteurs impliqués dans le maintien des cellules souches, tels que BMI1, KLF4 et SOX2, cibles des miR-200 [219]. Des travaux récents réalisés dans le cancer du sein ont montré que la répression de ZEB1 par les miR, notamment les miR-200, entraînait une inhibition des signaux promouvant le mimétisme vasculaire, contribuant ainsi à la dissémination métastatique [360]. Ainsi, il serait intéressant comme stratégie thérapeutique d'utiliser des miR, qui sont des oligonucléotides, afin de cibler ZEB1 et d'inhiber ses effets dans la cancérogenèse. Dans ce contexte, de nouvelles approches basées sur l'utilisation

d'oligonucléotides modifiés, capables d'empêcher la liaison à l'ADN des facteurs de transcription Snail1, Snail2 et Zeb2 ont été conçus récemment à cet effet [361]. Ces expériences pionnières pourraient ouvrir la voie à des innovations thérapeutiques prometteuses dont l'objectif serait de contrecarrer à la fois le développement de la tumeur et le processus de dissémination métastatique.

En conclusion générale, mes travaux de thèse permettent d'avoir une vue d'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression et la résistance du CCA, ouvrant une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette tumeur, dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces et d'améliorer le devenir des patients atteints de CCA.

5 Bibliographie

1. Banales, J.M., et al., *Bicarbonate-rich choleresis induced by secretin in normal rat is taurocholate-dependent and involves AE2 anion exchanger*. *Hepatology*, 2006. **43**(2): p. 266-75.
2. Lazaridis, K.N. and N.F. LaRusso, *The Cholangiopathies*. *Mayo Clin Proc*, 2015. **90**(6): p. 791-800.
3. Eaton, J.E., et al., *Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(3): p. 521-36.
4. O'Hara, S.P., et al., *HIV-1 Tat protein suppresses cholangiocyte toll-like receptor 4 expression and defense against Cryptosporidium parvum*. *J Infect Dis*, 2009. **199**(8): p. 1195-204.
5. Gevers, T.J. and J.P. Drenth, *Diagnosis and management of polycystic liver disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(2): p. 101-8.
6. Rafeeq, M.M. and H.A.S. Murad, *Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches*. *J Transl Med*, 2017. **15**(1): p. 84.
7. Saleh, M., B.M. Kamath, and D. Chitayat, *Alagille syndrome: clinical perspectives*. *Appl Clin Genet*, 2016. **9**: p. 75-82.
8. Deltenre, P. and D.C. Valla, *Ischemic cholangiopathy*. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(3): p. 235-46.
9. Razumilava, N. and G.J. Gores, *Cholangiocarcinoma*. *Lancet*, 2014. **383**(9935): p. 2168-79.
10. Padda, M.S., et al., *Drug-induced cholestasis*. *Hepatology*, 2011. **53**(4): p. 1377-87.
11. Mack, C.L., A.G. Feldman, and R.J. Sokol, *Clues to the etiology of bile duct injury in biliary atresia*. *Semin Liver Dis*, 2012. **32**(4): p. 307-16.
12. Li, Y., et al., *Cholangitis: a histologic classification based on patterns of injury in liver biopsies*. *Pathol Res Pract*, 2005. **201**(8-9): p. 565-72.
13. Banales, J.M., et al., *Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA)*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(5): p. 261-80.
14. Cardinale, V., et al., *Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity*. *World J Gastrointest Oncol*, 2012. **4**(5): p. 94-102.
15. Cardinale, V., et al., *Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors*. *World J Gastrointest Oncol*, 2010. **2**(11): p. 407-16.
16. Khan, S.A., et al., *Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us?* *J Hepatol*, 2012. **56**(4): p. 848-54.
17. Rizvi, S. and G.J. Gores, *Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(6): p. 1215-29.
18. Nakanuma, Y., et al., *Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept*. *World J Hepatol*, 2010. **2**(12): p. 419-27.
19. Guedj, N., P. Bedossa, and V. Paradis, *[Pathology of cholangiocarcinoma]*. *Ann Pathol*, 2010. **30**(6): p. 455-63.

20. Blechacz, B., et al., *Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(9): p. 512-22.
21. Yamasaki, S., *Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2003. **10**(4): p. 288-91.
22. Aishima, S. and Y. Oda, *Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015. **22**(2): p. 94-100.
23. Komuta, M., et al., *Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1876-88.
24. Liao, J.Y., et al., *Morphological subclassification of intrahepatic cholangiocarcinoma: etiological, clinicopathological, and molecular features*. Mod Pathol, 2014. **27**(8): p. 1163-73.
25. Arndtz, K. and G.M. Hirschfield, *Primary sclerosing cholangitis and the management of uncertainty and complexity*. Frontline Gastroenterol, 2017. **8**(4): p. 260-266.
26. Razumilava, N. and G.J. Gores, *Surveillance for Cholangiocarcinoma in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis: Effective and Justified?* Clin Liver Dis (Hoboken), 2016. **8**(2): p. 43-47.
27. Tyson, G.L. and H.B. El-Serag, *Risk factors for cholangiocarcinoma*. Hepatology, 2011. **54**(1): p. 173-84.
28. Grainge, M.J., et al., *The antecedents of biliary cancer: a primary care case-control study in the United Kingdom*. Br J Cancer, 2009. **100**(1): p. 178-80.
29. Welzel, T.M., et al., *Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database*. Hepatology, 2011. **54**(2): p. 463-71.
30. Huang, M.H., et al., *Relation of hepatolithiasis to helminthic infestation*. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(1): p. 141-6.
31. Erice, O., et al., *Molecular Mechanisms of Cholangiocarcinogenesis: New Potential Targets for Therapy*. Curr Drug Targets, 2017. **18**(8): p. 932-949.
32. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
33. Oishi, N., et al., *Transcriptomic profiling reveals hepatic stem-like gene signatures and interplay of miR-200c and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma*. Hepatology, 2012. **56**(5): p. 1792-803.
34. Woo, H.G., et al., *Identification of a cholangiocarcinoma-like gene expression trait in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3034-41.
35. Zou, S., et al., *Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5696.
36. Nakamura, H., et al., *Genomic spectra of biliary tract cancer*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 1003-10.
37. Borad, M.J., et al., *Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma*. PLoS Genet, 2014. **10**(2): p. e1004135.
38. Fujimoto, A., et al., *Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6120.
39. Boulter, L., et al., *WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited*. J Clin Invest, 2015. **125**(3): p. 1269-85.

40. Jiao, Y., et al., *Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas*. Nat Genet, 2013. **45**(12): p. 1470-1473.
41. Andersen, J.B., et al., *Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors*. Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 1021-1031 e15.
42. Moeini, A., et al., *Molecular Pathogenesis and Targeted Therapies for Intrahepatic Cholangiocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(2): p. 291-300.
43. Kayhanian, H., E.C. Smyth, and C. Braconi, *Emerging molecular targets and therapy for cholangiocarcinoma*. World J Gastrointest Oncol, 2017. **9**(7): p. 268-280.
44. Chan-On, W., et al., *Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers*. Nat Genet, 2013. **45**(12): p. 1474-8.
45. Saha, S.K., et al., *Corrigendum: Mutant IDH inhibits HNF-4alpha to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer*. Nature, 2015. **528**(7580): p. 152.
46. Borger, D.R., et al., *Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping*. Oncologist, 2012. **17**(1): p. 72-9.
47. Goepfert, B., et al., *Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma target the Wnt signaling pathway*. Hepatology, 2014. **59**(2): p. 544-54.
48. He, J.C., et al., *TACC3 overexpression in cholangiocarcinoma correlates with poor prognosis and is a potential anti-cancer molecular drug target for HDAC inhibitors*. Oncotarget, 2016. **7**(46): p. 75441-75456.
49. Grassian, A.R., R. Pagliarini, and D.Y. Chiang, *Mutations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 in intrahepatic cholangiocarcinoma*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(3): p. 295-302.
50. Alvaro, D., et al., *Estrogens and insulin-like growth factor 1 modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma*. Am J Pathol, 2006. **169**(3): p. 877-88.
51. Isse, K., et al., *Estrogen stimulates female biliary epithelial cell interleukin-6 expression in mice and humans*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 869-80.
52. Mancino, A., et al., *Estrogens stimulate the proliferation of human cholangiocarcinoma by inducing the expression and secretion of vascular endothelial growth factor*. Dig Liver Dis, 2009. **41**(2): p. 156-63.
53. Alpini, G., et al., *Serotonin metabolism is dysregulated in cholangiocarcinoma, which has implications for tumor growth*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9184-93.
54. Coufal, M., et al., *Increased local dopamine secretion has growth-promoting effects in cholangiocarcinoma*. Int J Cancer, 2010. **126**(9): p. 2112-22.
55. Fava, G., et al., *Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6752-61.
56. Marzioni, M., et al., *Human cholangiocarcinoma development is associated with dysregulation of opioidergic modulation of cholangiocyte growth*. Dig Liver Dis, 2009. **41**(7): p. 523-33.
57. DeMorrow, S., et al., *Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth: recruitment of Fas and Fas ligand to lipid rafts*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 13098-113.

58. Claperon, A., et al., *Hepatic myofibroblasts promote the progression of human cholangiocarcinoma through activation of epidermal growth factor receptor*. *Hepatology*, 2013. **58**(6): p. 2001-11.
59. Claperon, A., et al., *EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition*. *J Hepatol*, 2014. **61**(2): p. 325-32.
60. Yoshikawa, D., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(2): p. 418-25.
61. Yoon, J.H., et al., *Enhanced epidermal growth factor receptor activation in human cholangiocarcinoma cells*. *J Hepatol*, 2004. **41**(5): p. 808-14.
62. Terada, T., Y. Nakanuma, and A.E. Sirica, *Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis*. *Hum Pathol*, 1998. **29**(2): p. 175-80.
63. Sia, D., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies*. *Oncogene*, 2013.
64. Lozano, E., et al., *Cocarcinogenic effects of intrahepatic bile acid accumulation in cholangiocarcinoma development*. *Mol Cancer Res*, 2014. **12**(1): p. 91-100.
65. Werneburg, N.W., et al., *Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. **285**(1): p. G31-6.
66. Dai, J., et al., *Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR*. *J Hematol Oncol*, 2011. **4**: p. 41.
67. Liu, R., et al., *Conjugated bile acids promote cholangiocarcinoma cell invasive growth through activation of sphingosine 1-phosphate receptor 2*. *Hepatology*, 2014. **60**(3): p. 908-18.
68. Maroni, L., G. Alpini, and M. Marzioni, *Cholangiocarcinoma development: the resurgence of bile acids*. *Hepatology*, 2014. **60**(3): p. 795-7.
69. Sekiya, S. and A. Suzuki, *Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(11): p. 3914-8.
70. Huntzicker, E.G., et al., *Differential effects of targeting Notch receptors in a mouse model of liver cancer*. *Hepatology*, 2015. **61**(3): p. 942-52.
71. Fingas, C.D., et al., *Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells*. *Hepatology*, 2011. **54**(6): p. 2076-88.
72. Razumilava, N., et al., *Non-canonical Hedgehog signaling contributes to chemotaxis in cholangiocarcinoma*. *J Hepatol*, 2014. **60**(3): p. 599-605.
73. Sia, D., et al., *Integrative Molecular Analysis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Reveals 2 Classes That Have Different Outcomes*. *Gastroenterology*, 2013.
74. Wehbe, H., et al., *Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression*. *Cancer Res*, 2006. **66**(21): p. 10517-24.
75. Sato, Y., et al., *Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma*. *Am J Pathol*, 2010. **177**(1): p. 141-52.
76. Yoon, J.H., et al., *Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line*. *Gastroenterology*, 2002. **122**(4): p. 985-93.

77. Sirica, A.E., et al., *Cyclooxygenase-2 and ERBB-2 in cholangiocarcinoma: potential therapeutic targets*. *Semin Liver Dis*, 2002. **22**(3): p. 303-13.
78. Yeh, C.N., et al., *Reappraisal of the therapeutic role of celecoxib in cholangiocarcinoma*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e69928.
79. Zhang, Z., G.H. Lai, and A.E. Sirica, *Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation*. *Hepatology*, 2004. **39**(4): p. 1028-37.
80. Sirica, A.E. and G.J. Gores, *Desmoplastic stroma and cholangiocarcinoma: clinical implications and therapeutic targeting*. *Hepatology*, 2014. **59**(6): p. 2397-402.
81. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 309-22.
82. Junttila, M.R. and F.J. de Sauvage, *Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 346-54.
83. Sulpice, L., et al., *Molecular profiling of stroma identifies osteopontin as an independent predictor of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma*. *Hepatology*, 2013. **58**(6): p. 1992-2000.
84. Sirica, A.E., *The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **9**(1): p. 44-54.
85. Cadamuro, M., et al., *Platelet-derived growth factor-D and Rho GTPases regulate recruitment of cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma*. *Hepatology*, 2013. **58**(3): p. 1042-53.
86. Gentilini, A., et al., *Role of the stromal-derived factor-1 (SDF-1)-CXCR4 axis in the interaction between hepatic stellate cells and cholangiocarcinoma*. *J Hepatol*, 2012. **57**(4): p. 813-20.
87. Okabe, H., et al., *Identification of CXCL5/ENA-78 as a factor involved in the interaction between cholangiocarcinoma cells and cancer-associated fibroblasts*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(10): p. 2234-41.
88. Kim, Y., et al., *Hedgehog signaling between cancer cells and hepatic stellate cells in promoting cholangiocarcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2014. **21**(8): p. 2684-98.
89. Chuaysri, C., et al., *Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma*. *Oncol Rep*, 2009. **21**(4): p. 957-69.
90. Mertens, J.C., et al., *Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 897-907.
91. Subimerb, C., et al., *Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma*. *Mol Med Rep*, 2010. **3**(4): p. 597-605.
92. Hasita, H., et al., *Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(8): p. 1913-9.
93. Loilome, W., et al., *Activated macrophages promote Wnt/beta-catenin signaling in cholangiocarcinoma cells*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(6): p. 5357-67.
94. Bridgewater, J., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma*. *J Hepatol*, 2014. **60**(6): p. 1268-89.
95. Alvaro, D., et al., *Cholangiocarcinoma in Italy: A national survey on clinical characteristics, diagnostic modalities and treatment. Results from the "Cholangiocarcinoma" committee of the Italian Association for the Study of Liver disease*. *Dig Liver Dis*, 2011. **43**(1): p. 60-5.

96. Navaneethan, U., et al., *Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis*. *Gastrointest Endosc*, 2015. **81**(1): p. 168-76.
97. Arbelaiz, A., et al., *Serum extracellular vesicles contain protein biomarkers for primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma*. *Hepatology*, 2017. **66**(4): p. 1125-1143.
98. Rosen, C.B., J.K. Heimbach, and G.J. Gores, *Liver transplantation for cholangiocarcinoma*. *Transpl Int*, 2010. **23**(7): p. 692-7.
99. Khan, S.A., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update*. *Gut*, 2012. **61**(12): p. 1657-69.
100. Martin, R.C., 2nd, et al., *Cost comparison of endoscopic stenting vs surgical treatment for unresectable cholangiocarcinoma*. *Surg Endosc*, 2002. **16**(4): p. 667-70.
101. Tsukiyama, I., et al., *A Cost-Effectiveness Analysis of Gemcitabine plus Cisplatin Versus Gemcitabine Alone for Treatment of Advanced Biliary Tract Cancer in Japan*. *J Gastrointest Cancer*, 2017. **48**(4): p. 326-332.
102. Valle, J.W., et al., *Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(2): p. 391-8.
103. Valle, J., et al., *Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **362**(14): p. 1273-81.
104. Lamarca, A., et al., *Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(12): p. 2328-38.
105. Rizvi, S., et al., *Cholangiocarcinoma: molecular pathways and therapeutic opportunities*. *Semin Liver Dis*, 2014. **34**(4): p. 456-64.
106. Yao, L., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Upregulate 15-PGDH Expression in Cholangiocarcinoma Cells by Inhibiting miR-26a/b Expression*. *Cancer Res*, 2015. **75**(7): p. 1388-98.
107. Zhang, J., et al., *miR-21 Inhibition Reduces Liver Fibrosis and Prevents Tumor Development by Inducing Apoptosis of CD24+ Progenitor Cells*. *Cancer Res*, 2015. **75**(9): p. 1859-67.
108. Saborowski, A., et al., *Mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma validates FIG-ROS as a potent fusion oncogene and therapeutic target*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(48): p. 19513-8.
109. Wu, Y.M., et al., *Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(6): p. 636-47.
110. Philip, P.A., et al., *Phase II study of erlotinib in patients with advanced biliary cancer*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2006. **24**(19): p. 3069-74.
111. Lubner, S.J., et al., *Report of a multicenter phase II trial testing a combination of biweekly bevacizumab and daily erlotinib in patients with unresectable biliary cancer: a phase II Consortium study*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2010. **28**(21): p. 3491-7.
112. Lee, J., et al., *Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study*. *The lancet oncology*, 2012. **13**(2): p. 181-8.
113. Adeva, J., et al., *Medical treatment for cholangiocarcinoma*. *Liver Int*, 2019. **39 Suppl 1**: p. 123-142.
114. Larkin, J., F.S. Hodi, and J.D. Wolchok, *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(13): p. 1270-1.

115. Claperon, A., et al., *Loss of EBP50 stimulates EGFR activity to induce EMT phenotypic features in biliary cancer cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(11): p. 1376-88.
116. Pellat, A., J. Vaquero, and L. Fouassier, *Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology*. *Hepatology*, 2017.
117. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 99-110.
118. Jorissen, R.N., et al., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 31-53.
119. Roskoski, R., Jr., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. *Pharmacol Res*, 2014. **79**: p. 34-74.
120. Imai, K. and A. Takaoka, *Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(9): p. 714-27.
121. Fouassier, L., et al., *Signalling networks in cholangiocarcinoma: Molecular pathogenesis, targeted therapies and drug resistance*. *Liver Int*, 2019. **39 Suppl 1**: p. 43-62.
122. Kiguchi, K., *Molecular aspects of cholangiocarcinoma*. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2014. **21**(6): p. 371-9.
123. Scaltriti, M. and J. Baselga, *The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(18): p. 5268-72.
124. Zhang, Z., et al., *EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology*. *Oncotarget*, 2010. **1**(7): p. 497-514.
125. Ruppert, A.M., et al., *[A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway]*. *Rev Mal Respir*, 2011. **28**(4): p. 565-77.
126. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *The EGF receptor family as targets for cancer therapy*. *Oncogene*, 2000. **19**(56): p. 6550-65.
127. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. *Cell*, 1996. **87**(4): p. 619-28.
128. Goldman, C.K., et al., *Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(1): p. 121-33.
129. Gazzeri, S., *[Nuclear EGFR: a new mode of oncogenic signalling in cancer]*. *Biol Aujourdhui*, 2018. **212**(1-2): p. 27-33.
130. Moscatello, D.K., et al., *Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors*. *Cancer Res*, 1995. **55**(23): p. 5536-9.
131. Sharma, S.V., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(3): p. 169-81.
132. Gwak, G.Y., et al., *Detection of response-predicting mutations in the kinase domain of the epidermal growth factor receptor gene in cholangiocarcinomas*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005. **131**(10): p. 649-52.
133. Chang, Y.T., et al., *Clinicopathological and prognostic significances of EGFR, KRAS and BRAF mutations in biliary tract carcinomas in Taiwan*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014. **29**(5): p. 1119-25.
134. Leone, F., et al., *Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in bile duct and gallbladder carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(6): p. 1680-5.
135. Simbolo, M., et al., *Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups*. *Oncotarget*, 2014. **5**(9): p. 2839-52.

136. Kobayashi, S., et al., *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 786-92.
137. Jang, S., et al., *High throughput molecular profiling reveals differential mutation patterns in intrahepatic cholangiocarcinomas arising in chronic advanced liver diseases*. Mod Pathol, 2014. **27**(5): p. 731-9.
138. Shafizadeh, N., et al., *Epidermal growth factor receptor and HER-2/neu status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization in adenocarcinomas of the biliary tree and gallbladder*. Hum Pathol, 2010. **41**(4): p. 485-92.
139. Kwak, E.L., et al., *Phase 2 trial of afatinib, an ErbB family blocker, in solid tumors genetically screened for target activation*. Cancer, 2013. **119**(16): p. 3043-51.
140. Zhang, Z., et al., *Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy*. Hepatology, 2010. **52**(3): p. 975-86.
141. Pignochino, Y., et al., *Targeting EGFR/HER2 pathways enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in biliary tract and gallbladder carcinomas*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 631.
142. Cavalloni, G., et al., *Preclinical activity of EGFR and MEK1/2 inhibitors in the treatment of biliary tract carcinoma*. Oncotarget, 2016. **7**(32): p. 52354-52363.
143. Herberger, B., et al., *Simultaneous blockade of the epidermal growth factor receptor/mammalian target of rapamycin pathway by epidermal growth factor receptor inhibitors and rapamycin results in reduced cell growth and survival in biliary tract cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(6): p. 1547-56.
144. Yoshikawa, D., et al., *Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signalling, as a novel molecular-targeted therapy against cholangiocarcinoma*. Br J Cancer, 2009. **100**(8): p. 1257-66.
145. Ferraro, D., et al., *TACTIC: a multicentre, open-label, single-arm phase II trial of panitumumab, cisplatin, and gemcitabine in biliary tract cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2016. **78**(2): p. 361-7.
146. Kim, S.T., et al., *Molecular Subgroup Analysis of Clinical Outcomes in a Phase 3 Study of Gemcitabine and Oxaliplatin with or without Erlotinib in Advanced Biliary Tract Cancer*. Transl Oncol, 2015. **8**(1): p. 40-6.
147. Ramanathan, R.K., et al., *A phase II study of lapatinib in patients with advanced biliary tree and hepatocellular cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2009. **64**(4): p. 777-83.
148. Goff, L.W., et al., *A phase I trial investigating pulsatile erlotinib in combination with gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract cancers*. Invest New Drugs, 2017. **35**(1): p. 95-104.
149. Hezel, A.F., V. Deshpande, and A.X. Zhu, *Genetics of biliary tract cancers and emerging targeted therapies*. J Clin Oncol, 2010. **28**(21): p. 3531-40.
150. Liu, Q., et al., *EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 53.
151. Andersen, J.B., *Molecular pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015. **22**(2): p. 101-13.
152. Chong, D.Q. and A.X. Zhu, *The landscape of targeted therapies for cholangiocarcinoma: current status and emerging targets*. Oncotarget, 2016. **7**(29): p. 46750-46767.
153. Riely, G.J., et al., *Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(18): p. 5731-4.

154. Bos, J.L., *The ras gene family and human carcinogenesis*. Mutat Res, 1988. **195**(3): p. 255-71.
155. Chen, T.C., Y.Y. Jan, and T.S. Yeh, *K-ras mutation is strongly associated with perineural invasion and represents an independent prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma after hepatectomy*. Ann Surg Oncol, 2012. **19 Suppl 3**: p. S675-81.
156. Malka, D., et al., *Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(8): p. 819-28.
157. Tannapfel, A., et al., *Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma*. Gut, 2003. **52**(5): p. 706-12.
158. Hyman, D.M., et al., *Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations*. N Engl J Med, 2015. **373**(8): p. 726-36.
159. Loaiza-Bonilla, A., et al., *Dramatic response to dabrafenib and trametinib combination in a BRAF V600E-mutated cholangiocarcinoma: implementation of a molecular tumour board and next-generation sequencing for personalized medicine*. Ecancermedalscience, 2014. **8**: p. 479.
160. Lavingia, V. and M. Fakih, *Impressive response to dual BRAF and MEK inhibition in patients with BRAF mutant intrahepatic cholangiocarcinoma-2 case reports and a brief review*. J Gastrointest Oncol, 2016. **7**(6): p. E98-E102.
161. Robert, C., et al., *Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib*. N Engl J Med, 2015. **372**(1): p. 30-9.
162. Bekaii-Saab, T., et al., *Multi-institutional phase II study of selumetinib in patients with metastatic biliary cancers*. J Clin Oncol, 2011. **29**(17): p. 2357-63.
163. Prado, C.M., et al., *Skeletal muscle anabolism is a side effect of therapy with the MEK inhibitor: selumetinib in patients with cholangiocarcinoma*. Br J Cancer, 2012. **106**(10): p. 1583-6.
164. Gherardi, E., et al., *Targeting MET in cancer: rationale and progress*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(2): p. 89-103.
165. Miyamoto, M., et al., *Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 131-8.
166. Valle, J.W., et al., *New Horizons for Precision Medicine in Biliary Tract Cancers*. Cancer Discov, 2017. **7**(9): p. 943-962.
167. Menakongka, A. and T. Suthiphongchai, *Involvement of PI3K and ERK1/2 pathways in hepatocyte growth factor-induced cholangiocarcinoma cell invasion*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(6): p. 713-22.
168. Ross, J.S., et al., *New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing*. Oncologist, 2014. **19**(3): p. 235-42.
169. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
170. Goyal, L., et al., *A phase 2 and biomarker study of cabozantinib in patients with advanced cholangiocarcinoma*. Cancer, 2017. **123**(11): p. 1979-1988.
171. Khandwala, H.M., et al., *The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth*. Endocr Rev, 2000. **21**(3): p. 215-44.
172. Favoni, R.E. and A. de Cupis, *The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(2): p. 179-206.

173. Benabou, E., et al., *Insulin receptor isoform A favors tumor progression in human hepatocellular carcinoma by increasing stem/progenitor cell features*. *Cancer Lett*, 2019. **450**: p. 155-168.
174. Chettouh, H., et al., *Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors*. *Cancer Res*, 2013. **73**(13): p. 3974-86.
175. Le Roith, D. and A.A. Butler, *Insulin-like growth factors in pediatric health and disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(12): p. 4355-61.
176. Combettes-Souverain, M. and T. Issad, *Molecular basis of insulin action*. *Diabetes Metab*, 1998. **24**(6): p. 477-89.
177. Frasca, F., et al., *Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(5): p. 3278-88.
178. Garrouste, F.L., et al., *Up-regulation of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors during differentiation of HT29-D4 human colonic carcinoma cells*. *Endocrinology*, 1997. **138**(5): p. 2021-32.
179. Belfiore, A., et al., *Insulin/IGF-I hybrid receptors play a major role in IGF-I signaling in thyroid cancer*. *Biochimie*, 1999. **81**(4): p. 403-7.
180. Pandini, G., et al., *Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(7): p. 1935-44.
181. Pollak, M., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(12): p. 915-28.
182. Vazquez-Martin, A., et al., *IGF-1R/epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) crosstalk suppresses the erlotinib-sensitizing effect of EGFR exon 19 deletion mutations*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2560.
183. Morgillo, F., et al., *Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib*. *Cancer Res*, 2006. **66**(20): p. 10100-11.
184. Morgillo, F., et al., *Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(9): p. 2795-803.
185. Lee, Y., et al., *Inhibition of IGF1R signaling abrogates resistance to afatinib (BIBW2992) in EGFR T790M mutant lung cancer cells*. *Mol Carcinog*, 2016. **55**(5): p. 991-1001.
186. Park, J.H., et al., *Activation of the IGF1R pathway potentially mediates acquired resistance to mutant-selective 3rd-generation EGF receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(16): p. 22005-15.
187. Choi, Y.J., et al., *Combined inhibition of IGFR enhances the effects of gefitinib in H1650: a lung cancer cell line with EGFR mutation and primary resistance to EGFR-TK inhibitors*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010. **66**(2): p. 381-8.
188. Hurbin, A., et al., *Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma*. *J Pathol*, 2011. **225**(1): p. 83-95.
189. Vaquero, J., et al., *The IGF2/IR/IGF1R Pathway in Tumor Cells and Myofibroblasts Mediates Resistance to EGFR Inhibition in Cholangiocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2018. **24**(17): p. 4282-4296.
190. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(2): p. 131-42.

191. Aroeira, L.S., et al., *Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(7): p. 2004-13.
192. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
193. Berx, G., et al., *Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer*. Clin Exp Metastasis, 2007. **24**(8): p. 587-97.
194. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
195. Nakaya, Y. and G. Sheng, *Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view*. Dev Growth Differ, 2008. **50**(9): p. 755-66.
196. Demir, A.Y., et al., *Menstrual effluent induces epithelial-mesenchymal transitions in mesothelial cells*. Hum Reprod, 2004. **19**(1): p. 21-9.
197. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
198. Radisky, D.C., P.A. Kenny, and M.J. Bissell, *Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?* J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 830-9.
199. Rastaldi, M.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 137-46.
200. Moreno-Bueno, G., et al., *Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9543-56.
201. Spaderna, S., et al., *A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer*. Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 830-40.
202. Vaquero, J., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma: From clinical evidence to regulatory networks*. J Hepatol, 2017. **66**(2): p. 424-441.
203. Zavadil, J. and E.P. Bottinger, *TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
204. Peinado, H., M. Quintanilla, and A. Cano, *Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 21113-23.
205. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
206. De Craene, B. and G. Berx, *Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 97-110.
207. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
208. Nieto, M.A., *The snail superfamily of zinc-finger transcription factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(3): p. 155-66.
209. Massari, M.E. and C. Murre, *Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 429-40.
210. Postigo, A.A., et al., *Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins*. EMBO J, 2003. **22**(10): p. 2453-62.
211. Van de Putte, T., et al., *Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of*

- Hirschsprung disease-mental retardation syndrome*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 465-70.
212. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
213. Magee, J.A., E. Piskounova, and S.J. Morrison, *Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 283-96.
214. Prabavathy, D., Y. Swarnalatha, and N. Ramadoss, *Lung cancer stem cells-origin, characteristics and therapy*. Stem Cell Investig, 2018. **5**: p. 6.
215. Morel, A.P., et al., *Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2888.
216. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
217. Ghuwalewala, S., et al., *CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Stem Cell Res, 2016. **16**(2): p. 405-17.
218. Rhim, A.D., et al., *EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 349-61.
219. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1487-95.
220. Dang, H., et al., *Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 396.
221. Shuang, Z.Y., et al., *Transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition generates ALDH-positive cells with stem cell properties in cholangiocarcinoma*. Cancer Lett, 2014. **354**(2): p. 320-8.
222. Duangkumpha, K., et al., *BMP-7 blocks the effects of TGF-beta-induced EMT in cholangiocarcinoma*. Tumour Biol, 2014. **35**(10): p. 9667-76.
223. Terashita, K., et al., *ZEB1 expression is associated with prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma*. J Clin Pathol, 2016. **69**(7): p. 593-9.
224. Reichl, P., et al., *TGF-beta in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(27): p. 4135-47.
225. Chen, Y., et al., *TGF-beta1 expression is associated with invasion and metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma*. Biol Res, 2015. **48**: p. 26.
226. Nitta, T., et al., *Prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition-related markers in extrahepatic cholangiocarcinoma: comprehensive immunohistochemical study using a tissue microarray*. Br J Cancer, 2014. **111**(7): p. 1363-72.
227. Yang, H., et al., *FBXW7 suppresses epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastatic potential of cholangiocarcinoma cells*. Oncotarget, 2015. **6**(8): p. 6310-25.
228. Hirose, A., et al., *Low-dose paclitaxel inhibits the induction of epidermal-mesenchymal transition in the human cholangiocarcinoma CCKS-1 cell line*. Oncol Lett, 2013. **6**(4): p. 915-920.
229. Lu, Z., et al., *FTY720 inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma by inactivating STAT3 signaling*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 783.
230. Samatov, T.R., A.G. Tonevitsky, and U. Schumacher, *Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds*. Mol Cancer, 2013. **12**(1): p. 107.
231. Cardinale, V., et al., *Profiles of cancer stem cell subpopulations in cholangiocarcinomas*. Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1724-39.

232. Yamashita, T. and X.W. Wang, *Cancer stem cells in the development of liver cancer*. J Clin Invest, 2013. **123**(5): p. 1911-8.
233. Ren, S., et al., *Epithelial phenotype as a predictive marker for response to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer patients with wild-type EGFR*. Int J Cancer, 2014. **135**(12): p. 2962-71.
234. Yauch, R.L., et al., *Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8686-98.
235. Schmitz, S., et al., *Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(33): p. 34288-99.
236. Yao, Z., et al., *TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15535-40.
237. Shien, K., et al., *Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells*. Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 3051-61.
238. Yoshida, T., et al., *Podoplanin-positive cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment induce primary resistance to EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma with EGFR mutation*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(3): p. 642-51.
239. Yamada, T., et al., *Paracrine receptor activation by microenvironment triggers bypass survival signals and ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer cells*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(13): p. 3592-602.
240. Boeckx, C., et al., *The hypoxic tumor microenvironment and drug resistance against EGFR inhibitors: preclinical study in cetuximab-sensitive head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. BMC Res Notes, 2015. **8**: p. 203.
241. Romano, M., et al., *Tumor Microenvironment Versus Cancer Stem Cells in Cholangiocarcinoma: Synergistic Effects?* J Cell Physiol, 2016. **231**(4): p. 768-76.
242. Johansson, A.C., et al., *Cancer-associated fibroblasts induce matrix metalloproteinase-mediated cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(9): p. 1158-68.
243. Choe, C., et al., *Crosstalk with cancer-associated fibroblasts induces resistance of non-small cell lung cancer cells to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 3665-78.
244. Funahashi, J., et al., *Identification of nuclear factor delta EF1 and its binding site essential for lens-specific activity of the delta 1-crystallin enhancer*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(13): p. 3543-7.
245. Funahashi, J., et al., *Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis*. Development, 1993. **119**(2): p. 433-46.
246. Shargh, S.A., et al., *Downregulation of E-cadherin expression in breast cancer by promoter hypermethylation and its relation with progression and prognosis of tumor*. Med Oncol, 2014. **31**(11): p. 250.
247. Caramel, J., M. Ligier, and A. Puisieux, *Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer*. Cancer Res, 2018. **78**(1): p. 30-35.
248. Zhang, P., Y. Sun, and L. Ma, *ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance*. Cell Cycle, 2015. **14**(4): p. 481-7.

249. Kalra, R.S., et al., *CARF enrichment promotes epithelial-mesenchymal transition via Wnt/beta-catenin signaling: its clinical relevance and potential as a therapeutic target*. *Oncogenesis*, 2018. **7**(5): p. 39.
250. Cong, N., et al., *Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the wnt/beta-catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(4): p. 1579-87.
251. Yang, X., et al., *Wnt signaling through Snail1 and Zeb1 regulates bone metastasis in lung cancer*. *Am J Cancer Res*, 2015. **5**(2): p. 748-55.
252. Moon, Y.W., et al., *LAMC2 enhances the metastatic potential of lung adenocarcinoma*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(8): p. 1341-52.
253. Hiendlmeyer, E., et al., *Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors*. *Cancer Res*, 2004. **64**(4): p. 1209-14.
254. Sanchez-Tillo, E., et al., *ZEB1 Promotes invasiveness of colorectal carcinoma cells through the opposing regulation of uPA and PAI-1*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(5): p. 1071-82.
255. Fang, B., *RAS signaling and anti-RAS therapy: lessons learned from genetically engineered mouse models, human cancer cells, and patient-related studies*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016. **48**(1): p. 27-38.
256. Han, Y., et al., *Hepatocyte growth factor increases the invasive potential of PC-3 human prostate cancer cells via an ERK/MAPK and Zeb-1 signaling pathway*. *Oncol Lett*, 2016. **11**(1): p. 753-759.
257. Zhong, X., et al., *Suppression of MicroRNA 200 Family Expression by Oncogenic KRAS Activation Promotes Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition in KRAS-Driven Cancer*. *Mol Cell Biol*, 2016. **36**(21): p. 2742-2754.
258. Pickup, M., S. Novitskiy, and H.L. Moses, *The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(11): p. 788-99.
259. Joseph, J.V., et al., *TGF-beta is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1443.
260. Agajanian, M., F. Runa, and J.A. Kelber, *Identification of a PEAK1/ZEB1 signaling axis during TGFbeta/fibronectin-induced EMT in breast cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **465**(3): p. 606-12.
261. Larsen, J.E., et al., *ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(9): p. 3219-35.
262. Xu, W., Z. Yang, and N. Lu, *A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition*. *Cell Adh Migr*, 2015. **9**(4): p. 317-24.
263. Schmalhofer, O., S. Brabletz, and T. Brabletz, *E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(1-2): p. 151-66.
264. Liu, L.Z., et al., *Protein tyrosine phosphatase PTP4A1 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma via the PI3K/AKT pathway*. *Oncotarget*, 2016. **7**(46): p. 75210-75220.
265. Aigner, K., et al., *The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity*. *Oncogene*, 2007. **26**(49): p. 6979-88.
266. Okegawa, T., et al., *Cell adhesion proteins as tumor suppressors*. *J Urol*, 2002. **167**(4): p. 1836-43.

267. Wellner, U., T. Brabletz, and T. Keck, *ZEB1 in Pancreatic Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2010. **2**(3): p. 1617-28.
268. Bronsert, P., et al., *Prognostic significance of Zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) expression in cancer cells and cancer-associated fibroblasts in pancreatic head cancer*. *Surgery*, 2014. **156**(1): p. 97-108.
269. Shen, A., et al., *Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma*. *J Surg Oncol*, 2012. **105**(8): p. 830-4.
270. Zhang, J., et al., *Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(2): p. 949-56.
271. Matsubara, D., et al., *Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer*. *Pathol Int*, 2014. **64**(11): p. 560-8.
272. Zhou, Y.M., et al., *Clinicopathological significance of ZEB1 protein in patients with hepatocellular carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2012. **19**(5): p. 1700-6.
273. Okugawa, Y., et al., *Clinical significance of Zinc finger E-box Binding homeobox 1 (ZEB1) in human gastric cancer*. *J Surg Oncol*, 2012. **106**(3): p. 280-5.
274. Jia, B., et al., *Overexpression of ZEB1 associated with metastasis and invasion in patients with gastric carcinoma*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **366**(1-2): p. 223-9.
275. Zhang, G.J., et al., *High expression of ZEB1 correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer*. *Oncol Lett*, 2013. **5**(2): p. 564-568.
276. Eger, A., et al., *DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(14): p. 2375-85.
277. Maturi, V., et al., *Genome-wide binding of transcription factor ZEB1 in triple-negative breast cancer cells*. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(10): p. 7113-7127.
278. Ahn, Y.H., et al., *ZEB1 drives prometastatic actin cytoskeletal remodeling by downregulating miR-34a expression*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(9): p. 3170-83.
279. Suzuki, K., et al., *Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade*. *Oncol Lett*, 2018. **16**(2): p. 1758-1764.
280. Li, X., et al., *GATA3 acetylation at K119 by CBP inhibits cell migration and invasion in lung adenocarcinoma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **497**(2): p. 633-638.
281. Sahay, D., et al., *The LPA1/ZEB1/miR-21-activation pathway regulates metastasis in basal breast cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(24): p. 20604-20.
282. Harb, O.A., et al., *SPOP, ZEB-1 and E-cadherin expression in clear cell renal cell carcinoma (cc-RCC): Clinicopathological and prognostic significance*. *Pathophysiology*, 2018. **25**(4): p. 335-345.
283. Karihtala, P., et al., *Vimentin, zeb1 and Sip1 are up-regulated in triple-negative and basal-like breast cancers: association with an aggressive tumour phenotype*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **138**(1): p. 81-90.
284. Su, L., et al., *MEF2D Transduces Microenvironment Stimuli to ZEB1 to Promote Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer*. *Cancer Res*, 2016. **76**(17): p. 5054-67.
285. Di Leva, G., M. Garofalo, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 287-314.
286. Tian, Y., et al., *MicroRNA-200 (miR-200) cluster regulation by achaete scute-like 2 (Ascl2): impact on the epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(52): p. 36101-15.
287. Tsai, S.C., et al., *The miR-200b-ZEB1 circuit regulates diverse stemness of human hepatocellular carcinoma*. *Mol Carcinog*, 2017. **56**(9): p. 2035-2047.

288. Chen, J., et al., *Fas signaling induces stemness properties in colorectal cancer by regulation of Bmi1*. Mol Carcinog, 2017. **56**(10): p. 2267-2278.
289. Morel, A.P., et al., *A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability*. Nat Med, 2017. **23**(5): p. 568-578.
290. Preca, B.T., et al., *A self-enforcing CD44s/ZEB1 feedback loop maintains EMT and stemness properties in cancer cells*. Int J Cancer, 2015. **137**(11): p. 2566-77.
291. Murai, T., et al., *Engagement of CD44 promotes Rac activation and CD44 cleavage during tumor cell migration*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4541-50.
292. Dupont, C., D.R. Armant, and C.A. Brenner, *Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(5): p. 351-7.
293. Lazarova, D. and M. Bordonaro, *ZEB1 Mediates Drug Resistance and EMT in p300-Deficient CRC*. J Cancer, 2017. **8**(8): p. 1453-1459.
294. Ichikawa, K., et al., *MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP*. Mol Cell, 2015. **58**(1): p. 35-46.
295. Aghdassi, A., et al., *Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer*. Gut, 2012. **61**(3): p. 439-48.
296. Liao, W., et al., *Effect of epigenetic histone modifications on E-cadherin splicing and expression in lung cancer*. Am J Cancer Res, 2013. **3**(4): p. 374-89.
297. Roche, J., et al., *Global Decrease of Histone H3K27 Acetylation in ZEB1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells*. Cancers (Basel), 2013. **5**(2): p. 334-56.
298. Zhang, J., et al., *ZEB1 induces ER-alpha promoter hypermethylation and confers antiestrogen resistance in breast cancer*. Cell Death Dis, 2017. **8**(4): p. e2732.
299. Qin, Y., et al., *An hTERT/ZEB1 complex directly regulates E-cadherin to promote epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(1): p. 351-61.
300. Hou, L., et al., *SET8 induces epithelial-mesenchymal transition and enhances prostate cancer cell metastasis by cooperating with ZEB1*. Mol Med Rep, 2016. **13**(2): p. 1681-8.
301. Liu, Y., et al., *Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence*. Development, 2008. **135**(3): p. 579-88.
302. Gao, Y., et al., *The dual function of PRMT1 in modulating epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence in breast cancer cells through regulation of ZEB1*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19874.
303. de Barrios, O., et al., *ZEB1-induced tumorigenesis requires senescence inhibition via activation of DKK1/mutant p53/Mdm2/CtBP and repression of macroH2A1*. Gut, 2017. **66**(4): p. 666-682.
304. Wang, C., et al., *Targeted p53 activation by saRNA suppresses human bladder cancer cells growth and metastasis*. J Exp Clin Cancer Res, 2016. **35**: p. 53.
305. Ohashi, S., et al., *Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors*. Cancer Res, 2010. **70**(10): p. 4174-84.
306. Zhang, J., et al., *Down-regulation of FBP1 by ZEB1-mediated repression confers to growth and invasion in lung cancer cells*. Mol Cell Biochem, 2016. **411**(1-2): p. 331-40.

307. Chen, L., et al., *Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5241.
308. Katsura, A., et al., *ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells*. Mol Oncol, 2017. **11**(9): p. 1241-1262.
309. Baumann, M., M. Krause, and R. Hill, *Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(7): p. 545-54.
310. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(10): p. 714-26.
311. Holderfield, M., et al., *Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(7): p. 455-67.
312. Camidge, D.R., W. Pao, and L.V. Sequist, *Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(8): p. 473-81.
313. Shibue, T. and R.A. Weinberg, *EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(10): p. 611-629.
314. Zhang, P., et al., *ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(9): p. 864-75.
315. Hijosa-Valsero, M., R. Molina, and J.M. Bayona, *Assessment of a dielectric barrier discharge plasma reactor at atmospheric pressure for the removal of bisphenol A and tributyltin*. Environ Technol, 2014. **35**(9-12): p. 1418-26.
316. Zhang, X., et al., *ZEB1 confers chemotherapeutic resistance to breast cancer by activating ATM*. Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 57.
317. McNeely, S., R. Beckmann, and A.K. Bence Lin, *CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2014. **142**(1): p. 1-10.
318. Liu, W., et al., *Inhibition of TBK1 attenuates radiation-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 human lung cancer cells via activation of GSK-3beta and repression of ZEB1*. Lab Invest, 2014. **94**(4): p. 362-70.
319. Chen, W., et al., *Effect of AKT inhibition on epithelial-mesenchymal transition and ZEB1-potentiated radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma*. Oncol Lett, 2013. **6**(5): p. 1234-1240.
320. Zhang, P., et al., *miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5671.
321. Hanrahan, K., et al., *The role of epithelial-mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer*. Mol Oncol, 2017. **11**(3): p. 251-265.
322. Wang, Z., et al., *Novel crosstalk between KLF4 and ZEB1 regulates gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Int J Oncol, 2017. **51**(4): p. 1239-1248.
323. Siebzehnrubl, F.A., et al., *The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(8): p. 1196-212.
324. Arumugam, T., et al., *Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5820-8.
325. Ren, J., et al., *Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line*. J Cell Biochem, 2013. **114**(6): p. 1395-403.
326. Bai, W.D., et al., *MiR-200c suppresses TGF-beta signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer*. Int J Cancer, 2014. **135**(6): p. 1356-68.

327. Meidhof, S., et al., *ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat*. EMBO Mol Med, 2015. **7**(6): p. 831-47.
328. Haddad, Y., W. Choi, and D.J. McConkey, *Delta-crystallin enhancer binding factor 1 controls the epithelial to mesenchymal transition phenotype and resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in human head and neck squamous cell carcinoma lines*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(2): p. 532-42.
329. Richard, G., et al., *ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(10): p. 1143-1161.
330. Pellat, A., J. Vaquero, and L. Fouassier, *Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology*. Hepatology, 2018. **67**(2): p. 762-773.
331. Zheng, H. and Y. Kang, *Multilayer control of the EMT master regulators*. Oncogene, 2014. **33**(14): p. 1755-63.
332. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
333. Eun, K., S.W. Ham, and H. Kim, *Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting*. BMB Rep, 2017. **50**(3): p. 117-125.
334. Chen, J.S., et al., *A KRAS mutation status-stratified randomized phase II trial of gemcitabine and oxaliplatin alone or in combination with cetuximab in advanced biliary tract cancer*. Ann Oncol, 2015. **26**(5): p. 943-9.
335. Gruenberger, B., et al., *Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study*. The lancet oncology, 2010. **11**(12): p. 1142-8.
336. Leone, F., et al., *Panitumumab in combination with gemcitabine and oxaliplatin does not prolong survival in wild-type KRAS advanced biliary tract cancer: A randomized phase 2 trial (Vecti-BIL study)*. Cancer, 2016. **122**(4): p. 574-81.
337. Jimeno, A., et al., *Epidermal growth factor receptor dynamics influences response to epidermal growth factor receptor targeted agents*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3003-10.
338. Yoshida, T., et al., *ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147344.
339. Vermeulen, L., et al., *The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities*. Lancet Oncol, 2012. **13**(2): p. e83-9.
340. Moitra, K., H. Lou, and M. Dean, *Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(4): p. 491-502.
341. Fabregat, I., A. Malfettone, and J. Soukupova, *New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer*. J Clin Med, 2016. **5**(3).
342. Malaguarnera, R. and A. Belfiore, *The emerging role of insulin and insulin-like growth factor signaling in cancer stem cells*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 10.
343. Ma, Y., et al., *InsR/IGF1R Pathway Mediates Resistance to EGFR Inhibitors in Glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(7): p. 1767-76.
344. Desbois-Mouthon, C., et al., *Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2006. **119**(11): p. 2557-66.
345. Vigneri, P.G., et al., *The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 230.

346. Ireland, L., et al., *Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors*. *Cancer Res*, 2016. **76**(23): p. 6851-6863.
347. Ohashi, H., et al., *Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers*. *Cancer Sci*, 2012. **103**(2): p. 252-61.
348. Suda, K., et al., *The insulin-like growth factor 1 receptor causes acquired resistance to erlotinib in lung cancer cells with the wild-type epidermal growth factor receptor*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(4): p. 1002-6.
349. Corcoran, C., et al., *miR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer*. *Mol Cancer*, 2014. **13**: p. 71.
350. Li, X., et al., *Cetuximab-induced insulin-like growth factor receptor I activation mediates cetuximab resistance in gastric cancer cells*. *Mol Med Rep*, 2015. **11**(6): p. 4547-54.
351. Chen, W.J., et al., *Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3472.
352. Unger, C., et al., *Stromal-derived IGF2 promotes colon cancer progression via paracrine and autocrine mechanisms*. *Oncogene*, 2017. **36**(38): p. 5341-5355.
353. Svegliati-Baroni, G., et al., *Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways*. *Hepatology*, 1999. **29**(6): p. 1743-51.
354. Ocana, O.H., et al., *Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1*. *Cancer Cell*, 2012. **22**(6): p. 709-24.
355. Dong, C., et al., *Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(3): p. 316-31.
356. Cantor, J.R. and D.M. Sabatini, *Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(10): p. 881-98.
357. Dang, C.V., *Links between metabolism and cancer*. *Genes Dev*, 2012. **26**(9): p. 877-90.
358. Yuneva, M., *Finding an "Achilles' heel" of cancer: the role of glucose and glutamine metabolism in the survival of transformed cells*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(14): p. 2083-9.
359. Razungles, J., et al., *[The Warburg effect: from theory to therapeutic applications in cancer]*. *Med Sci (Paris)*, 2013. **29**(11): p. 1026-33.
360. Langer, E.M., et al., *ZEB1-repressed microRNAs inhibit autocrine signaling that promotes vascular mimicry of breast cancer cells*. *Oncogene*, 2018. **37**(8): p. 1005-1019.
361. Harney, A.S., et al., *Targeted inhibition of Snail family zinc finger transcription factors by oligonucleotide-Co(III) Schiff base conjugate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(33): p. 13667-72.

Titre : Rôle du facteur de transcription ZEB1 dans la progression et chimiorésistance du cholangiocarcinome

Résumé : ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1) est un facteur de transcription qui favorise l'invasion de la tumeur et les métastases en induisant une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans les cellules de carcinome. La TEM joue non seulement un rôle important dans le développement embryonnaire et la progression maligne, mais est également impliquée dans l'acquisition de propriétés des cellules souches cancéreuse (CSC) et la résistance aux traitements. L'objectif de ce travail était d'étudier l'implication de ZEB1 dans la progression et la chimiorésistance du CCA. Nos précédents travaux lors du premier article, ont montré une surexpression de ZEB1 dans les cellules résistantes au traitement anti-EGFR dans le CCA. Les données cliniques, ont révélé une expression de ZEB1 dans les échantillons humains de CCA et ont associé son expression à un mauvais pronostic. Pour les études in vitro, différents modèles d'études cellulaires ont été réalisés dans lesquels l'expression de ZEB1 a été soit invalidée, soit forcée. Les résultats ont montré l'implication de ZEB1 dans la plasticité cellulaire caractérisée par la mise en place d'un phénotype de TEM et de CSC dans les cellules exprimant ZEB1 par rapport aux cellules contrôles. Les modèles d'invalidation de ZEB1 ont montré une inhibition de ces processus. Par ailleurs, les analyses de viabilité cellulaire ont permis d'identifier ZEB1 comme un facteur de résistance au traitement anti-EGFR dans les modèles de CCA. Les modèles d'invalidation de ZEB1 ont montré une re-sensibilisation des cellules au traitement anti-EGFR. En conclusion, nous avons démontré dans cette étude que ZEB1 contribuerait à la plasticité cellulaire et à la chimiorésistance des cellules de CCA, faisant de lui une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le CCA.

Mots-clés : ZEB1, cholangiocarcinome, transition épithélio-mésenchymateuse, cellules souches tumorales, résistance

Title : Role of transcription factor ZEB1 in cholangiocarcinoma progression and chemoresistance

Abstract: ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1) is a transcription factor that promotes tumor invasion and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition (EMT) in carcinoma cells. EMT not only plays an important role in embryonic development and malignant progression, but is also implicated in acquisition of cancer stem cell properties and cancer therapy resistance. The aim of the study was to evaluate ZEB1 role in cholangiocarcinoma progression and chemoresistance. Our previous study in the first article showed ZEB1 overexpression in resistant cells to anti-EGFR treatment in CCA. Clinical data revealed ZEB1 expression in human tumor CCA samples and correlated its expression with a poor prognosis. To perform in vitro studies, different CCA cellular models were established, in which ZEB1 expression has been either invalidated or forced. We showed that ZEB1 regulates cellular plasticity characterized by an acquisition of TEM and CSC phenotypes in overexpressing ZEB1 cells. ZEB1 invalidation models showed a downregulation of these processes. In addition, cell viability analyzes identified ZEB1 as a resistance factor to anti-EGFR treatment in CCA models. ZEB1 inhibition models showed a cell re-sensitization to anti-EGFR treatment. In conclusion, we propose in this study that ZEB1 regulates CCA cells plasticity and chemoresistance, that could be a prime target in the development of new therapeutic strategies in CCA.

Keywords : ZEB1, Cholangiocarcinoma, epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells, resistance