



**HAL**  
open science

# Une nouvelle stratégie thérapeutique pour prolonger la réponse du cancer bronchique aux inhibiteurs d'EGFR en prévenant l'émergence des cellules résistantes

Lisa Brunet

► **To cite this version:**

Lisa Brunet. Une nouvelle stratégie thérapeutique pour prolonger la réponse du cancer bronchique aux inhibiteurs d'EGFR en prévenant l'émergence des cellules résistantes. Cancer. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR061 . tel-03676461

**HAL Id: tel-03676461**

**<https://theses.hal.science/tel-03676461v1>**

Submitted on 24 May 2022

**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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Une nouvelle stratégie thérapeutique pour prolonger la réponse  
du cancer bronchique aux inhibiteurs d'EGFR en prévenant  
l'émergence des cellules résistantes**

**Présentée et soutenue par  
LISA BRUNET**

**Thèse soutenue le 23/11/2021  
devant le jury composé de**

M. CHRISTIAN GAIDDON	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE STRASBOURG	Rapporteur du jury
MME CELINE GONGORA	DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE DE MONTPELLIER	Rapporteur du jury
M. YOUSSEF ANOUAR	DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME ZOULIKA KHERROUCHE	CHARGE DE RECHERCHE, UNIVERSITE DE LILLE	Membre du jury
MME ALEXANDRA MARTINS	CHARGE DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. LUCA GRUMOLATO	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par LUCA GRUMOLATO, DIFFERENCIATION ET COMMUNICATION  
NEURONALE ET NEUROENDOCRINE**









# Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la direction du Docteur Luca Grumolato, au sein du laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Unité INSERM 1239, dirigé par le Docteur Youssef Anouar.

Ces études ont été financées par une bourse de la Ligue contre le cancer de Normandie et de la Région Normandie et un contrat d'ATER (Université de Rouen Normandie) et ont également bénéficié de l'aide des organismes suivants :

- L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
- L'Université Rouen Normandie
- L'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB)
- L'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (ED nBISE)
- L'Institut National du Cancer (PLBIO2017)
- La Ligue contre le cancer, comité de Seine maritime
- La Fondation ARC
- L'Agence National de la Recherche (ANR)





### **Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse.**

Le Dr Céline GONGORA, Directeur de Recherche à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, et le Dr Christian GAIDDON, Directeur de Recherche à l'Inserm, Université de Strasbourg, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir être rapporteurs de ce travail. Je tiens à les remercier très sincèrement pour leur présence aujourd'hui et l'expertise qu'ils pourront apporter à nos travaux.

Un grand merci au Dr Alexandra MARTINS, Chargée de Recherche à l'Université de Rouen Normandie d'avoir bien voulu examiner ce manuscrit. Je la remercie sincèrement pour l'intérêt qu'elle témoigne à nos recherches.

Merci également au Dr Zoulika KHERROUCHE, Chargée de Recherche à l'Institut Pasteur de Lille, d'avoir bien voulu examiner ces travaux. Je lui signifie ici toute ma reconnaissance et la remercie chaleureusement pour sa collaboration à nos recherches.

Je remercie chaleureusement le Dr Youssef ANOUAR, Directeur de Recherche à l'Inserm et directeur du laboratoire DC2N de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir donné tous les moyens nécessaires à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail. Je tiens à lui témoigner ici toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée, pour ses encouragements et ses conseils dont j'ai bénéficié tout au long de la thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr Luca GRUMOLATO, mon directeur de thèse. Tout d'abord, merci pour la confiance que tu m'as accordée il y a 4 ans lorsque j'ai débuté cette thèse. Tu es un véritable modèle d'excellence et de rigueur scientifique. Tu as su m'encourager, en étant toujours à l'écoute, malgré un emploi du temps très chargé. Tu m'as également rassurée quand le doute me gagnait, en me disant de toujours aller de l'avant. Je te remercie chaleureusement du temps que tu as passé à me former, en me transmettant ta passion pour la recherche. Pendant ces 4 ans, tes conseils m'ont permis d'évoluer et d'acquérir des compétences qui me serviront à l'avenir.

### **Je voudrais remercier particulièrement nos collaborateurs.**

Ce travail a bénéficié de l'aide de nos collaborateurs français et étrangers de l'Institut Pasteur de Lille, du service des ressources biologiques de l'Université de Rouen, du Centre de Lutte contre le Cancer Eugène Marquis à Rennes, de l'Institut Icahn School of Medicine at Mount Sinai (New York, USA), de l'Oncological Institute Candiolo (Turin, Italie) et du Yonsei Cancer Center (Séoul, Corée du Sud).

### **Je voudrais ensuite remercier les membres (actuels et anciens) de notre petit groupe.**

Jiyoung, qui m'a supportée dans le bureau pendant ces 4 ans. Merci d'abord pour ton aide pour les manips, notamment pour les heures que tu as passé à faire de la BM pour mon projet de thèse. Merci également pour toutes nos discussions qui m'ont beaucoup aidée, tant sur le plan professionnel que personnel.

Alex, tout d'abord, merci pour ta disponibilité et tous les conseils et connaissances que tu m'as apportés. Les heures passées à l'animalerie, nos petites engueulades, nos blagues, nos rires... on a partagé pas mal de choses ces derniers mois...Merci d'avoir pris beaucoup de

temps à m'écouter, à me rassurer lorsque le stress prenait le contrôle... En bref, merci d'avoir été là et de m'avoir soutenue (et supportée) pendant cette thèse.

Houssein, voisin de bureau et thésard en même temps que moi. Merci pour ta rigueur et ta participation active au projet. Malgré ta discrétion, tu as toujours été disponible et à l'écoute.

Maria, qui a contribué activement au projet. Merci d'avoir été là au début de ma thèse, tu m'as appris beaucoup de choses à la paillasse, je t'en suis très reconnaissante. Malgré des hauts et des bas, j'ai été contente de partager un bout de thèse en ta compagnie.

Mirna, merci pour les conseils que tu m'as transmis avec ton point de vue de jeune docteure. Merci également d'avoir participé activement au projet pendant que j'étais en enseignement ou en rédaction. Et enfin merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

### **Je remercie les membres de l'équipe 1 dont j'ai fait partie.**

Merci pour votre aide et vos conseils. Dorthe, merci pour ta bonne humeur, tes discussions en BM ainsi que le temps que tu consacres à l'équipe, notamment pour les commandes. Merci à Lydie pour ses encouragements, ses discussions et sa bonne humeur. Christine, merci pour tes conseils et discussions à propos de l'enseignement et des manips. Christophe, merci d'avoir été disponible pour discuter plusieurs fois avec moi de l'enseignement. Merci également aux autres membres de l'équipe, David, Cédric, Isabelle, Anthony, Maïté, Lina, Amine, Loubna.

### **Je tiens également à remercier.**

Les membres du laboratoire DC2N, trop nombreux pour être cités, qui ont été présents pour moi durant toutes ces années et qui m'ont permis de mener cette thèse dans de bonnes conditions avec toujours le moyen d'avoir une aide au sein du laboratoire. Merci aux secrétaires, Sabrina, Laurence et Catherine pour leur aide précieuse au quotidien.

### **Un merci tout particulier aux personnes que j'ai le plus côtoyées.**

Tout d'abord, un très très très grand merci à Fanny. Comme tu le disais, on a fait cette aventure de thèse ensemble. On a passé tellement de temps en formation, en petite pause, en culture, en pause-déjeuner... Merci d'avoir été là dans les moments difficiles à m'écouter mais aussi dans les moments plus joyeux avec nos fous rires !

Inès, merci pour les petites discussions, surtout vers la fin de ma thèse. Merci pour ton soutien et ton sourire. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite !

Manue, je me souviendrai de notre petit séjour à Lille, pour la formation expérimentation animale, où l'on a bien marché et bien rigolé (même si j'ai eu un peu peur pour ta voiture à certains moments x)).

Marie-Anne, merci pour nos petites discussions et nos encouragements mutuels en cette fin de thèse, merci également pour ta bonne humeur !

Mouna, merci pour ton écoute et ta gentillesse. J'ai été ravie de te connaître et j'ai beaucoup aimé nos discussions dans le bus ☺

**Pour terminer, je remercie infiniment ma famille et mes proches.**

Merci à mes amis : Maëlle, Pauline, Valou, Kévin ... Heureusement que vous avez été là, avec nos petites soirées et tous ces moments partagés depuis maintenant plusieurs années... Coline, je pense à toi aussi même si tu es loin, merci pour tes encouragements et ta présence (par mail).

Je remercie également ma famille et plus particulièrement mes parents et mon frère. Merci pour tout, pour votre présence, vos encouragements, votre soutien ... Merci de m'avoir toujours aidée, même dans les moments les plus difficiles.

Enfin, je remercie celui qui m'a sûrement le plus supportée, Antoine. Tu as toujours été là pour me soutenir, me faire rire, me comprendre... Je n'aurais jamais assez de mots... Je te remercie du plus profond de moi-même. Je t'aime plus que tout.



# Production scientifique

## Article scientifique :

- **Brunet L**, Blanquer-Rosselló MDM#, Guernet A#, Chhourri H#, Alexandre D, Kherrouche Z, Lee J, Yao S, Arabo A, Swayden M, Godefroy D, Jamme P, Vinchent A, Bérard C, Tulasne D, Arena S, Bardelli A, Coulouarn C, Cho BC, Aaronson SA, Cortot AB, Anouar Y and Grumolato L\* : Prolonging lung cancer response to EGFR inhibition by targeting the selective advantage of resistant cells (Article en soumission)

## Communications orales :

- **Brunet L**, Blanquer-Rosselló MDM, Guernet A, Chhourri H, Kherrouche Z, Alexandre D, Yao S, Lee J, Tulasne D, Aaronson SA, Cortot AB, Anouar Y et Grumolato L : Une nouvelle stratégie thérapeutique pour prévenir la résistance du cancer bronchique aux thérapies ciblées. **Cancéropôle Nord-Ouest**, Format Digital, 3 novembre 2020 (*1er prix de communication orale*)

- **Brunet L**, Blanquer-Rosselló MDM, Guernet A, Chhourri H, Kherrouche Z, Alexandre D, Yao S, Lee J, Tulasne D, Aaronson SA, Cortot AB, Anouar Y and Grumolato L : Preventing acquired resistance to therapy by targeting tumor evolution: a new strategy to prolong lung cancer response to EGFR inhibition. **Oncoweek**, Toulouse, 1-5 février 2020

## Communications affichées :

- **Brunet L**, Blanquer-Rosselló MDM, Guernet A, Chhourri H, Kherrouche Z, Alexandre D, Yao S, Lee J, Aaronson SA, Cortot AB, Anouar Y and Grumolato L : Overcoming resistance to targeted therapy: a new combination strategy for the treatment of lung cancer. **Journée normande de la recherche biomédicale (JNRb)**, Caen, 19 novembre 2019 (*1er prix de communication affichée*)

- Guernet A, Chhourri H, **Brunet L**, Blanquer-Rosselló MDM, Alexandre D, Cortot AB, Aaronson A, Anouar Y and Grumolato L : CRISPR-barcoding to investigate lung cancer resistance to targeted therapy in a context of intratumor heterogeneity. **4th European**

**Association for Cancer Research (EACR) Conference on Cancer Genomics**, Cambridge (Royaume-uni), 23-26 juin 2019

- **Brunet L**, Blanquer-Rosselló MM, Guernet A, Cortot A, Aaronson SA, Anouar Y and Grumolato L :A new therapeutic strategy to overcome lung cancer resistance to EGFR inhibitors. **Journée de l'école doctorale** (EdN Bise), Caen, 21-22 mars 2019

- Grumolato L, Guernet A, Alexandre D, **Brunet L**, Blanquer Rosselló MM, Sachidanandam R, Aaronson SA , Anouar Y : Modeling intratumor heterogeneity through CRISPR-barcodes. **The 25<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cancer Research (EACR25)**, Amsterdam (Pays-bas), 29 juin – 3 juillet 2018

# Résumé

Les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) avec mutations activatrices de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) sont traités en première ligne avec des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKIs) de ce récepteur, tels que l'osimertinib. Malheureusement, après une phase initiale de réponse, presque invariablement les patients rechutent, suite à l'émergence de sous-populations de clones résistants, souvent déjà présents avant le début du traitement. Notre équipe a récemment mis au point une nouvelle stratégie basée sur CRISPR/Cas9 pour récapituler et étudier l'hétérogénéité intratumorale, que nous avons appelée CRISPR-barcoding. En utilisant des modèles cellulaires générés par cette approche, nous avons réalisé un criblage de petites molécules, qui nous a permis d'identifier l'inhibiteur multikinase sorafenib pour sa capacité à prévenir l'amplification des cellules de CBNPC insensibles aux EGFR-TKIs.

Dans mes travaux de thèse, nous avons montré que, en combinaison avec l'osimertinib, le sorafenib réduit l'avantage sélectif des cellules résistantes à l'inhibition d'EGFR, tout en préservant la réponse des cellules sensibles. Le sorafenib agit par un mécanisme complexe et indépendant des MAPKs, qui implique l'inhibition précoce de l'activité catalytique des *MAPK interacting kinases 1/2* et de la phosphorylation du facteur de transcription STAT3. A des stades plus tardifs, ce composé provoque une réduction de l'expression du facteur anti-apoptotique MCL-1 et promeut la dégradation de l'EGFR par les lysosomes. En utilisant des lignées cellulaires et des *patient-derived cells* de CBNPC, nous avons montré que le sorafenib empêche l'émergence de sous-populations contenant différentes mutations identifiées chez les patients, telles que EGFR-C797S, KRAS-G12D, BRAF-V600E, PIK3CA-E545K, ou l'amplification d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, comme MET et HER2. Nous avons pu confirmer ces résultats *in vivo* dans des modèles CRISPR-barcoding de CBNPC, qui ont révélé que la combinaison osimertinib-sorafenib retarde fortement la progression tumorale.

En conclusion, mes travaux de thèse proposent une nouvelle approche thérapeutique, qui vise à prolonger la réponse du CBNPC aux EGFR-TKIs en prévenant l'évolution clonale induite par le traitement *via* l'abolition de l'avantage sélectif des cellules résistantes.

Mots clés : Cancer bronchique non à petites cellules – Résistance à la thérapie – Inhibiteurs de tyrosine kinases - EGFR – Sorafenib – Osimertinib – Evolution clonale – CRISPR-barcoding





# Abstract

Non-small cell lung cancer (NSCLC) patients whose tumors display activating mutations of the epidermal growth factor receptor (EGFR) are treated in the first line with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) of this receptor, including osimertinib. After an initial response, the tumors almost invariably relapse, as a result of the emergence of subpopulations of resistant clones, which can be already present before the onset of the treatment. Our group recently developed CRISPR-barcoding, a novel approach to recapitulate and investigate oncogenic mutations in a context that mimics intratumor heterogeneity. Using cell models generated through this approach, we performed a small-molecule screen and identified the multikinase inhibitor sorafenib for its capacity to prevent the amplification of NSCLC cells insensitive to EGFR inhibition.

During my thesis, we showed that, in combination with osimertinib, sorafenib decreases the selective advantage of EGFR-TKI resistant cells, while preserving the response of sensitive cells. Sorafenib acts independently of MAPKs through a complex mechanism involving early inhibition of MAPK interacting kinases 1/2 catalytic activity and STAT3 phosphorylation. At later time points, this compound induces down-regulation of the pro-apoptotic factor MCL-1 and promotes EGFR degradation by the lysosomes. Using NSCLC established lines and patient-derived cells, we showed that sorafenib can prevent the emergence of cell subpopulations containing different types of resistance mutations identified in patients, including EGFR-C797S, KRAS-G12D, BRAF-V600E, PIK3CA-E545K, or the amplification of other receptor tyrosine kinases, such as MET and HER2. We confirmed these results *in vivo* using NSCLC CRISPR-barcoding models, which revealed that the osimertinib-sorafenib combination can substantially delay tumor progression.

Together, my studies support a new therapeutic strategy to prolong NSCLC response to EGFR-TKIs by abolishing the selective advantage of resistant cells, thus resulting in a global inhibition of drug-induced clonal evolution.

Keywords: Non-small cell lung cancer – Targeted therapy – Drug resistance – Tyrosine kinase inhibitors – EGFR – Sorafenib – Osimertinib – Clonal evolution – CRISPR-barcoding



# Sommaire

Liste des figures .....	21
Liste des abréviations .....	23
Introduction .....	25
1. Traitements anticancéreux et thérapie ciblée .....	27
1.1. Éléments historiques .....	27
1.1.1. La chirurgie .....	27
1.1.2. La radiothérapie.....	27
1.1.3. La chimiothérapie.....	28
1.1.4. La thérapie ciblée .....	29
1.1.5. Exemples de thérapie ciblée .....	31
1.2. Types d'agents thérapeutiques .....	36
1.2.1. Petites molécules inhibitrices .....	37
1.2.2. Autres types de thérapie ciblée.....	39
1.3. Anticorps monoclonaux .....	41
1.3.1. Inhibition des voies associées à la prolifération.....	41
1.3.2. Inhibition de l'interaction entre le cancer et son microenvironnement.....	42
1.3.3. Anticorps ciblant des marqueurs tumoraux.....	43
2. Le cancer bronchique .....	44
2.1. Épidémiologie, facteur de risque et prévention .....	44
2.2. Classification clinique et histologique .....	44
2.2.1. Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC).....	45
2.2.2. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC).....	46
2.3. Mutations fréquentes dans le CBNPC .....	47
2.3.1. Mutations d'EGFR .....	48
2.3.2. Altérations de HER2 .....	52
2.3.3. Altérations de MET .....	52

2.3.4. Mutations de KRAS .....	53
2.3.5. Mutations de BRAF .....	53
2.3.6. Mutations de PIK3CA et PTEN .....	54
2.3.7. Fusions oncogéniques.....	55
2.3.8. Inactivations de p53 et p16.....	55
2.4. Traitement du CBNPC .....	56
2.4.1. Chimiothérapie .....	56
2.4.2. Immunothérapie.....	57
2.4.3. Thérapie ciblée .....	57
2.4.4. Résistance à l'osimertinib .....	64
Objectifs de la thèse .....	73
Résultats .....	75
Discussion .....	149
1. Mécanismes d'action du sorafenib dans les cellules de CBNPC .....	151
2. Implications cliniques.....	157
Conclusion et perspectives .....	163
Références bibliographiques .....	167





# Liste des figures

Figure 1 : Photographie de Sydney Farber .....	29
Figure 2 : Structure du récepteur humain HER2 et de la partie Fab du trastuzumab.....	32
Figure 3 : Développement du Glivec .....	33
Figure 4 : Interaction du vemurafenib avec le site actif de la forme mutée (V600E) de la protéine BRAF .....	35
Figure 5 : Chronologie de l’approbation par la FDA des inhibiteurs de kinase au cours des 20 dernières années .....	36
Figure 6 : Différents types d’inhibiteurs réversibles de kinases .....	37
Figure 7 : Mécanisme d’action des inhibiteurs de PARP.....	40
Figure 8 : Mécanisme d’action des anticorps monoclonaux ciblant l’EGFR.....	42
Figure 9 : Diagramme représentant les cellules distales et proximales dans le poumon .....	46
Figure 10 : Altérations génétiques retrouvées dans le CBNPC .....	47
Figure 11 : Structure et activation de l’EGFR.....	48
Figure 12 : Schéma représentant l'activation allostérique de l’EGFR .....	49
Figure 13 : Voies de signalisation activées par les RTKs .....	50
Figure 14 : Principales mutations de l’EGFR retrouvées dans le CBNPC .....	51
Figure 15 : Mode de liaison et structure de la molécule d’osimertinib .....	60
Figure 16 : Survie sans progression des patients de l’étude FLAURA.....	62
Figure 17 : Principaux mécanismes de résistance à l’osimertinib .....	64
Figure 18 : Représentation des principaux mécanismes de résistance à l’osimertinib .....	66
Figure 19 : Différents modes d’acquisition d’une résistance à l’osimertinib dans le CBNPC ..	70
Figure 20 : Description de l’approche CRISPR-barcoding.....	71
Figure 21 : Rôle d’eIF4E dans la machinerie traductionnelle.....	153





# Liste des abréviations

ALK : *Anaplastic Lymphoma Kinase*

ARNm : ARN messenger

CBNPC : Cancer Bronchique Non à Petites Cellules

CBPC : Cancer Bronchique à Petites Cellules

CDK : *Cyclin-Dependent Kinase*

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CTLA-4 : *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

EGF : *Epidermal Growth Factor*

eIF4E : *eukaryotic translation Initiation Factor 4E*

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*

FDA : *Food and Drug Administration*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GIST : *Gastro Intestinal Stromal Tumor*

Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*

HER2 : *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*

INCa : Institut National du Cancer

JAK : *Janus kinase*

KRAS : *Kristen rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MCL-1 : *Myeloid Cell Leukemia 1 protein*

MEK : *Mitogen activate protein kinase kinase*

MNK1/2 : *MAP kinase sérine/thréonine-protéine kinase 1/2*  
mTORC1/2 : *mammalian target of rapamycin complex 1/2*  
NTRK : *neurotrophic tyrosine receptor kinase*  
PARP : *Poly (ADP-Ribose) Polymerase*  
PD-1 : *programmed cell death 1*  
PD-L1 : *programmed cell death ligand 1*  
PDGFR : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*  
PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*  
PIP2 : *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*  
PIP3 : *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*  
PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*  
qPCR : *PCR quantitative*  
Rb : *Retinoblastoma protein*  
RTK : *Récepteur à activité Tyrosine Kinase*  
SHP1 : *Src homology 2 domain-containing phosphatase 1*  
SOS : *son of sevenless*  
STAT : *signal transducers and activators of transcription*  
TNM : *Tumor – Node – Metastasis*  
TP53 : *Tumor Protein 53*  
VEGFR : *vascular endothelial growth factor receptor*

# Introduction



## **1. Traitements anticancéreux et thérapie ciblée**

Le cancer est une maladie complexe et dynamique, qui résulte de l'accumulation d'une série d'altérations génétiques et épigénétiques capables d'entraîner une prolifération anarchique et la transformation tumorale des cellules touchées. Une meilleure compréhension de ces processus a permis, au cours de ces dernières décennies, le développement de différentes approches thérapeutiques ciblant directement certaines caractéristiques propres des cellules cancéreuses.

### **1.1. Éléments historiques**

Avant les années 1990, la médecine disposait de trois types de traitements anticancéreux, à savoir, la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

#### ***1.1.1. La chirurgie***

L'exérèse de la lésion tumorale a été pendant longtemps le seul traitement pour les cancers solides et reste, de nos jours, l'option de choix, car potentiellement curative. Malheureusement, l'ablation totale de la tumeur est parfois impossible à cause de sa localisation, et la chirurgie est généralement inefficace dans le cas de cancers avancés métastatiques. Un bilan diagnostique, permettant d'établir le stade, le grade et la taille de la tumeur ainsi que sa localisation précise, est primordial pour la réussite de l'exérèse et pour la mise en place de thérapies adjuvantes, telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie.

#### ***1.1.2. La radiothérapie***

Depuis la découverte des rayons X en 1895, l'utilisation des radiations s'est développée dans le domaine de la cancérologie dans le but d'éliminer directement les cellules cancéreuses. La radiothérapie est utilisée pour délivrer de façon ciblée une dose de radiations à haute énergie, afin d'entraîner des dommages importants de l'ADN des cellules tumorales, induisant ainsi l'arrêt de la prolifération et la mort cellulaire. Au cours des 20-30 dernières années, le but des chercheurs et cliniciens a été de maximiser les doses de radiation administrées au niveau des cellules tumorales, tout en minimisant l'exposition des cellules normales environnantes, *via* notamment le développement de techniques plus précises d'administration comme l'*intensity modulated radiotherapy* et l'*image-guided radiotherapy* (Citrin, 2017).

De nos jours, environ 50% des patients sont traités avec une radiothérapie. Différents types de rayonnements, possédant des capacités de pénétration tissulaire distinctes, sont utilisés en clinique, tels que les photons (rayons X), les électrons et, plus rarement, les protons. Il existe globalement deux types de radiothérapies, externe et interne, et leur utilisation dépend du type de cancer, la taille de la tumeur et sa localisation. La radiothérapie peut aussi bien être utilisée de manière curative, souvent associée à d'autres types d'approches, comme la chirurgie ou la chimiothérapie, ou de manière palliative, afin de réduire les symptômes causés par le cancer.

Bien qu'ayant démontré une forte efficacité sur certains types de tumeurs, comme le cancer du larynx et le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), beaucoup de patients ne répondent pas à la radiothérapie. Plusieurs facteurs cliniques peuvent être en cause, comme la taille de la tumeur, le stade avancé ou la méconnaissance de l'étendue exacte de la lésion néoplasique. De même, certains types de tumeurs peuvent avoir une sensibilité réduite aux rayonnements par le biais de certains mécanismes associés au processus oncogénique, tels que l'hypoxie (Barker et al., 2015).

### 1.1.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie, utilisée pour le traitement du cancer depuis les années 1940, cible les cellules en division, et agit *via* des mécanismes différents selon le type de composé utilisé.

En 1942, des chercheurs examinèrent le potentiel thérapeutique en oncologie de plusieurs toxines, et notamment de la moutarde azotée, dérivée du gaz moutarde utilisé comme arme chimique pendant la première guerre mondiale, pour le traitement de patients atteints de lymphomes non Hodgkiniens. Ils démontrèrent ainsi que ce type de traitement entraînait une régression de la tumeur et que les tumeurs étaient plus sensibles aux toxines comparées aux tissus sains (Gilman, 1963; Gilman and Philips, 1946; Goodman and Wintrobe, 1946). Plus tard, il fut révélé que ces agents, dits alkylants, sont capables de former des radicaux alkyles interagissant très fortement avec l'ADN *via* des liaisons covalentes, ayant pour conséquence de bloquer la division cellulaire et d'induire une apoptose des cellules tumorales. En 1949, la méchloréthamine fut le premier agent de cette classe à obtenir une autorisation de mise sur le marché par la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine. Plus tard, d'autres agents alkylants, comme le cyclophosphamide, le chlorambucil ou les sels de platine, obtinrent une approbation aux USA ainsi que dans d'autres pays pour le traitement de différents types de lymphomes, leucémies et tumeurs solides (Chabner and Roberts, 2005).

Une autre approche, développée par Farber à la fin des années 40, consistait à utiliser les antifolates, des analogues de l'acide folique, tels que l'aminopterin ou l'amethopterin, chez les enfants atteints de leucémie (Farber and Diamond, 1948). Ces composés permettent de supprimer la prolifération des cellules tumorales et de rétablir une fonction normale de la moelle osseuse chez ces patients. Les antifolates ont également prouvé leur efficacité dans d'autres types de cancers, tels que le cancer du sein, de l'ovaire ou de la vessie, ainsi que le choriocarcinome, une tumeur rare qui se développe à partir des cellules du placenta (Elliot, 1962; Greenspan and Fieber, 1962; Greenspan et al., 1963; Li et al., 1958).



**Figure 1 : Photographie de Sydney Farber (1947).**

Par la suite, d'autres chimiothérapies ont été développées pour le traitement de divers cancers, telles que le 6-mercaptopurine (6-MP), un analogue de la purine capable d'inhiber la synthèse d'ADN et d'ARN ; la vincristine, un vinca-alcaloïde qui empêche la polymérisation des microtubules ; le 5-fluorouracil, un inhibiteur de la synthèse d'ADN ; le paclitaxel, un agent antimitotique. En se basant sur les recherches menées en bactériologie, notamment celles sur le développement d'antibiotiques, des combinaisons de chimiothérapies ayant des mécanismes d'action différents ont été utilisées, afin de prévenir la résistance observée chez les patients.

A part la résistance au traitement, la limitation majeure de la chimiothérapie et de la radiothérapie est représentée par les lourds effets secondaires dus à la toxicité aiguë ou chronique de ces approches.

### ***1.1.4. La thérapie ciblée***

Les avancées scientifiques, notamment au cours des années 1970-80, pour comprendre la biologie cellulaire, ainsi que l'initiation et la progression tumorale, ont permis d'identifier des

cibles moléculaires potentielles pour le traitement du cancer, telles que les facteurs de croissance et leurs récepteurs, des molécules de signalisation intracellulaire, des protéines du cycle cellulaire et des modulateurs d'apoptose. Ce développement va de pair avec la reconnaissance de l'origine génique du cancer et la découverte des premiers oncogènes, des gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, participent à l'initiation et/ou la progression tumorale. Les chercheurs ont pu également démontrer que les cellules cancéreuses souvent dépendent, pour leur prolifération et survie, de ces oncogènes et des voies qu'ils activent. Ces travaux sont à la base du concept d'addiction oncogénique (Sharma and Settleman, 2007; Weinstein, 2002; Weinstein and Joe, 2008) et ils ont permis le développement de nouvelles thérapies, dites ciblées, capables d'intervenir de façon plus spécifique sur les cellules tumorales, et donc de limiter les effets secondaires toxiques sur les cellules normales.

### Définition de la thérapie ciblée

Le terme de thérapie ciblée est utilisé surtout à partir de l'année 2000, mais sa définition a évolué au fil du temps, allant de pair avec les avancées scientifiques sur la tumorigenèse et la génétique du cancer.

En 2005, Sledge (Sledge, 2005) dresse plusieurs définitions de thérapies ciblées. La plus simple étant : « Une thérapie ciblée implique une thérapie avec une cible moléculaire spécifique ». Mais cette définition est loin d'être complète et reste relativement vague, puisqu'aucune thérapie n'agit sans cible moléculaire. En 2012, le *National Cancer Institute* (NCI) définit la thérapie ciblée comme « un traitement attaquant spécifiquement la cellule cancéreuse ». Mais en 2019, cette définition évolue de nouveau en apportant quelques explications supplémentaires :

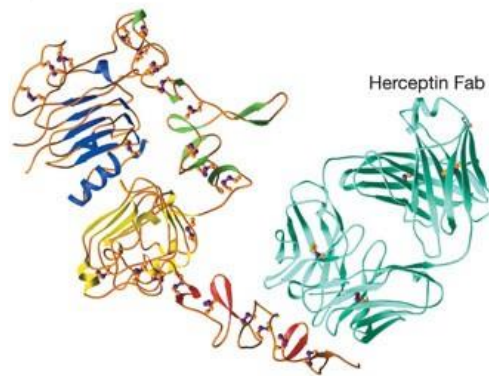
- Certaines thérapies bloquent l'action de certaines enzymes/protéines ou d'autres molécules impliquées dans la croissance cancéreuse
- D'autres types aident le système immunitaire pour tuer les cellules cancéreuses
- La plupart des thérapies ciblées sont des petites molécules ou des anticorps monoclonaux

Actuellement, les thérapies ciblées sont décrites comme « des médicaments bloquant la croissance et la propagation du cancer en interférant avec des molécules spécifiques, dites cibles moléculaires, qui sont responsables de la croissance, de la progression et de la propagation du cancer ». Elles sont souvent mises en opposition aux chimiothérapies conventionnelles par le fait qu'elles agissent sur une « cible moléculaire précise » et en ciblant spécifiquement la cellule cancéreuse, contrairement aux chimiothérapies, qui agissent plutôt en tuant les cellules en division, normales ou cancéreuses. Dans cette thèse, j'ai décidé, pour des raisons historiques et de simplicité, d'utiliser le terme de thérapie ciblée pour définir des traitements dirigés contre des protéines ou voies intracellulaires activées de façon aberrante et spécifique dans les cellules tumorales.



### *1.1.5. Exemples de thérapie ciblée*

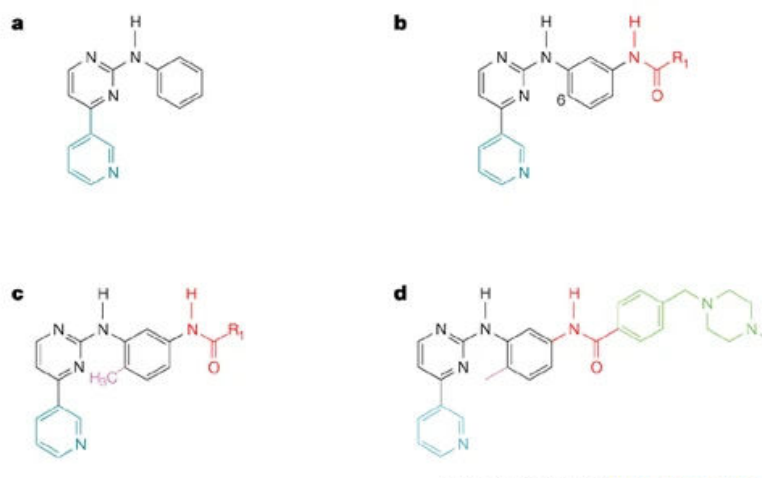
L'une des premières thérapies ciblées est celle qui vise HER2 (appelé également Neu ou ERBB2), un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) appartenant à la famille de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) et impliqué dans le contrôle de la prolifération et survie cellulaire *via* l'activation de voies intracellulaires, telles que *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) (Moasser, 2007). En 1984, l'équipe de R. Weinberg au *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) identifia l'oncogène Neu, l'homologue de HER2 chez le rongeur, grâce à un modèle de neuroblastome induit chimiquement chez le rat (Schechter et al., 1984). Le même groupe mit en évidence le potentiel oncogénique de Neu par sa capacité à transformer des cellules de fibroblaste de souris (Shih et al., 1981). Ces chercheurs montrèrent aussi que Neu est un RTK (Bargmann et al., 1986a) et qu'une mutation ponctuelle dans son domaine transmembranaire peut entraîner une transformation oncogénique (Bargmann et al., 1986b). En parallèle de ces travaux, le laboratoire de S. Aaronson au *National Cancer Institute* (NCI) mit en évidence une amplification de HER2 dans des modèles cellulaires humains de cancer du sein (King et al., 1985). Des études réalisées à la même époque démontrèrent que la surexpression de HER2 peut entraîner une transformation oncogénique dans les cellules NIH/3T3 de souris (Di Fiore et al., 1987; Hudziak et al., 1987). Chez les patients, on retrouve une amplification du gène *ERBB2* dans environ 25 à 30% des patients de cancer du sein, et elle est associée à un mauvais pronostic clinique (Slamon et al., 1987). Une surexpression de HER2 a également été observée dans plusieurs autres types de néoplasies, tels que les cancers ovariens, gastriques, bronchiques ou pancréatiques (Jaehne et al., 1992; Slamon et al., 1989; Weiner et al., 1990; Yamanaka et al., 1993). L'identification d'une addiction oncogénique de certains cancers à HER2 a porté au développement d'anticorps monoclonaux capables de cibler spécifiquement ce récepteur. En 1998, le trastuzumab (Herceptin, Genentech) fut approuvé par la FDA pour le traitement de cancer du sein métastatique présentant une amplification de HER2. L'efficacité du trastuzumab pour ce type de cancer fut démontrée aussi bien en monothérapie qu'en combinaison avec des chimiothérapies (Figure 2) (Slamon et al., 2001; Vogel et al., 2002). Le succès en clinique marqua un véritable changement dans la prise en charge de ces patientes, pour qui le pronostic a depuis changé de façon drastique (Sawyers, 2019). Le trastuzumab a ainsi constitué la preuve de concept pour un nouveau type de stratégie, basé sur l'identification de vulnérabilités propres des cellules tumorales, pouvant être ciblées grâce à des agents thérapeutiques spécifiques.



**Figure 2 : Structure du récepteur humain HER2 et de la partie Fab du trastuzumab (fragment de l'anticorps permettant la liaison à l'antigène) impliquée dans la reconnaissance du récepteur. Figure issue de Cho et al., 2003.**

Un autre exemple paradigmatique de thérapie ciblée vient de l'imatinib (Glivec, Novartis) dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) (Figure 3). Ce type de néoplasie du système hématopoïétique est caractérisé par la présence du chromosome de Philadelphie, découvert en 1960 par Nowell et Hungerford (Nowell and Hungerford, 1960), qui est la conséquence d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22, provoquant la fusion entre les gènes *BCR* et *ABL*, ce dernier codant pour une tyrosine kinase (Rowley, 1973). Ainsi, la protéine de fusion BCR-ABL entraîne une activation constitutive de voies de signalisation contrôlant la prolifération cellulaire. La fusion BCR-ABL est présente dans presque la totalité des cas de LMC (Bartram et al., 1983) et il a été montré qu'elle peut induire des leucémies (Daley et al., 1990; Heisterkamp et al., 1990). Eu égard de sa présence exclusive dans les cellules tumorales, cet oncogène apparut comme une cible thérapeutique prometteuse, afin de limiter les effets toxiques secondaire du traitement. La recherche d'inhibiteurs spécifiques de BCR-ABL aboutit en 1996 à la publication d'une étude montrant l'efficacité de la petite molécule STI 571 ou imatinib pour la prise en charge de patients de LMC (Druker et al., 1996). Ces résultats furent confirmés dans d'autres essais cliniques (Druker et al., 2001a, 2001b; Sawyers et al., 2002), qui portèrent, en 2001, à l'autorisation de mise sur le marché aux USA et en Europe. Le taux et la durée de la réponse exceptionnels de l'imatinib chez les patients atteints de LMC permirent de transformer un cancer fatal en une maladie chronique contrôlable, et donnèrent un élan extraordinaire au concept de thérapie ciblée. Malheureusement, malgré le développement, par la suite, de plusieurs autres agents thérapeutiques ciblés, aucun n'a été

capable de reproduire le même type de réponse dans le temps, en particulier pour le traitement des cancers solides.



**Figure 3 : Développement du Glivec.** La structure centrale du composé principal, un dérivé de phénylamino, est indiquée en noir. **a)** L'ajout d'un groupe 3'-pyridyle (en bleu) à la position 3' de la pyrimidine a renforcé l'activité cellulaire. **b)** Un groupe amide (en rouge) attaché au cycle phényle a fourni une activité contre les tyrosine kinases. **c)** Un "flag methyl" (en rose) attaché au cycle diaminophényle a supprimé l'activité inhibitrice indésirable de PKC. **d)** La fixation finale d'une fraction de N-méthyl pipérazine (en vert) a nettement augmenté la solubilité et la biodisponibilité orale. Figure et légende issues de Capdeville et al., 2002.

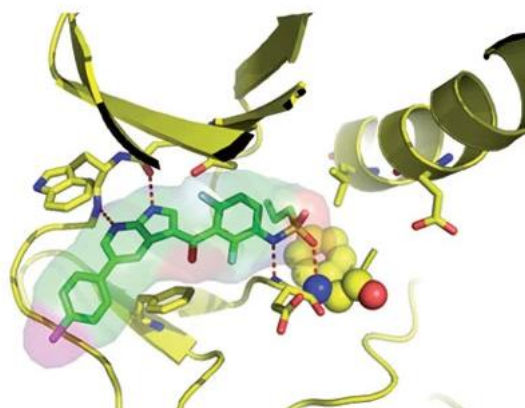
Par la suite, d'autres études montrèrent que l'imatinib peut agir également sur d'autres cibles, comme les RTKs c-Kit et *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR). Ces deux récepteurs sont fréquemment mutés dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). Ainsi, ces découvertes portèrent à l'approbation de cet inhibiteur pour le traitement des formes avancées, mais également en tant que thérapie adjuvante, chez les patients atteints de GIST présentant une mutation activatrice de c-Kit ou PDGFR. Le cas de l'imatinib a montré que des inhibiteurs peuvent affecter deux ou trois cibles pouvant alors être bénéfiques pour différents types de cancers ayant des anomalies génétiques distinctes. De plus, ce composé a servi de paradigme pour le développement d'autres inhibiteurs de tyrosine kinases pour le traitement des tumeurs solides.

En 1987, les laboratoires de J. Schlessinger et A. Ullrich montrèrent qu'une mutation ponctuelle dans la poche de liaison à l'ATP de l'EGFR abolit l'activité tyrosine kinase de ce récepteur (Honegger et al., 1987), bloquant ainsi la transmission du signal *via* les voies intracellulaires en aval (Redemann et al., 1992). Sur la base de ces travaux, une recherche de petites molécules capables d'inhiber l'activité catalytique de ce récepteur permit l'identification

du gefitinib (Iressa, AstraZeneca), un anilinoquinazoline de synthèse. L'efficacité et la toxicité de ce composé furent testées lors d'essais cliniques de phase I chez des patients atteints de cancers solides avancés (Baselga et al., 2002; Ranson et al., 2002), puis dans des essais cliniques de phase II réalisés chez des patients atteints de CBNPC au stade avancé ayant rechuté après un traitement par chimiothérapie (Fukuoka et al., 2003). Dans ces études, il fut remarqué qu'un groupe relativement restreint de patients montrait une réponse beaucoup plus importante par rapport aux autres, incitant alors la recherche de potentiels biomarqueurs prédictifs (Cohen et al., 2004). Des études approfondies sur ces cohortes permirent l'identification de mutations somatiques dans le domaine catalytique de l'EGFR qui conduisent à une activation constitutive de ce récepteur. Ces mutations, observées dans 15 à 50% des patients de CBNPC, sont associées à une sensibilité accrue au gefitinib et expliquent donc les taux de réponse élevés chez ces patients (Han et al., 2005; Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004). Le gefitinib et un autre inhibiteur d'EGFR, l'erlotinib (Tarceva, Genentech/OSI Pharmaceuticals) furent ainsi approuvés pour le traitement de CBNPCs avec mutation activatrice d'EGFR (Rosell et al., 2012; Sequist et al., 2008), ce qui représente le premier exemple de thérapie anticancéreuse adaptée au profil génétique de la tumeur.

Au début des années 2000, des mutations activatrices du gène *BRAF*, codant pour une sérine/thréonine kinase en amont de la voie des MAPKs, furent retrouvées dans plusieurs types de cancers, et notamment dans environ 60% de mélanomes (Davies et al., 2002). La mutation la plus fréquente, représentant environ 90% des cas, est la substitution d'une valine en acide glutamique en position 600 (V600E). Plusieurs études mirent en évidence l'implication de cette mutation dans l'initiation et la progression tumorale *via* une activation constitutive des MAPKs, révélant un intérêt potentiel de BRAF-V600E en tant que cible thérapeutique, notamment pour le traitement du mélanome (Hoeflich et al., 2006; Tuveson et al., 2003; Wellbrock et al., 2004). Afin de minimiser les effets secondaires chez les patients, les chercheurs essayèrent de développer des molécules capables d'inhiber spécifiquement la forme mutée de cette protéine. Des criblages d'un très grand nombre de composés connus pour inhiber l'activité de différentes kinases furent réalisés, mais sans succès. Une autre approche, développée au cours des années 90 et connue sous le nom de « *fragment-based drug design* », fut utilisée pour un criblage de molécules organiques de faible poids moléculaire et de faible complexité. Grâce à cette méthode, couplée à des analyses de cristallographie pour déterminer la conformation tridimensionnelle de la protéine mutée, il fut possible d'identifier le premier inhibiteur

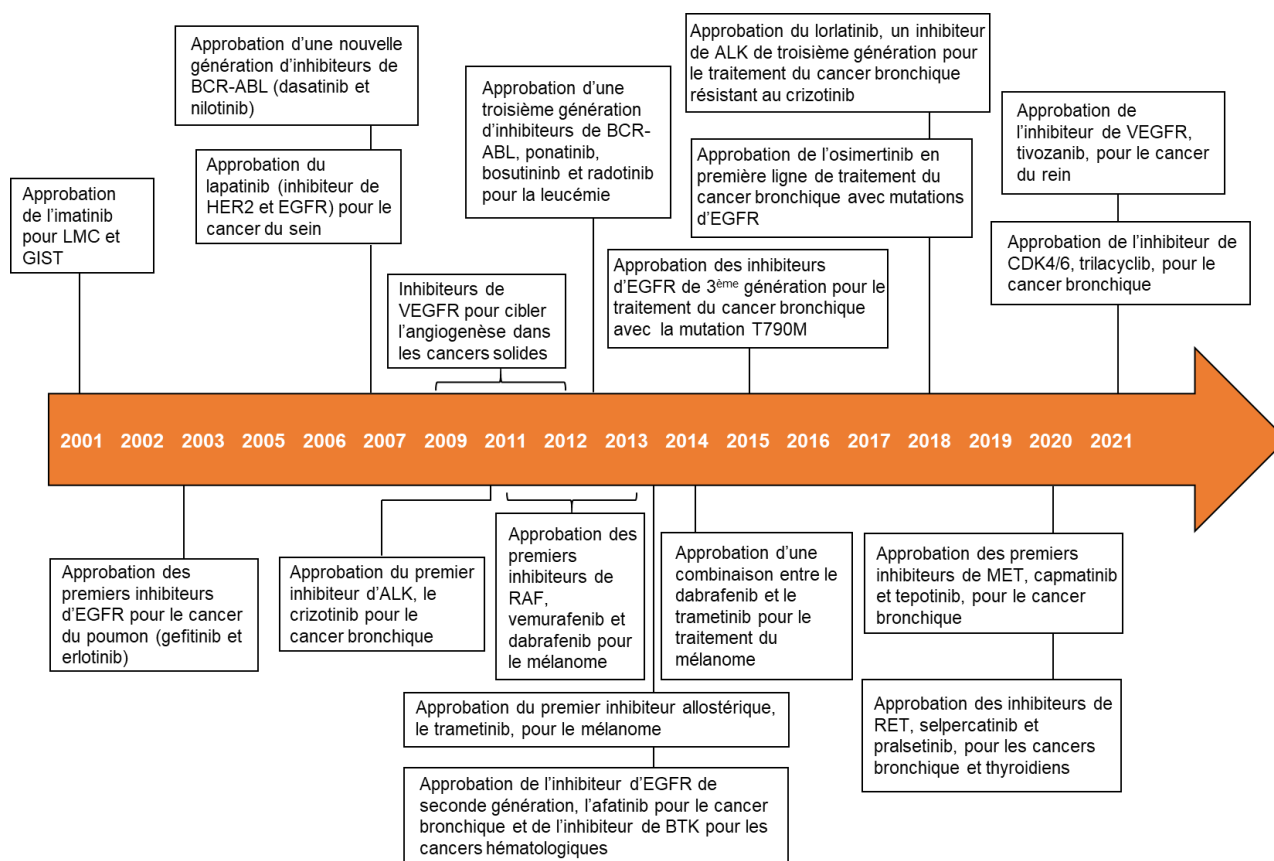
spécifique de BRAF-V600E, le vemurafenib (Zelboraf, Roche) (Figure 4) (Bollag et al., 2012; Zhang and Bollag, 2010).



**Figure 4 : Interaction du vemurafenib avec le site actif de la forme mutée (V600E) de la protéine BRAF.** Les principales interactions de liaison hydrogène entre le vemurafenib et les résidus du site actif de BRAF sont représentées par des pointillés rouges. Figure et légende issues de Bollag et al., 2012.

Après sa synthèse en 2005, une étude préclinique démontra que le vemurafenib inhibe fortement l'activation des MAPKs dans des lignées cellulaires de mélanome et il exerce une importante activité anti-tumorale *in vivo* dans des modèles de souris (Yang et al., 2010). L'efficacité de ce composé fut alors testée chez des patients atteints de mélanomes, tout d'abord lors d'essais cliniques de phase I (Flaherty et al., 2010) et II (Sosman et al., 2012), puis dans un essai clinique de phase III en comparaison avec la dacarbazine, la seule chimiothérapie approuvée à l'époque pour ce type de cancer (Chapman et al., 2011). Ces études aboutirent à la mise sur le marché du vemurafenib en août 2011, moins de 10 ans après la découverte des mutations de BRAF dans le cancer (Figure 5). A part l'impact extraordinaire pour les patients, pour qui, jusqu'alors, pratiquement aucune thérapie n'était disponible, le cas du vemurafenib est remarquable d'un point de vue conceptuel, car il s'agit du premier exemple de stratégie visant à développer un inhibiteur ciblant de façon spécifique la forme mutée d'une protéine présente dans les cellules tumorales. Malheureusement, les résultats d'essais cliniques pour d'autres types de cancer présentant la même mutation BRAF-V600E, notamment le cancer colorectal, furent décevants, indiquant que le contexte cellulaire peut influencer fortement les conséquences de l'inhibition d'une voie de signalisation (Prahallad et al., 2012). Ce type de phénomène est fréquent, mais il ne s'applique probablement pas à tous les oncogènes, comme suggéré par l'approbation en 2019 de l'entrectinib (Rozlytrek, Genentech). Ce médicament,

indiqué pour le traitement de tout cancer solide au stade avancé avec fusion du gène *neurotrophic tyrosine receptor kinase* (NTRK) constitue le premier exemple de thérapie ciblée agnostique, c'est-à-dire non limitée à un type particulier de néoplasie, mais visant une altération génétique présente dans différentes formes tumorales.



**Figure 5 : Chronologie de l'approbation par la FDA des inhibiteurs de kinase au cours des 20 dernières années.** LMC : leucémie myéloïde chronique ; GIST : tumeurs gastrointestinales ; BTK : tyrosine kinase de Bruton ; VEGFR : récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire. Figure adaptée de Cohen et al., 2021.

## 1.2. Types d'agents thérapeutiques

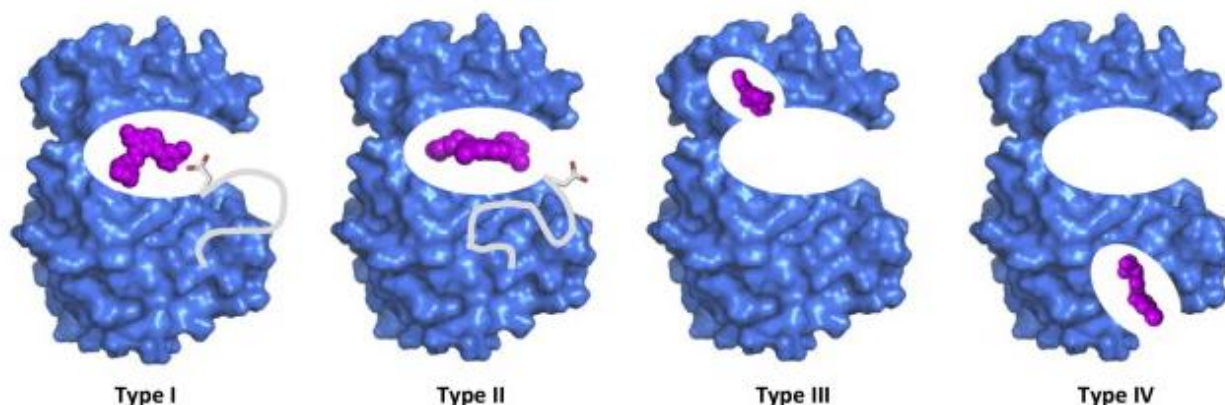
Les agents utilisés en thérapie ciblée peuvent être répartis en deux grandes familles : les petites molécules inhibitrices et les anticorps monoclonaux. Ces médicaments agissent sur différents types de protéines, tels que des récepteurs de facteurs de croissance, des acteurs en aval des voies de signalisation, des protéines du cycle cellulaire ou des modulateurs de l'apoptose.



### 1.2.1. Petites molécules inhibitrices

#### 1.2.1.1. Inhibiteurs de protéines kinases

La plupart des inhibiteurs développés au cours de ces dernières années pour la thérapie antitumorale est dirigée contre des protéines kinases, enzymes catalysant le transfert du phosphate terminal de l'ATP vers une protéine cible (Wu et al., 2015). Les kinases sont souvent impliquées dans l'initiation et/ou la progression tumorale, après l'apparition de mutations ou d'autres altérations génétiques, qui les rendent constitutivement actives et insensibles aux signaux de régulation (Cohen, 2002; Gschwind et al., 2004; Kim et al., 2009; Lapenna and Giordano, 2009). De plus, les réactions enzymatiques peuvent être bloquées plus facilement avec des agents pharmacologiques, comparées à d'autres types de cibles, tels que les interactions protéine-protéine ou protéine-ADN (Zhang et al., 2009). Les kinases partagent un certain degré d'homologie *via* des structures communes, notamment la poche de liaison à l'ATP et un motif DFG (Asp-Phe-Gly) (Thomson et al., 2021). Des inhibiteurs spécifiques ont été développés pour cibler ces kinases de manière irréversible ou réversible par le biais de différents mécanismes (Figure 6).



**Figure 6 : Différents types d'inhibiteurs réversibles de kinases.** Il existe globalement 4 modalités de liaisons utilisées par les inhibiteurs réversibles de kinases. Les inhibiteurs de type I se lient à la conformation active de la kinase, le résidu aspartate (squelette blanc) du motif DFG étant orienté vers la poche de liaison à l'ATP. Les inhibiteurs de type II se lient et stabilisent la conformation inactive de la kinase, le résidu aspartate retourné étant orienté vers l'extérieur de la poche de liaison. Les inhibiteurs de type III occupent une poche allostérique qui est adjacente à la poche de liaison à l'ATP mais ne la chevauche pas. Les inhibiteurs de type IV se lient à une poche allostérique éloignée de la poche de liaison à l'ATP. Figure d'après Wu et al., 2015.

### 1.2.1.2. Inhibiteurs de tyrosine kinases

Les kinases le plus fréquemment ciblées en cancérologie sont les tyrosine kinase. On peut en distinguer deux types :

- Les RTKs, glycoprotéines transmembranaires capables de transduire un signal extracellulaire au sein de la cellule et d'activer les voies de signalisation qui lui sont associées (par ex. : EGFR, PDGFR, c-Kit, ALK, NTRK)
- Les protéines tyrosine kinases non-récepteurs (NRTKs), qui interviennent plus en aval dans différentes voies de signalisation (par ex. : ABL, SRC, JAK)

Parmi les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKIs) approuvés en clinique, certains peuvent se lier de façon covalente, souvent à une cystéine, à proximité du site de liaison à l'ATP, bloquant ainsi l'activité catalytique. Parmi eux, on peut citer les exemples de l'ibrutinib (Imbruvica, Janssen-Cilag), un inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton utilisé pour le traitement de certaines leucémies (Burger et al., 2015) ou plus récemment l'osimertinib (Tagrisso, AstraZeneca), un inhibiteur d'EGFR (RTK) utilisé pour le traitement du cancer bronchique (Soria et al., 2017). D'autres TKIs sont réversibles et peuvent avoir plusieurs modes d'action (Thomson et al., 2021). Dans la plupart des cas, il s'agit de molécules compétitrices de l'ATP qui se lient à la conformation active de l'enzyme. Comme exemple, on retrouve le gefitinib et l'erlotinib, qui se fixent de manière réversible au niveau du site de liaison de l'ATP au niveau du domaine intracellulaire de l'EGFR, inhibant ainsi son autophosphorylation et l'activation des voies de signalisation sous-jacentes. Parmi les TKIs compétitifs de l'ATP, on retrouve aussi le crizotinib (XaLKori, Pfizer), inhibiteur ALK, c-Met, et ROS utilisé pour le traitement du cancer bronchique (Landi et al., 2019; Shaw et al., 2014; Solomon et al., 2014), mais également l'imatinib et le bosutinib (Bosulif, Pfizer), inhibiteurs de la NRTK BCR-ABL utilisés en clinique pour le traitement de LMC (Cortes et al., 2018).

### 1.2.1.3. Inhibiteurs d'autres kinases

Les protéines sérine/thréonine kinases catalysent le transfert d'un phosphate sur les sérines ou thréonines des protéines substrat et sont présentes dans différentes voies de signalisation (ex. : MAPKs, AKT) ou dans le contrôle du cycle cellulaire (*Aurora kinases*, *cyclin-dependent kinase* ; CDKs). Certains inhibiteurs de sérine/thréonine kinases sont des inhibiteurs allostériques, dont le site de fixation peut être adjacent au site de liaison de l'ATP, comme c'est le cas par exemple de l'inhibiteur des *mitogen activate protein kinase kinase 1* et



2 (MEK1/2), trametinib (Mekinist, Novartis), utilisé dans le traitement de mélanomes et de cancer bronchique présentant une mutation de BRAF (Planchard et al., 2016a; Syeda et al., 2021). D'autres, comme certains TKIs, sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, avec l'exemple du palbociclib (Ibrance, Pfizer), inhibiteur de CDK4/6, utilisé pour le traitement du cancer du sein (Turner et al., 2015).

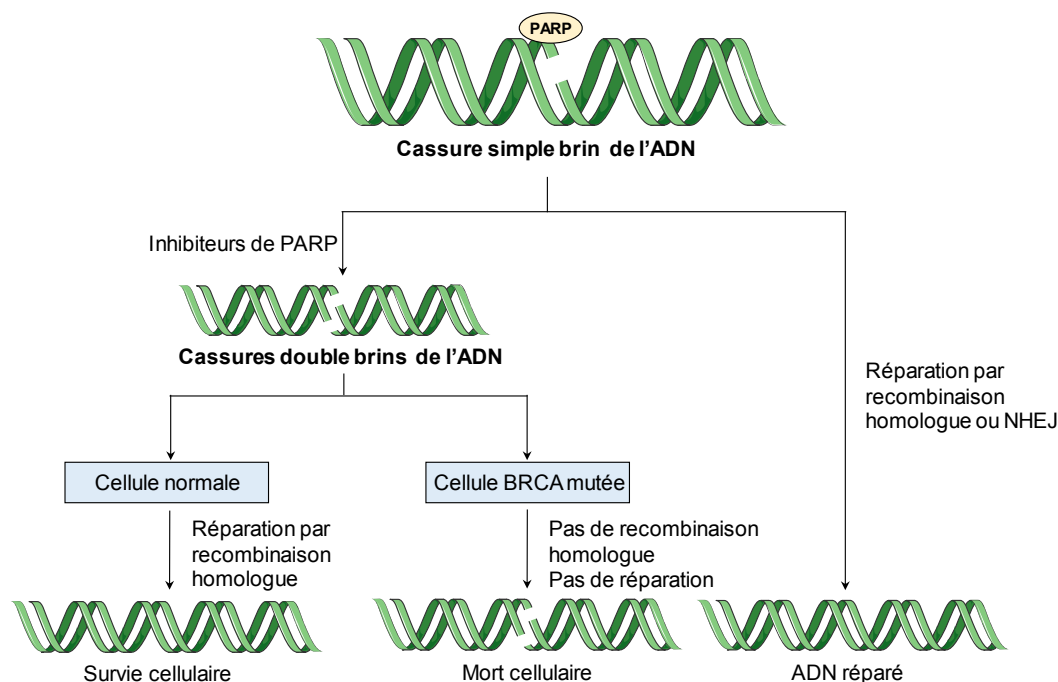
Parmi les autres types de kinases, on retrouve PI3K, qui catalyse la phosphorylation du *phosphatidylinositol-diphosphate* (PIP2) en *phosphatidylinositol-triphosphate* (PIP3), jouant ainsi un rôle clé dans la voie PI3K-AKT-mTOR, dérégulée dans de nombreux cancers (Engelman, 2009; Vivanco and Sawyers, 2002). Plusieurs types d'inhibiteurs ont été développés, dont certains ciblent uniquement PI3K et d'autres également mTOR. Différentes thérapies sont aujourd'hui utilisées en clinique tel que l'idelalisib (Zydelig, Gilead Sciences), approuvé pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens (Gopal et al., 2014) ou encore le pan-inhibiteur PI3K/mTOR, voxtalisib (Sanofi), en essai clinique pour le traitement de lymphomes et de leucémies (Brown et al., 2018).

### 1.2.2. Autres types de thérapie ciblée

Les kinases ne sont pas le seul type de protéine faisant l'objet de thérapie ciblée en oncologie. Depuis leur découverte au cours des années 60, les récepteurs hormonaux sont devenus des cibles thérapeutiques de choix dans les cancers hormono-dépendants comme certains cancers du sein. Parmi les hormonothérapies développées, on peut citer l'exemple du tamoxifène, qui fut d'abord utilisé comme contraceptif, puis comme agent anticancéreux par sa capacité de liaison aux récepteurs à l'œstradiol dans le cancer du sein à des stades avancés (Crump et al., 1997; Ingle et al., 1981). Par la suite, une autre stratégie fut développée dans les années 80, après l'échec du tamoxifène sur certaines patientes, qui consiste à inhiber l'activité de l'aromatase, une enzyme catalysant la conversion des androgènes en œstrogènes, comme par exemple la troisième génération de ces inhibiteurs comprenant l'anastrozole ou le létrozole (Johnston and Dowsett, 2003).

Un autre exemple notable est représenté par les inhibiteurs de *poly-ADP-ribose-polymérase* (PARP), comme l'olaparib (Lynparza, AstraZeneca) ou le rucaparib (Rubraca, Clovis Oncology), utilisés pour le traitement de différents types de tumeurs présentant des mutations de gènes impliqués dans la réparation d'ADN par recombinaison homologue, tels que *BRCA1* et *BRCA2*, des gènes de prédisposition au cancer du sein (Coleman et al., 2017; Golan

et al., 2019; Kaufman et al., 2015; Robson et al., 2017). Puisque PARP est nécessaire pour l'autre voie majeure de réparation de l'ADN par *non-homologous end joining*, ces inhibiteurs provoquent une accumulation de cassures de l'ADN dans les cellules tumorales, entraînant ainsi leur mort. Cette stratégie se base sur le concept de « létalité synthétique » et exploite une vulnérabilité spécifique des cellules tumorales, causée par une mutation impliquée dans le processus oncogénique (Figure 7) (Sonnenblick et al., 2015).



**Figure 7 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de PARP.** Les protéines PARP se lient aux cassures de l'ADN et participent à la réparation de l'ADN par *non-homologous end joining* (NHEJ). En présence d'inhibiteur de PARP, on a la formation de cassures double-brin, qui peuvent être réparées, dans les cellules normales, par recombinaison homologue. En revanche, les cellules tumorales avec mutation de BRCA1/2 ne peuvent pas réparer ces dommages de l'ADN, entraînant ainsi une instabilité du génome qui provoque un arrêt du cycle cellulaire et la mort par apoptose. Figure adaptée de Sonnenblick et al., 2015.

La GTPase RAS, et notamment l'isoforme KRAS, est l'oncogène le plus fréquemment muté dans les cancers humains (Prior et al., 2020). Malgré les nombreux travaux menés pour trouver un traitement efficace pour inhiber cette protéine, le développement de thérapies fut un échec, ce qui avait porté certains chercheurs à estimer que RAS était une cible « impossible » (Moore et al., 2020). Très récemment, une nouvelle petite molécule ciblant spécifiquement la mutation KRAS-G12C, le sotorasib (Lumakras, Amgen), a été approuvée pour le traitement des cancers bronchiques présentant cette mutation, ouvrant peut-être la voie à d'autres traitements anti-RAS (Skoulidis et al., 2021).

Les rapalogues, première génération d'inhibiteurs de mTOR, ne ciblent pas directement cette kinase, contrairement aux composés de classe plus récente, ils agissent en se fixant sur la protéine FKBP12 et bloquent ainsi la voie de signalisation (Benjamin et al., 2011). Parmi ces molécules, on peut citer l'exemple de l'everolimus (Afinitor, Novartis) utilisé dans différents types de cancers, tels que le cancer du rein ou du sein (Baselga et al., 2012; Motzer et al., 2008).

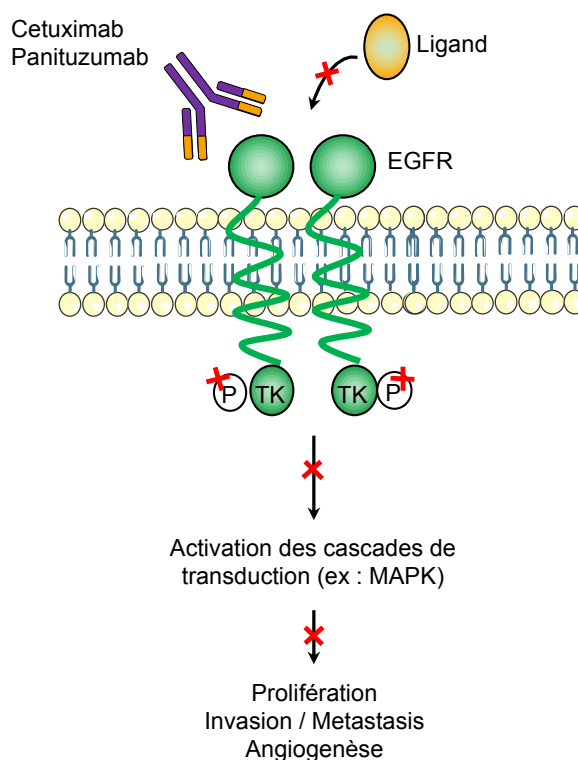
Une activation aberrante de la voie de signalisation Hedgehog (Hh) a été retrouvée dans le médulloblastome et le carcinome basocellulaire (Jones et al., 2012; Xie et al., 1998). Ces travaux ont porté au développement et à l'approbation d'inhibiteurs du récepteur *Smoothed*, tels que le vismodegib (Erivedge, Roche) et le sonidegib (Odomzo, Novartis), permettant de bloquer l'activation en aval des facteurs de transcription GLI et donc l'expression des gènes cibles de Hh associés à la progression tumorale (Ng and Curran, 2011).

### 1.3. Anticorps monoclonaux

Tout comme les petites molécules inhibitrices, les anticorps monoclonaux ont démontré une efficacité dans différents types de cancer et sont utilisés couramment en clinique. Comme ils ne peuvent pas pénétrer dans le compartiment intracellulaire, ils sont dirigés contre des antigènes présents soit au niveau de la membrane plasmique, soit sur une protéine extracellulaire.

#### 1.3.1. Inhibition des voies associées à la prolifération

Certains anticorps monoclonaux reconnaissent des oncogènes exprimés à la membrane cellulaire, comme c'est le cas du trastuzumab, développé pour inhiber HER2 dans le cancer mammaire (voir p.31). Un autre exemple typique est représenté par le cetuximab (Erbix, Merck) et le panitumumab (Vectibix, Amgen), deux autres anticorps monoclonaux humanisés capables de lier de façon spécifique le domaine extracellulaire de l'EGFR (Figure 8) (Kirkpatrick et al., 2004), et utilisés en monothérapie ou en combinaison avec la chimiothérapie pour le traitement des cancers colorectal et de la tête et du cou (García-Foncillas et al., 2019). Ces anticorps inhibent l'activation des voies de signalisation en aval de ces RTKs par des mécanismes différents : en interférant avec la liaison du ligand, en empêchant la dimérisation des récepteurs ou en promouvant leur dégradation (Wheeler et al., 2010). L'effet anti-tumoral de ces anticorps peut aussi dépendre de l'activation d'une réaction immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses (Hudis, 2007).



**Figure 8 : Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR.** Le cetuximab et le panituzumab bloquent la liaison des ligands à l'EGFR, inhibant ainsi la phosphorylation du récepteur et les événements en aval. Figure adaptée de Kirkpatrick et al., 2004.

### 1.3.2. Inhibition de l'interaction entre le cancer et son microenvironnement

D'autres anticorps monoclonaux utilisés en oncologie ciblent des protéines sécrétées qui participent à l'interaction de la tumeur avec les systèmes vasculaire et immunitaire. C'est par exemple le cas du bevacizumab (Avastin, Genetech), qui est capable de lier et de séquestrer le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), un facteur de croissance capable de promouvoir la néoangiogenèse tumorale. Cet anticorps a été approuvé pour le traitement de différents types de tumeurs, tels que le glioblastome et les cancers du côlon, poumon, et rein, et il agit en empêchant l'interaction du VEGF avec son récepteur, le VEGFR (Ferrara et al., 2004). La néoangiogenèse peut être également inhibée par des anticorps qui reconnaissent le domaine extracellulaire du VEGFR dans les cellules endothéliales, tels que le ramucirumab (Cyramza, Lilly), approuvé pour certains cancers colorectaux, bronchiques, hépatiques et gastriques. Un autre exemple de protéine exprimée dans les cellules tumorales et impliquée dans l'interaction avec le microenvironnement est le *programmed death-ligand 1* (PDL-1), capable d'inhiber l'activation des lymphocytes T *via* la liaison à son récepteur PD-1 (Havel et al., 2019). Ainsi, trois anticorps anti PDL-1 ont été approuvés en oncologie : l'atezolizumab (Tecentriq,

Genetech), l'avelumab (Bavencio, Merck/Pfizer) et le durvalumab (Imfinzi, Astrazeneca). Toutefois, PDL-1 peut aussi être exprimé par des cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur, et donc ces anticorps, ainsi que les autres inhibiteurs des checkpoints immunitaires, ne seront pas traités ici, car ils ne rentrent pas dans la définition stricte de thérapie ciblée que nous avons retenue pour cette thèse (voir p.30).

### 1.3.3. Anticorps ciblant des marqueurs tumoraux

Le premier anticorps monoclonal approuvé en clinique pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens, le rituximab (Ritaxon, Hoffmann-La Roche) a été développé pour reconnaître spécifiquement CD20, un antigène fortement exprimé dans les cellules lymphocytaires tumorales (Anderson et al., 1997). Contrairement aux autres anticorps monoclonaux cités précédemment, il n'agit pas en inhibant l'activité de la protéine ciblée, mais plutôt en permettant d'atteindre spécifiquement les cellules cancéreuses et de provoquer une réaction cytotoxique conduisant à leur mort par apoptose (Kosmas et al., 2002). Il connaît un succès clinique avec un taux de réponse élevé dans ce type de cancer (Colombat et al., 2001; Hainsworth, 2003) et est également utilisé en combinaison avec la chimiothérapie, notamment de type CHOP (combinaison de cyclophosphamide, d'adriamycine, de vincristine et de prednisone), ce qui permet d'améliorer le taux de rémission et de survie chez les patients (Czuczman et al., 1999).

Certains anticorps ont été conjugués à une drogue cytotoxique, appelés *antibody-drug conjugate* (ADC), afin de l'acheminer de façon spécifique au niveau des cellules tumorales qui expriment l'antigène correspondant. Parmi les premiers ADC approuvés en clinique, on retrouve le trastuzumab couplé à l'emtansine (Kadcycla, Roche), un dérivé de la maytansine inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, pour le traitement du cancer du sein métastatique HER2 positif (LoRusso et al., 2011). La reconnaissance du récepteur HER2 par le trastuzumab entraîne une internalisation de l'ADC au sein de la cellule cancéreuse, suivi d'une digestion protéolytique permettant le relargage du composé cytotoxique qui bloque la division, entraînant la mort cellulaire. D'autres ADC ont été approuvés en clinique pour le traitement de cancers liquides, comme le brentuximab vedotin (Adcetris, Seattle Genetics Inc.) pour le traitement de lymphomes CD30 positifs (Younes et al., 2010) ou encore le gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg, Pfizer) pour traiter les leucémies aiguës myéloïdes CD33 positives (Godwin et al., 2017).

## 2. Le cancer bronchique

### 2.1. Épidémiologie, facteur de risque et prévention

Le cancer du poumon est une maladie chronique qui se développe à partir des bronches et, plus rarement, des cellules tapissant les alvéoles pulmonaires. C'est la cause principale de mortalité liée au cancer dans le monde, avec près d'1,7 millions de décès par an. La plupart des personnes diagnostiquées ont 65 ans ou plus, avec un âge médian au moment du décès de 69 ans pour les hommes et 68 ans chez les femmes (American Cancer Society et l'Institut National du Cancer, INCa). En France, l'incidence et le taux de mortalité sont relativement stables chez les hommes, alors qu'ils sont en nette augmentation chez les femmes.

D'après l'INCa, le tabagisme est, de loin, le premier facteur de risque et la cause de près de 80% des décès associés au cancer bronchique. De plus, le tabagisme passif peut augmenter le risque de développer un cancer du poumon et serait à l'origine de 1 100 décès par an en France. Les principales recommandations pour réduire les risques de développer un cancer du poumon sont donc d'arrêter de fumer ou de s'éloigner de la fumée de cigarettes afin d'éviter le tabagisme passif. Concernant l'utilisation des cigarettes électroniques, plusieurs études sont en cours afin d'évaluer si leur utilisation a un impact sur le risque de développer un cancer du poumon.

D'autres facteurs environnementaux, tels que l'exposition à l'amiante, au radon ou à certains rayonnements ionisants, sont reconnus comme cancérigènes et sont donc susceptibles d'augmenter la survenue d'un cancer bronchique. Des radiothérapies antérieures pour le traitement d'un autre cancer et la pollution de l'air pourraient augmenter également le risque de développer un cancer du poumon (INCa). Bien que la plupart des cancers bronchiques soient dus à des expositions environnementales, des études suggèrent qu'il existe certains *loci* de susceptibilité, tels que ceux des gènes *BRCA2*, *CHEK2*, *RNASET2* ou encore *NRG1*, associés à un risque plus élevé de développer un cancer bronchique. (McKay et al., 2017; Wang et al., 2014).

### 2.2. Classification clinique et histologique

Le cancer du poumon est généralement classifié en deux principaux types histologiques : le cancer bronchique à petites cellules (CBPC), représentant environ 15% de cas, et le CBNPC, qui regroupe le restant 85% des cas.

Bien que la plupart de ces cancers soient hétérogènes, les pathologistes ont développé des classifications suivant le sous-type dominant, permettant une uniformisation dans la prise en charge des patients. Dans le cas du CBNPC, par exemple, le diagnostic du cancer bronchique se base sur la classification TNM (*Tumor-Node-Metastase*), régulièrement mise à jour par les cliniciens. Cette classification se base sur plusieurs facteurs, comme la taille de la tumeur, sa localisation, son degré d'invasivité et de potentiel métastatique. L'examen essentiel est le scanner thoracique, avec injection de produit de contraste, permettant de mesurer précisément la tumeur, et pouvant être complété par d'autres examens complémentaires, tel que l'IRM thoracique.

### 2.2.1. Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC)

Le CBPC est une forme agressive de cancer du poumon de type neuroendocrine, associée presque invariablement au tabagisme (Alexandrov et al., 2016). Il présente une mortalité particulièrement élevée, avec un taux de survie à 5 ans estimé à seulement 7 mois (Wang et al., 2017). Les altérations génétiques retrouvées dans une grande majorité des cas de CBPC sont l'inactivation concomitante des deux suppresseurs de tumeurs *Tumor Protein 53* (TP53) et *RB transcriptional corepressor 1* (RB1) (Rudin et al., 2021). D'autres altérations ont également été identifiées telles que des amplifications des gènes de la famille de *MYC* et des mutations provoquant la perte de fonction des gènes *NOTCH* (Lim et al., 2017; Rudin et al., 2021). Malgré la difficulté pour catégoriser les différentes formes de CBPC, une classification vient d'être proposée sur la base du niveau d'expression des facteurs de transcription *achaete-scute homologue*, *neurogenic differentiation factor 1*, *POU class 2 homeobox 3* et *yes-associated protein 1* (Rudin et al., 2019).

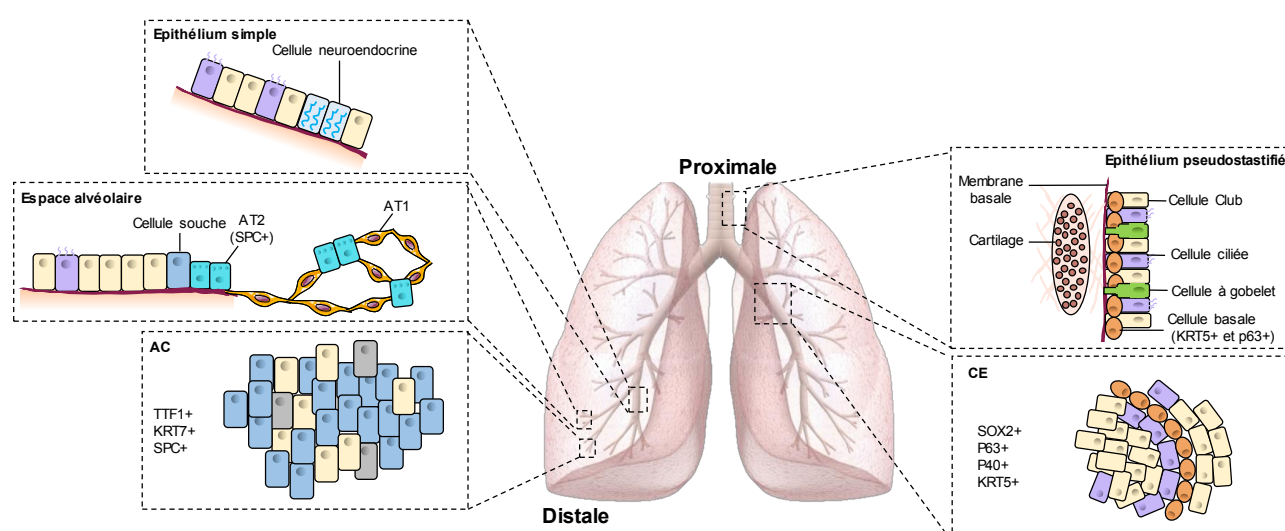
Le traitement standard pour la prise en charge des patients de CBPC est une combinaison chimiothérapeutique de cisplatine ou carboplatine avec l'étoposide (Farago and Keane, 2018). En 2019, une association de ce type de chimiothérapie avec l'anticorps monoclonal anti-PDL-1 atezolizumab (Tecentriq, Genentech) a été approuvé par la FDA en première ligne de traitement. Deux autres thérapies, l'inhibiteur de topoisomérase I topotecan et l'anticorps anti-PD-1 nivolumab (Opdivo, Bristol-Myers Squibb), ont montré des effets bénéfiques chez moins de 30% des patients, soulignant le manque de traitements effectifs pour ce type de cancer (Ready et al., 2019; Rudin et al., 2019).



### 2.2.2. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)

Les CBNPCs peuvent être regroupés en trois types principaux : les adénocarcinomes (environ 50% des cas), les carcinomes épidermoïdes (environ 40% des cas) et les carcinomes à grandes cellules (la forme minoritaire, environ 10% des cas).

Les adénocarcinomes possèdent une histologie plutôt glandulaire et se développent généralement à partir des pneumocytes de type II qui tapissent les alvéoles pulmonaires, dans les voies aériennes périphériques. Ces tumeurs expriment la plupart du temps des marqueurs biologiques, tels que le facteur de transcription *thyroid transcription factor-1* ou la kératine 7 (Figure 9) (Langer et al., 2010). Au contraire, les carcinomes épidermoïdes ont une localisation proximale et dérivent de l'épithélium pseudo-stratifié des voies respiratoires (Sarode et al., 2020). Ils expriment des biomarqueurs de kératination, tels que les kératines 5 et 6, en plus de l'expression d'autres marqueurs comme p63 ou encore *SRY-box 2* (Chen et al., 2014; Lu et al., 2010). Bien que toutes les formes de CBNPC soient associées au tabagisme, les carcinomes épidermoïdes s'avèrent y être plus fortement liés que les adénocarcinomes (American Cancer Society). Les carcinomes à grandes cellules constituent un sous-ensemble de CBNPC de type peu différencié. A la différence des adénocarcinomes et des carcinomes épidermoïdes, ils sont difficiles à classer, car ils ne présentent pas de marqueurs spécifiques et ils sont, par conséquent, diagnostiqués par exclusion (Chen et al., 2014).

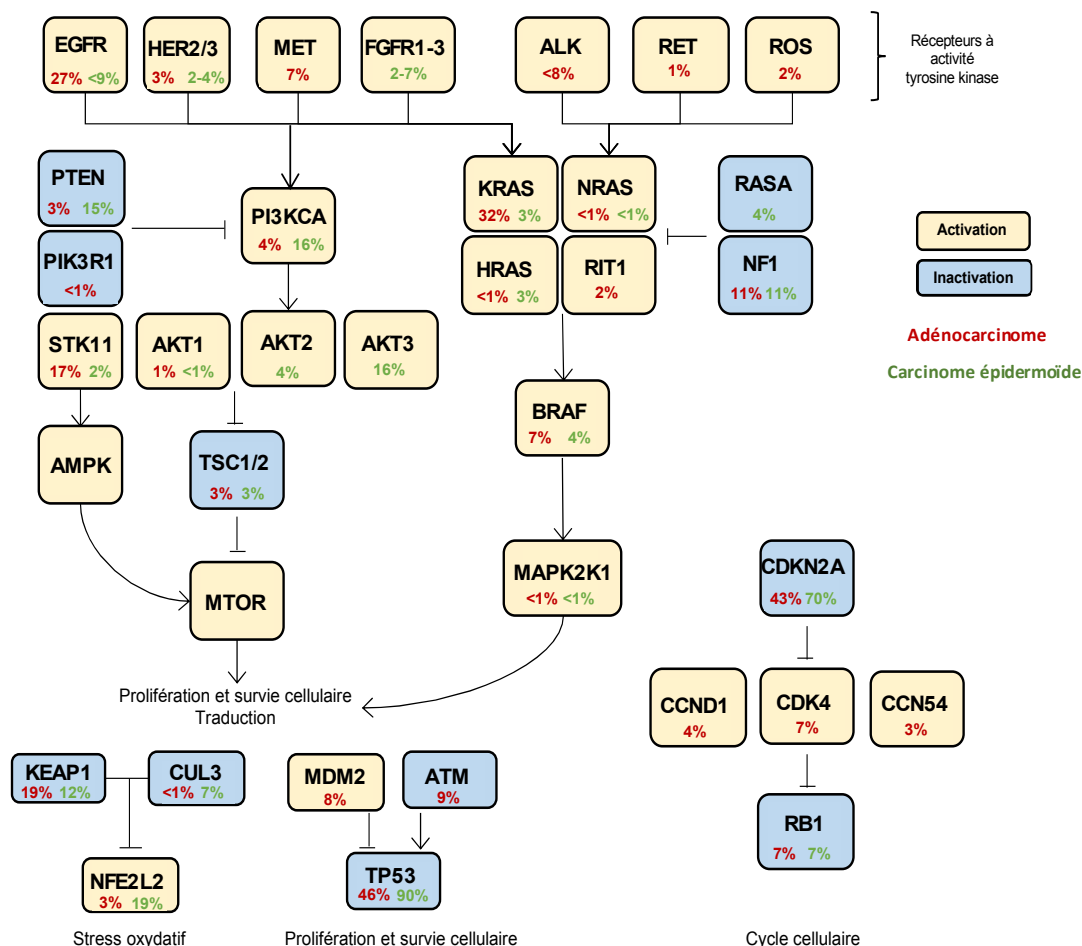


**Figure 9 : Diagramme représentant les cellules distales et proximales dans le poumon, ainsi que les marqueurs spécifiques de l'adénocarcinome et du carcinome épidermoïde.** Dans le poumon proximal, les cellules basales de la trachée ont été proposées comme cellules d'origine du carcinome épidermoïde au vue de leur expression commune de marqueurs comme p40, p63, SRY-box (SOX2), kératine 5 (KRT5). Les adénocarcinomes possèdent des caractéristiques proches des voies aériennes distales, avec l'expression de la protéine C du surfactant (SPC), de la kératine 7 (KRT7) et du facteur de transcription thyroïdien (TTF1). AT : type d'épithélium alvéolaire ; CE : carcinome épidermoïde ; AC : adénocarcinome. Figure adaptée de Chen et al., 2014.



### 2.3. Mutations fréquentes dans le CBNPC

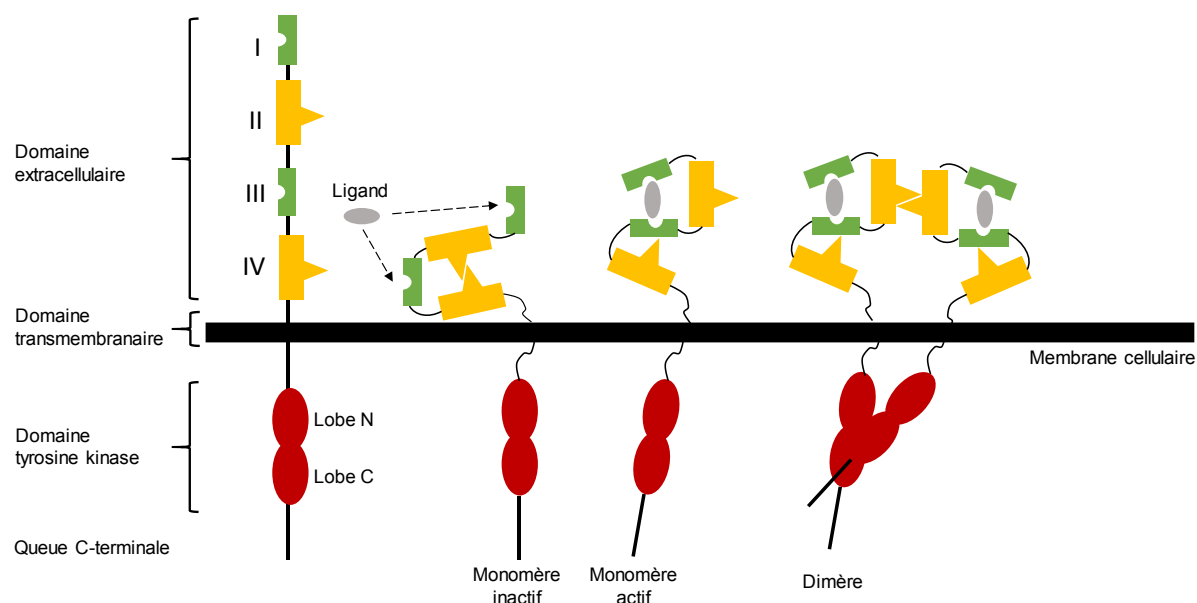
Certains gènes sont souvent mutés dans le CBNPC, avec une fréquence qui parfois varie en fonction du type histologique de la tumeur du patient (Figure 10) (Herbst et al., 2018). Ces altérations génétiques sont impliquées dans la formation et/ou la progression du CBNPC et elles représentent, par conséquent, des cibles potentielles pour le traitement. Si les mutations d'oncogènes, tels que KRAS, EGFR et ALK, sont, dans la majorité des cas, exclusives et reflètent donc une sensibilité différente de la tumeur vis-à-vis des agents thérapeutiques, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, comme *TP53* ou *CDKN2A*, est généralement distribuée de façon plus large (Skoulidis and Heymach, 2019). Les altérations génétiques plus fréquentes dans le CBNPC, et dont le rôle oncogénique dans ce type de cancer a été démontré, sont décrites plus en détails ci-dessous.



**Figure 10 : Altérations génétiques retrouvées dans le CBNPC.** La fréquence des altérations est basée sur la somme des mutations somatiques, des délétions homozygotes, des amplifications et de la sur- ou sous-expression des gènes (pour *AKT3*, *FGFR1* et *PTEN*). Les gènes les plus fréquemment mutés sont *KRAS*, *EGFR*, *TP53*, *KEAP1*, *STK11* et *NF1* dans l'adénocarcinome et *TP53* et *CDKN2A* dans le carcinome épidermoïde. Figure adaptée de Herbst et al., 2018.

### 2.3.1. Mutations d'EGFR

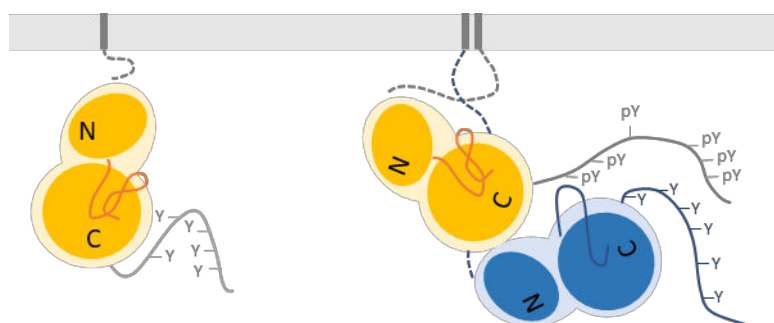
L'EGFR est un RTK qui fait partie de la famille ERBB des récepteurs de facteurs de croissance, incluant 3 autres membres : ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) et ERBB4 (HER4). Il partage une structure commune avec d'autres RTK, comprenant des domaines de liaison aux ligands dans la région extracellulaire, une hélice transmembranaire ainsi qu'une région cytoplasmique avec un domaine tyrosine kinase (TK) et une région C-terminale (Lemmon and Schlessinger, 2010). Le domaine TK, partie très conservée des RTKs, se compose d'un lobe N, capable de fixer l'ATP et d'un lobe C doté d'une activité phosphotransférase. Son activation est régulée par une boucle d'activation, dont le positionnement peut conditionner la conformation ouverte ou fermée de la poche de fixation de l'ATP.



**Figure 11 : Structure et activation de l'EGFR.** Les régions extracellulaires sont composées de quatre domaines, numérotés I, II, III et IV. Les domaines I et III sont des domaines de liaison au ligand, tandis que les domaines II et IV sont des domaines riches en cystéine qui se lient entre eux mais servent également à la dimérisation avec d'autres récepteurs. Le domaine tyrosine-kinase possède un lobe N-terminal et un lobe C-terminal, qui sont conservés chez les RTK. La queue C-terminale contient de nombreuses tyrosines, qui sont des cibles pour la phosphorylation. En l'absence de ligand, le récepteur adopte une conformation fermée (monomère inactif). Quand le ligand se fixe au niveau des domaines I et III, il en résulte un repliement exposant le domaine II, qui est l'interface de dimérisation. Les deux récepteurs actifs peuvent ainsi interagir, permettant le rapprochement des domaines catalytiques, qui entraîne une transphosphorylation. Figure adaptée de Sergina and Moasser, 2007

En conditions physiologiques, la liaison des ligands comme l'EGF ou le *transforming growth factor  $\alpha$*  entraîne un changement de conformation permettant la formation d'homodimère ou d'hétéro-dimères avec d'autres membres de la famille ERBB, notamment HER2 et HER3. Les modalités de dimérisation varient entre les différents types de RTKs. Certains

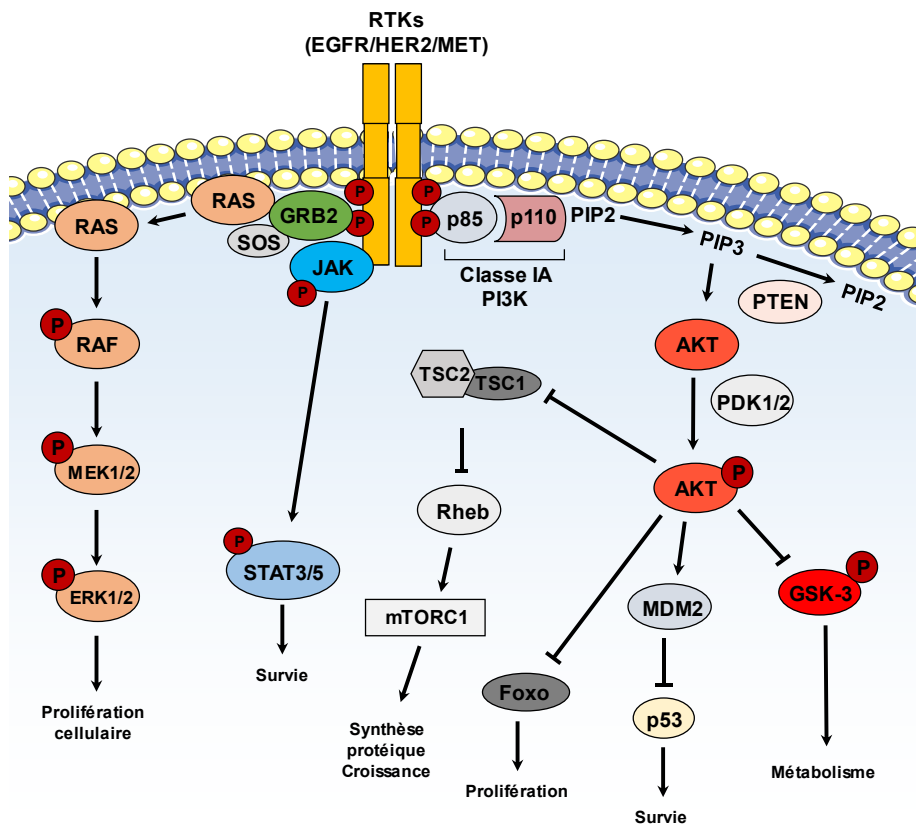
ligands, tel que le *nerve growth factor*, forment une sorte de pont entre deux molécules de récepteur. Dans le cas de l'EGFR, la fixation du ligand sur le monomère inactif entraîne un changement de conformation qui permet l'exposition d'un domaine de dimérisation, constituant ainsi l'interface avec un autre monomère de la famille ERBB (Lemmon and Schlessinger, 2010) (Figure 11). En l'absence de ligand, le domaine TK de la forme monomérique du récepteur est auto-inhibé. Contrairement à d'autres RTKs, la transphosphorylation de résidus tyrosines dans la boucle d'activation n'est pas essentielle pour la levée de l'auto-inhibition de l'EGFR (Zhang et al., 2006). Les ligands entraînent la formation d'un dimère asymétrique dans lequel le lobe C du premier récepteur, appelé « activateur », rentre en contact avec le lobe N du deuxième, appelé « récepteur » (Figure 12). Après un changement de conformation dans le lobe N et la boucle d'activation de la kinase réceptrice, l'auto-inhibition est levée, permettant la phosphorylation de plusieurs tyrosines présentes sur la queue C-terminale de « l'activateur » (Lemmon et al., 2014). Ces phospho-tyrosines servent de sites de fixation pour le recrutement de différentes protéines adaptatrices ou de signalisation intracellulaire.



**Figure 12 : Schéma représentant l'activation allostérique de l'EGFR.** Après dimérisation des récepteurs, il y a rapprochement des domaines tyrosines kinase, formant ainsi un dimère asymétrique. Le lobe C du domaine kinase représenté en jaune sert d'« activateur » et le lobe N de l'autre domaine kinase, représenté en bleu, est le « récepteur » qui devient activé allostériquement et trans-phosphoryle les tyrosines dans la queue C-terminale de l'activateur. Figure adaptée de Lemmon et al., 2014.

Ces molécules adaptatrices contiennent des domaines *Src homology 2* ou *phosphotyrosine binding* qui peuvent se lier aux phosphotyrosines et induisent l'activation de voies de signalisation en aval du récepteur. Par exemple, GRB2 ou *son of sevenless* (SOS) sont responsables de la stimulation de différentes protéines effectrices telle que RAS permettant alors l'activation de la voie des MAPKs. L'EGFR peut recruter d'autres protéines, comme PI3K ou *Janus kinases* (JAK), responsables de l'activation des voies PI3K-AKT-mTOR et JAK-

*Signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) respectivement, ayant pour conséquence finale une augmentation de la prolifération et la survie cellulaire (Figure 13) (Lemmon and Schlessinger, 2010; Sharma et al., 2007).

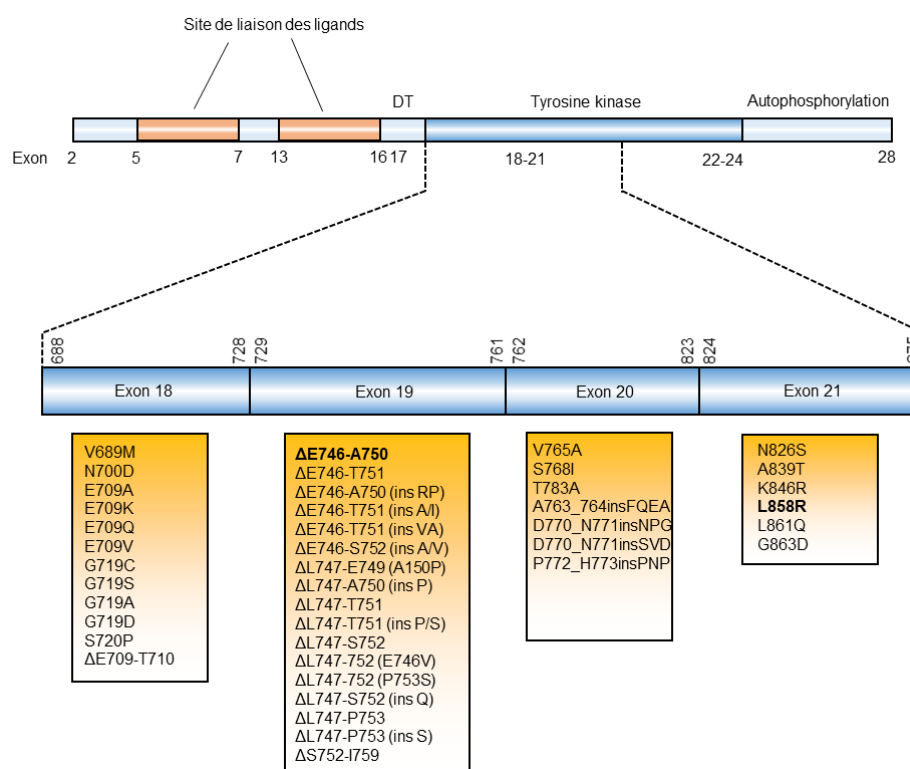


**Figure 13 : Voies de signalisation activées par les RTKs.** L'activation des RTKs à la suite de la liaison des ligands permet de stimuler différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, le métabolisme du glucose ou la synthèse protéique : les voies MAPK, JAK-STAT et PI3K-AKT. ERK, *extracellular signal-regulated kinases* ; Foxo : Forkhead box ; GSK3, *glycogen synthase kinase 3* ; GRB2, *growth factor receptor-bound protein* ; JAK, *Janus kinase* ; MDM2, *mouse double minute 2* ; MEK, *mitogen-activated protein kinase kinase* ; mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1* ; PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase* ; PIP2, *phosphatidylinositol-4,5 biphosphate* ; PIP3, *phosphatidylinositol(3,4,5) triphosphate* ; PTEN, *phosphatase et tensin homolog* ; Rheb, *RAS homolog enriched in the brain* ; SOS, *son of sevenless* ; STAT, *signal transducer et activator of transcription* ; TSC1/2, *tuberous sclerosis 1/2*. PDK1/2 : *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/2*.

Chez les patients atteints de CBNPC, des mutations activatrices de l'EGFR sont présentes dans environ 15% des cas pour la population caucasienne et dans plus de 50% des cas pour la population asiatique (Barlesi et al., 2016; Rosell et al., 2009; Shi et al., 2014). Ce type d'aberration est plus fréquemment retrouvé dans l'adénocarcinome (Herbst et al., 2018). Bien qu'il existe beaucoup de mutations touchant le site catalytique de l'EGFR, les formes majoritairement retrouvées chez les patients atteints de CBNPC (environ 90%) sont la substitution L858R dans l'exon 21 et la délétion de quelques codons dans l'exon 19 (Figure 14)

(Linardou et al., 2009; Pao and Chmielecki, 2010; Ke and Wu, 2016). Ces mutations entraînent une activation d'EGFR indépendante de la fixation du ligand, ayant pour conséquence finale la stimulation constitutive des voies de signalisation associées. (Pao and Chmielecki, 2010; Sharma et al., 2007). Ces deux altérations majoritaires sont liées à une sensibilité accrue aux inhibiteurs d'EGFR, comme cela a été énoncé dans la première partie de cette introduction de thèse (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004).

Des mutations plus rares, retrouvées chez approximativement 10% des patients, représentent un groupe relativement hétérogène par rapport à leur sensibilité aux EGFR-TKIs. Elles incluent des insertions ou des mutations ponctuelles dans l'exon 20 (S768I) des substitutions dans l'exon 18 (E709A/G/K/V et G719S/A/C/D) et dans l'exon 21 (L861Q), mais également des mutations dites « complexes » (S768I+G719X) (Figure 14) (Russo et al., 2019). Alors que les altérations touchant l'exon 18 confèrent globalement une sensibilité aux EGFR-TKIs, la plupart des insertions dans l'exon 20 sont associées à une résistance primaire (Yasuda et al., 2012).



**Figure 14. Principales mutations de l'EGFR retrouvées dans le CBNPC.** Cette représentation du gène *EGFR* montre la distribution des exons dans la région codant le domaine extracellulaire, où se trouvent les sites de liaison des facteurs de croissance, le domaine transmembranaire (DT) et le domaine intracellulaire, qui comprend les domaines tyrosine kinase et d'autophosphorylation. Les exons 18-21 du domaine tyrosine kinase sont la région où se situent les principales mutations retrouvées dans le CBNPC. Les mutations les plus répandues sont des délétions de quelques codons dans l'exon 19, ainsi que la substitution L858R dans l'exon 21, codant la boucle d'activation du récepteur (indiquées en gras sur le schéma). Figure adaptée de Russo et al., 2019 et Sharma et al., 2007.

### *2.3.2. Altérations de HER2*

HER2, codé par le gène *ERBB2*, est un RTK de la famille de l'EGFR qui, contrairement aux autres membres, ne possède pas de ligand connu (Yarden and Sliwkowski, 2001). Il est associé à un fort potentiel oncogénique, notamment dans le cancer du sein dans lequel il est bien souvent amplifié et/ou surexprimé (Wolff et al., 2018). Des mutations activatrices de HER2 sont retrouvées chez 2-4% des patients atteints de CBNPC, avec une fréquence globalement plus élevée dans les adénocarcinomes, les femmes et la population asiatique (Stephens et al., 2004). Dans environ 90% des cas, ces mutations correspondent à des insertions de 9 à 12 nucléotides dans l'exon 20 codant pour une partie du domaine TK et elle provoquent une activation constitutive du récepteur (Arcila et al., 2012; Mazières et al., 2013). L'activation oncogénique de HER2 peut également être le résultat d'une surexpression ou d'une augmentation du nombre de copies du gène par amplification ou polysomie du chromosome 17 (Mar et al., 2015). La surexpression et l'amplification de *ERBB2* sont retrouvées respectivement chez 2-3% et 2-4% des patients atteints de CBNPC (Yoshizawa et al., 2014).

### *2.3.3. Altérations de MET*

Dans environ 7% des cas de CBNPC, on retrouve des altérations de *MET*, gène codant pour le RTK c-Met, ayant pour ligand l'*hepatocyte growth factor* (Guo et al., 2020). Bien qu'il partage des propriétés oncogéniques avec d'autres RTKs, c-Met est décrit comme un récepteur non conventionnel en raison de ses fonctions pléiotropes sur la motilité cellulaire, l'invasion, l'angiogenèse ou encore le processus métastatique (Comoglio et al., 2018). Par exemple, des conditions hypoxiques peuvent induire une expression de *MET* via le facteur *hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ), promouvant des signaux pro-invasifs, associés à la dissémination des cellules cancéreuses vers d'autres sites (Comoglio et al., 2018).

La dérégulation des voies de signalisation associées à c-Met observée dans le CBNPC peut être due à de mécanismes différents, tels que l'amplification du gène et des mutations ponctuelles (Guo et al., 2020). L'amplification de c-Met a été observée dans 1-5% des patients atteints de CBNPC (Drilon et al., 2017) et elle peut être le résultat, comme pour HER2, soit d'une polysomie avec augmentation du nombre de copies du chromosome 7, soit de la duplication focale ou régionale de *MET* (Guo et al., 2020). Parmi les mutations ponctuelles, dans environ 3-4% des CBNPCs on retrouve des substitutions ou des insertions qui affectent le site d'épissage de l'exon 14 (Kong-Beltran et al., 2006; Paik et al., 2015). Ces mutations

entraînent un saut de cet exon, qui code pour le domaine juxta-membranaire du récepteur (Reungwetwattana et al., 2017). Ce domaine contient, le site de phosphorylation Y1003 impliqué dans le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase Cbl. En l'absence de ce domaine, c-Met n'est pas ubiquitiné et il peut donc s'accumuler, provoquant une augmentation de la signalisation en aval (Comoglio et al., 2018). Deux autres sites semblent participer à l'effet oncogénique du saut de l'exon 14 : comme la sérine en position 985, pouvant être phosphorylée par la PKC afin de réguler négativement l'activation de c-Met, et un site de clivage potentiel par les caspases (Cortot et al., 2017).

### 2.3.4. Mutations de *KRAS*

Les mutations de *KRAS* sont présentes dans environ 30% des adénocarcinomes (Ryan and Corcoran, 2018). Le gène *KRAS* code une petite GTPase pouvant être activée en se liant au GTP et ainsi déclencher des voies en aval, telles que MAPKs et PI3K-AKT (Mo et al., 2018). Cette activation est régulée par des facteurs permettant l'échange GDP-GTP ou promouvant l'activité GTPase de RAS. Eu égard à son rôle central dans la signalisation cellulaire, et notamment des RTKs, RAS est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques, tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Moore et al., 2020).

Dans le CBNPC, les mutations du gène *KRAS* sont le plus fréquemment retrouvées chez les patients atteints d'adénocarcinome (30%) que chez ceux atteints de carcinome épidermoïde (5%) (Ferrer et al., 2018; Zhou and Christiani, 2011). Les mutations inhibent l'activité GTPase de *KRAS*, entraînant ainsi une accumulation de la forme active couplée au GTP au sein de la cellule cancéreuse. Les mutations les plus fréquemment retrouvées chez les patients touchent les exons 2 et 3 et affectent les codons 12, 13, 61 et plus rarement le codon 146. La mutation majoritaire est la mutation ponctuelle G12C (42%), mais on retrouve également les mutations G12V (17%), G12D (17%) et G12A (7%) (Salgia et al., 2021).

### 2.3.5. Mutations de *BRAF*

Des mutations somatiques de *BRAF* ont été détectées chez environ 3-7% des patients atteints de CBNPC (Herbst et al., 2018; Leonetti et al., 2018). Le gène *BRAF* code pour la protéine BRAF, une sérine/thréonine kinase en amont des MAPKs, membre de la famille des protéines kinases RAF avec ARAF et CRAF (Karoulia et al., 2017). L'interaction de BRAF avec RAS permet le recrutement de ce complexe à la membrane, puis la dimérisation et l'activation de BRAF. BRAF déclenche ainsi la cascade de signalisation des MAPKs, en



phosphorylant les kinases MEK1 et MEK2, qui à leur tour phosphorylent les *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2* (ERK1/2) (Figure 13) (Zhang and Liu, 2002).

Environ 50% des mutations de *BRAF* dans le CBNPC se trouvent dans l'exon 15, entraînant le remplacement d'une valine par un glutamate en position 600 (V600E). Cette mutation est retrouvée plus fréquemment chez les femmes et dans l'adénocarcinome (Cui et al., 2017; Leonetti et al., 2018). Les mutations *BRAF* non-V600E représentent l'autre moitié des patients et peuvent être d'autres substitutions en position 600, comme V600K/D/M, ou alors des mutations qui affectent différents codons, telles que G464E/V/R, G469A/V/S, D469V ou encore D594G (Litvak et al., 2014). Dans la plupart des cas, les mutations de *BRAF* surviennent dans la région qui code pour le domaine kinase et elles ont comme conséquence de déstabiliser la conformation inactive de *BRAF* au profit de celle active (Wan et al., 2004).

### 2.3.6. Mutations de *PIK3CA* et *PTEN*

Les phosphatidylinositol-3-kinases sont des acteurs clés de la voie de signalisation intracellulaire PI3K-AKT-mTOR, régulant la prolifération, l'adhésion, la survie et la motilité cellulaire (Hoxhaj and Manning, 2020). Celle-ci se trouve fréquemment dérégulée dans différents types de cancers non seulement à cause d'altérations des récepteurs aux facteurs de croissance en amont, mais également suite à des mutations qui affectent certains de ses acteurs majeurs, tels que *PIK3CA* et *Phosphatase and TENsin homolog* (*PTEN*) (Thorpe et al., 2015).

Des études réalisées chez des patients atteints de CNBPC ont révélé la présence de mutations dans le gène *PIK3CA*, codant pour la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  de PI3K (Janku et al., 2011; Samuels et al., 2004). Ces mutations surviennent principalement au niveau des résidus E452 et E545, dans l'exon 9, et H1047, dans l'exon 20, constituant une sorte de « hot spots » mutationnels, ayant pour conséquence finale l'activation constitutive de PI3K (Chaft et al., 2012).

*PTEN* est une phosphatase lipidique impliquée dans la régulation de la voie PI3K-AKT-mTOR par son action antagoniste sur PI3K en déphosphorylant PIP3 en position D3 pour générer PIP2 (Figure 13) (Bunney and Katan, 2010). Des mutations inactivatrices de ce gène suppresseur de tumeur sont observées dans 3 à 15% des CBNPCs, plus fréquemment dans les carcinomes épidermoïdes. Ces mutations touchent généralement les exons 5 à 8 et entraînent une perte de fonction de la protéine, conduisant alors à une accumulation de PIP3 et une activation de AKT (Engelman, 2009; Janku et al., 2014).



### 2.3.7. Fusions oncogéniques

Les gènes *ALK*, *ROS1* et *RET*, codant pour des RTKs, peuvent faire l'objet de réarrangements chromosomiques qui conduisent à la formation de protéines de fusion constitutivement activées, responsables de l'initiation et de la progression de différents types de cancer (Schram et al., 2017). Dans le CBNPC, les réarrangements chromosomiques impliquant *ROS* et *RET* sont relativement peu fréquents (environ 1-2%), alors que ceux impliquant *ALK* sont plus communs et représentent entre 3 et 7% des cas (Shaw et al., 2013a). Il existe plusieurs partenaires conduisant à l'expression de nombreux variants de fusion et impliquant différents mécanismes de réarrangements chromosomiques (Shaw et al., 2013a). *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4* (*EML4*) est le gène le plus fréquemment impliqué dans ce type de fusions avec *ALK* dans le CBNPC (Soda et al., 2007). Néanmoins, d'autres partenaires ont été identifiés au cours des dernières années, tels que *translocated promoter region*, *nuclear basket protein* (Choi et al., 2014), *Kinesin Family Member 5B* (*KIF5B*) (Takeuchi et al., 2009), *Kinesin Light Chain 1* (Togashi et al., 2012), *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 3* (Jung et al., 2012) et plus récemment *Dynactin Subunit 1* et *Sequestosome 1* (Iyevleva et al., 2015). Les réarrangements concernant *ROS1* ont en général comme résultat des fusions avec les gènes *CD74* ou *TPD52L1* (Drilon et al., 2021; Zhu et al., 2016). Quant à *RET*, son partenaire le plus fréquent dans le CBNPC est le gène *KIF5B* (Gautschi et al., 2017). Les conséquences de ces fusions peuvent varier en fonction des gènes impliqués, mais, dans la plupart des cas, cela conduit à l'activation constitutive du domaine catalytique du RTK et, donc, des voies de signalisation en aval.

### 2.3.8. Inactivations de *p53* et *p16*

*TP53* est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers (Bykov et al., 2018). Il code la protéine *p53*, un facteur de transcription activé en réponse au stress génotoxique, capable de déclencher l'arrêt du cycle cellulaire, la mort par apoptose ou la sénescence, grâce à la régulation de différents gènes, tels que *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*, *BCL2 associated X*, *apoptosis regulator*, *p53 upregulated modulator of apoptosis* et *solute carrier family 7 member 11*. La plupart des altérations de *TP53* sont des mutations faux-sens qui affectent le domaine de liaison à l'ADN, rendant la protéine incapable d'exercer ses fonctions (Mogi and Kuwano, 2011). Dans le CBNPC, les mutations de *TP53* sont plus fréquentes dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes et touchent

principalement les codons 157, 158, 245, 248 et 273 (Herbst et al., 2018; Mogi and Kuwano, 2011).

Un autre gène suppresseur de tumeur fréquemment altéré dans le CBNPC est *cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*, codant p16INK4a, une protéine inhibitrice des kinases CDK4/6, impliquées dans la phosphorylation de la *retinoblastoma protein* (Rb) et p14ARF, une protéine pouvant interagir avec p53. Dans le CBNPC, l'inactivation de p16 se produit le plus souvent par délétion du gène ou hyperméthylation du promoteur (Tam et al., 2013).

### 2.4. Traitement du CBNPC

Après l'établissement du diagnostic, la prise en charge du patient dépend du stade et du grade de la tumeur, défini par la classification TNM, et de ses caractéristiques histologiques et génétiques. Dans le cas de tumeurs primaires bien localisées à un stade peu avancé (stades I à II), la chirurgie est le traitement le plus utilisé et reste le seul potentiel curatif (Uramoto and Tanaka, 2014). La résection chirurgicale de la tumeur peut être associée à un traitement adjuvant, tel que radiothérapie, chimiothérapie (Chaft et al., 2021) ou thérapie ciblée (Wu et al., 2020). La rechute peut être due à des micro-métastases présentes avant la chirurgie, ou bien à la dissémination de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine au cours de la résection tumorale. Les CBNPC qui récidivent après une chirurgie ou qui présentent un stade plus avancé sont traités de façon systémique avec des chimiothérapies, des immunothérapies ou des thérapies ciblées. Le choix pour l'une ou l'autre de ces thérapies dépend de l'identification d'altérations moléculaires au sein de la tumeur après biopsie (Hanna et al., 2020).

#### 2.4.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie est administrée en première ligne ou en adjuvant lorsque l'on ne détecte aucune altération moléculaire que l'on peut cibler avec une autre thérapie. Elle est utilisée aussi chez les patients atteints de CBNPC métastatiques, dans le but de réduire les symptômes liés à la progression tumorale, prolonger la survie et améliorer la qualité de vie du patient (Arbour and Riely, 2019).

Avant les années 2000, les patients atteints de CBNPC étaient traités avec le même type de chimiothérapie en fonction du sous-type histologique. Actuellement, les chimiothérapies cytotoxiques sont plutôt utilisées en combinaison, afin de diminuer le risque de rechute

(Ettinger et al., 2019; Hanna et al., 2020). En effet, il a été montré que l'utilisation concomitante de plusieurs composés cytotoxiques, dont au moins un dérivé des sels de platine, permet d'augmenter la survie des patients, comparée à une monothérapie (Zukin et al., 2013). Cependant, la plupart des chimiothérapies cytotoxiques causent des effets secondaires relativement lourds comme les nausées et les vomissements, l'alopécie, la fatigue, des dysfonctionnements rénaux ou encore une myélosuppression (Arbour and Riely, 2019).

### 2.4.2. Immunothérapie

Les cellules cancéreuses peuvent exprimer des néo-antigènes à leur surface susceptibles d'être reconnus par le système immunitaire et donner lieu à une réponse antitumorale. Or, souvent cette réponse est inhibée par des mécanismes d'immunotolérance activés par des récepteurs comme PD-1 et *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) exprimés dans les cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T (Kubli et al., 2021). Ainsi, des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICB : *immune checkpoint blockers*) ont été développés afin de lever ces boucles de régulation et permettre donc de renforcer la réponse dirigée contre les cellules tumorales. Les principaux ICB approuvés pour le traitement du CBNPC sont des anticorps monoclonaux ayant comme cibles PD-1, son ligand PD-L1 et CTLA-4, et sont utilisés en première ligne, seuls ou en combinaison, chez des patients à un stade avancé et/ou métastatique (Grant et al., 2021; Herbst et al., 2018). L'utilisation d'inhibiteurs de PD-1, tel que le pembrolizumab (Keytruda, Merck), a montré une meilleure efficacité comparativement aux chimiothérapies, avec une survie sans progression et globale plus longue, mais seulement chez des patients avec une expression relativement élevée (50% ou plus) de PD-L1 (Reck et al., 2016). Pour cette raison, les taux d'expression de PD-1 et PD-L1 sont testés par immunohistochimie en tant que facteurs prédictifs de réponse lors des examens effectués sur la biopsie tumorale du patient (Hanna et al., 2020).

### 2.4.3. Thérapie ciblée

L'identification d'altérations génétiques impliquées dans l'initiation et/ou la progression du CBNPC (voir ci-dessus) a permis le développement d'un certain nombre de thérapies ciblées. Elles sont généralement utilisées en première ligne de traitement dans le cas de cancers bronchiques inopérables au stade avancé, mais elles peuvent également servir de thérapies adjuvantes après résection chirurgicale des tumeurs à un stade plus précoce. A ce jour, les molécules approuvées en clinique permettent de cibler ALK, ROS, BRAF, MET, RET, KRAS

(mutation G12C) et EGFR dans les CBNPCs qui présentent une mutation de ces oncogènes. Ci-dessous je traiterai de façon générale certaines de ces thérapies ciblées, pour ensuite me concentrer sur les inhibiteurs d'EGFR.

### 2.4.3.1. Exemples de thérapie ciblée hors EGFR-TKIs

Le crizotinib est un inhibiteur de ALK qui montre une meilleure efficacité comparé à la chimiothérapie chez les patients dont la tumeur présente un remaniement chromosomique qui provoque l'expression d'une protéine de fusion contenant le domaine catalytique de ce récepteur (Shaw et al., 2013; Solomon et al., 2014). Ce composé, qui inhibe également d'autres RTKs, a été aussi approuvé pour le traitement de CBNPCs avec fusions de ROS1 (2016) ou des altérations de l'exon 14 de MET après progression sous chimiothérapie (2018). D'autres inhibiteurs d'ALK ont été développés, tels que l'alectinib (Alecensa, Genentech), le ceritinib (Zykadia, Novartis) et le brigatinib (Alunbrig, Takeda). Chez des patients avec mutation de ALK, l'alectinib et le brigatinib ont montré une activité supérieure, ainsi qu'une meilleure pénétration dans le système nerveux central (SNC) (Camidge et al., 2018; Peters et al., 2017). Malheureusement, malgré le succès rencontré avec ces inhibiteurs, les patients invariablement rechutent. En 2018, un autre composé, le lorlatinib (Lorviqua, Pfizer), a été approuvé pour le traitement du CBNPC en première ligne ou après progression suite à un traitement initial avec crizotinib (Shaw et al., 2020; Solomon et al., 2018).

Concernant les altérations génétiques impliquant le gène *RET*, plusieurs inhibiteurs ont fait l'objet de recherche clinique, et notamment le selpercatinib (Retevmo, Eli Lilly), qui a montré une efficacité clinique chez les patients préalablement traités ou pas par une chimiothérapie (Drilon et al., 2020) et qui a été approuvé en 2020 par la FDA pour le traitement du CBNPC métastatique présentant des fusions de ce gène. Le cabozantinib (Cabometyx, Exelixis), un composé aussi capable d'inhiber d'autres kinases, telles que MET, VEGFR ou encore c-KIT (Drilon et al., 2013), a également montré une efficacité lors d'un essai de phase II chez des patients de CBNPC avec fusion de RET (Drilon et al., 2016).

Approuvés pour le traitement du mélanome, les inhibiteurs de B-Raf vemurafenib et dabrafenib (Tafinlar, GlaxoSmithKline) ont montré une réponse clinique en monothérapie chez les patients de CBNPC présentant la mutation BRAF-V600E (Hyman et al., 2015; Planchard et al., 2016b). Comme pour le mélanome, la combinaison avec des inhibiteurs de MEK, tel que le trametinib, s'est révélée encore plus efficace (Planchard et al., 2017). Ainsi, l'association

dabrafenib et trametinib a été approuvée en 2017 pour le traitement de CBNPCs présentant la mutation BRAF-V600E.

### *2.4.3.2. Thérapies ciblées anti-EGFR*

#### *2.4.3.2.1 EGFR-TKIs de première génération*

Les molécules de première génération, gefitinib et erlotinib, sont des EGFR-TKIs capables de se lier de façon non-covalente à la poche de liaison à l'ATP, afin d'empêcher l'interaction entre le domaine TK et la molécule d'ATP. Ils ont été approuvés en 2003 et 2004 pour traiter les patients atteints de CBNPC ayant rechuté après une chimiothérapie conventionnelle. L'utilisation de ces inhibiteurs s'est avéré particulièrement efficace chez les patients présentant les mutations L858R et les délétions de l'exon 19 (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004). Il a été montré que ces mutations activatrices réduisent en même temps l'affinité d'EGFR pour l'ATP, permettant à ces inhibiteurs d'inhiber plus fortement la forme mutée que la forme sauvage du récepteur (Carey et al., 2006; Yun et al., 2007). Par la suite, des études cliniques de phase III (IPASS et NEJ002), réalisées en Asie de l'Est et au Japon, révélèrent que le gefitinib augmente significativement la survie sans progression des patients avec EGFR muté, comparativement à la chimiothérapie (Maemondo et al., 2010; Mok et al., 2009). Un peu plus tard, les mêmes résultats furent obtenus pour l'erlotinib dans les essais de phase III OPTIMAL et EURTAC, réalisées chez des patients asiatiques et européens (Rosell et al., 2012; Zhou et al., 2011). Ainsi, ces travaux conduisirent à l'approbation du gefitinib (en 2013) et de l'erlotinib (en 2015) pour le traitement en première ligne des patients de CBNPC avec mutations activatrices d'EGFR.

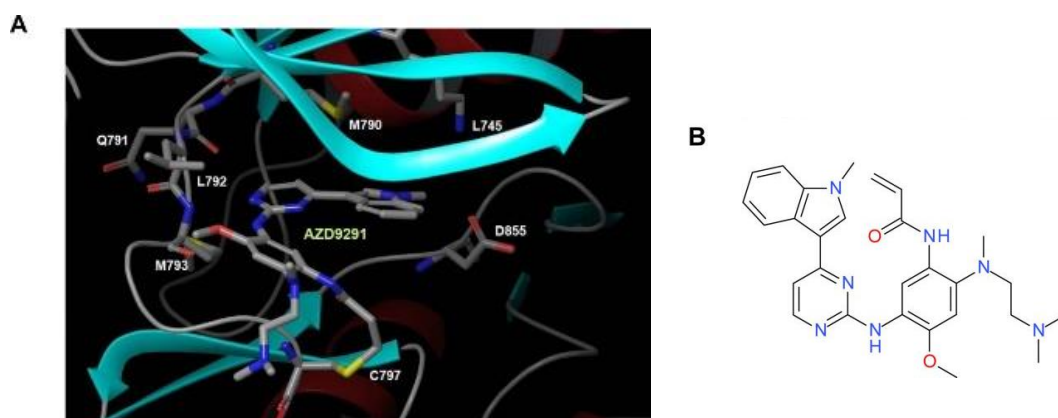
#### *2.4.3.2.2 EGFR-TKIs de deuxième génération*

Malgré une réponse initiale au gefitinib ou à l'erlotinib, la plupart des patients rechute au bout de 10-12 mois de traitement, à cause de l'apparition de mécanismes de résistance. Dans environ 60% des cas, ceci est dû à une mutation secondaire touchant l'exon 20 de l'EGFR donnant lieu à la substitution T790M, qui augmente l'affinité du récepteur muté pour l'ATP à des niveaux proches du sauvage (Yun et al., 2008). Dans le but de surmonter la résistance médiée par la substitution T790M, différents inhibiteurs de seconde génération ont été développés. Ces composés, tels que l'afatinib (Giotrif, Boehringer Ingelheim Pharmaceutical) et le dacomitinib (Vizimpro, Pfizer), se lient de façon covalente à la poche de liaison de l'ATP au sein du domaine TK de l'EGFR (Yu and Pao, 2013). Bien qu'ayant montré des résultats

encourageants dans des études précliniques, l'afatinib s'est révélé peu efficace chez les patients présentant une résistance acquise aux inhibiteurs d'EGFR, avec un bénéfice minime sur la survie (Katakami et al., 2013; Miller et al., 2012). En revanche, cet inhibiteur a maintenu une remarquable efficacité en première ligne chez des patients présentant des mutations primaires de l'EGFR en comparaison avec la chimiothérapie, notamment en doublant le taux de réponse et en augmentant considérablement la survie sans progression des patients présentant soit la substitution L858R, soit une délétion dans l'exon 19 (Sequist et al., 2013; Yang et al., 2013). A la suite de ces études cliniques, l'afatinib reçu en 2013 une approbation par la FDA pour le traitement des patients atteints de CBNPC à un stade avancé et présentant des mutations d'EGFR. De plus, des études cliniques plus récentes ont montré que l'afatinib et le dacomitinib permettent d'augmenter la survie sans progression des patients avec EGFR muté en comparaison avec un traitement au gefitinib (Mok et al., 2018; Paz-Ares et al., 2017; Wu et al., 2017). En 2018, le dacomitinib reçu également une approbation par la FDA pour le traitement en première ligne de patients atteints de CBNPC métastatiques porteurs de la mutation L858R ou de la délétion dans l'exon 19.

### 2.4.3.2.3 EGFR-TKIs de troisième génération

L'osimertinib (Tagrisso, Astrazeneca) est le seul EGFR-TKI de troisième génération approuvé pour les patients de CBNPC avec mutations d'EGFR (Jänne et al., 2015; Planchard et al., 2018). Contrairement aux inhibiteurs de première ou deuxième génération, il est composé d'un noyau anilinopyrimidine et se fixe de manière irréversible sur la cystéine en position 797 du récepteur (Figure 15) (Cross et al., 2014).



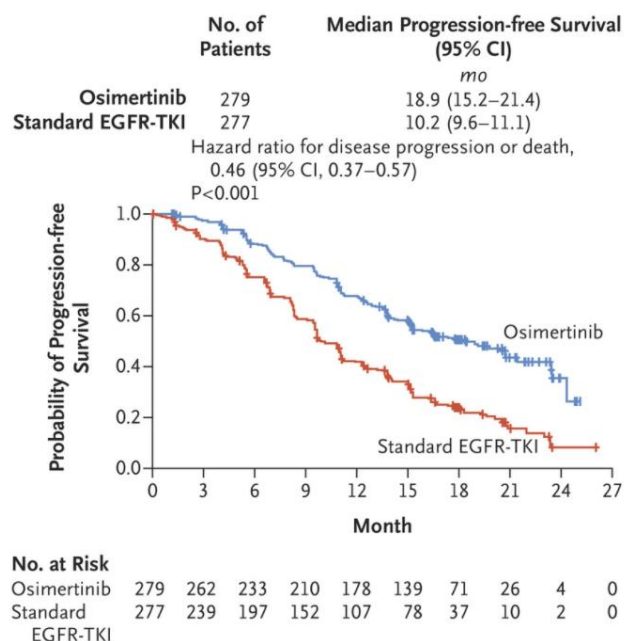
**Figure 15 : Mode de liaison et structure de la molécule d'osimertinib. A,** La structure de l'EGFR-T790M permet de visualiser le mode de liaison covalent entre l'osimertinib et le récepteur *via* la cystéine 797. **B,** Structure chimique de l'osimertinib (Cross et al., 2014).

Dans des études *in vitro*, l'osimertinib révéla une puissance 200 fois supérieure envers les formes mutés d'EGFR comparées au récepteur sauvage (Cross et al., 2014). En utilisant des modèles transgéniques et de xénogreffes de CBNPC résistant aux EGFR-TKIs de première génération (EGFR-L858R/T790M), les mêmes auteurs montrèrent un effet significatif de ce composé sur la progression tumorale. Ces résultats furent confirmés dans des études cliniques (Jänne et al., 2015) et l'osimertinib reçut une approbation accélérée par la FDA en 2015 pour le traitement de patients ayant développé une résistance aux inhibiteurs d'EGFR de première ou deuxième génération suite à l'apparition de la mutation EGFR-T790M.

Par la suite, l'étude d'extension AURA de phase II confirma l'efficacité de l'osimertinib chez des patients atteints de CBNPC avec la mutation T790M de l'EGFR prétraités avec des inhibiteurs de première génération, avec des effets secondaires minimes et souligna également l'importance d'effectuer des biopsies afin de s'assurer de la présence de cette mutation, utilisée comme marqueur prédictif de la réponse à l'osimertinib (Goss et al., 2016; Yang et al., 2017). En 2017, l'étude clinique AURA de phase III montra une augmentation de la durée moyenne de survie sans progression des patients atteints de CBNPC résistant aux EGFR-TKIs de première génération traités par osimertinib, comparés à la combinaison chimiothérapeutique platinum-pemetrexed (Mok et al., 2017). Cette même étude permit de démontrer que l'osimertinib était capable de pénétrer dans le SNC et qu'il était efficace même chez des patients ayant développé des métastases au niveau du cerveau. Ces résultats conduisirent en 2017 à l'approbation complète de l'osimertinib chez les patients ayant progressé après un traitement avec un EGFR-TKI et présentant la mutation T790M.

Suite à ces résultats, l'osimertinib fut testé en première ligne de traitement pour tenter d'éviter l'apparition de résistance chez les patients atteints de CBNPC avec mutations d'EGFR. L'étude FLAURA de phase III mis en évidence que l'osimertinib était plus efficace que le gefitinib et l'erlotinib en première ligne de traitement, avec une augmentation de 10,2 à 18,9 mois de la durée de survie sans progression des patients présentant les mutations L858R ou une délétion au niveau de l'exon 19 (Figure 16) (Soria et al., 2017). Dans cette même étude, l'osimertinib augmenta la survie globale des patients d'environ 12% avec une durée de la réponse doublée (17,2 mois avec l'osimertinib comparés à 8,5 mois avec un inhibiteur de première génération) (Soria et al., 2017). Ces travaux conduisirent en 2018 à l'approbation de l'osimertinib en première ligne de traitement des CBNPC au stade avancé avec mutations activatrices d'EGFR.





**Figure 16 : Survie sans progression des patients de l'étude FLAURA.** Pendant cet essai, les patients atteints de CBNPC à un stade avancé, présentant des mutations activatrices d'EGFR (L858R ou DelEx19) et n'ayant reçu aucune thérapie, ont été randomisés pour recevoir par voie orale soit l'osimertinib (80 mg/jour), soit un EGFR-TKI de première génération (gefitinib (250 mg/jour) ou erlotinib (150 mg/jour)). Les courbes de Kaplan-Meier représentent la survie sans progression de ces patients (Soria et al., 2017).

Les patients atteints de CBNPC à des stades précoces peuvent bénéficier d'une résection chirurgicale ainsi qu'un traitement adjuvant post-opératoire avec une chimiothérapie. L'étude ADAURA de phase III, réalisée chez des patients ayant subi une résection chirurgicale et présentant des mutations de l'EGFR, montra l'efficacité de l'osimertinib en tant que thérapie adjuvante, avec ou non une chimiothérapie administrée au préalable (Wu et al., 2020). Les patients traités à l'osimertinib ont une survie sans maladie plus longue que ceux traités avec un placebo, passant de 44% à 90%. De plus, après 24 mois de traitement, 98% des patients traités à l'osimertinib contre 85% de ceux traités avec le placebo, ne présentent pas de métastases au niveau du SNC, montrant ainsi que l'utilisation de l'osimertinib comme thérapie adjuvante permet de réduire le risque de récurrence dû aux métastases cérébrales, diminuant également le risque d'un mauvais pronostic clinique. Depuis décembre 2020, l'osimertinib est approuvé en tant que thérapie adjuvante après résection tumorale sur des patients atteints de CBNPC à des stades précoces, présentant des mutations activatrices de l'EGFR, ayant reçu ou pas une chimiothérapie au préalable. D'autres essais cliniques, NeoADAURA (NCT04351555) et LAURA (NCT03521154), sont en cours afin d'évaluer l'efficacité de l'osimertinib soit en tant que thérapie néoadjuvante en comparaison avec une chimiothérapie seule chez des patients



ayant subi une résection tumorale, soit après une chimio-radiothérapie chez des patients avec un CBNPC non résécable.

En plus d'une très bonne efficacité clinique, l'osimertinib affiche aussi un meilleur profil de toxicité comparé aux TKIs de première et deuxième génération. Si les effets secondaires de haut grade sont peu fréquents, l'étude FLAURA a pu décrire chez les patients des symptômes typiques d'une inhibition d'EGFR, tels que des diarrhées, des éruptions cutanées et, plus rarement, des nausées, de la fatigue ou une anémie (Soria et al., 2017).

De nouveaux TKIs de troisième génération, aussi capables d'inhiber l'EGFR avec mutation T790M, ont fait récemment l'objet d'autorisations en Asie. C'est notamment le cas de l'almonertinib (Ameile, Hansoh Pharma), composé ayant une structure proche de l'osimertinib, approuvé en 2020 en Chine pour les patients atteints de CBNPC à un stade avancé ayant progressé après une première thérapie anti-EGFR, suite aux résultats positifs de l'étude APOLLO (Yang et al., 2020; Lu et al., 2020). Un autre essai clinique de phase III est en cours de recrutement afin de tester l'efficacité de l'almonertinib en première ligne de traitement en comparaison avec le gefitinib chez des patients avec EGFR muté. Après publication des résultats d'une étude coordonnée par B.C. Cho (Ahn et al., 2019), une autre molécule de troisième génération, le lazertinib (Leclaza, Yuhan and Janssen Biotech), a été autorisée en Corée du Sud en janvier 2021 pour le traitement des CBNPCs au stade avancé présentant la mutation T790M et ayant progressé après traitement avec d'autres EGFR-TKIs. Son efficacité en première ligne comparée au gefitinib est actuellement testée dans le cadre de l'essai clinique multicentrique randomisé de phase III LASER (NCT04248829).

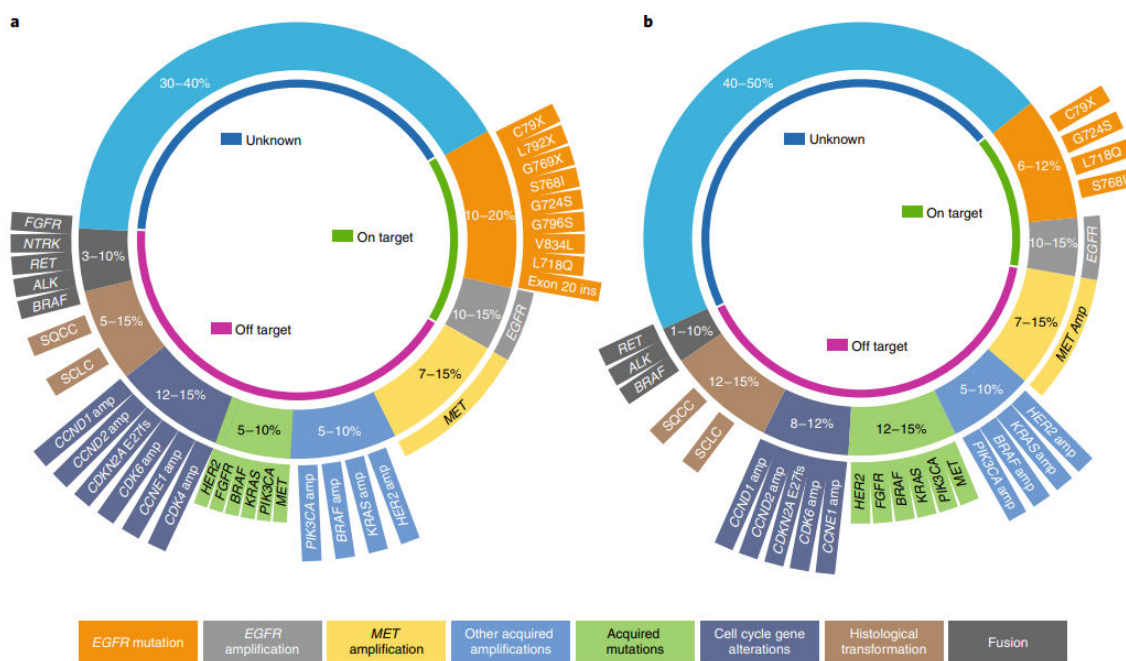
Le développement d'inhibiteurs de troisième génération a également connu des échecs. C'est notamment le cas de l'olmutinib (Olita, Boehringer Ingelheim and Hanmi Pharmaceutical) qui fut tout d'abord approuvé en Corée du Sud pour le traitement de patients atteints de CBNPC présentant la mutation T790M, sur la base d'un essai clinique de phase I/II (Kim et al., 2019). Toutefois, sa prescription et son développement ont dû être arrêtés en raison de fortes toxicités cutanées chez certains patients, avec notamment l'apparition du syndrome Stevens-Johnson, une sorte d'allergie médicamenteuse pouvant avoir des conséquences fatales (Nagasaka et al., 2021). Un autre exemple célèbre est représenté par le rociletinib (Xegafri, Clovis Oncology), l'un des premiers EGFR-TKI de troisième génération testés en clinique. Cette molécule n'a finalement pas été approuvée compte-tenu de sa moindre efficacité par rapport à l'osimertinib, mais également à cause d'une incidence élevée d'effets secondaires de haut grade, tels que diarrhée et hyperglycémie, probablement provoquée par l'effet inhibiteur

d'un métabolite du rociletinib sur les récepteurs de l'insuline et de l'*insulin-like growth factor* (Nagasaka et al., 2021; Sequist et al., 2015; Yang et al., 2021).

#### 2.4.4. Résistance à l'osimertinib

##### 2.4.4.1. Principaux mécanismes de résistance à l'osimertinib

Malgré une réponse qui perdure en moyenne un an et demi, presque invariablement les tumeurs développent une résistance à l'osimertinib, qui entraîne la rechute des patients (Leonetti et al., 2019; Passaro et al., 2021). Parmi les mécanismes les plus fréquents, on retrouve des mutations secondaires d'EGFR, comme la substitution C797S, une amplification d'autres RTKs, une activation aberrante de voies de transduction en aval, ainsi qu'une modification histologique ou phénotypique, telle que la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Figure 17).



**Figure 17 : Principaux mécanismes de résistance à l'osimertinib.** La nature et la fréquence d'apparition des mécanismes de résistance à l'osimertinib varient en fonction de son utilisation en seconde (a) ou première (b) ligne de traitement chez les patients. Amp, amplification ; Ins, insertion (Passaro et al., 2021).

##### 2.4.4.1.1 Mécanismes dépendants de l'EGFR

L'émergence de résistance dépendante de l'EGFR touche le plus fréquemment la cystéine en position 797, site de liaison de l'osimertinib (Passaro et al., 2021). Le plus souvent, il s'agit d'une substitution de la cystéine en sérine, et plus rarement en glycine (Piotrowska et al., 2018;

Yang et al., 2018). Cette mutation a été l'un des premiers mécanismes de résistance identifiés par l'analyse d'ADN tumoral circulant chez les patients après récurrence à l'osimertinib (Thress et al., 2015). En utilisant le même type d'approche, des études plus récentes ont identifié la mutation C797S dans 7% et 15% des patients traités à l'osimertinib, respectivement en première ligne ou après échec d'un autre EGFR-TKI (Papadimitrakopoulou et al., 2018; Ramalingam et al., 2018a). Lorsque les mutations C797S et T790M coexistent, leur position allélique relative peut avoir des conséquences importantes car, si c'est en *trans*, la tumeur devrait être sensible à une combinaison d'osimertinib et d'inhibiteurs de première génération (Niederst et al., 2015a; Wang et al., 2017b).

D'autres mutations d'EGFR moins fréquentes ont été identifiées dans des CBNPC ayant développé une résistance à l'osimertinib. Ainsi, la substitution de résidus adjacents à la cystéine 797, tels que la glycine en position 796, peuvent également entraîner une forte réduction de la sensibilité à l'osimertinib, comme le cas des mutations G796S et G796R (Ou et al., 2017; Zhang et al., 2018). Une autre étude permet d'identifier des mutations présentes dans l'exon 20 de l'EGFR, touchant la leucine en position 792, qui confèrent également une résistance à l'osimertinib en interférant avec sa liaison au domaine kinase par encombrement stérique (Yang et al., 2018).

Des mutations plus rares peuvent également survenir dans l'exon 18 de l'EGFR dans le site de liaison de l'ATP, sur la leucine en position 718 (L718Q), sur la glycine en position 719 (G719A) ou en position 724 (G724S) (Bersanelli et al., 2016; Oztan et al., 2017; Yang et al., 2018). Il a été montré que les tumeurs présentant la mutation G724S peuvent rester sensibles aux EGFR-TKIs de deuxième génération, notamment l'afatinib, offrant alors une opportunité thérapeutique si la mutation T790M est absente (Fassunke et al., 2018; Wei et al., 2021).

Parmi les autres altérations qui ont été associées à une résistance à l'osimertinib on peut citer la mutation S768I, des insertions dans l'exon 20 ou l'amplification de l'EGFR (Knebel et al., 2017; Leventakos et al., 2016).

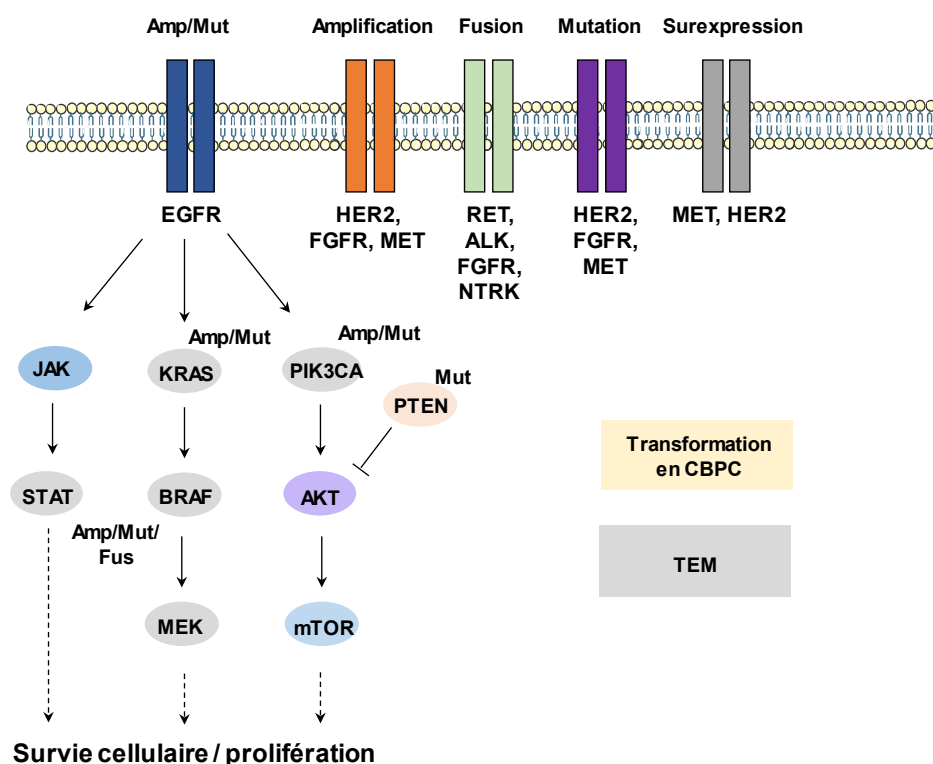
Lors des récurrences à l'osimertinib utilisé en deuxième ligne chez des patients présentant la substitution T790M, cette mutation n'est plus détectable dans environ 50% des cas et cela est associé à une progression tumorale plus rapide (Lin et al., 2018; Zhao et al., 2019). La perte de T790M généralement implique la mise en place d'un mécanisme de résistance indépendant de l'EGFR et elle n'est donc pas accompagnée par une re-sensibilisation aux inhibiteurs de première et deuxième génération (Oxnard et al., 2018).

## 2.4.4.1.2 Mécanismes indépendants de l'EGFR

Contrairement à ce qui était observé avec les inhibiteurs de première génération, avec notamment la mutation T790M, les mécanismes de résistance à l'osimertinib indépendants de l'EGFR semblent être prédominants chez les patients (Le et al., 2018; Mu et al., 2020).

## a Activation d'autres RTKs

Une étude réalisée en 2016 identifia une amplification de *MET* et *ERBB2* dans une petite cohorte de tumeurs résistantes à l'osimertinib et au rociletinib (Ortiz-Cuaran et al., 2016). Il s'agit d'un des premiers articles décrivant ce type de mécanisme de résistance vis-à-vis de ces inhibiteurs, qui avait déjà été décrit pour les EGFR-TKIs de première génération (Engelman et al., 2007; Takezawa et al., 2012). Ainsi, l'activation constitutive de ces autres RTKs induite par leur amplification permet de court-circuiter l'EGFR et stimuler les mêmes voies de signalisation en aval (Figure 18) (Engelman et al., 2007; Shi et al., 2016; Takezawa et al., 2012).



**Figure 18 : Représentation des principaux mécanismes de résistance à l'osimertinib.** Les mécanismes de résistance à l'osimertinib peuvent consister en des altérations d'EGFR (mutations et amplification), l'activation d'autres RTKs, comme MET ou HER2, la mutation d'effecteurs en aval de la voie d'EGFR, ou des transformations histologiques, telles que la transformation en CBPC ou la TEM. Abréviations : amp, amplification ; mut, mutation ; fus, fusion. Figure adaptée de Leonetti et al., 2019 et Passaro et al., 2021.

L'amplification de *MET* représente le mécanisme le plus fréquent de résistance à l'osimertinib, observé chez environ 15% des patients traités en première ligne (Oxnard et al., 2018). L'amplification de *ERBB2*, quant à elle, a été identifiée chez 5% et 2% des patients ayant rechuté après traitement à l'osimertinib respectivement en seconde ou en première ligne (Passaro et al., 2021). Ces données suggèrent que cibler spécifiquement ces altérations, une fois qu'elles sont détectées chez ces patients, pourrait être une stratégie efficace pour prévenir la rechute tumorale. Dans un essai clinique de phase I/II, le salvolitinib (Orpathys, Astrazeneca), en combinaison avec l'osimertinib chez des patients présentant une mutation d'EGFR et une amplification de *MET* a montré une bonne tolérabilité et une réponse objective dans 30% des cas (Sequist et al., 2020). D'autres études sont en cours, dont SAVANNAH (NCT03778229), afin de tester l'efficacité de cette combinaison chez des patients ayant progressé à l'osimertinib et présentant une amplification de *MET*. Concernant les amplifications de *ERBB2*, une étude multicentrique de phase II est en cours afin d'évaluer la toxicité et l'efficacité d'une association d'ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla, Genentech) et osimertinib chez des patients présentant ce type de mécanisme de résistance (NCT03784599). Des mutations insertionnelles dans l'exon 20 de *ERBB2* peuvent aussi être responsables d'une résistance à l'osimertinib (Ramalingam et al., 2018b). Dans de très rares cas, chez des patients en progression sous osimertinib on a pu identifier des mutations conduisant au saut de l'exon 14 de *MET* (Pinquie et al., 2021).

L'activation d'autres RTKs, tels que ALK, RET, ROS1 et *fibroblast growth factor receptors*, dans des CBNPCs résistants à l'osimertinib peut aussi être le résultat d'un réarrangement chromosomique (Papadimitrakopoulou et al., 2018; Piotrowska et al., 2018; Ramalingam et al., 2018a; Zeng et al., 2018). Même s'il s'agit de cas assez rares, l'implication thérapeutique peut être importante : par exemple une combinaison d'osimertinib avec un inhibiteur spécifique de RET, comme le pralsetinib (Gavreto, Roche), a été proposée pour le traitement de tumeurs résistantes présentant une translocation impliquant ce gène (Piotrowska et al., 2018).

### *b Activation d'acteurs en aval de la voie de l'EGFR*

La mutation KRAS-G12S fait également partie des mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs de troisième génération (Ortiz-Cuaran et al., 2016). RAS joue un rôle crucial dans la signalisation de l'EGFR, en raison de sa capacité à stimuler les MAPKs et la voie PI3K/AKT (Figure 18). Ainsi, plusieurs mutations activatrices de KRAS, telles que G12D, G12V, G13D, Q61R et Q61K, ont été identifiées dans des CBNPCs ayant développé une résistance à

l'osimertinib (Le et al., 2018; Leonetti et al., 2019; Nukaga et al., 2017; Oxnard et al., 2018). Chez d'autres patients, un dérèglement de KRAS ou NRAS a été décrit suite à l'amplification de leurs gènes (Eberlein et al., 2015; Le et al., 2018).

Une réactivation de la voie MAPK peut aussi être causée par une mutation de *BRAF*, telle que la V600E, retrouvée chez environ 3% des patients (Ho et al., 2017; Papadimitrakopoulou et al., 2018; Ramalingam et al., 2018a). Des rapports de cas cliniques de ce type de résistance suggèrent qu'une combinaison dabrafenib, trametinib et osimertinib, permettant une co-inhibition de BRAF/MEK/EGFR, serait plutôt bien tolérée et bénéfique pour les patients (Huang et al., 2019; Mauclet et al., 2021; Meng et al., 2020). Une autre piste thérapeutique pouvant être exploitée est l'utilisation d'une association d'osimertinib avec le vemurafenib, décrite, pour l'instant, seulement dans une étude (Xie et al., 2021).

La réactivation de AKT lors de l'inhibition d'EGFR par l'osimertinib peut être aussi provoquée par la mutation ou amplification de *PIK3CA*, ou la perte de *PTEN* (Passaro et al., 2021). En effet, plusieurs mutations activatrices de *PIK3CA*, telles que E545K, E542K, R88Q, N345K et E418K, ont été retrouvées chez 5-12% des patients après un traitement en deuxième ligne avec l'osimertinib (Chabon et al., 2016; Oxnard et al., 2018; Papadimitrakopoulou et al., 2018; Ramalingam et al., 2018a). Parmi les mutations de *PIK3CA* identifiées chez les patients après une première ligne de traitement à l'osimertinib, on retrouve les mutations E453K, H1047R et E545K (Ramalingam et al., 2018a). Dans de très rares cas, il a été décrit des délétions de *PTEN* chez les patients ayant rechuté après un traitement en seconde ou première ligne avec l'osimertinib (Lee et al., 2020).

### *c Transformation histologique et phénotypique*

Chez certains patients ayant rechuté après un traitement avec des EGFR-TKIs, on retrouve une différenciation de la tumeur en CBPC (Sequist et al., 2011). Cette transformation, qui concerne entre 4 et 15% des CBNPCs traités par l'osimertinib (Oxnard et al., 2018; Schoenfeld et al., 2020), consiste en un changement de phénotype avec l'acquisition de caractéristiques neuroendocrines, détectables par immunohistochimie à partir de biopsies grâce à l'expression de marqueurs, tels que la synaptophysine, la chromogranine A ou encore CD56 (Niederst et al., 2015b). Dans pratiquement la totalité des cas, la différenciation en CBPC est accompagnée par une inactivation des gènes *RBI* et *TP53* (Schoenfeld et al., 2020; Sequist et al., 2011), mais ces altérations ne sont pas suffisantes pour entraîner ce type de transformation,



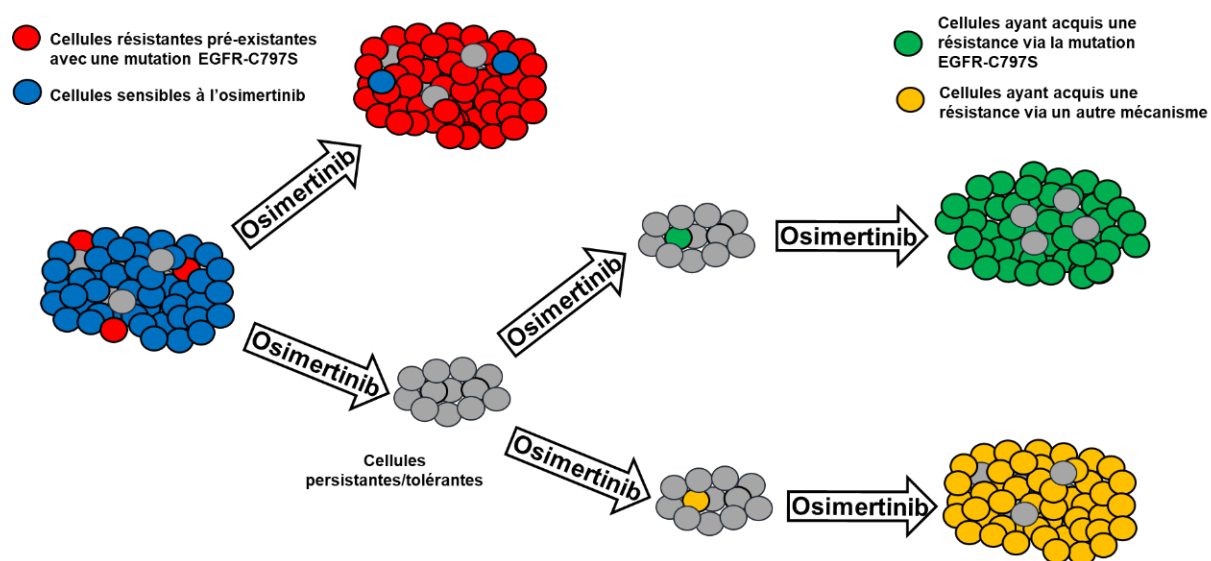
indiquant que d'autres mécanismes sont impliqués dans ce phénomène (Niederst et al., 2015b; Oser et al., 2015). Selon une étude récente, la transformation neuroendocrine serait le résultat complexe d'une reprogrammation transcriptionnelle, associée à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les voies PI3K/AKT ou NOTCH (Quintanal-Villalonga et al., 2021). D'autres changements phénotypiques moins fréquents peuvent être impliqués dans la résistance aux inhibiteurs d'EGFR, comme une transformation en carcinome épidermoïde ou avec un phénotype mixte CBNPC/CBPC (Schoenfeld et al., 2020).

Bien que décrite principalement dans le cadre d'une résistance aux inhibiteurs d'EGFR de première génération (Sequist et al., 2011; Uramoto et al., 2010), la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) peut également être impliquée dans la résistance à l'osimertinib (Leonetti et al., 2019). La TEM est un processus transitoire et réversible avec lequel les cellules passent d'un état épithélial à un état mésenchymateux (Kalluri and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Ainsi, les cellules assument une morphologie fusiforme et deviennent plus motiles et invasives, et on retrouve une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux, tels que l'E-cadhérine, et une augmentation de marqueurs mésenchymateux, tels que la vimentine, la fibronectine et la N-cadhérine (Dongre and Weinberg, 2019). Cette transition phénotypique est contrôlée par des facteurs de transcription spécifiques, comme ZEB1/2, SNAIL, SLUG et TWIST1/2 (Weng et al., 2019; Yochum et al., 2019). Des études précliniques ont montré qu'une inhibition de certains de ces facteurs, comme SNAIL ou TWIST1, pourrait représenter une stratégie thérapeutique (Qin et al., 2021; Yochum et al., 2019). Par exemple, le palbociclib (inhibiteur de CDK4/6) peut contrecarrer une résistance à l'osimertinib médiée par une surexpression de SNAIL dans des lignées de CBNPC (Qin et al., 2021).

### *2.4.4.2. Résistance et hétérogénéité intratumorale*

Les tumeurs sont des entités hétérogènes constituées de sous-populations cellulaires ayant des profils génétiques et/ou épigénétiques variés (Dagogo-Jack and Shaw, 2018). Cette diversité est influencée par différents facteurs, comme l'environnement et la thérapie, capables d'exercer une pression sélective qui affecte la progression et l'évolution des tumeurs (Marusyk et al., 2020). Ainsi, la réponse adaptative à un traitement par des EGFR-TKIs entraîne la disparition des populations cellulaires sensibles et l'enrichissement de clones résistants (Vasan et al., 2019). Il a été montré que des sous-populations contenant des mutations de résistance peuvent être déjà présentes avant le début du traitement (Bhang et al., 2015; Hata et al., 2016). En parallèle, ces inhibiteurs peuvent aussi favoriser la sélection de sous-populations, dites

tolérantes ou persistantes, ayant une plus faible sensibilité à la thérapie. Ces cellules sont responsables du maintien de ce qui est défini comme « maladie résiduelle minimale » pendant la phase de réponse à la thérapie, et qui précède la récurrence de la tumeur. Contrairement à la résistance, la tolérance est décrite comme un stade durant lequel les cellules tumorales sont sensibles au traitement, mais elles peuvent survivre en réduisant fortement ou complètement leur taux de prolifération (Marine et al., 2020). Ainsi, les cellules tolérantes/persistantes constituent une sorte de réservoir, à partir duquel des cellules résistantes vont pouvoir émerger grâce à l'acquisition *de novo* d'altérations génétiques qui leur permettent de devenir complètement insensibles à la thérapie (Figure 19) (Hata et al., 2016; Ramirez et al., 2016). Ces cellules tolérantes peuvent être à l'origine de différents mécanismes de résistance, ce qui rend plus difficile la mise en place d'une seconde ligne de traitement (Marusyk et al., 2020). Il a aussi été montré que la tolérance/persistance est une propriété transitoire des cellules, avec l'implication de mécanismes épigénétiques (Sharma et al., 2010) ou l'activation de certaines voies de signalisation, comme la voie YAP (Kurppa et al., 2020).

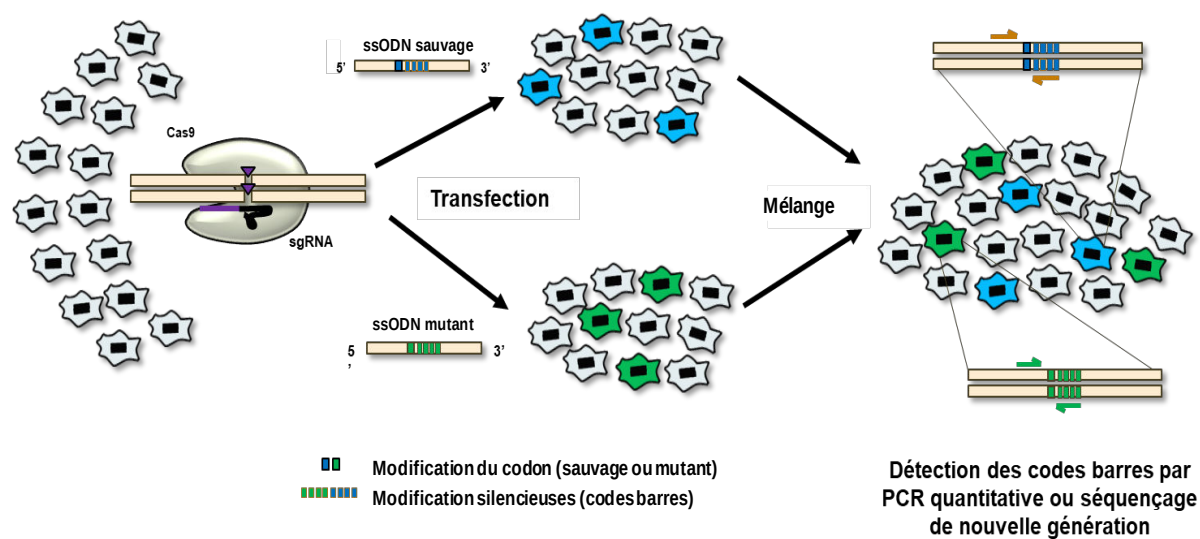


**Figure 19 : Différents modes d'acquisition d'une résistance à l'osimertinib dans le CBNPC.** Des clones contenant une mutation de résistance (comme ici, la mutation EGFR-C797S, en rouge dans le schéma) peuvent être déjà présents dans la masse tumorale avant le début du traitement. Ces cellules sont amplifiées en présence d'osimertinib. En parallèle, des cellules tolérantes/persistantes (en gris) peuvent également survivre au traitement, et fonctionner en tant que réservoir pour l'apparition de différents types de mutations de résistance (en jaune et en vert). Figure adaptée de Hata et al., 2016 et Oxnard, 2016.



### Modélisation de l'hétérogénéité intratumorale par CRISPR-barcoding

En 2016, notre groupe a mis au point une nouvelle approche basée sur la technologie CRISPR/Cas9 permettant de modéliser la résistance des cellules de CBNPC aux EGFR-TKIs dans un contexte d'hétérogénéité intratumorale (Guernet et al., 2016). Comme illustré en Figure 20, une mutation de résistance est introduite directement dans le génome, couplée à une courte série de mutations silencieuses, qui constituent une sorte d'étiquette génétique. A cause de la faible efficacité de CRISPR/Cas9, seulement une petite sous-population de cellules intègre le code-barres, alors la majorité des cellules n'est pas modifiée. Ainsi, on peut suivre l'évolution de la proportion de cellules résistantes en présence d'EGFR-TKIs en analysant les codes-barres par PCR quantitative à partir de l'ADN génomique (Figure 20).



**Figure 20 : Description de l'approche CRISPR-barcoding.** Les cellules sont co-transfectées avec un vecteur induisant l'expression de l'endonucléase Cas9 et de l'ARN servant de guide (single guide RNA, sgRNA) pour le clivage double-brin de l'ADN par la Cas9, ainsi qu'avec un oligonucléotide d'ADN simple brin (ssODN) contenant la mutation d'intérêt (mutant) couplée à une série de mutations silencieuses. En parallèle, un ssODN contenant uniquement des mutations silencieuses (sauvage), différentes de celles du code-barres mutant, est utilisé comme contrôle interne pour le clivage hors cible de l'ADN par la Cas9. Après la transfection, les cellules ainsi modifiées sont mélangées, afin d'obtenir une population hétérogène de cellules présentant des sous-populations ayant intégré les codes-barres contrôle ou muté. Les cellules peuvent ensuite être exposées à une pression sélective et l'émergence de cellules possédant la mutation d'intérêt peut être évaluée par la détection des différents codes-barres par PCR quantitative ou séquençage NGS. Adapté de Guernet et al., 2016.

***Le sorafenib inhibe l'émergence des cellules résistantes aux EGFR-TKIs***

Dans le même article, le groupe de L. Grumolato a montré *in vitro* et *in vivo* que les mutations EGFR-T790M, KRAS-G12D et EML4-ALK permettent aux cellules PC9 dérivées de CBNPC humain de devenir insensibles aux gefitinib. En utilisant un modèle multiplex basé sur ces trois altérations, un criblage de petites molécules a été réalisé afin d'identifier des composés pouvant prévenir ou ralentir l'émergence de cellules résistantes aux EGFR-TKIs. Ces travaux ont ainsi permis d'identifier l'inhibiteur multikinase sorafenib (Nevaxar, Bayer) pour sa capacité à inhiber l'amplification des sous-populations mutées en présence du gefitinib.

Initialement développé pour inhiber la sérine/thréonine kinase RAF, le sorafenib agit également sur différents RTKs, tels que VEGFR1/2/3, PDGFR $\beta$ , c-Kit et RET (Carlomagno et al., 2006; Wilhelm et al., 2004). Il a été montré que ce composé inhibe la voie des MAPKs dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein, du pancréas ou de la peau avec des mutations oncogéniques de KRAS ou BRAF, mais pas dans celles de CBNPC présentant le même type d'altérations (Wilhelm et al., 2004). Cette étude décrit aussi une action antitumorale dans plusieurs modèles de xénogreffes, notamment dans les cellules A549 de CBNPC avec mutation de KRAS, suggérant que le sorafenib pourrait aussi agir *via* un mécanisme indépendant des MAPKs. Par la suite, cette molécule fit l'objet de plusieurs essais cliniques, qui démontrèrent son efficacité chez des patients atteints de cancer rénal avancé et aboutirent à son approbation en 2005 pour ce type de tumeur (Kane et al., 2006; Ratain et al., 2006). En 2007 et en 2013, le sorafenib fût approuvé pour le traitement respectivement du cancer du foie et de la thyroïde (Brose et al., 2014; Llovet et al., 2008).

Au cours de la dernière partie de la thèse d'Alexis Guernet, les résultats du criblage furent confirmés et on montra que le sorafenib est également capable d'inhiber l'émergence de cellules avec mutation EGFR-C797S en présence d'osimertinib. D'un point de vue mécanistique, le sorafenib n'affecte pas la voie des MAPKs dans les cellules de CBNPCs, mais il induit une inhibition rapide de la phosphorylation de STAT3 et, plus tardivement, une diminution de l'expression d'EGFR.

# Objectifs de la thèse

L'acquisition d'une résistance est la limitation la plus importante de la thérapie ciblée anticancéreuse. La grande majorité des patients de CBNPC traités par l'osimertinib présente une réponse à cet inhibiteur qui perdure pendant, en moyenne, plus d'un an et demi. Malheureusement, presque invariablement les tumeurs deviennent insensibles et recommencent à progresser. La mise en place de nouvelles stratégies pour prévenir ou ralentir la résistance à l'osimertinib est un enjeu majeur pour le traitement du cancer bronchique. En utilisant l'approche CRISPR-barcoding, le groupe du Dr Grumolato avait identifié le sorafenib dans un criblage de composés potentiellement capables d'inhiber l'émergence de sous-populations cellulaires résistantes. Bien qu'originellement développé pour inhiber RAF, dans les cellules de CBNPC ce composé n'agit pas *via* la voie des MAPKs, indiquant un mécanisme plus complexe. Ainsi, le premier objectif de ma thèse a été de mieux caractériser l'action du sorafenib dans les cellules de CBNPC en testant ses effets sur d'autres voies ou processus pouvant lui être associés. En particulier, nous avons étudié de façon plus globale son impact sur l'évolution clonale induite par l'osimertinib, en utilisant des code-barres complexes insérés dans le génome des cellules à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. Un autre objectif de ma thèse a été de générer de nouveaux modèles cellulaires afin de reproduire les mécanismes de résistance aux EGFR-TKIs plus fréquemment identifiés chez les patients et de tester les effets du sorafenib dans ces différents contextes. Enfin, nous voulions confirmer *in vivo* l'efficacité de la combinaison osimertinib-sorafenib en utilisant des xénogreffes de cellules de CBNPC modifiées par CRISPR-barcoding. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse font l'objet d'une publication en cours de soumission.



# Résultats



## Article en soumission

### *Prolonging lung cancer response to EGFR inhibition by targeting the selective advantage of resistant cells*

**Brunet *et al.***

Dans cet article en soumission, nous proposons une nouvelle approche thérapeutique, qui vise à prolonger la réponse du CBNPC aux EGFR-TKIs en prévenant l'évolution clonale induite par le traitement, *via* l'abolition de l'avantage sélectif des cellules résistantes.

#### Principaux résultats de l'étude :

- Abolition de l'avantage sélectif des cellules résistantes par le sorafenib
- Le sorafenib empêche l'évolution clonale des cellules de CBNPC induite par les EGFR-TKIs
- Inhibition précoce par le sorafenib de : l'activité catalytique de MNK, la phosphorylation de STAT3 et l'expression de MCL-1
- Le sorafenib promeut, plus tardivement, la dégradation d'EGFR par les lysosomes
- Le sorafenib prévient l'émergence de cellules présentant différents mécanismes de résistance
- La combinaison osimertinib/sorafenib ralentit la progression des cellules de CBNPC *in vivo*





1 **Prolonging lung cancer response to EGFR inhibition by targeting**  
2 **the selective advantage of resistant cells**

3

4 Lisa Brunet<sup>1,2</sup>, #Maria del Mar Blanquer-Rosselló<sup>1,2</sup>, #Alexis Guernet<sup>1,2</sup>, #Houssein  
5 Chhourj<sup>1,2</sup>, David Alexandre<sup>1,2</sup>, Zoulika Kherrouche<sup>3</sup>, Jiyoung Lee<sup>1,2</sup>, Shen Yao<sup>4</sup>, Arnaud  
6 Arabo<sup>5</sup>, Mirna Swayden<sup>1,2</sup>, David Godefroy<sup>1,2</sup>, Philippe Jamme<sup>3</sup>, Audrey Vinchent<sup>3</sup>, Caroline  
7 Bérard<sup>6</sup>, David Tulasne<sup>3</sup>, Sabrina Arena<sup>7,8</sup>, Alberto Bardelli<sup>7,8</sup>, Cédric Coulouarn<sup>9</sup>, Byoung  
8 Chul Cho<sup>10</sup>, Stuart A. Aaronson<sup>4</sup>, Alexis B. Cortot<sup>3</sup>, Youssef Anouar<sup>1,2</sup> and Luca  
9 Grumolato<sup>1,2,\*</sup>

10

11 <sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, DC2N, Rouen, France

12 <sup>2</sup>Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen, France

13 <sup>3</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 – UMR1277 -  
14 Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Lille, France

15 <sup>4</sup>Department of Oncological Sciences, Tisch Cancer Institute, Icahn School of Medicine at  
16 Mount Sinai, New York, NY, USA

17 <sup>5</sup>Biological Resource Service (SRB), Faculty of Sciences and Techniques, Normandie Univ,  
18 UNIROUEN, Rouen, France

19 <sup>6</sup>LITIS EA 4108, Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen, France

20 <sup>7</sup>Candiolo Cancer Institute, FPO - IRCCS, Candiolo, Italy

21 <sup>8</sup>Department of Oncology, University of Torino, Candiolo, Italy

22 <sup>9</sup>Inserm, Univ Rennes 1, UMR\_S 1242, Centre de Lutte contre le Cancer Eugène Marquis,  
23 Rennes, France

24 <sup>10</sup>Yonsei Cancer Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea

25

26 # These authors contributed equally

27 \* Correspondance: luca.grumolato@univ-rouen.fr

28 **Abstract**

29 Lung cancers treated with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) of the epidermal growth factor  
30 receptor (EGFR) almost invariably relapse in the long term, due to the emergence of  
31 subpopulations of resistant cells. Here we show that the clinically approved drug sorafenib, in  
32 combination with the EGFR-TKI osimertinib, abolishes the selective advantage of EGFR-TKI-  
33 resistant clones, while preserving the response of EGFR-TKI-sensitive cells, thus resulting in  
34 an overall inhibition of clonal evolution within the tumor cell mass population. Sorafenib is  
35 active against multiple mechanisms of resistance/tolerance to EGFR-TKIs and its effects  
36 depend on early inhibition of MAPK interacting kinase (MNK) activity and signal transducer  
37 and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation, and later down-regulation of MCL1  
38 and EGFR. These findings indicate that sorafenib could substantially prolong lung cancer  
39 response to EGFR-TKIs by targeting its capacity to adapt to targeted therapy through the  
40 emergence of resistant clones.

## 41 Introduction

42 Clonal driver mutations are a target of choice for cancer therapy. One of the first and more  
43 successful examples of this type of treatment is represented by EGFR-TKIs, including  
44 gefitinib, erlotinib and osimertinib, which constitute the standard of care for EGFR-mutant  
45 non-small cell lung cancer (NSCLC)<sup>1-7</sup>. Despite objective response rates that can exceed  
46 80%<sup>5,8</sup>, EGFR-TKIs, as other targeted therapies, almost invariably fail in the long term  
47 because of the development of resistance<sup>9,10</sup>. Tumors are constituted of an intricate  
48 combination of heterogeneous subclonal populations that can evolve in the presence of a  
49 selective pressure, such as therapeutic intervention<sup>11-14</sup>. It has been shown that treatment  
50 with EGFR-TKIs promotes either the amplification of pre-existing resistant clones<sup>15,16</sup> or the  
51 emergence of *de novo* resistance alterations from a pool of drug persister/tolerant cells<sup>16-19</sup>,  
52 eventually resulting in tumor relapse.

53 Current guidelines for advanced NSCLC bearing EGFR driver mutations recommend  
54 first-line treatment with osimertinib, followed, upon progression, by chemotherapy<sup>20,21</sup>. When  
55 an actionable mechanism of resistance is identified, combinations with other targeted agents  
56 can provide some levels of antitumor activity<sup>22,23</sup>. In both cases, the treatment is adapted  
57 sequentially as the tumor progresses.

58 Cancer response to therapy is a Darwinian process, and various approaches have  
59 been designed to specifically target the evolutionary dynamics that drive resistance<sup>13,24-28</sup>.  
60 Some strategies<sup>29,30</sup> aim at guiding clonal evolution and rely on the assumption that emerging  
61 resistant populations can exhibit a decreased fitness or new vulnerabilities compared to the  
62 original cells. For example, certain treatments can induce an adaptive response through  
63 activation of compensatory pathways that are potentially targetable<sup>31,32</sup>, whereas resistance  
64 to other drugs can be accompanied by collateral sensitivities or, even, synthetic lethality<sup>33-35</sup>.  
65 As compared to other tumor types, these mechanisms don't seem very common in EGFR-  
66 mutant NSCLCs<sup>13</sup>. Moreover, contrary to other Darwinian systems, where high fitness is  
67 compatible with a stable equilibrium<sup>36</sup>, cancer shows low selective pressure for sustainability

68 and, since both the tumor and the patient will ultimately die, it behaves as an evolutionary  
69 dead end. Thus, while conceptually intriguing, adaptive targeted therapies may present the  
70 risk of favoring tumor progression<sup>37</sup>, by selecting increasingly more aggressive cell  
71 populations.

72 As an alternative approach, drug combinations could be designed to restrain, instead  
73 of steer clonal evolution, by specifically targeting the selective advantage of resistant  
74 subpopulations over sensitive cells. However, this strategy relies on the early identification of  
75 emerging mutant clones by liquid biopsies<sup>38-40</sup>. Despite the high sensitivity of this type of  
76 technology, resistant subpopulations still can only be recognized when they reach a relatively  
77 large size, making it difficult to achieve significant clinical responses, unless highly efficient  
78 drugs are available. Another potential strategy is based on preventive targeting of resistant  
79 cells, at a stage where they are already present, but too few to be detectable. Two main  
80 arguments support this approach. First, in tumors strongly addicted to a particular oncogenic  
81 event, such as in the case of EGFR-mutant NSCLCs, epistasis restricts the possible routes  
82 to high fitness<sup>41</sup> and the mechanisms of resistance are probably limited. In addition, a drug  
83 exerting only a minor effect on a full-blown population of cancer cells is likely to induce a  
84 much more dramatic response on rare clusters of resistant clones scattered within the tumor  
85 mass.

86 Using a DNA barcoding strategy to generate and trace small pools of NSCLC  
87 resistant cells within a sensitive mass population<sup>42</sup>, we performed an unbiased functional  
88 screen to identify compounds capable of countering the positive selection for adaptive  
89 resistance induced by EGFR-TKIs. We found that the clinically approved multikinase inhibitor  
90 sorafenib can prevent the emergence of subpopulations of NSCLC cells containing various  
91 mechanisms of resistance. The effects of sorafenib are independent of the MAPK pathway  
92 and rely instead on early inhibition of MNK activity and STAT3 phosphorylation, and later  
93 down-regulation of MCL1 and EGFR. Our findings demonstrate that sorafenib prolongs the  
94 effects of EGFR-TKI treatment by inhibiting NSCLC clonal evolution.

95 **Results**

96 **Sorafenib inhibits the positive selection of resistant subpopulations of NSCLC cells**  
97 **in the presence of EGFR-TKIs**

98 New drug combinations are generally tested using populations of homogenously sensitive or  
99 insensitive cells<sup>43</sup>. To identify treatments that specifically target the emergence of resistant  
100 clones, we used a different strategy, in which small pools of cells bearing the EGFR-T790M,  
101 KRAS-G12D or EML4-ALK mutations, conferring NSCLC resistance to EGFR-TKIs, were  
102 generated by CRISPR/Cas9 within a mass population of PC9 cells. The mutations were  
103 coupled to a genetic barcode, to facilitate their detection by qPCR from genomic DNA<sup>42</sup>.  
104 Using this model, we screened small molecules potentially capable of inhibiting the  
105 amplification of resistant cells selected by treatment with the EGFR-TKI gefitinib. While the  
106 3<sup>rd</sup> generation EGFR-TKI WZ42002 and the ALK-TKI TAE684 specifically blocked the  
107 enrichment of the EGFR-T790M and EML4-ALK subpopulations, respectively, the  
108 multikinase inhibitor sorafenib prevented the emergence of all three mechanisms of  
109 resistance at *in vitro* concentrations that were clinically relevant<sup>44,45</sup> (Suppl. Table 1, Suppl.  
110 Fig. 1a-b).

111 As shown in Fig. 1a, the increase in the proportion of EGFR-T790M mutant cells induced  
112 by gefitinib was markedly inhibited by sorafenib co-treatment in different EGFR-addicted  
113 NSCLC lines. Third generation irreversible EGFR-TKIs, such as osimertinib, have been  
114 developed to counter resistance induced by the T790M gatekeeper mutation<sup>4,46,47</sup>. Another  
115 secondary/tertiary mutation of EGFR, involving the binding site of the drug to the receptor,  
116 cysteine 797, is one of the most common mechanisms of resistance to osimertinib in  
117 patients<sup>10,48</sup>. We modeled EGFR-C797S-mediated resistance to osimertinib in PC9 and  
118 H1975 cells, as well as in the NSCLC patient-derived cell (PDC) line YU-1150. In each case,  
119 co-treatment with sorafenib dramatically reduced the enrichment of EGFR-C797S  
120 subpopulations induced by osimertinib, regardless of whether a concurrent T790M mutation  
121 was present (Fig.1b-c and Suppl. Fig. 1c).

122 Sorafenib is a multikinase inhibitor targeting RAF, the vascular endothelial growth factor  
123 receptors, platelet-derived growth factor receptors, KIT and RET, and it has been approved  
124 for the treatment of advanced kidney, thyroid and liver cancers<sup>49</sup>. To assess sorafenib  
125 specificity in preventing the emergence of EGFR-TKI resistant NSCLC cells, we tested the  
126 effects of other clinically approved multikinase inhibitors displaying partially overlapping  
127 pharmacological profiles (Suppl. Fig. 1d). Fig. 1d shows that, in contrast to sorafenib,  
128 sunitinib, regorafenib, lenvatinib and cabozantinib were unable, at commonly used  
129 concentrations, to inhibit the enrichment of the EGFR-C797S subpopulations induced by  
130 osimertinib.

131 Next, we derived osimertinib resistant PC9 cells containing the EGFR-C797S mutation  
132 (OR-PC9) and compared their response to treatment with that of parental cells. As expected,  
133 osimertinib inhibited the growth of parental, but not of OR-PC9 cells, whereas sorafenib  
134 similarly affected both (Fig. 1e-f). Of note, sorafenib didn't exert any additive effects in  
135 EGFR-TKI sensitive cells when combined with either osimertinib (Fig. 1e-f) or gefitinib  
136 (Suppl. Fig. 1e). These results imply that, while osimertinib alone favors the emergence of  
137 resistant over sensitive cells, the sorafenib-osimertinib combination inhibits the growth of  
138 both cell populations, thus preserving their relative proportion (Fig. 1g). The lack of  
139 synergistic effects between sorafenib and EGFR-TKIs likely explains why this multikinase  
140 inhibitor was not considered a hit in previous drug screens aimed at identifying new  
141 combinations to prevent resistance in NSCLC cells<sup>43</sup>. Sunitinib didn't affect PC9 cell growth,  
142 while cabozantinib showed a strong synergy with osimertinib (Fig. 1e). This observation is  
143 consistent with results of our CRISPR-barcoding experiments (Fig. 1d) and implies that, in  
144 combination with osimertinib, cabozantinib would be expected to enhance the emergence of  
145 EGFR-TKI resistant cells (Fig. 1g).

146

147 **Sorafenib inhibits the clonal evolution of NSCLC cells induced by osimertinib**

148 To further explore the lack of additive effects of osimertinib and sorafenib on growth  
149 inhibition, we investigated the effects of these drugs, alone or in combination, on the PC9 cell  
150 gene expression profile (Suppl. Table 2). As shown by gene set enrichment analysis (GSEA),  
151 the profile of osimertinib-treated cells correlated very well with a NSCLC EGFR-signaling  
152 signature<sup>50</sup>. A similar result was obtained for cells treated with the combination, whereas  
153 sorafenib alone showed a negative enrichment score (ES; Fig. 2a and Suppl. Fig. 2a),  
154 suggesting that, when sensitive cells are exposed to both drugs, the effects on EGFR-  
155 dependent gene expression are predominantly mediated by osimertinib. Moreover, when we  
156 generated our own signature for the osimertinib/sorafenib combination (Suppl. Table 3), we  
157 found higher ES for cells treated with osimertinib, as compared to sorafenib (Fig. 2b and  
158 Suppl. Fig. 2b). These results were also confirmed by cluster analysis (Suppl. Fig. 2c),  
159 supporting the concept that, in a mixed cell population treated with both drugs, EGFR-TKI  
160 sensitive cells respond primarily to osimertinib, whereas sorafenib acts on resistant cells.

161 Our findings that sorafenib blocks the emergence of resistant cells induced by EGFR-  
162 TKIs suggested that, in combination with osimertinib, sorafenib exerted a broad inhibition of  
163 cancer cell clonal evolution induced by the treatment, while maintaining the strong anti-tumor  
164 effects of osimertinib on sensitive cells. To confirm this hypothesis, we labeled several  
165 thousand PC9 clonal subpopulations using CRISPR highly complex barcodes<sup>42</sup> and  
166 compared the effects of a two-week treatment with osimertinib and sorafenib, either alone or  
167 in combination. We reasoned that pools of intrinsically tolerant or resistant cells within the  
168 original population should be consistently enriched in the different replicates during the  
169 treatment, as opposed to randomly selected cells, which would be expected to be present in  
170 only one or two replicates<sup>19</sup>. As shown in Fig. 2c and Suppl. Fig. 2d, the number of these  
171 subpopulations was strongly reduced by the combination compared to osimertinib alone,  
172 implying an inhibitory effect on clonal evolution. Consistent with these data, cluster analysis  
173 showed that the barcode profile of the cells treated with the combination was closer to the  
174 control than with osimertinib treatment alone (Fig. 2d). These results were confirmed by the

175 correlation matrix and correlation plots depicted in Fig. 2e and Fig. 2f, and indicate that while  
176 osimertinib induces a shift in the clonal architecture of the cancer cell population, this effect  
177 can be inhibited by co-treatment with sorafenib.

178

### 179 **Sorafenib early treatment inhibits MNK activity, STAT3 phosphorylation and MCL1** 180 **expression in NSCLC cells**

181 Despite having been originally developed as an inhibitor of the serine/threonine kinase RAF,  
182 in PC9 cells sorafenib was unable to down-regulate the expression of well-characterized  
183 MAPK-regulated genes, including DUSP6, SPRY2 and ETV5<sup>51</sup>, as shown by gene array and  
184 qPCR (Suppl. Fig. 3a-b). Consistent with these results, this drug did not affect phospho-ERK  
185 levels (Fig. 3a). Instead, as previously reported in leukemia cells<sup>52</sup>, sorafenib rapidly inhibited  
186 phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in PC9 cells (Fig.  
187 3a), as well as other NSCLC cells, including two different PDC lines (Fig. 3b and Suppl. Fig.  
188 3c). A component of the translation regulatory machinery, eIF4E has been implicated in  
189 different types of cancer<sup>53-57</sup> and its phosphorylation is mediated by MNKs, whose activity is  
190 regulated by ERK<sup>53</sup>. Because sorafenib did not detectably affect MAPKs in NSCLC cells and  
191 its effects on eIF4E phosphorylation were readily seen after 30 min of treatment (Fig. 3a), we  
192 hypothesized that this multikinase inhibitor might act directly on MNKs. A potential inhibition  
193 of MNK catalytic activity by sorafenib has been suggested by high throughput *in vitro* kinase  
194 screens<sup>58</sup>, although, to our knowledge, this has not been demonstrated in living cells. We  
195 initially confirmed that sorafenib can affect MNK1/2 activity in *in vitro* assays, in which the  
196 myelin basic protein or a short peptide derived from the human cAMP Response Element  
197 Binding protein were used as a substrate (Suppl. Fig. 3d). To investigate the potential direct  
198 effects of sorafenib on MNK in PC9 cells, we generated a lentiviral inducible system to  
199 express a constitutively active form of MNK2 (CA-MNK2). Fig. 3c shows that sorafenib, but  
200 not the MEK inhibitor trametinib, dose-dependently inhibited the phosphorylation of eIF4E  
201 induced by CA-MNK2. In accordance with these results, *in vitro* phosphorylation of  
202 immunoprecipitated eIF4E by recombinant MNK2 was inhibited by sorafenib, but not by



203 trametinib (Fig. 3d). Of note, MNK inhibition by sorafenib didn't affect cap binding of eIF4E  
204 (Suppl. Fig. 3e), suggesting that eIF4E phosphorylation doesn't exert a global effect on  
205 protein translation, consistent with previous studies<sup>53,59</sup>. Together, our data demonstrate for  
206 the first time that sorafenib can block eIF4E phosphorylation by directly inhibiting MNK  
207 catalytic activity.

208         After a few hours of treatment, sorafenib also inhibited the phosphorylation of STAT3  
209 (Fig. 3e and Suppl. Fig. 4a), as has been described in other types of cancer<sup>60-62</sup>. Of note, the  
210 effects on eIF4E and STAT3 phosphorylation were specific for sorafenib, as they were not  
211 observed with the other multikinase inhibitors (Suppl. Fig. 4b-c). Sorafenib also induced a  
212 more delayed down-regulation of MCL1 and MYC in different NSCLC cells, including two  
213 PDC lines (Fig. 3f-g and Suppl. Fig. 4d), which was first detectable at 24 hrs. While previous  
214 studies suggested a role of eIF4E phosphorylation in the expression of MCL1 and MYC<sup>55,57</sup>,  
215 the levels of these two proteins were not affected by treatment with the MNK inhibitor  
216 eFT508 (data not shown), indicating that inhibition of eIF4E was not sufficient to account for  
217 all the effects of sorafenib in NSCLC cells. Of note, while the enrichment of resistant cells  
218 could not be blocked by MNK, STAT3 or MCL1 inhibitors alone (Suppl. Fig. 4e and data not  
219 shown), the combination of all three compounds mimicked the effects of sorafenib (Fig. 3h).  
220 Together, these results indicate that sorafenib prevented the emergence of EGFR-TKI  
221 resistant subpopulations of NSCLC cells through a mechanism involving, at least in part, its  
222 combined inhibitory effects on MNK, STAT3 and MCL1.

223

#### 224 **Late down-regulation of EGFR by sorafenib in NSCLC cells**

225 Time-course experiments in PC9 cells revealed that sorafenib also induced a marked down-  
226 regulation of EGFR expression at the protein level by 2-3 days of treatment, with concomitant  
227 inhibition of downstream effectors of the EGFR pathway (Fig. 4a and Suppl. Fig. 5a). Similar  
228 results were observed with other NSCLC cells, including PDCs (Fig. 4b and Suppl. Fig. 5b-  
229 c), while other multikinase inhibitors, such as sunitinib and regorafenib, failed to effectively  
230 down-regulate the receptor (Suppl. Fig. 5d-e). As shown in Fig. 4c and Suppl. Fig. 5f, the

231 EGFR-TKI/sorafenib combination provoked a decrease of EGFR expression and STAT3  
232 phosphorylation in EGFR-TKI-resistant, but not in EGFR-TKI-sensitive cells. These data  
233 indicate that the effects of sorafenib are, at least in part, blocked by co-treatment with EGFR-  
234 TKIs, thus providing a mechanistic explanation for the lack of additive/synergistic effects by  
235 the two drugs.

236 By qPCR analysis, sorafenib did not cause any alteration in EGFR mRNA levels  
237 (Suppl. Fig. 5g), implying a post-transcriptional effect on protein level. To investigate whether  
238 the drug inhibited EGFR protein translation or stability, we generated a lentiviral vector in  
239 which the PGK promoter drives expression of FLAG-tagged EGFR and green fluorescent  
240 protein (GFP), separated by the T2A self-cleaving peptide. As shown in Fig. 4d, sorafenib  
241 strongly reduced the expression of the exogenous receptor, whereas it had no effect on GFP  
242 levels, indicating that the multikinase inhibitor does not affect EGFR translation, but instead  
243 promotes EGFR degradation. It has been recently reported that in mutant, but not wild-type  
244 (wt) NSCLC cells, EGFR can be degraded by a macropinocytosis-dependent lysosomal  
245 pathway<sup>63</sup>. Consistent with this mechanism, the inhibitory effects of sorafenib were more  
246 pronounced on the Ex19Del mutant compared to the wt receptor (Fig. 4e). We also found  
247 that suppression of lysosomal degradation by chloroquine blocked the down-regulation of  
248 EGFR induced by sorafenib (Fig. 4f). Of note, co-treatment with chloroquine also partially  
249 rescued the effects of sorafenib on the emergence of EGFR-TKI-resistant cells (Fig. 4g),  
250 implying that its ability to induce EGFR down-regulation contributes to the mechanism of  
251 action of this multikinase inhibitor in NSCLC cells.

252

### 253 **Sorafenib prevents the emergence of cell subpopulations containing different** 254 **clinically relevant mechanisms of resistance**

255 The results of our initial screen and the complex effects of sorafenib in NSCLC cells  
256 suggested that this drug might interfere with different mechanisms of resistance to EGFR-  
257 TKIs found in patients. As shown in Fig. 5a, sorafenib inhibited the emergence of osimertinib-  
258 induced PC9 subpopulations containing EGFR or HER2 mutations, such as EGFR-

259 G724S<sup>64,65</sup> and HER2-ex20ins<sup>10</sup>. We observed a similar inhibition of the emergence of  
260 activating mutations of downstream effectors of EGFR signaling, including KRAS-G12D,  
261 BRAF-V600E and PIK3CA-E545K<sup>10,65</sup>, in PC9 cells (Fig. 5a) as well as in other NSCLC cell  
262 models, including PDCs (Fig. 5b and Suppl. Fig. 6a-c). Consistent with our initial screen,  
263 sorafenib also inhibited the amplification of cells containing the chromosomal inversion  
264 leading to the expression of the EML4-ALK fusion oncogene<sup>65</sup> (Fig. 5c). Amplification of other  
265 receptor tyrosine kinases, including MET and HER2, are among the most common  
266 mechanisms of resistance to osimertinib<sup>10,65</sup>. We modeled these aberrations in PC9 cells  
267 using lentivirus-mediated cDNA overexpression (Suppl. Fig.6d) or upregulation of the  
268 endogenous gene through a dCas9 activator system<sup>66</sup> (Suppl. Fig.6e), and showed that both  
269 escape mechanisms can be inhibited by co-treatment with sorafenib (Fig. 5d). As a different  
270 approach, we performed a mixing experiment using parental HCC827 and lentiviral labeled  
271 HCC827-GR6 cells<sup>67</sup>, a MET-amplified clone resistant to EGFR-TKIs (Suppl. Fig.6f). Figure  
272 5e shows that sorafenib prevented the emergence of the HCC827-GR6 subpopulation in the  
273 presence of osimertinib, confirming the effects of this drug in preventing resistance mediated  
274 by MET amplification.

275         It has been reported that resistance to EGFR-TKIs can be accompanied by typical  
276 features of an epithelial to mesenchymal transition (EMT)<sup>65</sup>. Using a lentiviral inducible  
277 system, we found that sorafenib prevented the osimertinib-induced enrichment of cells  
278 expressing the EMT transcription factor SLUG (Fig. 5f), supporting the potential of this drug  
279 to antagonize selection of subpopulations that escape EGFR-TKI treatment through  
280 phenotypic transformation. Previous studies have demonstrated that fully resistant cells can  
281 derive from less sensitive cells capable of surviving in the presence of EGFR-TKIs, defined  
282 as persister or tolerant<sup>16,68,69</sup>. We found that sorafenib inhibits the amplification of barcoded  
283 persisters induced by osimertinib in a mass population of PC9 cells (Fig. 5g), suggesting that  
284 this combination may also be effective against non-genetic mechanisms of  
285 resistance/tolerance.

286 Anti-EGFR therapies are used for other tumor types, including colorectal cancers  
287 (CRCs) with wt RAS and BRAF, which are treated with anti-EGFR monoclonal antibodies,  
288 such as cetuximab or panitumumab. Similar to NSCLCs, these tumors eventually relapse  
289 due to the acquisition of resistance through various mechanisms<sup>70</sup>. As with NSCLC,  
290 sorafenib inhibited eIF4E phosphorylation and induced EGFR down-regulation in CRC cells  
291 (Suppl. Fig.6g-h). Through CRISPR-barcoding, we also observed that sorafenib can block  
292 the emergence of resistant CRC cells containing mutations within the EGFR extracellular  
293 domain or KRAS (Fig. 5h-i). Together, these results indicate that co-treatment with sorafenib  
294 can prevent resistance to targeted therapy in different types of EGFR-addicted cancer cells.  
295

### 296 **The combination of osimertinib/sorafenib delays NSCLC resistance *in vivo***

297 Conventional strategies are ill-suited to investigate acquired resistance to osimertinib in  
298 NSCLC mouse models, since the initial response to this EGFR-TKI is particularly long,  
299 typically lasting for several months<sup>47</sup>. Therefore, we performed experiments using mass  
300 populations constituted of a large majority of EGFR-TKI-sensitive cells and small pools of  
301 resistant cells. Using iDISCO 3D imaging<sup>71</sup>, we showed that EGFR-TKI resistant PC9 cells  
302 containing EGFR-C797S, KRAS-G12D or PIK3CA-E545K mutations were enriched in  
303 xenografts from mice treated with osimertinib, and this effect was inhibited by co-treatment  
304 with sorafenib (Fig. 6a and Supplementary Video). To better estimate the tumor growth delay  
305 induced by this drug combination, SCID mice inoculated with EGFR-C797S CRISPR-  
306 barcoded PC9 cells were treated with osimertinib and/or sorafenib. As illustrated in Fig. 6b  
307 and Suppl. Fig. 7a, the growth of tumors was slowed by sorafenib and, more markedly, by  
308 osimertinib, while it was completely blocked by the combination. Using a multiplex model  
309 containing four distinct types of resistant subpopulations (Suppl. Fig.7b), the kinetics of tumor  
310 growth in response to osimertinib alone was retarded by about two weeks (Fig.6c), with the  
311 rapid amplification of the different pools of resistant cells (Suppl. Fig. 7c). In contrast, co-  
312 treatment with sorafenib drastically delayed the emergence of resistance (Fig. 6c). The PDC  
313 line YUX-1024 forms tumors that are histopathologically similar to patient-derived xenografts

314 obtained from the same patient (Suppl. Fig. 7d). We mixed a small fraction of barcoded  
315 BRAF-V600E-mutant cells in a mass population of YUX-1024 cells, which was then  
316 inoculated in SCID mice. Osimertinib delayed tumor growth for about a month, while the  
317 osimertinib-sorafenib combination was more effective, slowing progression for three  
318 additional months (Fig. 6d-f). Of note, this regimen could be maintained for more than five  
319 months without any sign of toxicity. Together, these data indicate that sorafenib can  
320 substantially prolong the responsiveness of NSCLC models to osimertinib *in vivo*.

## 321 **Discussion**

322 Long term failure of targeted therapy is mainly due to the emergence of subpopulations of  
323 resistant cells. Different combinations of drugs exerting additive or synergistic effects have  
324 been designed, based on the concept that deeper pathway inhibition is required to delay  
325 resistance and enable durable efficacy. While successful with certain tumors, such as in the  
326 case of BRAF and MEK inhibitors in melanoma<sup>72</sup>, associations of compounds that target the  
327 same pathway can also cause higher toxicity and lower therapeutic indexes. Taking  
328 advantage of a DNA barcoding approach, we demonstrate here an alternative strategy, in  
329 which a combination of a primary drug highly effective on the bulk of the cell population is  
330 coupled to a second compound that specifically targets the remaining small pools of resistant  
331 cells.

332 Consistent with our findings with EGFR-addicted NSCLC and CRC cells, a recent  
333 study showed that a transcriptional signature to detect activation of this receptor can be used  
334 to accurately predict the response to sorafenib in both cancer cell lines and patients<sup>73</sup>. An  
335 increased vulnerability to sorafenib of cancer cells addicted to this receptor may also explain  
336 the results of the phase III MISSION trial, in which sorafenib significantly improved the overall  
337 survival of patients with relapsed or refractory NSCLC displaying mutant, but not wt EGFR<sup>74</sup>.  
338 Instead of targeting a specific component of the EGFR signaling pathway, we found that  
339 sorafenib affects different intracellular pathways that contribute to the proliferation and  
340 survival of tumor cells in which this receptor is activated. Indeed, despite having been  
341 originally developed as a RAF inhibitor, sorafenib doesn't induce a rapid inhibition of MAPKs  
342 in NSCLC cells, but it blocks the catalytic activity of MNKs. These kinases are responsible for  
343 eIF4E phosphorylation, which is known to be associated with the efficient translation of  
344 various oncogenes<sup>54-57</sup>, and they can also promote tumor progression independently of  
345 eIF4E<sup>75,76</sup>. At later time points, we showed that sorafenib inhibits STAT3 phosphorylation, as  
346 well as the expression of MCL1, MYC and EGFR. While MNK and MYC inhibition was  
347 induced by both sorafenib and EGFR-TKIs (Fig. 3 and data not shown), the decreased levels

348 of EGFR and phospho-STAT3 were observed in the presence of sorafenib alone, but not with  
349 the combination, hence providing a mechanistic basis for the lack of synergy between the  
350 two drugs. Together, our findings imply that, in a mass population of NSCLC cells treated  
351 with the combination, osimertinib acts on EGFR-TKI-sensitive cells, whereas sorafenib  
352 inhibits the growth of EGFR-TKI-resistant cells (Suppl. Fig. 8). Thus, by lifting the selective  
353 pressure induced by osimertinib, sorafenib represses clonal evolution.

354 The relatively broad mechanism of action of sorafenib in EGFR-addicted NSCLC cells  
355 is consistent with its capacity to inhibit the emergence of different types of EGFR-TKI  
356 resistant and tolerant cells. Of note, recent phase III randomized clinical trials demonstrated  
357 that chemotherapy significantly prolonged the survival of NSCLC patients in combination with  
358 gefitinib<sup>77,78</sup>. It is possible that chemotherapy agents may function in a similar manner to  
359 sorafenib, by inhibiting the growth of cells less sensitive to EGFR-TKIs, thus neutralizing their  
360 selective advantage and preventing the clonal shift of the NSCLC cell population.

361 The clinical application of sorafenib in combination with erlotinib or gefitinib was  
362 tested in early phase clinical trials in a limited number of patients. While treatment efficacy  
363 was never compared to that of the EGFR-TKI alone, the combination was generally well-  
364 tolerated, with manageable adverse effects<sup>79-81</sup>. The 3<sup>rd</sup> generation EGFR-TKI osimertinib  
365 has reduced treatment toxicity and considerably extended NSCLC response, but efforts to  
366 further prolong patient survival are still needed. Besides conventional strategies in which  
367 therapy is sequentially adapted as the tumor progresses, several clinical trials are currently  
368 testing the effects of combinations of osimertinib with different types of drugs in treatment-  
369 naive patients, including chemotherapy, antiangiogenetic agents and MET or MEK  
370 inhibitors<sup>10</sup>. Our present evidence that sorafenib can effectively target different types of  
371 emerging EGFR-TKI resistant NSCLC cells and prolong treatment response without obvious  
372 toxicity in animal models strongly supports the clinical potential of combined osimertinib and  
373 sorafenib therapy for EGFR mutant NSCLCs.

374 **Methods**

375 **Cell culture and Inhibitors.** Human embryonic kidney 293T cells were obtained from ATCC;  
376 PC9 cells (NSCLC, EGFR-Ex19Del) were obtained from ECACC (distributed by Sigma-  
377 Aldrich); HCC4006 (NSCLC, EGFR-Ex19Del) and H1975 cells (NSCLC, EGFR-  
378 L858R/T790M) were obtained from ATCC; HCC827 cells (NSCLC, EGFR-Ex19Del) were a  
379 gift from Pr. J. Minna, UT Southwestern Medical Center, Dallas (USA); HCC827-GR6 were a  
380 gift from Pr. P. Jänne, Dana-Farber Cancer Institute, Boston (USA); HCA-46 cells (CRC)  
381 were obtained from ECACC; CCK81 cells (CRC) were obtained from HSRRB (Japan);  
382 LIM1215 cells<sup>82</sup> were obtained from Prof. R. Whitehead, Vanderbilt University, Nashville  
383 (USA), with permission from the Ludwig Institute for Cancer Research, Zurich (Switzerland).  
384 NSCLC PDC lines YU-1150 (EGFR-L858R/T790M) and YUX-1024 (EGFR-L858R) were  
385 described previously<sup>83</sup>. 293T cells were grown in DMEM (Life Technologies) supplemented  
386 with 10% FBS (Life Technologies); HCA-46 cells were grown in DMEM supplemented with  
387 5% FBS; PC9, HCC4006, HCC827, H1975, YU-1150 and YUX-1024 were grown in  
388 RPMI1640 (2Mm L-Glutamine + 25 mM HEPES) supplemented with 10% FBS; LIM1215  
389 cells were grown in RPMI1640 supplemented with 10% FBS, 0.5 µg/ml insuline (Sigma-  
390 Aldrich), 1 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich) and 10 µM 1-thioglycerol (Sigma-Aldrich);  
391 CCK81 cells were grown in MEM (Life Technologies) supplemented with 10% FBS. All media  
392 were supplemented with 0.5% penicillin/streptomycin (Life Technologies).

393 Osimertinib, sorafenib, cabozantinib and lenvatinib were purchased from LC  
394 Laboratories. Gefitinib and doxycycline were purchased from Santa Cruz Biotechnology.  
395 Trametinib and puromycin were purchased from ChemCruz. Sunitinib, eFT-508,  
396 napabucasin, S63845, cetuximab were purchased from Selleckchem. Regorafenib was  
397 purchased from TargetMol. Crizotinib and chloroquine were purchased from Sigma-Aldrich.  
398 Blasticidin and zeocin were purchased from ThermoFisher.

399



400 **CRISPR-Barcoding, cell transfection and DNA constructs.** sgRNA vectors were  
401 generated as previous described<sup>42</sup> by cloning annealed oligonucleotides containing the  
402 targeting sequence (Suppl. Table 4) into the pSpCas9(BB)-2A-Puro vector (a gift from Feng  
403 Zhang, Addgene plasmid # 48139)<sup>84</sup> digested with BbsI (New England Biolabs). The  
404 sequences of the donor single-stranded DNA oligonucleotide (ssODNs, Integrated DNA  
405 technologies) used for CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair, containing the  
406 mutation of interest and a few additional silent mutations constituting the barcode, are shown  
407 in Suppl. Table 5. Cells were co-transfected with 2 µg of the CRISPR/Cas9 plasmid and 2 µg  
408 of ssODN (50 µM) using a Nucleofector II and Amaxa Nucleofector kits (Lonza) according to  
409 the manufacturer's instructions. The efficiency of each transfection was checked in parallel  
410 using a GFP-containing plasmid.

411 Lentiviral vectors for inducible expression of CA-MNK2 (T379D) and SLUG were  
412 generated by Gibson assembly (New England Biolabs) or standard cloning in the pTRIPZ  
413 plasmid from pTK-Slug (a gift from Bob Weinberg, Addgene plasmid # 36986)<sup>85</sup> and  
414 pDONR223-MKMK2 (a gift from William Hahn & David Root, Addgene plasmid # 23735)<sup>86</sup>.  
415 The sequence encoding the Flag tag was cloned between the HindIII and KpnI sites of the  
416 pHA-eIF4E plasmid (a gift from Dong-Er Zhang, Addgene plasmid # 17343)<sup>87</sup>. Flag-tagged wt  
417 and Ex19Del human EGFR constructs in the lentiviral VIRSP vector were generated by PCR  
418 with Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent technologies) from EGFR WT (a gift from  
419 Matthew Meyerson, Addgene plasmid # 11011)<sup>88</sup> and pBabe EGFR Del1 (a gift from  
420 Matthew Meyerson, Addgene plasmid # 32062)<sup>89</sup> plasmids, respectively. The T2A peptide  
421 and EGFP were cloned by Gibson assembly downstream of EGFR-Ex19Del in the VIRSP  
422 plasmid. Wt HER2 was cloned into VIRSP from the pCEV29-erbB2 plasmid previously  
423 generated by M. Igarashi in S.Aaronson's lab, and the sequence encoding A775insYVMA  
424 was added by site-directed mutagenesis and Gibson assembly. For MET overexpression  
425 through CRISPRa<sup>66</sup>, the lentiviral vectors dCAS-VP64\_Blast, MS2-P65-HSF1\_Hygro and  
426 sgRNA(MS2)\_zeo (gifts from Feng Zhang, Addgene plasmids # 61425, # 61426 and #  
427 61427) were used. The MET sgRNA target sequence (5'-TGGCAGGGCAGCGCGCGTGT)

428 was cloned in sgRNA(MS2)\_zeo. To generate osimertinib-tolerant cells, PC9 cells  
429 transduced with dCAS-VP64\_Blast, MS2-P65-HSF1\_Hygro and empty sgRNA(MS2)\_zeo  
430 were used. To label cells used in iDISCO 3D-imaging, lentiviral vectors GFP-VIRHD,  
431 mCherry-VIRHD and pLenti-puro-LacZ (a gift from le-Ming Shih, Addgene plasmid #  
432 39477)<sup>90</sup> were used. All constructs were sequence verified.

433 For lentivirus production, 293T cells were co-transfected using polyethylenimine  
434 (Polysciences) with the lentiviral vector, pCMV Δ8.91 and pMD VSG-G plasmids as  
435 previously described<sup>91</sup>. The conditioned media containing the viral particles was collected  
436 two, three and four days after transfection, cleared by centrifugation, supplemented with 8  
437 μg/ml polybrene and added to PC9 cells for overnight incubation at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Two days  
438 after transduction, the cells were selected in 1 μg/ml puromycin, 10 μg/ml blasticidin or 250  
439 μg/ml zeocin.

440

441 **DNA extraction, RNA extraction and qPCR.** Genomic DNA (gDNA) was extracted using  
442 NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Total  
443 RNA was isolated using the Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) and chloroform (Sigma-Aldrich),  
444 purified with NucleoSpin RNA columns (Macherey-Nagel), quantified by Nanodrop One  
445 (Thermo Scientific), DNase digested and reverse-transcribed using the Improm-II Reverse  
446 Transcription System (Promega). qPCR was performed from 100 ng of gDNA using the Fast  
447 SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) on a QuantStudio Flex PCR System (Thermo  
448 Scientific). The sequence of the different PCR primers, designed using Primer-BLAST  
449 (NCBI), is provided in Suppl. Table 6. For CRISPR-barcoding experiments, to avoid potential  
450 amplification from ssODN molecules not integrated in the correct genomic locus, one of the  
451 two primers was designed to target the endogeneous genomic sequence flanking the region  
452 sharing homology with the ssODNs. qPCR analysis was performed using the standard curve  
453 method. For the initial CRISPR-barcoding screen, qPCR was performed using a QuantStudio  
454 12K Flex System (Thermo Scientific). The wt and mutant EGFR-T790 barcodes were  
455 detected by Taqman PCR using the EGFR-FW (5'-TCCCTCCAGGAAGCCTACG)

456 and EGFR-RV (5'-CCTTCCCTGATTACCTTTGCGA) primers and the EGFR-T790T  
457 (5'-CCAACTGATTACCCAGCTCATGCCC) and the EGFR-T790M (5'-  
458 GCTTATAATGCAACTGATGCCCTTCGG) probes, using a Taqman master mix (Thermo  
459 Scientific).

460

461 **Cell viability and colony forming assays.** For cell viability assay, 2,500 PC9 cells per well  
462 were seeded in 96-well plates. Cells were incubated overnight to allow attachment to the  
463 plates, followed by treatment with the different drugs. The culture media/drugs were  
464 refreshed every 2/3 days. After 6 days of treatment, CellTiter-Glo reagent (Promega) was  
465 added to culture medium, mixed with an orbital shaker for 2 min to induce cell lysis and  
466 incubated for 10 min at room temperature to stabilize the luminescent signal. Measurements  
467 were performed according to manufacturer's instructions using Infinite F200 PRO (TECAN).  
468 Cell viability was analysed based on the levels of luminescence, proportional to the amount  
469 of ATP present in the cells.

470 For long-term colony forming assays, 5,000-10,000 cells per well were seeded in six-  
471 well plates. The following day, the cells were treated as indicated for the different  
472 experiments, then they were dried, fixed with a 10% MetOH, 10% acetic acid solution, and  
473 stained with a 1% crystal violet (Merck) MetOH solution. Excess stain was removed by  
474 rinsing in deionized water and the plates were air-dried. Plate images were captured using a  
475 ChemiDoc Imaging System.

476

477 **Flow cytometry.** Parental or Flag-EGFR\_Ex19Del-T2A-GFP (VIRSP)-transduced PC9 cells,  
478 treated with or without sorafenib (5  $\mu$ M) for three days, were trypsinized, washed and fixed  
479 with 4% paraformaldehyde. The levels of green fluorescence were measured by FACS using  
480 a CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter) and analysed with the CytExpert software  
481 (Beckman Coulter).

482

483 **Immunoblot, m7GTP pull-down and *in vitro* kinase assay.** Cells were lysed in a buffer  
484 containing 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, NP40 0.5%, 20 mM NaF, 2  
485 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, supplemented with protease inhibitor mini tablets (Thermo Scientific). Lysates  
486 were cleared by centrifugation at 14,000 g for 15 min at 4°C and protein concentration was  
487 determined using the Bradford assay (Bio-Rad). Sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer  
488 was added to equal amounts of lysates, followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
489 (PAGE) and transfer to polyvinylidene fluoride membranes (Bio-Rad) using a Trans-Blot  
490 Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in  
491 5% nonfat dried milk (Sigma-Aldrich) in PBS and incubated overnight at 4°C with the primary  
492 antibodies (Suppl. Table 7) in 3% BSA PBS-tween. After washing, the membranes were  
493 incubated 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5,000) and  
494 the bands were visualized by chemiluminescence using the Clarity Western ECL substrate  
495 (Bio-Rad) and a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad). The images were analyzed using the  
496 Image Lab Software (Bio-Rad) and the original blots are shown in Suppl. Fig. 9.

497 To isolate cap-binding proteins, 40 µL of immobilized gamma-aminophenyl-m7GTP  
498 beads (Jena Bioscience) were added to 1 mg of PC9 cell lysates, followed by overnight  
499 incubation at 4°C. After four washes in lysis buffer, SDS loading buffer was added to the  
500 beads, and immunoblot was performed in parallel from both the m7GTP-bound fraction and  
501 total lysate.

502 For *in vitro* MNK2 kinase assay, 293T cells transfected with Flag-eIF4E (pcDNA3)  
503 were treated overnight with trametinib 0.1 µM, followed by cell lysis and immunoprecipitation  
504 using anti-Flag M2 agarose beads (Sigma-Aldrich). After extensive washing with cold lysis  
505 buffer and PBS, equal amounts of beads were incubated with kinase buffer (Abcam)  
506 supplemented with 300 µM ATP, 0.25 mM DTT and 50 µg/ml BSA, in the presence or the  
507 absence of 100 ng of recombinant human MNK2 protein (Abcam) and different  
508 concentrations of sorafenib or other inhibitors for 20 min at 30°C. The reaction was stopped  
509 by adding SDS loading buffer, followed by SDS-PAGE and immunoblot.

510

511 **Gene array analysis.** PC9 cells were treated in triplicate with or without osimertinib (1  $\mu$ M)  
512 and/or sorafenib (5  $\mu$ M) for 1, 2 or 4 days (for the longest time point, the media was renewed  
513 after 2 days), and total RNA was isolated using the miRNeasy kit (Qiagen) following the  
514 manufacturer's instructions. The RNA quality was verified on agarose gel. Gene expression  
515 profiling was performed using a low-input QuickAmp labeling kit and human SurePrint G3  
516 8x60K microarrays (Agilent Technologies), as previously described<sup>92</sup>. Differentially expressed  
517 genes were identified by a 2-sample univariate t test and a random variance model, as  
518 previously described<sup>93</sup>. Datasets were deposited into Gene Expression Omnibus  
519 (GSE179192).

520 *[To review GEO accession GSE179192 while in private status:*

521 *Go to <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE179192>*

522 *Enter token wzebkqaobdkfhcj into the box]*

523

524 **Barcode sequencing.** Highly complex CRISPR-barcodes were inserted into the AAVS1  
525 locus of PC9 cells as previously described<sup>42</sup>. Barcoded cells were treated for 2 weeks with or  
526 without 1  $\mu$ M osimertinib and 5  $\mu$ M sorafenib, alone or in combination (four replicates per  
527 condition, one million cells per replicate in T-150 cm<sup>2</sup> flasks). After treatment, the cells were  
528 harvested and genomic DNA was extracted using NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel)  
529 according to manufacturer's instructions. Targeted amplification of the integrated barcode in  
530 the AAVS1 locus was performed using previously described<sup>42</sup> primers containing Illumina  
531 adapter sequences and 6 bp unique indexes. For each sample, we performed 3 PCR  
532 reactions, each from 500 ng of genomic DNA in a final volume of 50  $\mu$ l, using Herculase II  
533 Fusion DNA Polymerase (Agilent technologies) and the following program: 98°C for 5  
534 minutes; followed by 27 cycles of 20 s at 98°C, 20 s at 60°C and 30 s at 72°C; final extension  
535 at 72°C for 3 min. The PCR products from the same sample were pooled and purified over  
536 2% agarose gels (band size at 275 bp) using NucleoSpin® Gel and PCR clean-up kit  
537 (Macherey-Nagel). Purified amplicons were quantified by Qubit (Thermofisher) and their  
538 quality was assessed by Bioanalyzer (Agilent). Sequencing was performed on an Illumina

539 MiniSeq, using the High Output Reagent Kit (300-cycles). Counts of barcodes for each  
540 sample were extracted from FASTQ files using galaxy (<https://usegalaxy.org>). Heatmap and  
541 Ward's clustering analyses were performed using euclidean distance with R software.  
542 Spearman correlations were calculated using Excel (Microsoft).

543

544 **Mouse xenografts.** For the experiment illustrated in Fig. 6b, PC9 cells containing the EGFR-  
545 C797S CRISPR-barcode were mixed with Matrigel (Corning) and subcutaneously inoculated  
546 in the left and right flanks ( $2 \times 10^6$  cells per site) of male SCID mice. For the experiment  
547 shown in Fig. 6c, separate batches of PC9 cells containing the EGFR-C797S, KRAS-G12D  
548 or PIK3CA-E545K CRISPR-barcode were pooled and supplemented with a small fraction  
549 (1:200) of PC9 cells transduced with the HER2-ex20ins vector. The cells were mixed with  
550 Matrigel and bilaterally inoculated in SCID mice. For the experiment depicted in Fig. 6e-f,  
551 YUX-1024 cells were transfected for BRAF-V600E CRISPR-barcoding and selected with 0.1  
552  $\mu\text{M}$  osimertinib for three weeks. The cells were then mixed with parental YUX-1024 in a  
553 1:200 proportion, supplemented with 50% Matrigel and bilaterally inoculated in the flanks of  
554 female SCID mice. The size of the tumors was measured by caliper every 2-3 days. When  
555 tumors were palpable (Fig 6b) or reached an average size of about 100 (Fig 6c) or 200  $\text{mm}^3$   
556 (Fig 6e-f), the mice were treated 3 times a week with osimertinib (5 mg/kg for experiments  
557 with PC9 cells; 10 mg/kg for experiments with YUX-1024 cells) and sorafenib (60 mg/kg),  
558 alone or in combination, using a water/EtOH/Kolliphor (Sigma-Aldrich) solution. For the  
559 experiment shown in Fig. 6b, the mice were initially treated 5 times a week for 12 days,  
560 before switching to a 3-times-a-week regimen for the rest of the experiment. When the size  
561 of at least one of the tumors reached the arbitrary volume of 800  $\text{mm}^3$  (Fig.6c,e), the mice  
562 were sacrificed and the tumors were dissected for gDNA extraction.

563 For iDISCO 3D-analysis, PC9 cells containing the EGFR-C797S, PIK3CA-E545K or  
564 KRAS-G12D CRISPR-barcode were selected with osimertinib (0.1  $\mu\text{M}$ ) and transduced with  
565 GFP, mCherry or b-galactosidase lentiviruses, respectively. The cells were selected with  
566 puromycin, and GFP and mCherry containing cells were sorted by FACS. The three cell

567 populations were mixed with parental PC9 cells in a 1:1000 proportion, to form a mass  
568 population of osimertinib-sensitive (unlabeled) and osimertinib-resistant (labeled) cells. YUX-  
569 1024 cells containing the BRAF-V600E CRISPR-barcode and selected with osimertinib (0.1  
570  $\mu\text{M}$ ) were transduced with a GFP lentivirus, puromycin selected and FACS sorted. The cells  
571 were then mixed with parental YUX-1024 (1:200 ratio). PC9 and YUX-1024 cells were mixed  
572 with Matrigel and subcutaneously inoculated in the flanks of female SCID mice. When the  
573 tumors reached an average size of 200  $\text{mm}^3$ , the mice were randomized and treated 3 times  
574 a week with osimertinib (5 mg/kg for the PC9 experiment, 10 mg/kg for the YUX-1024  
575 experiment) alone or in combination with sorafenib (60 mg/kg) by gavage. Control mice were  
576 sacrificed after randomization. The other mice were sacrificed after 4 weeks of treatment and  
577 the tumors were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde.

578 Animal experiments were approved by Mount Sinai's Animal Care and Use Committee  
579 (IACUC) or the French Regional Ethics Committees and the Ministry of Education, Research  
580 and Innovation (project n°19253-201903191709966 v1 and authorization n° 11752 –  
581 16/10/18), and they were performed in accordance with the European Committee Council  
582 Directive (2010-63-EU).

583  
584 **iDISCO 3D-imaging.** Sample processing, immunostaining and imaging were described  
585 previously<sup>94,95</sup>. Briefly, the tumors were dehydrated with increasing concentrations of MetOH  
586 (20, 40, 60, 80 and 100%), followed by incubation in a solution of 2/3 dichloromethane (DCM;  
587 Sigma-Aldrich), 1/3 MetOH. The tumors were then bleached overnight using a fresh 5%  
588 solution of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in MetOH at 4°C, followed by rehydration with decreasing concentrations of  
589 MetOH (100, 80, 60, 40 and 20%). The tumors were incubated for 2 days with a  
590 permeabilizing solution containing PBS1, Triton-X 100, glycine and 10% DMSO, then  
591 incubated for two additional days with a blocking solution containing 6% Donkey Serum,  
592 Triton-X 100 and 10% DMSO. The anti-GFP, anti-RFP/mCherry and anti-beta-galactosidase  
593 antibodies (Suppl. Table 7) were incubated in PTwH/5%DMSO/3% Donkey Serum for 1  
594 week at 37°C. After 5 washes, the tumors were incubated with the secondary antibodies

595 (Suppl. Table 7) in PTwH/3% Donkey Serum for 1 week at 37°C. The tumors were washed 5  
596 times and then dehydrated using increasing concentrations of MetOH, followed by a  
597 delipidation using DCM solutions and overnight clearing in dibenzylether (DBE; Sigma-  
598 Aldrich).

599         Cleared samples were imaged with an Ultramicroscope II (LaVision BioTec) using the  
600 InspectorPro software (LaVision BioTec). The light sheet was generated by a Coherent  
601 Sapphire Laser (LaVision BioTec) at wavelengths of 488, 561 and 640 nm and six cylindrical  
602 lenses. A binocular stereomicroscope (MXV10, Olympus) with a 2x objective (MVPLAPO,  
603 Olympus) was used at different magnifications (0.63X and 0.8x). The samples were placed in  
604 an imaging reservoir made of 100% quartz (LaVision BioTec), filled with DBE and illuminated  
605 from the side by the laser light. Images were acquired with a PCO Edge SCMOS CCD  
606 Camera (2560 x 2160 Pixel size, LaVision BioTec). The step size in Z-orientation between  
607 each image was fixed at 4 or 6 µm for 0.63x and 0.8x magnifications. Images were  
608 processed and analyzed using the Imaris software (Bitplane).

609

610 **Statistical analysis.** Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism software  
611 using Mann-Whitney's test.



## 612 **Acknowledgments**

613 We thank M. Thomas, I. Lihmann, T. Lecroq, L. Mouchard, G. Favre and O. Calvayrac for  
614 helpful discussion. We thank P. Jänne (Dana-Farber Cancer Institute), J. Minna (UT  
615 Southwestern Medical Center) and R. Whitehead (Vanderbilt University) for sharing cell  
616 lines. Some experiments and analyses, including part of the qPCR for the initial screen,  
617 amplicon quality assessment by Bioanalyzer and 3D-imaging analysis using the Imaris  
618 software, were performed at the Cell Imaging Platform of Normandie (PRIMACEN). We  
619 thank D. Cartier (DC2N), G. Riou (IRIB Flow Cytometry Facility), J. Maucotel (SRB,  
620 UNIROUEN), M. Di Giovanni, M. Bénard and A. Lebon (PRIMACEN) for technical  
621 assistance.

622 This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche  
623 Médicale (INSERM), the Université de Rouen Normandie, the Institut National du Cancer  
624 (PLBIO 2017-159), the Agence Nationale de la Recherche (METROPOLIS), the Ligue contre  
625 le Cancer de Haute-Normandie, the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer  
626 (PJA20161205119), the Conseil Régional de Normandie and the FEDER program of the  
627 European Union. L.B. was supported by a doctoral fellowship from the Ligue contre le  
628 Cancer de Normandie and the Normandie Region. A.G. was supported by a doctoral  
629 fellowship from the Normandie Region. H.C. was supported by doctoral fellowships from the  
630 Nabatieh Municipal Council (Lebanon) and the Fondation pour la Recherche Médicale. M.S.  
631 is recipient of a post-doctoral fellowship from the Fondation de France. B.C.C. was supported  
632 by Basic Science Research Program through the NRF funded by the Korean Ministry of  
633 Science and ICT (2016R1A2B3016282).

634

## 635 **Author Contributions**

636 L.B., MdM.B.-R., A.G., H.C., D.A., Z.K., J.L., S.Y., A.A., M.S., D.G., P.J., A.V. and L.G.  
637 performed the experiments. L.B., MdM.B.-R., A.G., H.C., D.A., Z.K., J.L., A.A., M.S., D.T.,

638 S.A.A., A.B.C., Y.A. and L.G. designed and/or analyzed experiments. C.B. participated in the  
639 analysis of highly complex CRISPR-barcode. S.A. and A.B. provided CRC cell lines and  
640 participated in experiment design and analysis. C.C. performed and analyzed gene array  
641 experiments. B.C.C. provided the PDC lines and participated in experiment design and  
642 analysis. L.G., Y.A. and A.B.C. acquired funding. S.A.A, S.A., D.T., Z.K. and Y.A. edited the  
643 manuscript. L.G. conceived and supervised the study, and wrote the manuscript with help  
644 from L.B. All authors reviewed the manuscript.

645 **Competing interests**

646 L.G., A.G., Y.A. and S.A.A. are listed as inventors on a patent application related to this  
647 work. The other authors declare no competing interests.

648 **References**

- 649 1. Lynch, T.J., *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying  
650 responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**, 2129-2139  
651 (2004).
- 652 2. Mok, T.S., *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J*  
653 *Med* **361**, 947-957 (2009).
- 654 3. Rosell, R., *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European  
655 patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a  
656 multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* **13**, 239-246 (2012).
- 657 4. Janne, P.A., *et al.* AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J*  
658 *Med* **372**, 1689-1699 (2015).
- 659 5. Soria, J.C., *et al.* Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung  
660 Cancer. *N Engl J Med* **378**, 113-125 (2018).
- 661 6. Ramalingam, S.S., *et al.* Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated  
662 Advanced NSCLC. *N Engl J Med* **382**, 41-50 (2020).
- 663 7. Wu, Y.L., *et al.* Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J*  
664 *Med* **383**, 1711-1723 (2020).
- 665 8. Ramalingam, S.S., *et al.* Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive  
666 Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **36**, 841-849 (2018).
- 667 9. Rotow, J. & Bivona, T.G. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nat*  
668 *Rev Cancer* **17**, 637-658 (2017).
- 669 10. Passaro, A., Jänne, P.A., Mok, T. & Peters, S. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant  
670 lung cancer. *Nature Cancer* **2**, 377-391 (2021).
- 671 11. McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and  
672 the Future. *Cell* **168**, 613-628 (2017).
- 673 12. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat*  
674 *Rev Clin Oncol* **15**, 81-94 (2018).
- 675 13. Vasan, N., Baselga, J. & Hyman, D.M. A view on drug resistance in cancer. *Nature* **575**, 299-  
676 309 (2019).
- 677 14. Marusyk, A., Janiszewska, M. & Polyak, K. Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of  
678 Therapy Resistance. *Cancer Cell* **37**, 471-484 (2020).
- 679 15. Bhang, H.E., *et al.* Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-  
680 complexity barcoding. *Nat Med* **21**, 440-448 (2015).
- 681 16. Hata, A.N., *et al.* Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to  
682 epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med* **22**, 262-269 (2016).
- 683 17. Ramirez, M., *et al.* Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant  
684 cancer persister cells. *Nature communications* **7**, 10690 (2016).
- 685 18. Shah, K.N., *et al.* Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR  
686 inhibitors in lung cancer. *Nat Med* **25**, 111-118 (2019).
- 687 19. Kurppa, K.J., *et al.* Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated  
688 Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway. *Cancer Cell* **37**, 104-122 e112  
689 (2020).
- 690 20. Planchard, D., *et al.* Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines  
691 for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **29**, iv192-iv237 (2018).
- 692 21. Hanna, N.H., *et al.* Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer With Driver Alterations:  
693 ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update. *J Clin Oncol* **39**, 1040-1091 (2021).
- 694 22. Gainor, J.F., *et al.* Dramatic Response to Combination Erlotinib and Crizotinib in a Patient  
695 with Advanced, EGFR-Mutant Lung Cancer Harboring De Novo MET Amplification. *Journal of*  
696 *thoracic oncology* **11**, e83-85 (2016).
- 697 23. Sequist, L.V., *et al.* Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-  
698 amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors:

- 699 interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study. *The Lancet. Oncology* **21**, 373-  
700 386 (2020).
- 701 24. Bozic, I., *et al.* Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy.  
702 *eLife* **2**, e00747 (2013).
- 703 25. Michor, F. & Beal, K. Improving Cancer Treatment via Mathematical Modeling: Surmounting  
704 the Challenges Is Worth the Effort. *Cell* **163**, 1059-1063 (2015).
- 705 26. Amirouchene-Angelozzi, N., Swanton, C. & Bardelli, A. Tumor Evolution as a Therapeutic  
706 Target. *Cancer discovery* (2017).
- 707 27. Stankova, K., Brown, J.S., Dalton, W.S. & Gatenby, R.A. Optimizing Cancer Treatment Using  
708 Game Theory: A Review. *JAMA oncology* **5**, 96-103 (2019).
- 709 28. Bailey, C., *et al.* Tracking Cancer Evolution through the Disease Course. *Cancer discovery* **11**,  
710 916-932 (2021).
- 711 29. Gatenby, R.A., Silva, A.S., Gillies, R.J. & Frieden, B.R. Adaptive therapy. *Cancer Res* **69**, 4894-  
712 4903 (2009).
- 713 30. Acar, A., *et al.* Exploiting evolutionary steering to induce collateral drug sensitivity in cancer.  
714 *Nature communications* **11**, 1923 (2020).
- 715 31. Das Thakur, M., *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to  
716 forestall drug resistance. *Nature* **494**, 251-255 (2013).
- 717 32. Sun, C., *et al.* Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma.  
718 *Nature* **508**, 118-122 (2014).
- 719 33. Kong, X., *et al.* Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch.  
720 *Nature* **550**, 270-274 (2017).
- 721 34. Lee, J.S., *et al.* Synthetic lethality-mediated precision oncology via the tumor transcriptome.  
722 *Cell* (2021).
- 723 35. Boshuizen, J. & Peeper, D.S. Rational Cancer Treatment Combinations: An Urgent Clinical  
724 Need. *Mol Cell* **78**, 1002-1018 (2020).
- 725 36. Nowak, M.A. & Sigmund, K. Evolutionary dynamics of biological games. *Science* **303**, 793-799  
726 (2004).
- 727 37. Algazi, A.P., *et al.* Continuous versus intermittent BRAF and MEK inhibition in patients with  
728 BRAF-mutated melanoma: a randomized phase 2 trial. *Nat Med* **26**, 1564-1568 (2020).
- 729 38. Misale, S., *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy  
730 in colorectal cancer. *Nature* **486**, 532-536 (2012).
- 731 39. Tsui, D.W.Y., *et al.* Dynamics of multiple resistance mechanisms in plasma DNA during EGFR-  
732 targeted therapies in non-small cell lung cancer. *EMBO molecular medicine* **10**(2018).
- 733 40. Parikh, A.R., *et al.* Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor  
734 heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med* **25**, 1415-1421 (2019).
- 735 41. Fragata, I., Blanckaert, A., Dias Louro, M.A., Liberles, D.A. & Bank, C. Evolution in the light of  
736 fitness landscape theory. *Trends in ecology & evolution* **34**, 69-82 (2019).
- 737 42. Guernet, A., *et al.* CRISPR-Barcoding for Intratumor Genetic Heterogeneity Modeling and  
738 Functional Analysis of Oncogenic Driver Mutations. *Mol Cell* **63**, 526-538 (2016).
- 739 43. Crystal, A.S., *et al.* Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug  
740 combinations for cancer. *Science* **346**, 1480-1486 (2014).
- 741 44. Hu, S., *et al.* Comparison of antitumor effects of multitargeted tyrosine kinase inhibitors in  
742 acute myelogenous leukemia. *Molecular cancer therapeutics* **7**, 1110-1120 (2008).
- 743 45. Liston, D.R. & Davis, M. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for  
744 Nonclinical Studies. *Clin Cancer Res* **23**, 3489-3498 (2017).
- 745 46. Zhou, W., *et al.* Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature*  
746 **462**, 1070-1074 (2009).
- 747 47. Cross, D.A., *et al.* AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance  
748 to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer discovery* **4**, 1046-1061 (2014).
- 749 48. Thress, K.S., *et al.* Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-  
750 small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* **21**, 560-562 (2015).

- 751 49. Wilhelm, S., *et al.* Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for  
752 treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 835-844 (2006).
- 753 50. Kobayashi, S., *et al.* Transcriptional profiling identifies cyclin D1 as a critical downstream  
754 effector of mutant epidermal growth factor receptor signaling. *Cancer Res* **66**, 11389-11398  
755 (2006).
- 756 51. Pratilas, C.A., *et al.* (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK  
757 signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**,  
758 4519-4524 (2009).
- 759 52. Rahmani, M., Davis, E.M., Bauer, C., Dent, P. & Grant, S. Apoptosis induced by the kinase  
760 inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through  
761 inhibition of translation. *J Biol Chem* **280**, 35217-35227 (2005).
- 762 53. Robichaud, N., Sonenberg, N., Ruggero, D. & Schneider, R.J. Translational Control in Cancer.  
763 *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11**(2019).
- 764 54. Ruggero, D., *et al.* The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates  
765 with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* **10**, 484-486 (2004).
- 766 55. Wendel, H.G., *et al.* Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* **21**, 3232-3237  
767 (2007).
- 768 56. Furic, L., *et al.* eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate  
769 cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14134-14139 (2010).
- 770 57. Knight, J.R.P., *et al.* MNK Inhibition Sensitizes KRAS-Mutant Colorectal Cancer to mTORC1  
771 Inhibition by Reducing eIF4E Phosphorylation and c-MYC Expression. *Cancer discovery* **11**,  
772 1228-1247 (2021).
- 773 58. Davis, M.I., *et al.* Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology*  
774 **29**, 1046-1051 (2011).
- 775 59. Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S. & Fukunaga, R. Mnk2 and Mnk1  
776 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E  
777 but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* **24**, 6539-6549 (2004).
- 778 60. Yang, F., *et al.* Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription 3 signaling  
779 associated with growth arrest and apoptosis of medulloblastomas. *Molecular cancer*  
780 *therapeutics* **7**, 3519-3526 (2008).
- 781 61. Blechacz, B.R., *et al.* Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3  
782 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2.  
783 *Hepatology* **50**, 1861-1870 (2009).
- 784 62. Chen, K.F., *et al.* Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells  
785 through the inhibition of STAT3. *Clin Cancer Res* **16**, 5189-5199 (2010).
- 786 63. Menard, L., Floc'h, N., Martin, M.J. & Cross, D.A.E. Reactivation of Mutant-EGFR Degradation  
787 through Clathrin Inhibition Overcomes Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer*  
788 *Res* **78**, 3267-3279 (2018).
- 789 64. Fassunke, J., *et al.* Overcoming EGFR(G724S)-mediated osimertinib resistance through unique  
790 binding characteristics of second-generation EGFR inhibitors. *Nature communications* **9**, 4655  
791 (2018).
- 792 65. Leonetti, A., *et al.* Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung  
793 cancer. *British journal of cancer* **121**, 725-737 (2019).
- 794 66. Konermann, S., *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9  
795 complex. *Nature* **517**, 583-588 (2015).
- 796 67. Engelman, J.A., *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by  
797 activating ERBB3 signaling. *Science* **316**, 1039-1043 (2007).
- 798 68. Sharma, S.V., *et al.* A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell  
799 subpopulations. *Cell* **141**, 69-80 (2010).
- 800 69. Shen, S., Vagner, S. & Robert, C. Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors. *Cell* **183**, 860-  
801 874 (2020).

- 802 70. Di Nicolantonio, F., *et al.* Precision oncology in metastatic colorectal cancer - from biology to  
803 medicine. *Nat Rev Clin Oncol* (2021).
- 804 71. Renier, N., *et al.* iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for  
805 volume imaging. *Cell* **159**, 896-910 (2014).
- 806 72. Karoulia, Z., Gavathiotis, E. & Poulikakos, P.I. New perspectives for targeting RAF kinase in  
807 human cancer. *Nat Rev Cancer* **17**, 676-691 (2017).
- 808 73. Cheng, C., Zhao, Y., Schaafsma, E., Weng, Y.L. & Amos, C. An EGFR signature predicts cell line  
809 and patient sensitivity to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer* **147**, 2621-2633  
810 (2020).
- 811 74. Paz-Ares, L., *et al.* Monotherapy Administration of Sorafenib in Patients With Non-Small Cell  
812 Lung Cancer (MISSION) Trial: A Phase III, Multicenter, Placebo-Controlled Trial of Sorafenib in  
813 Patients with Relapsed or Refractory Predominantly Nonsquamous Non-Small-Cell Lung  
814 Cancer after 2 or 3 Previous Treatment Regimens. *Journal of thoracic oncology* **10**, 1745-1753  
815 (2015).
- 816 75. Brown, M.C. & Gromeier, M. MNK Controls mTORC1:Substrate Association through  
817 Regulation of TELO2 Binding with mTORC1. *Cell reports* **18**, 1444-1457 (2017).
- 818 76. Ke, X.Y., *et al.* MNK1 and MNK2 enforce expression of E2F1, FOXM1, and WEE1 to drive soft  
819 tissue sarcoma. *Oncogene* **40**, 1851-1867 (2021).
- 820 77. Hosomi, Y., *et al.* Gefitinib Alone Versus Gefitinib Plus Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung  
821 Cancer With Mutated Epidermal Growth Factor Receptor: NEJ009 Study. *J Clin Oncol* **38**, 115-  
822 123 (2020).
- 823 78. Noronha, V., *et al.* Gefitinib Versus Gefitinib Plus Pemetrexed and Carboplatin Chemotherapy  
824 in EGFR-Mutated Lung Cancer. *J Clin Oncol* **38**, 124-136 (2020).
- 825 79. Adjei, A.A., *et al.* Phase I trial of sorafenib in combination with gefitinib in patients with  
826 refractory or recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 2684-2691 (2007).
- 827 80. Duran, I., *et al.* Phase I targeted combination trial of sorafenib and erlotinib in patients with  
828 advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **13**, 4849-4857 (2007).
- 829 81. Lim, S.M., *et al.* A multicenter phase II study of sorafenib in combination with erlotinib in  
830 patients with advanced non-small cell lung cancer (KCSG-0806). *Lung cancer* **93**, 1-8 (2016).
- 831 82. Whitehead, R.H., Macrae, F.A., St John, D.J. & Ma, J. A colon cancer cell line (LIM1215)  
832 derived from a patient with inherited nonpolyposis colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* **74**,  
833 759-765 (1985).
- 834 83. Yun, J., *et al.* YH25448, an Irreversible EGFR-TKI with Potent Intracranial Activity in EGFR  
835 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **25**, 2575-2587 (2019).
- 836 84. Ran, F.A., *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* **8**,  
837 2281-2308 (2013).
- 838 85. Guo, W., *et al.* Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **148**,  
839 1015-1028 (2012).
- 840 86. Johannessen, C.M., *et al.* COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase  
841 pathway reactivation. *Nature* **468**, 968-972 (2010).
- 842 87. Okumura, F., Zou, W. & Zhang, D.E. ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances  
843 cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes Dev* **21**, 255-260 (2007).
- 844 88. Greulich, H., *et al.* Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR  
845 mutants. *PLoS medicine* **2**, e313 (2005).
- 846 89. Yuza, Y., *et al.* Allele-dependent variation in the relative cellular potency of distinct EGFR  
847 inhibitors. *Cancer Biol Ther* **6**, 661-667 (2007).
- 848 90. Guan, B., Wang, T.L. & Shih le, M. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-  
849 mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res*  
850 **71**, 6718-6727 (2011).
- 851 91. Grumolato, L., *et al.* Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate  
852 completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* **24**, 2517-2530 (2010).

- 853 92. Sulpice, L., *et al.* Gene expression profiling of the tumor microenvironment in human  
854 intrahepatic cholangiocarcinoma. *Genomics data* **7**, 229-232 (2016).
- 855 93. Allain, C., Angenard, G., Clement, B. & Coulouarn, C. Integrative Genomic Analysis Identifies  
856 the Core Transcriptional Hallmarks of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* **76**,  
857 6374-6381 (2016).
- 858 94. Belle, M., *et al.* Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell*  
859 **169**, 161-173 e112 (2017).
- 860 95. Belle, M., *et al.* A simple method for 3D analysis of immunolabeled axonal tracts in a  
861 transparent nervous system. *Cell reports* **9**, 1191-1201 (2014).

862 **Figure legends**

863 **Figure 1. Sorafenib inhibits the emergence of resistant subpopulations of NSCLC cells**  
864 **induced by EGFR-TKIs.**

865 **a**, PC9, HCC4006 or HCC827 NSCLC cells containing EGFR-T790M-mutant subpopulations  
866 generated by CRISPR-barcoding were treated with gefitinib (1  $\mu$ M; Gef) alone or in  
867 combination with sorafenib (5  $\mu$ M; Soraf) for 5 days. The proportion of EGFR-T790M cells  
868 was assessed by qPCR from genomic DNA and normalized using EGFR\_Ctrl primers. Mean  
869  $\pm$  SEM (n=4) of one representative of at least three independent experiments. \*p < 0.05 and  
870 \*\*p < 0.01 (Mann-Whitney test).

871 **b**, PC9 and H1975 cells and YU-1150 patient-derived cells (PDC) containing EGFR-C797S-  
872 subpopulations were treated with osimertinib (0,1  $\mu$ M, Osim) alone or in combination with  
873 sorafenib (5  $\mu$ M) for 10 days and the proportion of EGFR-C797S-barcoded cells was  
874 measured as in **a**. Mean  $\pm$  SEM (n=4) of one representative of at least three independent  
875 experiments.

876 **c**, PC9 and H1975 cells described in **b** were treated with osimertinib alone (1  $\mu$ M for PC9  
877 cells, 0,1  $\mu$ M for H1975 cells) or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M) for 20 days (PC9 cells)  
878 or 15 days (H1975 cells). The cells were then fixed and stained with crystal violet.

879 **d**, Effects of osimertinib alone (0,1  $\mu$ M) or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M), sunitinib (1  
880  $\mu$ M; Sun), regorafenib (2  $\mu$ M; Reg), lenvatinib (1  $\mu$ M; Lenv) or cabozantinib (5  $\mu$ M; Cab) in  
881 EGFR-C797S-CRISPR-barcoded PC9 cells. The cells were treated for 7 (left panel) or 10  
882 (right panel) days, and the proportion of the EGFR-C797S subpopulation was measured by  
883 qPCR. The mean  $\pm$  SEM (n=5 or n=4) of one representative of three experiments is shown.

884 **e**, Cell viability of parental or osimertinib-resistant (OR-PC9, EGFR-T790M/C797S) PC9 cells  
885 treated for 5 days as indicated with osimertinib (0,1  $\mu$ M), sorafenib (5  $\mu$ M), sunitinib (1  $\mu$ M) or  
886 cabozantinib (5  $\mu$ M).



887 **f**, Colony forming assay representative images of parental, gefitinib-resistant/osimertinib-  
888 sensitive (GR-PC9, EGFR-T790M) or osimertinib-resistant PC9 cells treated for 5 days with  
889 osimertinib (1  $\mu$ M) or sorafenib (5  $\mu$ M), alone or in combination.

890 **g**, Diagram representing the effects of the indicated treatments on a mixed population of  
891 osimertinib-sensitive (yellow) and osimertinib-resistant (red) NSCLC cells.

892

893 **Figure 2. Sorafenib inhibits the clonal evolution of NSCLC cells induced by**  
894 **osimertinib.**

895 **a**, Gene set enrichment analysis (GSEA) of EGFR-TKI up-regulated genes in NSCLC cells  
896 (KOBAYASHI\_EGFR\_SIGNALING\_24HR\_UP), performed on gene array data obtained from  
897 PC9 cells treated with osimertinib (1  $\mu$ M) or sorafenib (5  $\mu$ M), alone or in combination  
898 (Combo) for two days. Enrichment scores (ES) and P values are reported.

899 **b**, The data described in **a** were analyzed using our osimertinib-sorafenib combination  
900 signature (COMBO\_UP).

901 **c**, PC9 cells containing highly complex CRISPR-barcodes in the AAVS1 locus were treated  
902 for two weeks with osimertinib (1  $\mu$ M) and sorafenib (5  $\mu$ M), alone or in combination (n=4 per  
903 condition). Barcodes enriched at least 5-fold over the control in 4 or 3 replicates are shown.

904 **d**, Barcode heatmap and Ward's hierarchical clustering of the four replicates per condition of  
905 the experiment described in **c**.

906 **e**, Correlation matrix of the data shown in **d**.

907 **f**, Pearson correlation of the barcode distribution in control versus osimertinib- or  
908 combination-treated cells. The coefficients of determination ( $R^2$ ) and the P-value are  
909 indicated.

910

911 **Figure 3. Sorafenib inhibits phosphorylation of eIF4E and STAT3, and expression of**  
912 **MCL1 and MYC in NSCLC cells.**

913 **a**, PC9 cells were treated for 10 to 60 minutes (min) with sorafenib (5  $\mu$ M) or the MEK  
914 inhibitor trametinib (50 nM), followed by immunoblot using the indicated antibodies.

915 **b**, YUX-1024 and YU-1150 PDCs were treated for 2h with sorafenib (5  $\mu$ M), osimertinib (0,1  
916  $\mu$ M) and the MNK inhibitor eFT-508 (1  $\mu$ M) and immunoblot was performed using the  
917 indicated antibodies.

918 **c**, PC9 cells transduced with a lentiviral vector for inducible expression of a constitutively  
919 active form of Flag-tagged MNK2 (CA-MNK2) were pre-treated with or without doxycycline  
920 (0,1  $\mu$ g/ml; Dox) for 12h, followed by 1h treatment with sorafenib (5, 10 or 20  $\mu$ M), eFT-508  
921 (20  $\mu$ M, positive control) or trametinib (1  $\mu$ M; Tram, negative control). Immunoblot was  
922 performed using the indicated antibodies.

923 **d**, Flag-tagged eIF4E was immunoprecipitated from transfected 293T cells and *in vitro* kinase  
924 assay was performed using recombinant active MNK2 (rMNK2) in the presence or the  
925 absence of the indicated concentrations of sorafenib, trametinib or eFT-508. Immunoblot was  
926 performed using anti-phospho-eIF4E, anti-MNK2 and anti-Flag antibodies.

927 **e**, PC9 cells were treated with sorafenib (5  $\mu$ M) or trametinib (50 nM) for 6h, followed by  
928 immunoblot using the indicated antibodies.

929 **f**, PC9 cells were treated with or without sorafenib (5  $\mu$ M) for 24, 48 or 72h, followed by  
930 immunoblot using the indicated antibodies.

931 **g**, YU-1150 and YUX-1024 PDCs were treated with or without sorafenib (5  $\mu$ M) for 3 days,  
932 followed by immunoblot using the indicated antibodies.

933 **h**, EGFR-T790M CRISPR-barcoded PC9 cells were treated with gefitinib (1  $\mu$ M) alone, or in  
934 combination with sorafenib (5  $\mu$ M) or three other inhibitors (iESM): napabucasin (0.5  $\mu$ M,  
935 STAT3 inhibitor), S63845 (0.1  $\mu$ M, MCL1 inhibitor) and eFT-508 (1  $\mu$ M) in 5% FBS medium  
936 for 5 days. The proportion of the EGFR-T790M barcode was measured by qPCR from  
937 genomic DNA and normalized using EGFR\_Ctrl primers. Mean  $\pm$ SEM (n=5) of one  
938 representative of three experiments. \*p < 0.05 (Mann-Whitney test).

939

940 **Figure 4. Sorafenib induces late down-regulation of EGFR in NSCLC cells**

941 **a**, Time-course effects of sorafenib (5  $\mu$ M) in PC9 cells. Immunoblot was performed using the  
942 indicated antibodies. eIF4E was used as loading control.

943 **b**, YUX-1024 and YU-1150 PDCs were treated with sorafenib (5  $\mu$ M) for 5 days, followed by  
944 immunoblot using anti-EGFR and anti-tubulin antibodies.

945 **c**, GR-PC9 and OR-PC9 cells were treated with osimertinib (1  $\mu$ M) and sorafenib (5  $\mu$ M),  
946 alone or in combination, for 3 days, followed by immunoblot using the indicated antibodies.

947 **d**, PC9 cells were transduced with a lentiviral vector containing Flag-tagged EGFR-Ex19Del  
948 and green fluorescent protein (GFP), separated by the T2A self-cleaving peptide and under  
949 the control of the PGK promoter. Two different clones were isolated and treated for 3 days in  
950 the presence or the absence of sorafenib (5  $\mu$ M). The expression of EGFR and GFP was  
951 measured by immunoblot (upper panel) and FACS (lower panel), respectively.

952 **e**, PC9 cells were transduced with lentiviral vectors containing either Ex19Del-mutant or WT  
953 Flag-tagged EGFR and two clones per condition were isolated. The clones were treated in  
954 the presence or absence of sorafenib (5  $\mu$ M) for 3 days, and immunoblot was performed  
955 using anti-Flag and anti-tubulin antibodies.

956 **f**, PC9 cells were treated with sorafenib (5  $\mu$ M) alone or in combination with different  
957 concentrations of chloroquine (ChQ) for 3 days, followed by immunoblot with anti-EGFR and  
958 anti-tubulin antibodies.

959 **g**, PC9 cells containing the EGFR-T790M CRISPR-barcode were treated with gefitinib (1  $\mu$ M)  
960 alone or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M), with or without chloroquine (20  $\mu$ M) for 4 days.  
961 Genomic DNA was derived and the proportion of the EGFR-T790M barcode was measured  
962 by qPCR and normalized using the EGFR\_Ctrl primers. The mean  $\pm$ SEM (n=5) of one  
963 representative of three experiments is represented. \*\*p < 0.01 (Mann-Whitney test).

964

965 **Figure 5. Sorafenib prevents the emergence of cell subpopulations containing**  
966 **different clinically relevant mechanisms of EGFR-TKI resistance.**

967 **a**, CRISPR-barcoding was used to generate PC9 cell subpopulations containing EGFR-  
968 G724S, HER2-ex20ins (HER2-A775insV-G776C), KRAS-G12D, BRAF-V600E or PIK3CA-  
969 E545K mutations, and the cells were treated with or without osimertinib (0,1  $\mu$ M), alone or in  
970 combination with sorafenib (5  $\mu$ M) or trametinib (10 nM; Tram) for 7 (BRAF-V600E), 10  
971 (EGFR-G724S and KRAS-G12D), 15 (PIK3CA-E545K) or 20 days (HER-ex20ins). The  
972 proportions of the mutant barcodes were assessed by qPCR from genomic DNA and  
973 normalized using EGFR\_Ctrl primers. Mean  $\pm$ SEM (n=4) of one representative of at least  
974 three experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (Mann-Whitney test).

975 **b**, The BRAF-V600E mutation was introduced by CRISPR/Cas9 in YUX-1024 and YU-1150  
976 PDCs, followed by selection in the presence of osimertinib (0,1  $\mu$ M). The mutant cells were  
977 mixed parental cells (1 to 100 ratio), and the resulting cell population was treated with  
978 osimertinib (0,1  $\mu$ M, 7 days) alone or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M). The proportion of  
979 the BRAF-V600E barcode was measured by qPCR. Mean  $\pm$ SEM (n=4) of one representative  
980 of three experiments.

981 **c**, The EML4-ALK chromosomal inversion was induced by CRISPR/Cas9 in a small  
982 subpopulation of PC9 cells. The proportion of mutant cells was assessed after treatment in  
983 the presence or the absence of osimertinib (0,1  $\mu$ M, 10 days), alone or in combination with  
984 sorafenib (5  $\mu$ M).

985 **d**, Overexpression of HER2-A775insYVMA (HER-ex20ins) in PC9 cells was induced by  
986 transduction with a lentiviral vector. MET overexpression was induced using a dCas9  
987 activator system through a sgRNA targeting the MET gene, followed by two-week selection  
988 in the presence of osimertinib (0,1  $\mu$ M). The cells overexpressing HER-ex20ins or MET were  
989 mixed with parental PC9 cells (1 to 100 ratio) and treated with osimertinib (0,1  $\mu$ M) alone or  
990 in combination with sorafenib (5  $\mu$ M) or crizotinib (1  $\mu$ M; Criz) for 10 (HER-ex20ins) or 15  
991 (MET) days. The proportion of cells overexpressing the two receptors was assessed by  
992 qPCR from genomic DNA using vector specific primers and normalized using EGFR\_Ctrl

993 primers. Mean  $\pm$ SEM (n=4 for HER2-ex20ins; n=5 for MET) of one representative of three  
994 experiments.

995 **e**, EGFR-TKI resistant HCC827-GR6 cells were transduced with a lentiviral vector and mixed  
996 with parental HCC827 in a 1 to 100 ratio. The cells were then treated for 6 days with  
997 osimertinib (0,1  $\mu$ M) alone or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M), and the proportion of  
998 HCC827-GR6 cells was measured by qPCR using vector specific primers. The mean  $\pm$ SEM  
999 (n=4) of one representative of three different experiments is represented.

1000 **f**, PC9 cells were transduced with an empty lentiviral vector (Vec) or a vector for inducible  
1001 expression of the EMT transcription factor SLUG (SLUG), followed by a 7 day treatment in  
1002 the presence or the absence of doxycycline (1  $\mu$ g/ml). Immunoblot (left panel) was performed  
1003 using anti-SLUG, anti-vimentin and anti-tubulin antibodies. Parental PC9 (Par) were used as  
1004 negative control. Cells containing the SLUG vector, pre-treated in the presence or the  
1005 absence of doxycycline for at least a week, were mixed with parental PC9 (1 to 100 ratio)  
1006 and treated for 7 days with osimertinib (0,1  $\mu$ M) alone or in combination with sorafenib (5  
1007  $\mu$ M). The proportion of cells containing the lentiviral vector was assessed by qPCR. Mean  
1008  $\pm$ SEM (n=4) of one representative of three experiments.

1009 **g**, PC9 cells transduced with the dCas9 activator and a control sgRNA viruses were selected  
1010 in the presence of osimertinib (0,1  $\mu$ M) for 3 weeks (Persister cells), then mixed with parental  
1011 cells (1 to 100 ratio). The proportion of Persister cells was assessed by qPCR after a 15-day  
1012 treatment with osimertinib (0,1  $\mu$ M) alone or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M) or crizotinib  
1013 (0.5  $\mu$ M). The mean  $\pm$ SEM (n=4) of one representative of three experiments is represented.

1014 **h-i**, The EGFR-G465R (**h**) or KRAS-G12D (**i**) mutations were introduced by CRISPR-  
1015 barcoding in a subpopulation of LIM1215 CRC cells, and the proportion of mutant cells was  
1016 assessed after 6 days in the presence or the absence of cetuximab (20  $\mu$ g; Cetux) or  
1017 osimertinib (1  $\mu$ M), alone or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M). The mean  $\pm$ SEM ( n=3 for  
1018 EGFR-G465R; n=4 for KRAS-G12D) of one representative of three different experiments is  
1019 represented.

1020

1021 **Figure 6. Sorafenib delays the emergence of osimertinib-resistant cells *in vivo***

1022 **a**, A PC9 mass population containing small pools (1 to 1000 ratio each) of EGFR-C797S

1023 (expressing GFP), KRAS-G12D (expressing  $\beta$ -galactosidase) and PIK3CA-E545K

1024 (expressing mCherry) osimertinib-resistant cells were subcutaneously injected in the right

1025 and left flanks of SCID mice. Once the tumors reached a mean volume of about 200 mm<sup>3</sup>,

1026 the mice were sacrificed (Ctrl) or treated for 4 weeks with osimertinib (5 mg/kg) alone or in

1027 combination with sorafenib (60 mg/kg; Combo). 3D-imaging through iDISCO technology was

1028 performed to visualize the subpopulations of resistant cells. To maintain a similar size of the

1029 samples from different conditions, the tumors from osimertinib-treated mice were cut in two.

1030 **b**, CRISPR-barcoding was used to generate a subpopulation of PC9 cells bearing the EGFR-

1031 C797S mutation, and the cells were then injected in the right and left flanks of SCID mice.

1032 Once the tumors were palpable (arrow), the mice were randomized and treated with or

1033 without osimertinib (5 mg/kg) and sorafenib (60 mg/kg), alone or in combination, and the

1034 volume of the tumors was measured by caliper. The mean tumor volumes  $\pm$  SEM are

1035 represented (n=5 mice per group).

1036 **c**, A PC9 mass population containing small pools of EGFR-C797S, KRAS-G12D and

1037 PIK3CA-E545K CRISPR-barcoded or HER2-ex20ins overexpressing cells was injected in the

1038 right and left flanks of SCID mice. Once the tumors reached a mean volume of about 100

1039 mm<sup>3</sup>, the mice were randomized and treated with either vehicle or osimertinib (5 mg/kg)

1040 alone or in combination with sorafenib (60 mg/kg) for the indicated period. The mean tumor

1041 volumes  $\pm$  SEM are shown (n=6 mice for the control, n=10 mice for the other groups).

1042 **d**, YUX-1024 PDCs containing a subpopulation (1 to 200 ratio) of BRAF-V600E resistant

1043 cells expressing GFP were subcutaneously injected in the right and left flanks of SCID mice.

1044 Once the tumors reached a mean volume of about 200 mm<sup>3</sup>, the mice were sacrificed (Ctrl)

1045 or treated for 4 weeks with osimertinib (10 mg/kg) alone or in combination with sorafenib (60

1046 mg/kg), followed by 3D-imaging. Tumors from osimertinib-treated tumors were cut in two

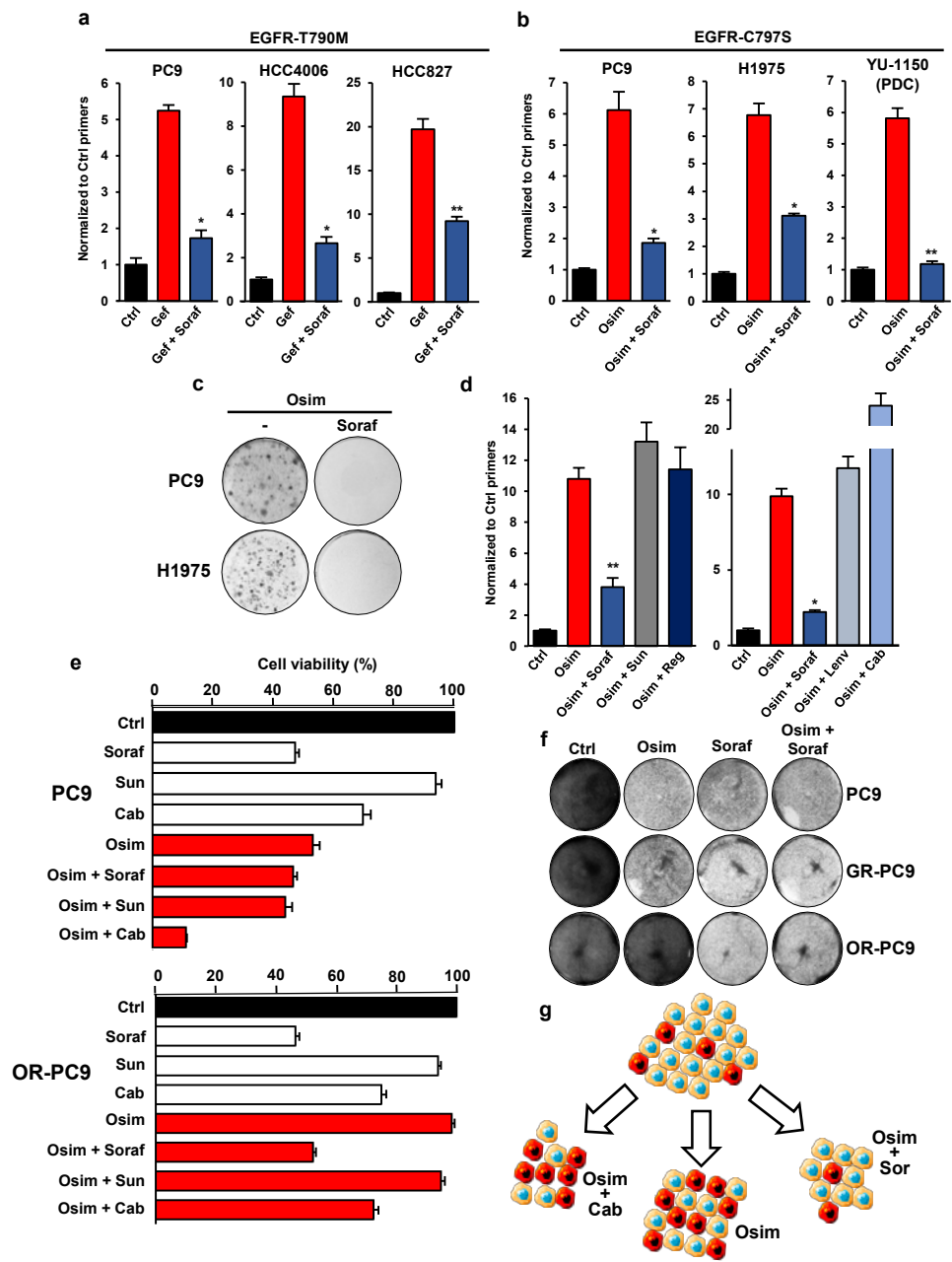
1047 before staining to ensure comparable size of the samples.

1048 **e**, A mass population of YUX-1024 PDCs containing a pool (1 to 200 ratio) of BRAF-V600E  
1049 cells was injected in the right and left flanks of SCID mice. When the tumors reached a mean  
1050 volume of about 200 mm<sup>3</sup>, the mice were treated with vehicle, osimertinib (10 mg/kg),  
1051 sorafenib (60 mg/kg) or a combination of the two inhibitors. The mean tumor volumes ± SEM  
1052 are represented (n=6 mice for the control, n=8 for the other groups).

1053 **f**, Kaplan-Meier diagram of the experiment illustrated in **e**. The mice were sacrificed when the  
1054 volume of at least one of the tumors exceeded 800 mm<sup>3</sup>.

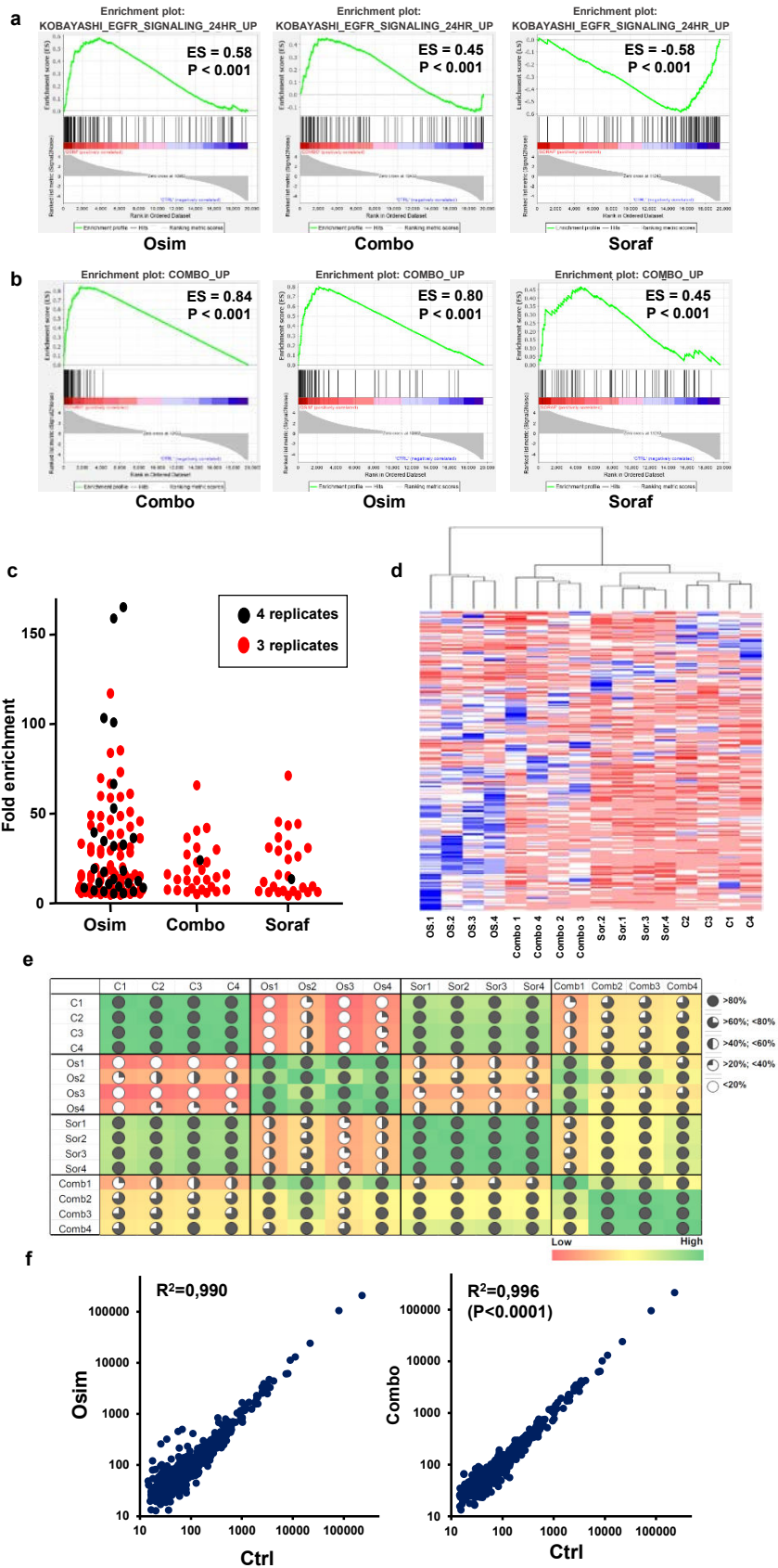






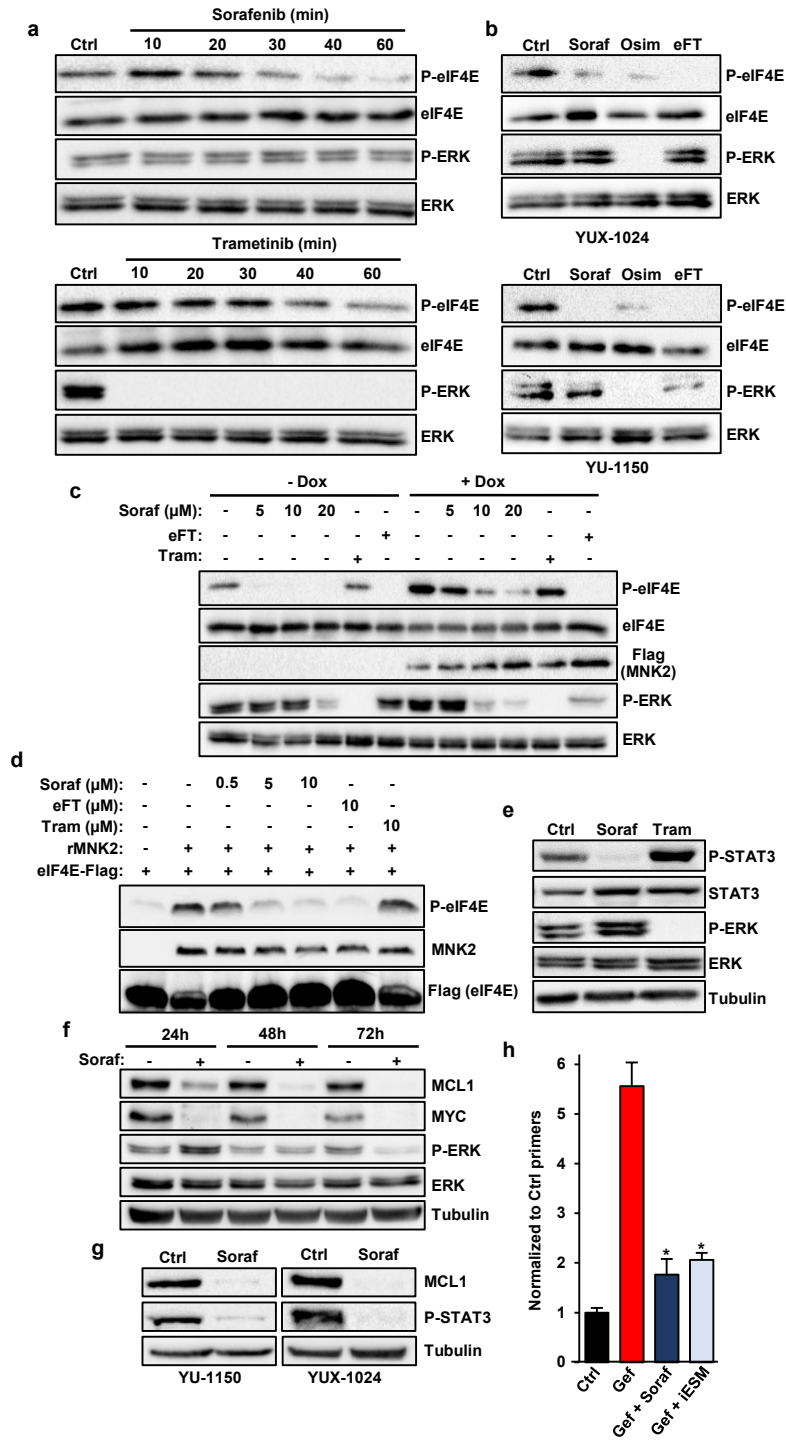
**Figure 1**





**Figure 2**





**Figure 3**



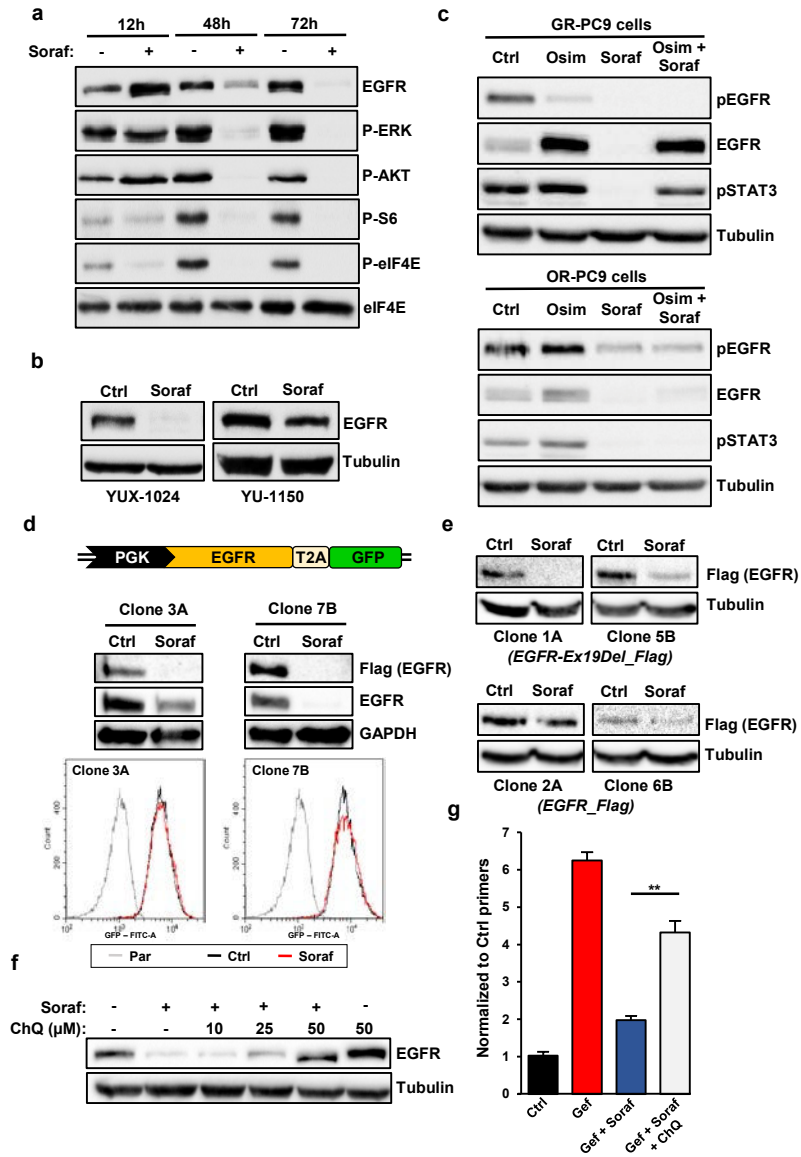
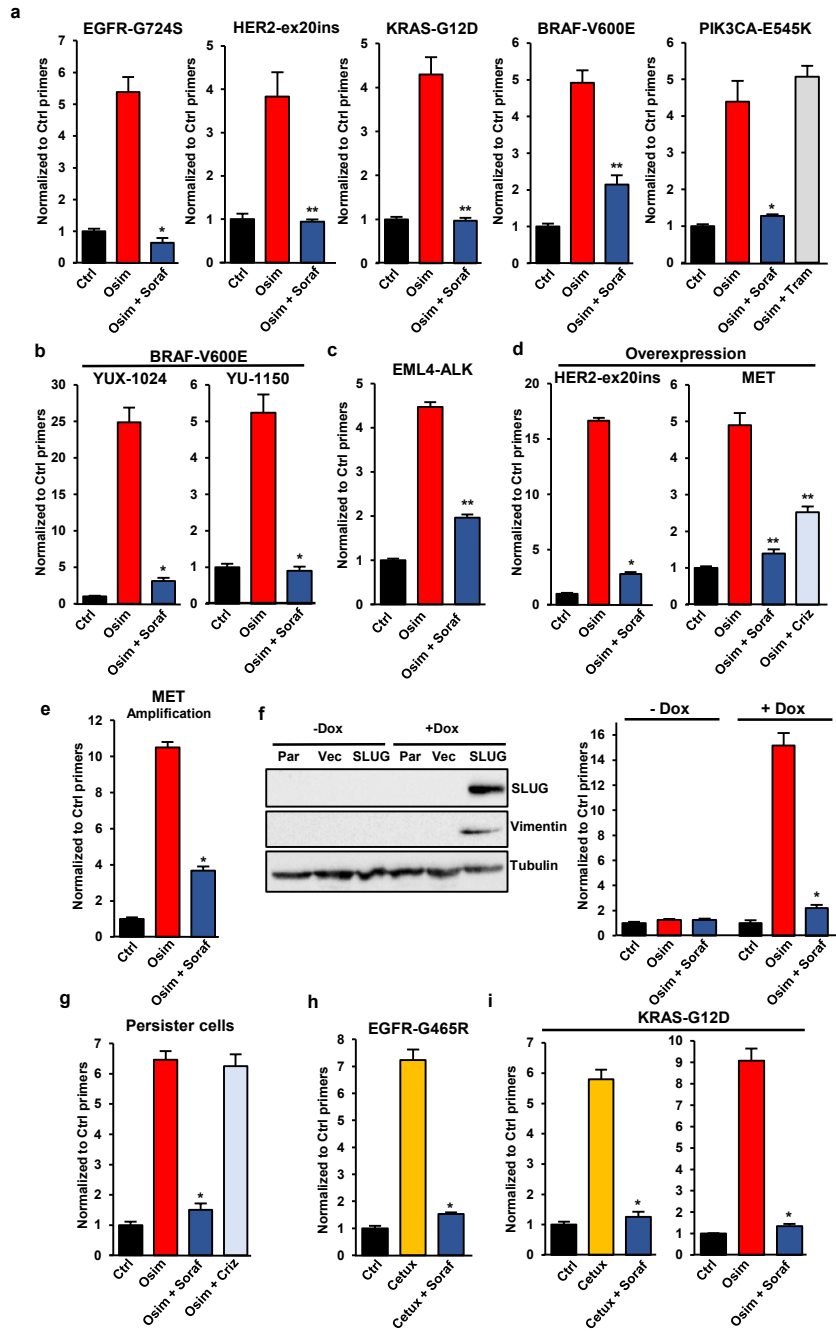


Figure 4

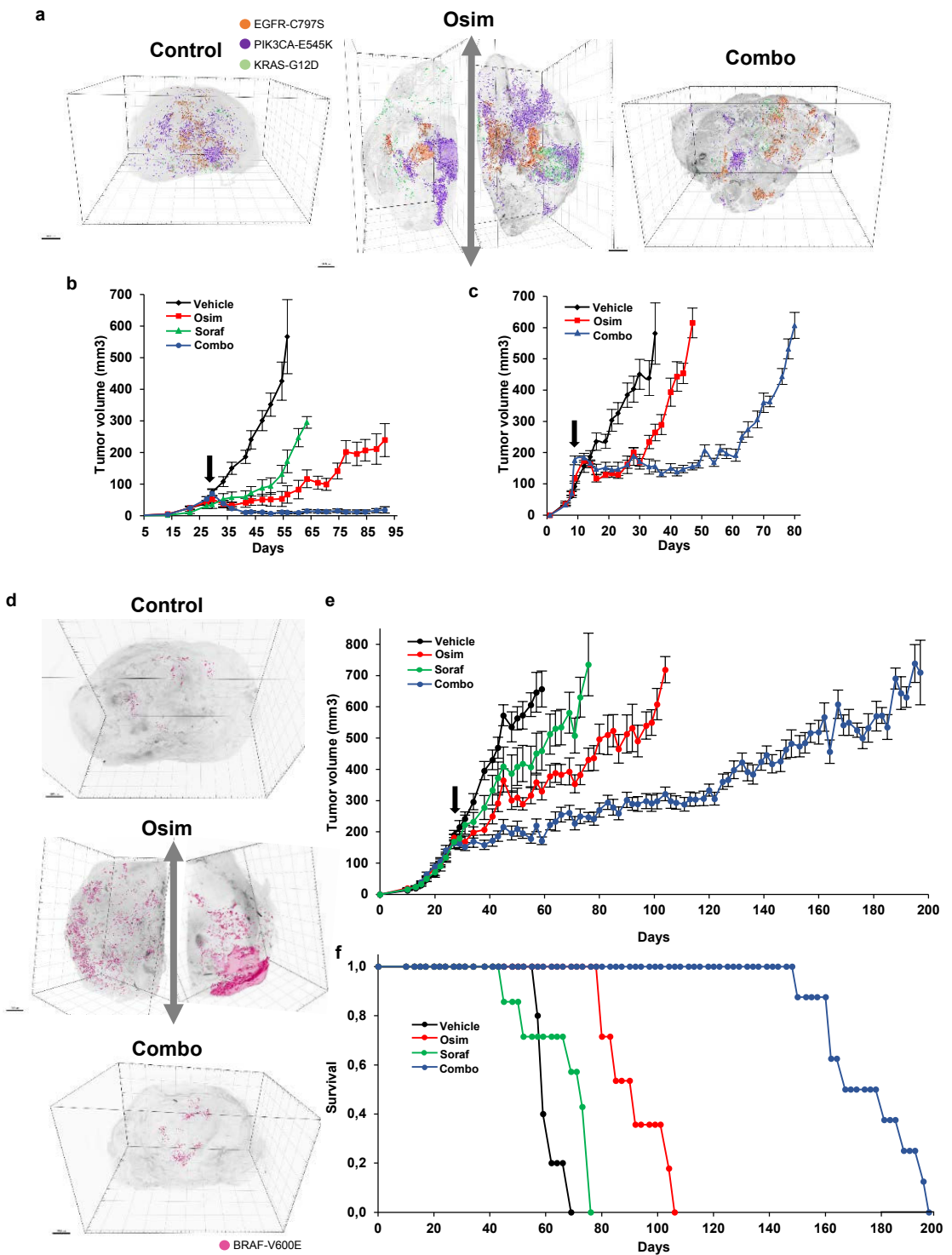






**Figure 5**



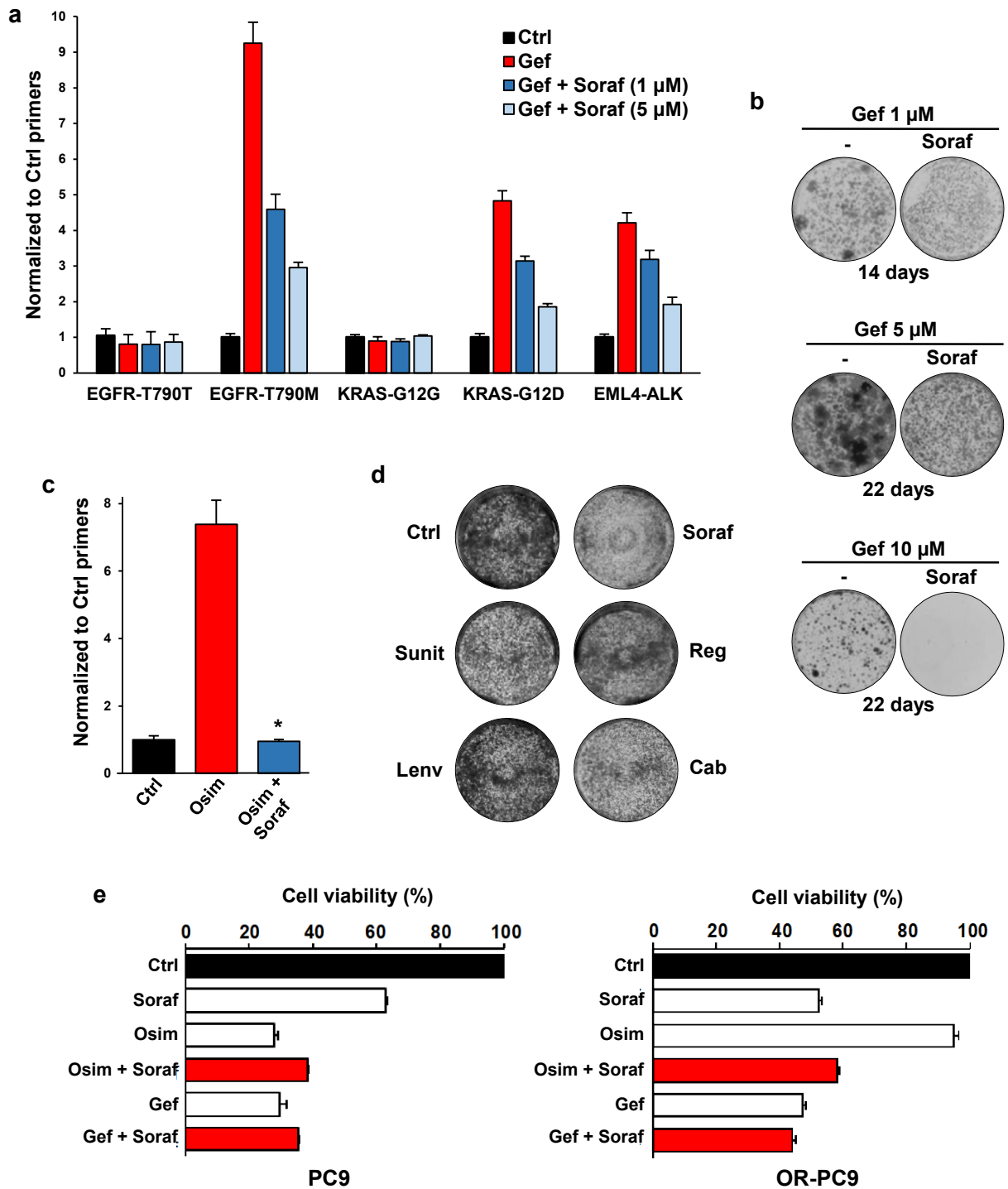


**Figure 6**



## **Supplementary Figures**

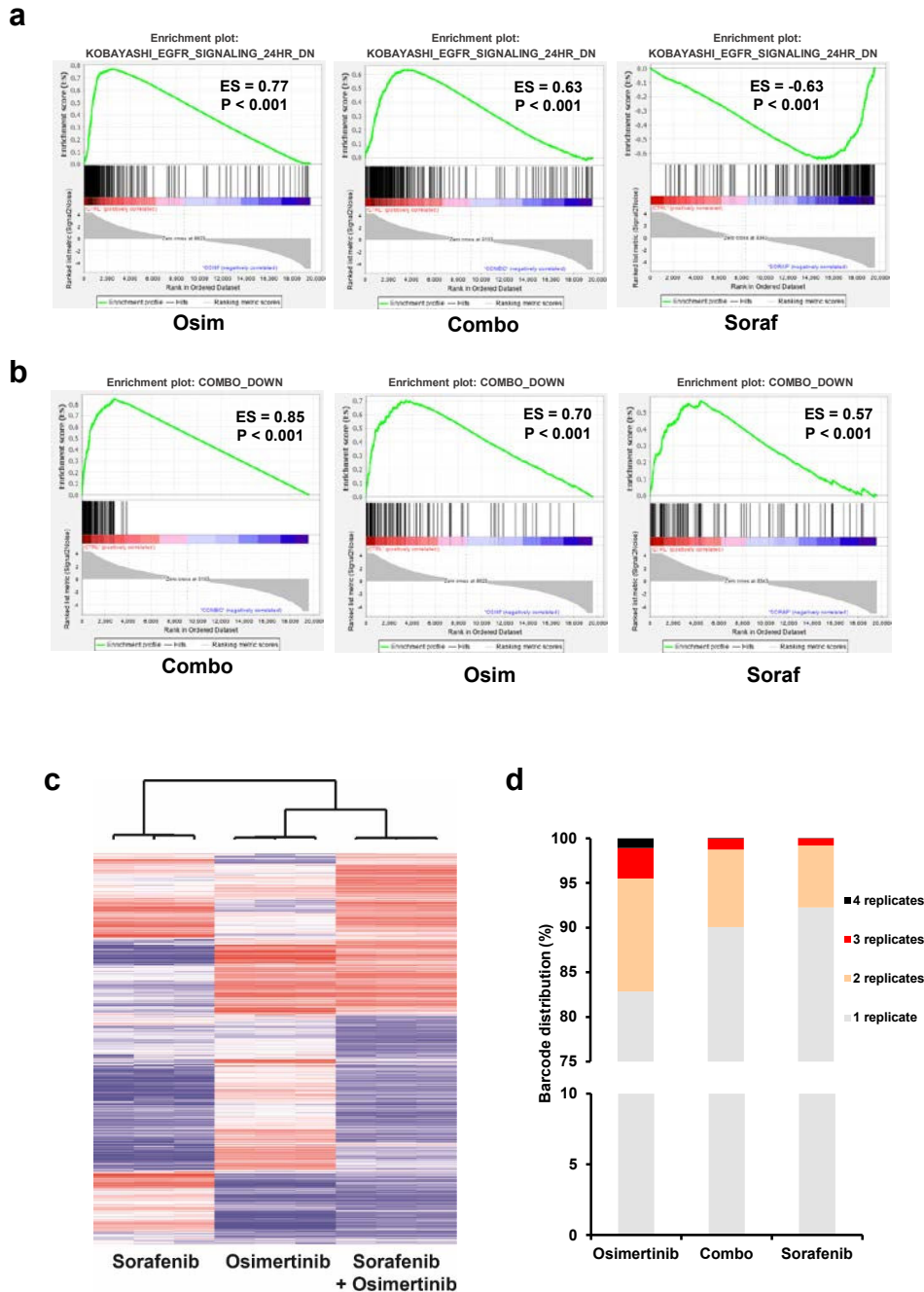




**Supplementary Fig. 1. Effects of Sorafenib on the emergence of resistant subpopulations of NSCLC cells induced by EGFR-TKIs.** **a**, The indicated CRISPR-barcodes were introduced in PC9 cells, and the cells were treated with or without gefitinib (1  $\mu$ M), alone or in combination with sorafenib (1 or 5  $\mu$ M), for 5 days. The proportion of the barcodes was measured by qPCR from genomic DNA and normalized using EGFR\_Ctrl primers. **b**, Representative images of colony forming assays of the same population of CRISPR-barcoded PC9 cells treated with gefitinib (1, 5 or 10  $\mu$ M) alone or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M) for 14 or 22 days. **c**, CRISPR-barcoding was used to introduce the EGFR-C797S barcode in a population of PC9 cells containing the EGFR-T790M mutation. The cells were then treated with osimertinib (1  $\mu$ M) or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M) for 9 days, and the proportion of the EGFR-C797S barcode was assessed by qPCR. The mean  $\pm$ SEM (n=4) of one representative of three experiments is represented. **d**, Colony forming assay of PC9 cells treated for 5 days with sorafenib (5  $\mu$ M), sunitinib (1  $\mu$ M), regorafenib (2  $\mu$ M), lenvatinib (1  $\mu$ M) or cabozantinib (5  $\mu$ M). **e**, Cell viability assay of parental or osimertinib-resistant PC9 cells grown for 5 days in the presence or the absence of gefitinib (1  $\mu$ M) or osimertinib (0,1  $\mu$ M) alone or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M). The fraction of viable cells was measured by CellTiter-Glo and normalized to the DMSO-treated control.

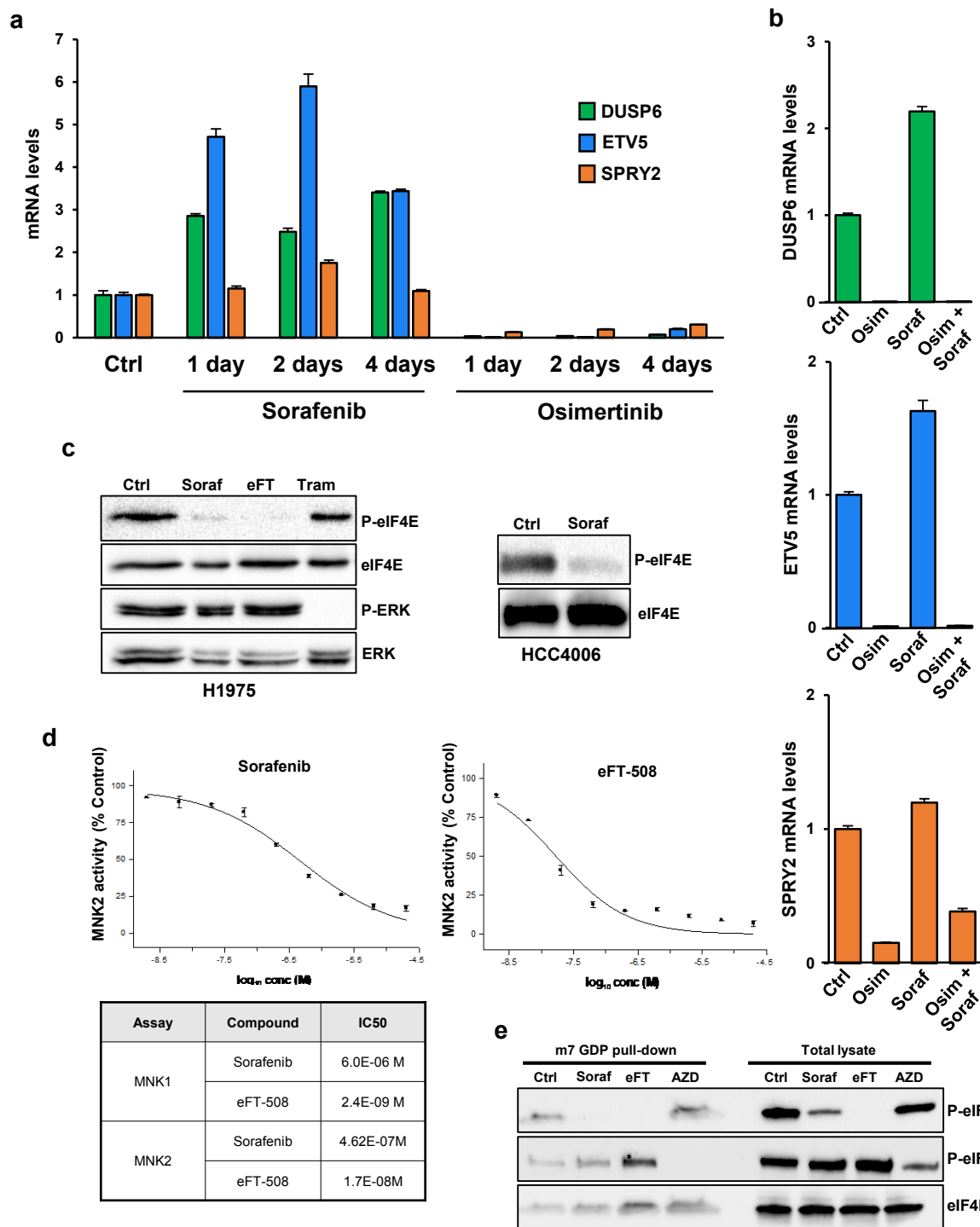






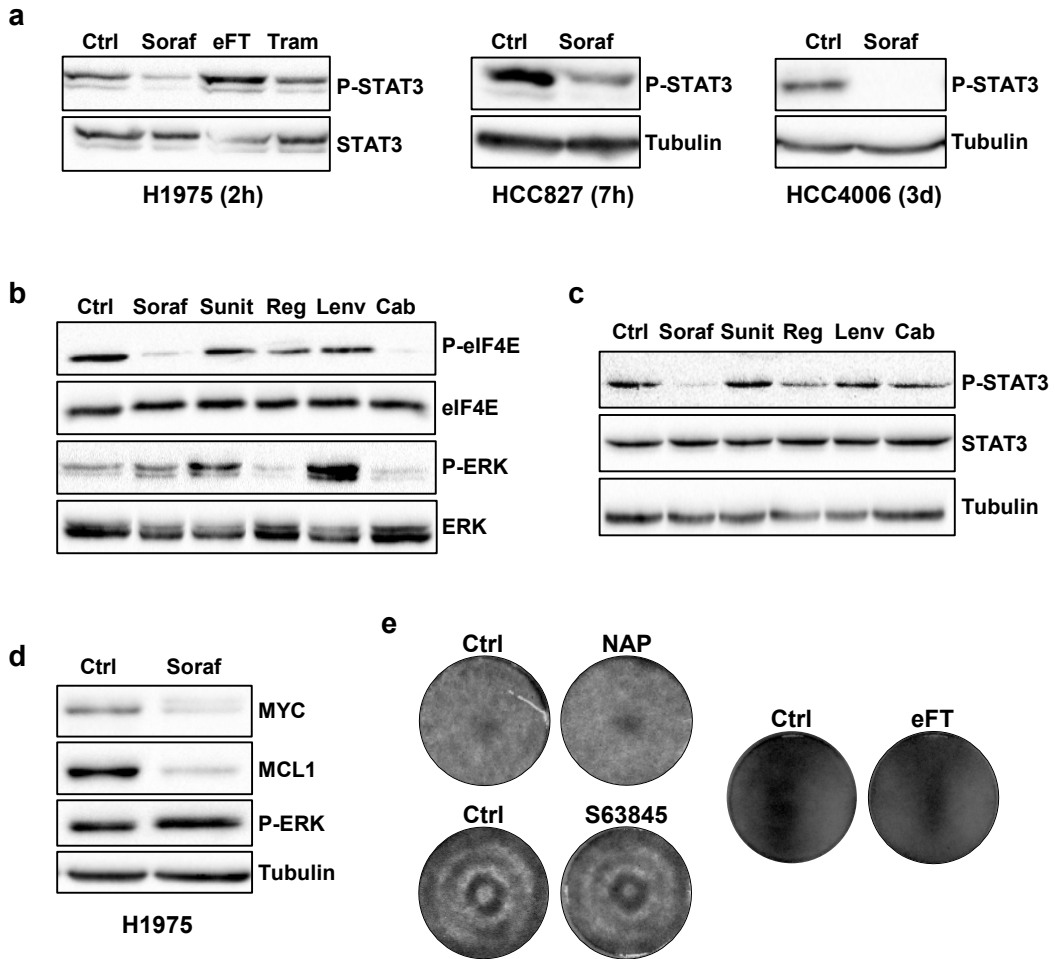
**Supplementary Fig. 2. Effects of sorafenib on the clonal evolution of NSCLC cells induced by osimertinib.** **a**, Gene set enrichment analysis (GSEA) of EGFR-TKI down-regulated genes in NSCLC cells (KOBAYASHI\_EGFR\_SIGNALING\_24HR\_DOWN), performed on gene array data obtained from PC9 cells treated with osimertinib (1  $\mu$ M) or sorafenib (5  $\mu$ M), alone or in combination (Combo), for two days. Enrichment scores (ES) and P values are reported. **b**, The data described in **a** were analyzed using our osimertinib-sorafenib combination signature (COMBO\_DOWN). **c**, Heatmap and hierarchical clustering of the gene array data. **d**, PC9 cells containing highly complex CRISPR-barcodes were treated for two weeks with osimertinib (1  $\mu$ M) and sorafenib (5  $\mu$ M), alone or in combination (n=4 per condition). The percentage of barcodes enriched at least 5-fold in 1, 2, 3 or 4 replicates is shown.





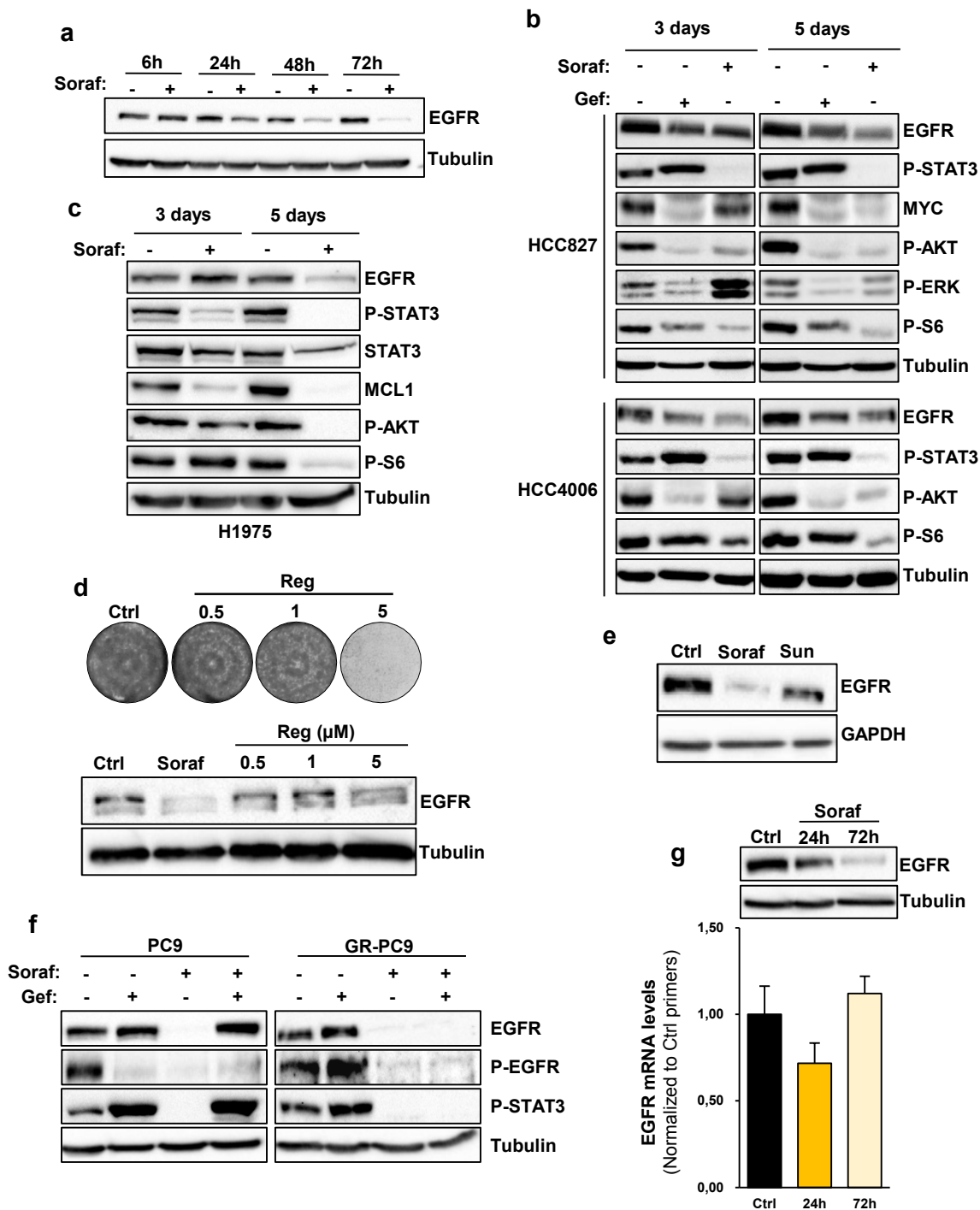
**Supplementary Fig. 3. Sorafenib blocks phosphorylation of eIF4E by a direct inhibition of MNK activity without affecting MAPKs in NSCLC cells.** **a**, Gene array data of the expression of DUSP6, SPRY2 and ETV5 MAPK target genes in PC9 cells treated for 1, 2 or 4 days with osimertinib (1  $\mu$ M) or sorafenib (5  $\mu$ M). **b**, PC9 cells were treated with osimertinib (1  $\mu$ M) and sorafenib (5  $\mu$ M), alone or in combination, for 2 days and the expression of DUSP6, SPRY2 and ETV5 was assessed by qPCR. **c**, H1975 and HCC4006 cells were treated for 2h with or without sorafenib (5  $\mu$ M), eFT-508 (1  $\mu$ M; eFT, MNK inhibitor) or trametinib (50 nM; Tram, MEK inhibitor), followed by immunoblot using the indicated antibodies. **d**, Effects of sorafenib and eFT-508 on the *in vitro* catalytic activity of MNK2 and MNK1, measured using as a substrate the myelin basic protein or a peptide derived from the human cAMP Response Element Binding protein, respectively. **e**, Cap pull-down assay in PC9 cells treated for 6h in the presence or the absence of sorafenib (5  $\mu$ M), eFT-508 (1  $\mu$ M) or AZD8055 (1  $\mu$ M; AZD, mTOR inhibitor). Cell lysate was pulled-down using m7 GDP beads, and immunoblot was performed using the indicated antibodies.





**Supplementary Fig. 4. Sorafenib inhibits phosphorylation of STAT3 and expression of MYC and MCL1 in NSCLC cells.** **a**, H1975, HCC827 and HCC4006 cells were treated for the indicated time points with sorafenib (5  $\mu$ M), eFT-508 (1  $\mu$ M) or trametinib (50 nM), followed by immunoblot using anti-phospho-STAT3, anti-STAT3 or anti-tubulin antibodies. **b**, **c**, PC9 cells were treated for 2h (**b**) or 6h (**c**) with sorafenib (5  $\mu$ M), sunitinib (1  $\mu$ M), regorafenib (2  $\mu$ M), lenvatinib (1  $\mu$ M) or cabozantinib (5  $\mu$ M) and immunoblot was performed using the indicated antibodies. **d**, H1975 cells were treated for 3 days in the presence or the absence of sorafenib (5  $\mu$ M), followed by immunoblot using the indicated antibodies. **e**, Representative images of colony forming assays of PC9 cells treated for 6 days with napabucasin (0,5  $\mu$ M; NAP, STAT3 inhibitor), S63845 (0,1  $\mu$ M; MCL1 inhibitor) or eFT-508 (1  $\mu$ M).

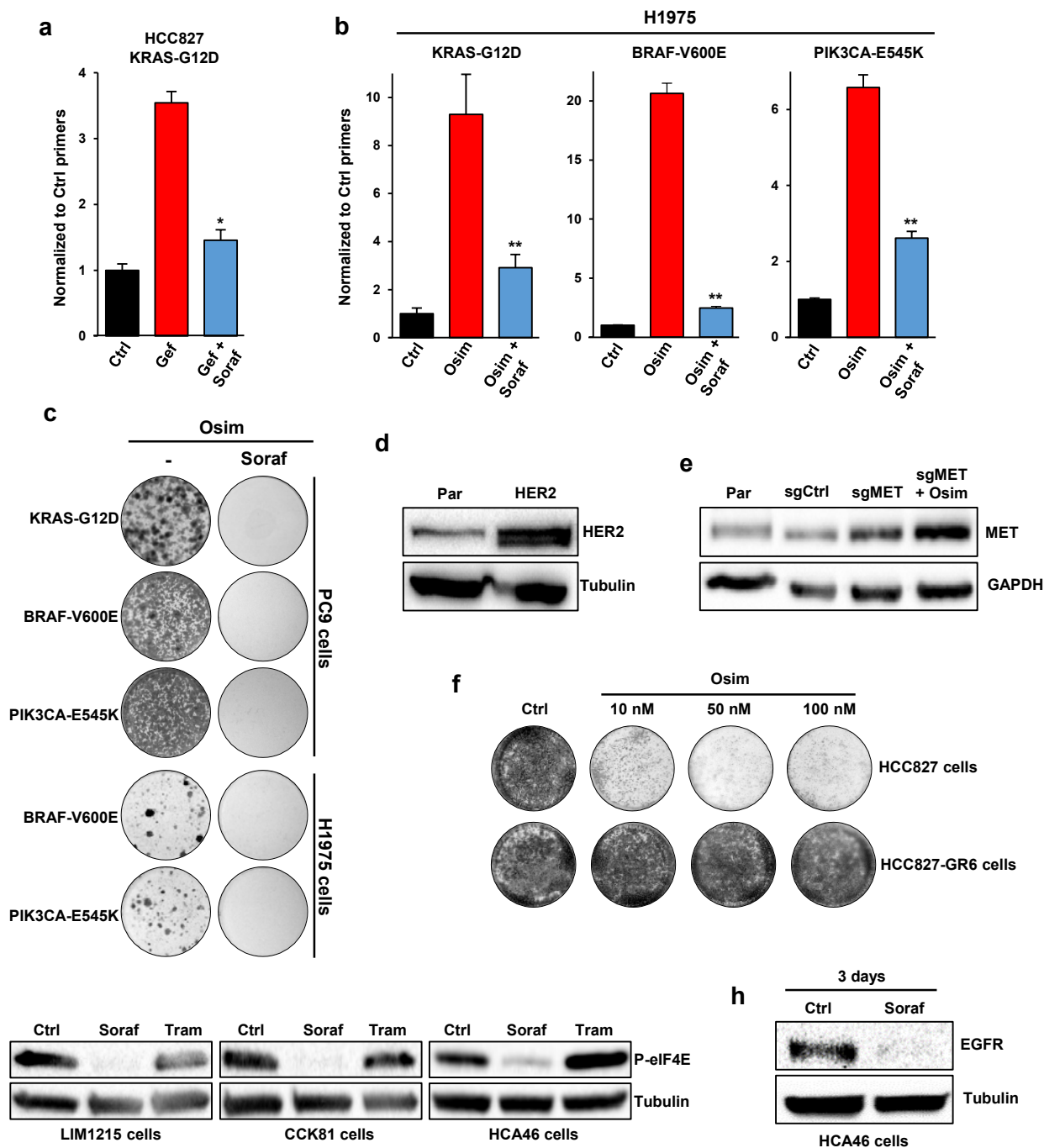




**Supplementary Fig. 5. EGFR down-regulation by Sorafenib in NSCLC cells.** **a**, PC9 cells were treated for the indicated time points with sorafenib (5  $\mu$ M) and immunoblot was performed with anti-EGFR and anti-tubulin antibodies. **b**, HCC827 and HCC4006 cells were treated for 3 or 5 days in the presence or the absence of sorafenib (5  $\mu$ M) or gefitinib (1  $\mu$ M), followed by immunoblot using the indicated antibodies. **c**, H1975 cells were treated for 3 and 5 days with or without sorafenib (5  $\mu$ M), followed by immunoblot using the indicated antibodies. **d**, PC9 cells were treated for 4 days with or without sorafenib (5  $\mu$ M) or regorafenib, followed by immunoblot (lower panel). Colony forming assay of PC9 cells treated with increasing concentrations of regorafenib (upper panel). **e**, PC9 cells were treated for 3 days with sorafenib (5  $\mu$ M) or sunitinib (1  $\mu$ M), followed by immunoblot with anti-EGFR and anti-GAPDH antibodies. **f**, Parental and gefitinib-resistant (EGFR-T790M, GR) PC9 cells were treated for 3 days with sorafenib (5  $\mu$ M) or gefitinib (1  $\mu$ M), alone or in combination, and immunoblot was performed using the indicated antibodies. **g**, PC9 cells were treated for 24 and 72h with sorafenib (5  $\mu$ M) and the levels of EGFR mRNA and protein were assessed by immunoblot (upper panel) or RT-qPCR (lower panel).

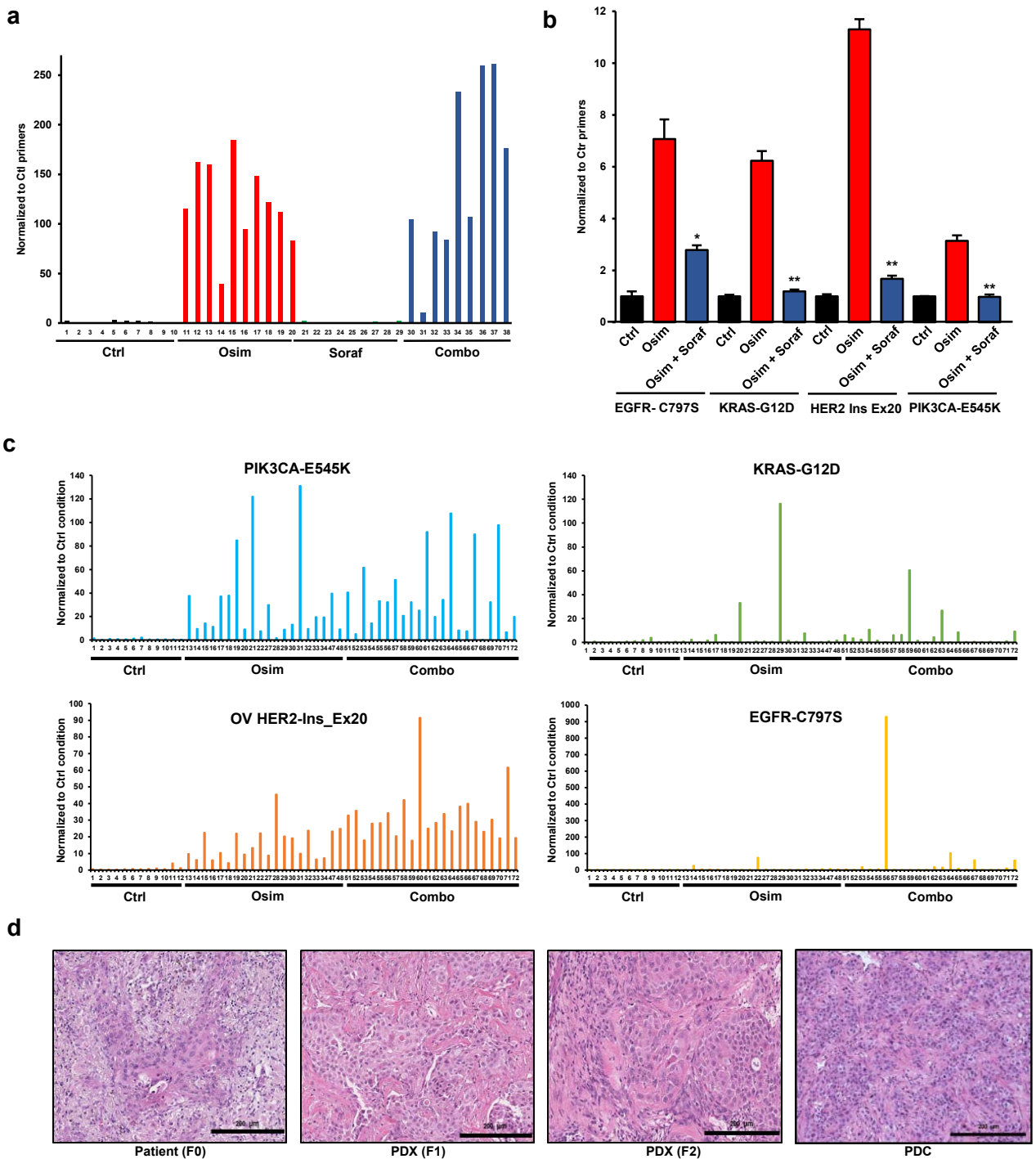






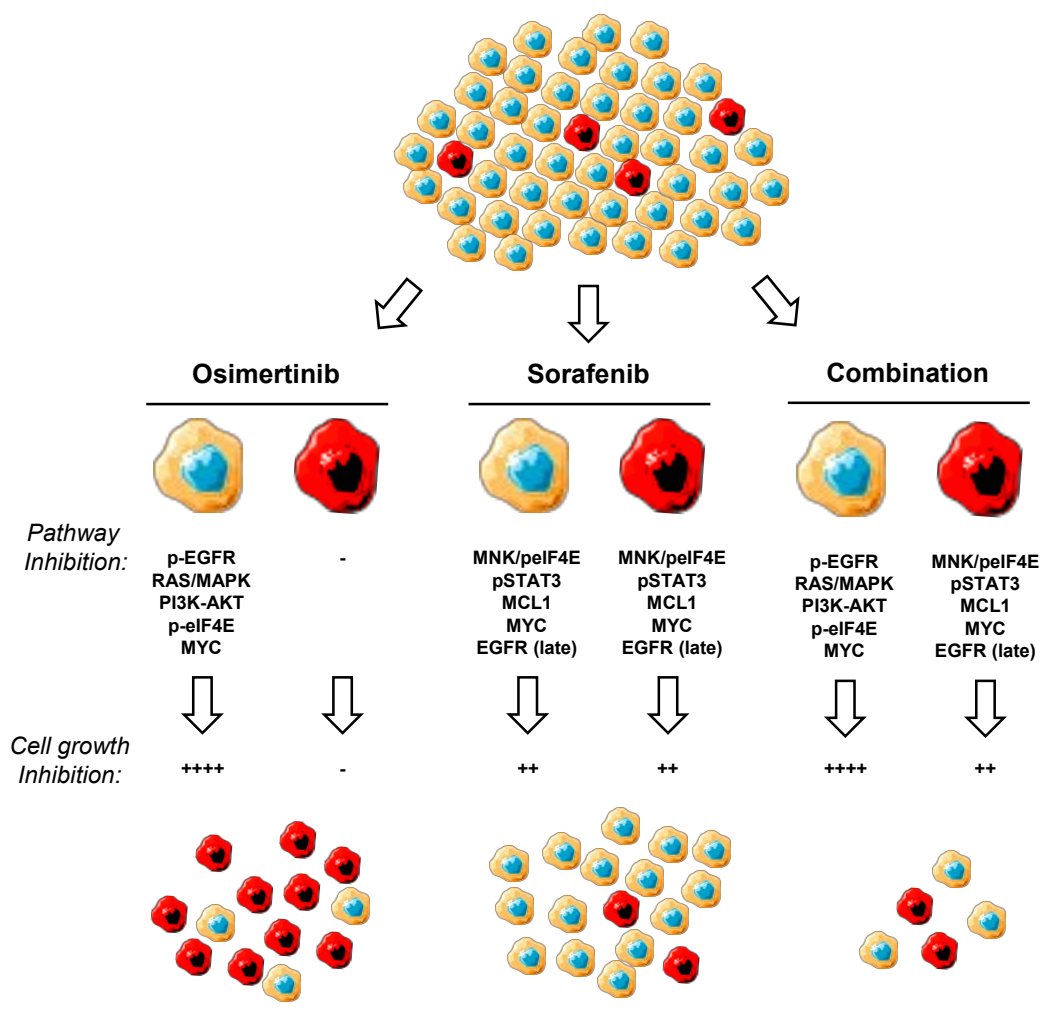
**Supplementary Fig. 6. Effects of Sorafenib on different mechanisms of resistance to EGFR-TKIs.** **a**, Effects of gefitinib (1  $\mu$ M), with or without sorafenib (5  $\mu$ M), on the proportion of HCC827 cells containing the CRISPR-barcode KRAS-G12D after 5 days of treatment. The barcode levels were assessed by qPCR and normalized using EGFR\_Ctrl primers. Mean ( $\pm$ SEM; n=4) of one representative of three experiments. **b**, Effects of osimertinib (0,1  $\mu$ M) with or without sorafenib (5  $\mu$ M) on the proportion of KRAS-G12D (15 days), BRAF-V600E (7 days) or PIK3CA-E545K (15 days) CRISPR-barcodes in H1975 cells. Mean ( $\pm$ SEM; n=4) of individual experiments repeated at least three times. **c**, Representative images of colony forming assays of PC9 and H1975 cells containing the indicated CRISPR-barcodes and treated with osimertinib alone (0,1  $\mu$ M) or in combination with sorafenib (5  $\mu$ M) for one month. **d**, PC9 cells were transduced (HER2) or not (Par) with a HER2 lentivirus and immunoblot was performed using the indicated antibodies. **e**, The levels of MET receptor were assessed by immunoblot in parental (Par) PC9 and in cells containing the dCas9 activator system with a control (sgCtrl) or a MET-specific (sgMET) sgRNA. A population of sgMET cells was selected for two weeks with osimertinib (0,1  $\mu$ M; sgMET+Osim) before the lysis. **f**, HCC827 and HCC827-GR6 cells were treated for 7 or 5 days, respectively, with the indicated concentrations of osimertinib, followed by fixation and Crystal violet staining. **g**, LIM1215, HCA46 and CCK81 CRC cells were treated for 2h in the presence or the absence of sorafenib (3  $\mu$ M) or trametinib (25 nM), followed by immunoblot using anti-phospho-eIF4E or anti-tubulin antibodies. **h**, HCA46 cells were treated with sorafenib (5  $\mu$ M) for 3 days, followed by immunoblot using anti-EGFR and anti-tubulin antibodies.





**Supplementary Fig. 7.** **a**, The levels of the EGFR-C797S CRISPR-barcode were measured by qPCR from genomic DNA derived from the tumors described in Fig. 6b. The values were normalized using control primers (the value of 1 corresponds to the levels measured in the injected cells). **b**, Effects of a 15-day treatment with osimertinib (0,1  $\mu$ M) with or without sorafenib (5  $\mu$ M) on the proportion of the indicated barcodes in the same multiplex PC9 cell model used for the mouse experiment described in Fig. 6c. The mean  $\pm$ SEM (n=5) of one representative of three experiments is represented. **c**, The levels of the indicated barcodes were measured by qPCR from the tumors described in Fig. 6c. **d**, Representative images of hematoxylin-eosin staining of the YHIM-1024 original tumor, the corresponding YHIM-1024 PDXs (F1 inoculated in nude mice, F2 in NOG mice) and tumors obtained in SCID mice from YUX-1024 PDCs. Scale bar, 200  $\mu$ m.





**Supplementary Fig. 8.** Diagram illustrating the effects of osimertinib and sorafenib, alone or in combination, on a mass population of osimertinib-sensitive (yellow) and osimertinib-resistant (red) NSCLC cells.



**Supplementary Table 1 : Small molecule screen in CRISPR-barcoded PC9 cells treated in combination with gefitinib (Gef)**

			EGFR T790M						EML4-ALK						KRAS G12D					
			EXP1			EXP2			EXP1			EXP2			EXP1			EXP2		
			mean	sem		mean	sem		mean	sem		mean	sem		mean	sem		mean	sem	
		Concentrations																		
Ctrl			1	0,15	1	0,25	1,03	0,16	1	0,04	1,03	0,16	1	0,04	1,01	0,12	1	0,05		
Gef		1 uM	4,21	1,33	4,77	0,71	2,71	0,09	4,15	0,17	3,24	0,21	3,42	0,13	3,24	0,21	3,42	0,13		
Gef + TAE684		0,5 uM	4,97	1,01	3,47	1,51	1,13	0,06	1,36	0,06	4,76	0,22	7,99	2,83	4,76	0,22	7,99	2,83		
Gef + WZ42002		0,5 uM	0,7	0,18	0,8	0,06	2,44	0,15	3,12	0,24	3,31	0,24	4,36	1,56	3,31	0,24	4,36	1,56		
Gef + KU55933		5 uM	5,05	0,46	2,56	0,48	3,26	0,23	4,56	0,56	4,07	0,43	8,84	2,39	4,07	0,43	8,84	2,39		
Gef + IMP2		5 uM	3,27	1,05	4,32	1,25	2,82	0,37	3,89	0,27	3,58	0,5	4,73	0,93	3,58	0,5	4,73	0,93		
Gef + AZD5363		1 uM	2,61	0,24	1,68	0,63	2,38	0,12	2,03	0,1	2,73	0,35	2,14	0,11	2,73	0,35	2,14	0,11		
Gef + Sunitinib		1 uM	3,32	0,6	3,98	0,75	1,68	0,27	1,97	0,36	2,99	0,26	4,05	0,74	2,99	0,26	4,05	0,74		
Gef + Sorafenib		1 uM	1,15	0,03	1,15	0,14	1,86	0,11	3,16	0,15	2,21	0,04	1,87	0,19	2,21	0,04	1,87	0,19		
Gef + Compound C		1 uM	2,68	0,58	3,22	0,66	2,62	0,23	4,29	0,22	4,22	0,52	3,58	0,27	4,22	0,52	3,58	0,27		
Gef + U0126		1 uM	3,12	0,51	5	2	3,59	0,17	4,19	0,2	4,1	0,11	6,83	1,02	4,1	0,11	6,83	1,02		
Gef + STO-609		1 uM	4,64	1,06	2,79	0,38	3,04	0,27	4,19	0,11	3,71	0,63	4,71	0,67	3,71	0,63	4,71	0,67		
Gef + PS1145		1 uM	3,53	0,84	2,57	0,75	2,92	0,22	5,23	1,25	3,27	0,18	5,79	2,16	3,27	0,18	5,79	2,16		
Gef + R89		1 uM	2,48	0,15	2,43	0,56	2,05	0,4	3,67	0,1	3,32	0,29	5,04	0,98	3,32	0,29	5,04	0,98		
Gef + Chelerythrin		1 uM	2,34	0,38	1,87	0,09	2,46	0,09	3,85	0,13	3,52	0,15	2,65	0,32	3,52	0,15	2,65	0,32		
Gef + Doxorubicin		50 nM	1,09	0,27	4,52	1,08	1,3	0,07	1,79	0,27	1,76	0,26	2,25	0,44	1,76	0,26	2,25	0,44		
Gef + Verteporfin		2 uM			5,47	1,08			4,06	0,47			5,59	0,85			5,59	0,85		





# Discussion



Dans mes travaux de thèse, nous avons démontré que le sorafenib, un inhibiteur multikinase déjà employé en clinique pour le traitement des cancers du rein, du foie et de la thyroïde, inhibe l'émergence des cellules résistantes aux EGFR-TKIs, tels que la molécule de troisième génération osimertinib. Les effets du sorafenib ne reposent pas sur les MAPKs, mais plutôt sur l'inhibition précoce de l'activité des kinases *MAP kinase sérine/thréonine-protéine kinase 1/2* (MNK1/2) et de la phosphorylation de STAT3, ainsi que, plus tardivement, sur la diminution de l'expression de *myeloid cell leukemia 1 protein* (MCL-1) et d'EGFR. Dans différents modèles CRISPR-barcoding de xénogreffes, et notamment en utilisant une lignée *patient-derived cells* (PDC), la combinaison osimertinib/sorafenib permet de retarder de plusieurs semaines/mois la rechute tumorale. Ainsi, l'ensemble de nos résultats indique que, en inhibant l'évolution clonale induite par le traitement, le sorafenib pourrait prolonger la réponse du CBNPC aux EGFR-TKIs.

### 1. Mécanismes d'action du sorafenib dans les cellules de CBNPC

Nous avons montré que d'autres inhibiteurs multikinases approuvés en cliniques ne sont pas capables de reproduire l'effet du sorafenib sur l'émergence de cellules résistantes aux EGFR-TKIs. Ces composés possèdent des profils pharmacologiques proches avec certaines cibles communes, comme VEGFR ou c-Kit (Tableau 1). Ces observations suggèrent que le sorafenib pourrait agir *via* une cible non partagée par l'ensemble de ces molécules. Comme le montre le tableau 1, seuls le sorafenib et le regorafenib inhibent RAF, une sérine/thréonine kinase cruciale dans la voie de signalisation en aval de l'EGFR. Malgré le rôle crucial de RAF dans l'activation de MEK (Figure 13), nos résultats indiquent que le sorafenib, contrairement au regorafenib, n'affecte pas la voie des MAPKs dans les cellules de CBNPC (Fig Suppl 4b de l'article). Ces résultats sont en accord avec une étude plus ancienne qui avait déjà montré que, contrairement à son action dans des lignées de cancer du sein, du pancréas ou du colon, le sorafenib n'avait pas d'effet sur les MAPKs dans les cellules de CBNPC (Wilhelm et al., 2004). Dans les cellules PC9, une concentration de 10  $\mu\text{M}$  est nécessaire pour inhiber la phosphorylation de ERK, alors que 5  $\mu\text{M}$  de sorafenib suffisent à bloquer complètement l'émergence des cellules résistantes. Cette concentration est pertinente d'un point de vue clinique. En effet, comparé à d'autres composés utilisés chez les patients, le sorafenib a une affinité très élevée pour les protéines du plasma ou du sérum contenu dans le milieu de culture cellulaire, avec un pourcentage de liaison de 99.5% (Hu et al., 2008; Liston and Davis, 2017).

Par conséquent, une concentration plus élevée est nécessaire pour que la fraction non liée puisse interagir avec ses cibles moléculaires. Ainsi, le sorafenib est utilisé chez les patients à une dose de 800 mg/jour, qui est 16 fois supérieure à celle du sunitinib (50 mg/jour), autre inhibiteur multikinase (Liston and Davis, 2017).

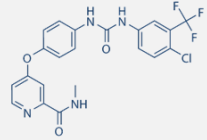
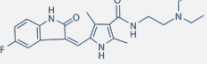
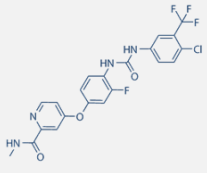
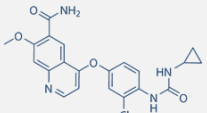
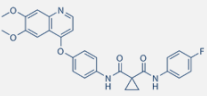
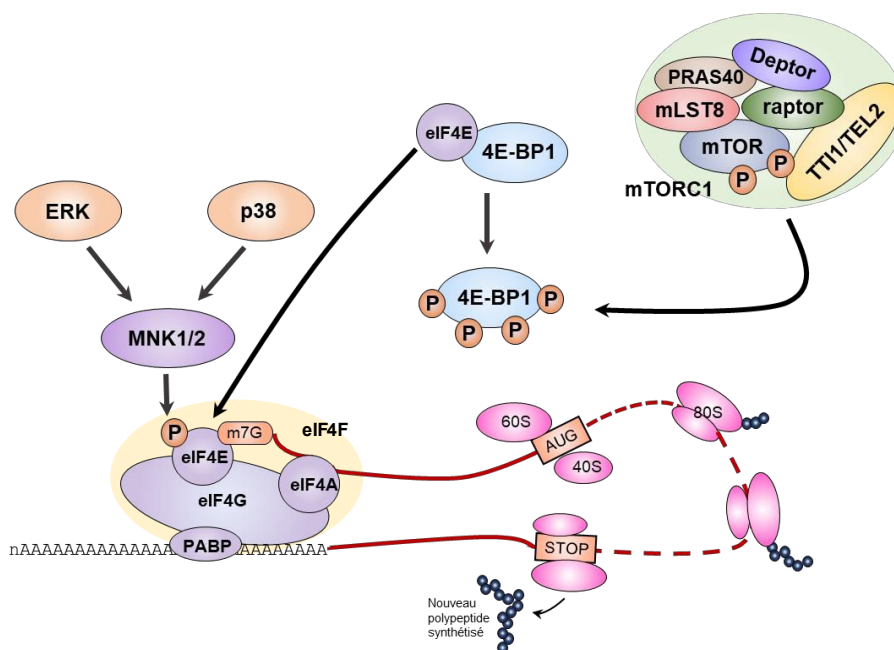
Composé	Structure	Cibles	Utilisation clinique (année d'approbation)
<b>Sorafenib (Nexavar, Bayer)</b>		C-RAF BRAF WT / V600E mutation VEGFR1-3 FGFR1 PDGFR-β Flt-3 p38 c-Kit RET	Cancer de la thyroïde (2013) Cancer du foie (2007) Cancer du rein (2005)
<b>Sunitinib (Sutent, Pfizer)</b>		VEGFR 1-3 PDGFR α/β C-Kit Flt-3 RET AXL	Cancer du rein (2006) Cancer du pancréas (2011) GIST (2006)
<b>Regorafenib (Stivarga, Bayer)</b>		RET VEGFR 1-3 PDGFR α/β C-Kit FGFR 1-2 TIE2 DDR2 TRKA Eph2a C-RAF BRAF WT / V600E mutation SAPK2 RTK5 Abl	Cancer colorectal (2012) GIST (2013) Cancer du foie (2017)
<b>Lenvatinib (Lenvima, Merck)</b>		VEGFR 1-3 PDGFRα FGFR 1-4 RET C-Kit	Cancer de la thyroïde (2015) Cancer du rein (2016) Cancer du foie (2018) Cancer de l'endomètre (2019)
<b>Cabozantinib (Cabometyx, IPSEN PHARMA)</b>		MET VEGFR2 Flt-3 C-Kit RET AXL TIE-2	Cancer du rein (2016) Cancer du foie (2019)

Tableau 1 : Tableau comparatif des inhibiteurs multikinases.

Bien que principalement associées aux MAPKs, les protéines RAF prennent également part à d'autres voies de transduction. En particulier, C-RAF, l'isoforme pour laquelle le sorafenib possède l'affinité la plus importante, participe à la formation de tumeurs de la peau et du poumon par un mécanisme indépendant des MAPKs, qui implique *Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase* (Rock)-Cofilin (Ehrenreiter et al., 2009; Sanclemente et al., 2018). En utilisant des shRNA inductibles, nous avons observé que l'inhibition de C-RAF dans les cellules PC9 n'affecte pas leur croissance (données non illustrées). L'ensemble de ces

observations suggère que les protéines RAF ne participent pas au mécanisme d'action du sorafenib dans les cellules de CBNPC.

Dans une étude de 2005 dans des cellules de lymphome, il avait été montré que le sorafenib pouvait inhiber la phosphorylation de *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E), un facteur d'initiation de la traduction, par un mécanisme non élucidé (Rahmani et al., 2005). Ce facteur, qui fait partie du complexe eIF4F, avec la protéine d'échafaudage eIF4G et l'ARN hélicase eIF4A (Figure 21) (Bhat et al., 2015; D'Abronzio and Ghosh, 2018), peut être phosphorylé au niveau de la sérine 209 par les kinases MNK1/2, qui sont régulées principalement par ERK (Ueda et al., 2004; Waskiewicz et al., 1997). Dans les cellules de CBNPC, le sorafenib entraîne une diminution très rapide de la phosphorylation d'eIF4E sans affecter les MAPKs. Alors qu'une étude de compétition *in vitro* à partir d'une large série de molécules avait suggéré une certaine affinité de ce composé pour MNK1/2 (Davis et al., 2011), nous avons démontré pour la première fois dans un modèle biologique que le sorafenib inhibe directement l'activité catalytique de ces kinases.



**Figure 21 : Rôle d'eIF4E dans la machinerie traductionnelle.** L'initiation de la traduction est régulée par le facteur 4EBP1, qui séquestre eIF4E. Lorsqu'il est phosphorylé par le complexe mTORC1, 4EBP1 libère eIF4E, qui peut alors se lier à la coiffe (5'-cap) de l'ARNm et former le complexe eIF4F avec les autres facteurs eIF4G et eIF4A. eIF4E peut être phosphorylé par les kinases MNK1/2, qui sont elles-mêmes régulées par ERK et/ou p38. Cette phosphorylation a été associée à la traduction de certains oncogènes. Une fois formé, le complexe eIF4F permet alors de recruter les ribosomes vers l'ARNm par le biais des interactions de eIF4E avec la coiffe. eIF4G interagit également avec la protéine de liaison PABP qui s'associe à la queue poly A de l'ARNm. La fin de l'initiation de la traduction est marquée par la formation d'un ribosome 80S compétent, aboutissant à la formation d'un nouveau polypeptide. 4E-BP, *4E-binding protein* ; m7G, *7-methylguanosine 5'-cap* ; mTORC1, *mTOR complex 1* ; PABP, *Poly(A)-binding protein*. D'après Bhat et al., 2015 et D'Abronzio and Ghosh, 2018.

Une des premières démonstrations du rôle d'eIF4E dans le cancer vient du laboratoire de P.P. Pandolfi, qui a révélé que la surexpression de ce facteur chez la souris sous le contrôle d'un promoteur  $\beta$ -actin ubiquitaire promeut le développement de différents types de tumeurs, tels que les lymphomes, angiosarcomes et adénocarcinomes pulmonaires (Ruggero et al., 2004). Les propriétés oncogéniques de cette protéine ont été confirmées par l'équipe de S. Lowe, qui a montré que la reconstitution du système hématopoïétique de souris irradiées avec des cellules souches surexprimant eIF4E peut induire une lymphomagenèse. Ce type d'effet n'a pas pu être observé en utilisant le mutant eIF4E-S209A, alors que le processus de tumorigenèse dans ce modèle peut être accéléré par l'activation constitutive de MNK1, mais pas par l'expression d'un dominant négatif de cette kinase (Wendel et al., 2007). En accord avec une implication de la phosphorylation de ce facteur d'initiation de la traduction par MNK dans le cancer, le *knock-in* d'eIF4E-S209A permet de retarder le développement de tumeurs de la prostate induit par la délétion de *PTEN* (Furic et al., 2010). Cette phosphorylation pourrait également contribuer au rôle du microenvironnement dans la progression du cancer mammaire, où il a été montré que l'expression d'eIF4E-S209A dans les cellules normales n'a pas d'effet sur la tumeur primaire, mais bloque le développement de métastases au niveau du poumon (Robichaud et al., 2018). D'un point de vue mécanistique, la phosphorylation d'eIF4E ne semble pas avoir un effet global sur la traduction, mais elle a été associée à la traduction de certains oncogènes. En particulier, des études réalisées dans des cellules de mélanome et de leucémie ont montré que l'inhibition de MNK1/2 entraîne une sous-expression des gènes dont l'ARNm possède de longues séquences 5'-UTR riches en G+C, tels que MCL-1, c-MYC et les cyclines A2/B (Kosciuczuk et al., 2016; Zhan et al., 2017). MNK1/2 pourraient également participer à la progression tumorale, indépendamment d'eIF4E. En effet, dans différentes lignées de sarcome, les effets antiprolifératifs de l'inhibition de ces kinases ne sont pas corrélés à la phosphorylation d'eIF4E (Ke et al., 2021), et il a été suggéré que MNK1/2 pourraient intervenir directement dans la régulation de l'activité de mTORC1, en augmentant son association avec ses substrats (Brown and Gromeier, 2017).

L'implication de MNK dans différents types de tumeurs a incité au développement d'inhibiteurs spécifiques. De plus, le double KO de MNK1/2 chez la souris n'entrave pas la viabilité des embryons et n'affecte pas la traduction globale des protéines (Ueda et al., 2004), suggérant que l'inhibition systémique de ces kinases ne devrait pas présenter un taux élevé de toxicité. Dans une étude récente, l'une de ces molécules, l'eFT-508 (Tomivosertib, eFFECTOR Therapeutics), sensibilise le cancer colorectal à l'inhibition de mTOR. En particulier, les

auteurs ont montré que la double inhibition de MNK et de mTOR est nécessaire pour réduire l'expression de c-MYC et la prolifération des cellules tumorales (Knight et al., 2021). L'efficacité de l'eFT-508, en combinaison avec une immunothérapie, pour le traitement des tumeurs solides, est en cours d'évaluation clinique dans un essai de phase II (NCT03616834). Dans les cellules PC9, ce composé s'est révélé incapable de mimer seul les effets du sorafenib sur l'expression de c-MYC et MCL-1 ou sur l'enrichissement de sous-populations résistantes (données non illustrées). En revanche, nous avons montré que l'émergence de ces cellules peut être contrecarrée par une combinaison de petites molécules ciblant MNK1/2, MCL-1 et STAT3. Ces résultats indiquent que l'inhibition de ces trois facteurs par le sorafenib participe, au moins en partie, à son mécanisme d'action dans les cellules de CBNPC.

Plusieurs groupes ont décrit un effet inhibiteur du sorafenib sur MCL-1 et STAT3 et différents mécanismes ont été proposés (Rahmani et al., 2005; Plastaras et al., 2007; Chen et al., 2010; Tai et al., 2013). En particulier, il a été suggéré que l'action anti-tumorale de ce composé dans les cellules d'hépatocarcinome pourraient être médiée par une réduction de phospho-STAT3 (Chen et al., 2010; Gu et al., 2011) *via* l'augmentation de l'activité de la tyrosine phosphatase *src homology region 2 domain-containing phosphatase-1* (SHP-1) (Tai et al., 2011, 2014). En utilisant des shRNA inductibles et un dominant-négatif, nous avons montré que l'inhibition de SHP-1 n'antagonise pas les effets du sorafenib sur la phosphorylation de ce facteur de transcription dans les cellules PC9 (données non illustrées). D'autres travaux seront nécessaires pour élucider le mécanisme d'action de ce composé sur STAT3 et MCL-1 dans les cellules de CBNPC.

A partir de 2-3 jours de traitement, le sorafenib provoque une forte réduction du taux d'EGFR dans les cellules de CBNPC, ainsi qu'une inhibition des voies de transduction en aval de ce récepteur. Nos expériences de PCR quantitative ont révélé que ce composé n'a pas d'effet sur la transcription de ce gène. En utilisant un vecteur lentiviral contenant, sous le contrôle d'un même promoteur, les séquences codant l'EGFR et la GFP, séparées par le peptide T2A, nous avons démontré que le sorafenib inhibe la stabilité du récepteur, en promouvant sa dégradation par les lysosomes. Des études précédentes ont révélé que l'EGFR peut être internalisé par une voie d'endocytose médiée par les clathrines (Huang et al., 2004; Vieira et al., 1996). Ce processus est particulièrement important pour les formes mutées du récepteur, car il permet de prévenir leur dégradation, tout en maintenant leur activation constitutive (Chung et al., 2009; Shtiegman et al., 2007). Il a également été montré qu'une inhibition des clathrines dans les cellules de CBNPC entraîne une dégradation d'EGFR muté par macropinocytose, une voie

lysosomale indépendante de la clathrine et de la dynamine (Ménard et al., 2018). L'inhibition plus importante de l'EGFR muté que nous avons observée en présence du sorafenib suggère que ce composé pourrait affecter le trafic intracellulaire et les mécanismes d'internalisation des protéines membranaires. Il est également possible que les protéines MNK1/2, STAT3 et MCL-1 participent à ces effets. Nos expériences préliminaires suggèrent que la combinaison des trois inhibiteurs de ces facteurs induit une diminution partielle de l'EGFR muté (données non illustrées), mais d'autres travaux seront nécessaires pour tester cette hypothèse.

Nous avons démontré que le sorafenib peut prévenir l'émergence de cellules résistantes aux inhibiteurs d'EGFR, non seulement dans les cellules de CBNPC, mais aussi dans celles de cancer colorectal. En accord avec ces résultats, une étude récente montre qu'une signature transcriptionnelle permettant de détecter l'activation d'EGFR peut être utilisée comme facteur prédictif de la réponse au sorafenib (Cheng et al., 2020). De plus, lors de l'essai clinique de phase III MISSION, réalisé chez des patients atteints de CBNPC, le sorafenib en monothérapie prolonge de façon significative la survie sans progression et la survie globale des patients présentant un EGFR muté, mais pas sauvage (Paz-Ares et al., 2015). Ces observations suggèrent que l'addiction oncogénique à ce récepteur pourrait rendre les cellules tumorales particulièrement vulnérables aux effets de cet inhibiteur.

La sous-expression d'EGFR induite par le sorafenib peut sans doute expliquer les effets de ce composé sur l'émergence de cellules présentant des mutations secondaires d'EGFR. En revanche, l'impact sur d'autres mécanismes de résistance semble moins évident. Dans le cancer du pancréas, qui, presque invariablement, présente une mutation de KRAS (Buscail et al., 2020), il a été montré que l'inhibition de l'EGFR ralentit fortement la croissance tumorale dans des modèles transgéniques (Blasco et al., 2019; Navas et al., 2012), et les patients qui ne peuvent pas être opérés sont traités par une combinaison d'erlotinib et chimiothérapie. Dans le CBNPC avec mutation d'EGFR, une étude récente a révélé que, malgré l'inhibition de son activité catalytique, le récepteur peut promouvoir la résistance aux EGFR-TKIs en stimulant les voies de survie NF- $\kappa$ B et PI3K via l'activation de *protein kinase C- $\delta$*  (Lee et al., 2018). Ces observations suggèrent que la dégradation d'EGFR induite par le sorafenib pourrait contribuer, au moins en partie, à l'inhibition de sous-populations présentant des mutations oncogéniques en aval du récepteur.

Des études ont montré que le sorafenib pourrait agir sur des processus cellulaires impliqués dans la résistance/tolérance au traitement, tels que l'autophagie et la ferroptose (Park



et al., 2010; Dixon et al., 2014). De plus, la chloroquine, un inhibiteur lysosomal et d'autophagie, restaure l'émergence des cellules résistantes aux EGFR-TKIs en présence de sorafenib. En utilisant d'autres approches pharmacologiques et génétiques pour cibler l'autophagie, nous n'avons pas pu reproduire ces effets (données non illustrées), indiquant que l'action de la chloroquine dépend plutôt de son inhibition de l'activité des lysosomes. De même, différents agonistes et inhibiteurs de la ferroptose, tels que l'érastine, la ferrostatin-1 et la déféroxamine, se sont révélés incapables de reproduire ou de bloquer les effets du sorafenib dans les cellules de CBNPC (données non illustrées). Ces résultats indiquent que l'autophagie et la ferroptose ne sont pas impliquées dans l'inhibition par ce composé de l'émergence de sous-populations cellulaires résistantes aux EGFR-TKIs.

## **2. Implications cliniques**

Dans ma thèse, nous proposons une nouvelle stratégie thérapeutique pour prolonger la réponse du CBNPC aux EGFR-TKIs qui repose sur l'inhibition par le sorafenib de l'avantage sélectif des cellules résistantes à l'osimertinib. Différents types de combinaisons ont été développées pour augmenter le bénéfice clinique des thérapies anticancéreuses. Certaines de ces approches visent à potentialiser les effets des thérapies ciblées. Par exemple, le trastuzumab est utilisé avec des agents chimiothérapeutiques, tels que la cisplatine, pour améliorer la réponse des patientes atteintes de cancer du sein métastatique avec amplification de *ERBB2* (Stemmler et al., 2005). Toujours dans le but de renforcer les effets du traitement, une autre stratégie a été d'essayer d'inhiber plus fortement un signal oncogénique dont la tumeur dépend, en ciblant différents acteurs d'une même voie. Ceci est notamment le cas des mélanomes avec mutation activatrice de BRAF, qui sont traités avec une combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK afin de bloquer de façon plus robuste et prolongée les MAPKs (Solit et al., 2006; Long et al., 2014). Bien que potentiellement plus puissantes que des stratégies conventionnelles avec un seul agent thérapeutique, ces approches peuvent présenter des effets toxiques plus importants chez les patients, causés par l'inhibition des MAPKs dans les tissus sains. Pour limiter ce problème, le laboratoire de R. Bernards a récemment proposé une variante de cette approche, avec la combinaison de faibles doses d'inhibiteurs d'EGFR, RAF, MEK et ERK, qui, seuls, sont incapables d'arrêter complètement l'activité de leurs cibles, mais qui, ensemble, peuvent bloquer efficacement la voie d'EGFR muté dans les cellules de CBNPC (Fernandes Neto et al., 2020).

Un autre type de combinaison pour augmenter l'efficacité du traitement vise à exacerber les conséquences d'une létalité synthétique. En effet, dans certains cas, les altérations impliquées dans le processus de tumorigenèse rendent les cellules cancéreuses plus vulnérables vis-à-vis d'une classe particulière de molécules. L'exemple classique est celui des cancers des ovaires et du sein présentant une mutation de *BRC1/2*, qui entraîne un défaut de réparation de l'ADN pouvant être exploité en utilisant des inhibiteurs de PARP, tels que l'olaparib (Figure 7) (Kim et al., 2015; Robson et al., 2017). Ainsi, la combinaison de ce type de composés avec un agent chimiothérapeutique, pouvant induire des dommages de l'ADN, permet d'obtenir une réponse plus importante chez les patients (Rugo et al., 2016).

Le microenvironnement joue un rôle majeur dans la progression tumorale et la réponse au traitement, et il représente donc une cible potentielle importante pour la thérapie. Par exemple, dans le CBNPC, une mutation d'EGFR peut entraîner une production élevée de VEGF et d'autres facteurs pouvant agir sur le tissu endothélial pour promouvoir l'angiogenèse (Nilsson et al., 2021). Dans ce cas, l'association d'inhibiteurs d'EGFR et de VEGFR permet de cibler à la fois les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement. Ce type de combinaison a fait l'objet de l'étude clinique ARTEMIS, qui a montré qu'un traitement par erlotinib et bevacizumab augmente la survie sans progression de 6,7 mois par rapport à l'erlotinib seul chez les patients de CBNPC avec mutation d'EGFR (Zhou et al., 2021). Un autre élément essentiel des interactions entre cancer et tissus sains est représenté par le système immunitaire, dont l'activité peut être stimulée dans le cadre de certaines associations de médicaments. Par exemple, l'utilisation de pembrolizumab, anticorps monoclonal dirigé contre PD-1, avec les inhibiteurs de BRAF et MEK, dabrafenib et trametinib, permet de favoriser l'infiltration des cellules T CD8+ au sein de la tumeur et d'obtenir une réponse plus durable chez les patients atteints de mélanome (Ribas et al., 2019; Ferrucci et al., 2020). Par ailleurs, la combinaison avec une chimiothérapie peut potentialiser les effets de l'immunothérapie, en promouvant la présentation d'antigènes ou la libération de signaux régulant la phagocytose par les cellules cancéreuses en apoptose. Ceci a notamment été démontré pour la gemcitabine, un agent chimiothérapeutique qui a des effets immunostimulants, et qui est utilisée en combinaison avec l'ipilimumab (Yervoy, Bristol Myers Squibb), anticorps monoclonal dirigé contre CTLA-4 (Galluzzi et al., 2015).

Presque invariablement, les thérapies ciblées ne sont pas curatives et sont destinées à l'échec à long terme, à cause de la capacité des tumeurs à s'adapter et devenir insensibles au traitement. Ainsi, certains types de combinaisons ont spécifiquement été conçus de façon à

contrecarrer l'émergence d'une résistance. Dans certains cas, les cellules tumorales peuvent s'adapter rapidement à un inhibiteur, grâce à une réactivation de la signalisation ou par l'engagement de voies parallèles. Il est alors possible de cibler ces mécanismes, tout en maintenant l'inhibition initiale. Par exemple, contrairement au mélanome, le cancer colorectal avec mutation de BRAF présente une faible réponse aux inhibiteurs de cet oncogène, à cause d'une réactivation des MAPKs médiée par l'EGFR. Une combinaison d'inhibiteurs d'EGFR et de BRAF a alors été proposée afin de prévenir cette adaptation des cellules tumorales (Prahallad et al., 2012; Kopetz et al., 2015). Après avoir montré une efficacité clinique dans l'essai BEACON (Kopetz et al., 2019), la combinaison d'encorafenib (Braftovi, Array BioPharma) et cetuximab a été approuvée en avril 2020 pour le traitement des cancers colorectaux avec une mutation de BRAF. Dans d'autres cas, la mise en place de nouveaux circuits peut engendrer un changement phénotypique qui rend les cellules vulnérables à une nouvelle thérapie. Un exemple extrême de ce phénomène est représenté par l'addiction au traitement. Ceci a été démontré dans le mélanome, qui peut développer une résistance aux inhibiteurs de BRAF et MEK par un changement phénotypique médié par ERK2, et dont la suractivation devient toxique une fois que le traitement s'arrête (Moriceau et al., 2015; Kong et al., 2017). Cette vulnérabilité peut être exploitée en alternant les inhibiteurs de BRAF et MEK avec une période d'arrêt de ces médicaments, ce qui a été défini en tant que « drug holiday », pouvant être accompagnée par des cycles d'agents chimiothérapeutiques, tels que la dacarbazine (Kong et al., 2017). Parfois, le traitement avec un premier composé peut servir à diriger délibérément la réponse tumorale afin de rendre les cellules sensibles à une deuxième molécule. Ce type de combinaison séquentielle a été proposée dans le cancer du foie, où le premier composé, un inhibiteur de *cell division cycle 7-related protein kinase*, induit la sénescence des cellules tumorales qui peuvent être ensuite traitées avec un agent sénolytique (Wang et al., 2019), et dans le mélanome, où l'arrêt de la voie des MAPKs entraîne une sensibilité aux inhibiteurs d'histones désacétylases (Wang et al., 2018).

Pour traiter les patients atteints de CBNPC avec mutations activatrices d'EGFR, la recommandation actuelle prévoit l'utilisation d'osimertinib en première ligne. Cependant, malgré des taux de réponse initiale très élevés, après en moyenne 18 mois les patients rechutent, suite à l'émergence de cellules insensibles au traitement. Si le mécanisme de résistance est identifié et peut être ciblé par des composés qui peuvent être utilisés en clinique, les tumeurs sont traitées avec une combinaison de ces agents avec un EGFR-TKI. C'est notamment le cas de MET (Sequist et al., 2020) et un essai clinique de phase II est en cours afin d'évaluer

l'efficacité de la combinaison osimertinib-savolitinib chez des patients ayant progressé sous osimertinib et présentant une surexpression/amplification de ce RTK (NCT03778229). Comme alternative à ce type d'approche séquentiel, d'autres stratégies combinatoires ont été proposées pour prévenir l'émergence de cellules résistantes avant qu'un mécanisme particulier ne soit identifié. Par exemple, le laboratoire de P. Jänne a montré qu'une association d'osimertinib avec un inhibiteur de MEK, qui cible en aval la voie d'EGFR, peut ralentir l'acquisition d'une résistance (Tricker et al., 2015). Un essai clinique est en cours afin de tester ce type de traitement chez des patients n'ayant reçu aucune thérapie au préalable (NCT03392246). L'approche que nous proposons consiste à inhiber, avec le sorafenib, l'avantage sélectif des cellules résistantes en présence d'osimertinib, réprimant ainsi l'évolution clonale au sein de la population de cellules cancéreuses, et donc l'adaptation de la tumeur au traitement. Bien que plus spécifique, ce type de stratégie pourrait présenter des analogies avec les effets d'une chimiothérapie cytotoxique en association avec un EGFR-TKI, qui a montré des bénéfices cliniques dans des essais récents (Hosomi et al., 2020; Noronha et al., 2020). Il est en effet concevable que l'agent chimiothérapeutique agisse préférentiellement sur les cellules tumorales qui sont toujours capables de proliférer, en vertu de leur résistance à la thérapie ciblée. De façon similaire, nos travaux montrent que le sorafenib cible spécifiquement les cellules qui, par des mécanismes différents, ne répondent plus (ou moins) aux EGFR-TKIs. Ce type d'effets, mis en évidence grâce à notre stratégie CRISPR-barcoding, n'aurait pas pu être identifié par des approches plus classiques, basées sur la recherche de synergie, entre deux composés dans une population cellulaire homogène.

Le sorafenib est utilisé en clinique pour le traitement du cancer du foie, de la thyroïde et du rein. Les principaux effets secondaires retrouvés chez les patients sont une fatigue, une perte de cheveux, des réactions allergiques, une leucopénie et des troubles cutanés, dont le syndrome main-pied, qui entraîne des gonflements et des rougeurs de la paume des mains et de la plante des pieds (source INCa). Des essais cliniques de phase II ont montré que, en plus d'être assez bien toléré, le sorafenib pouvait avoir un bénéfice, en monothérapie en 2 ou 3<sup>ème</sup> ligne de traitement, chez des patients atteints de CBNPC à des stades avancés (Blumenschein et al., 2009; Wakelee et al., 2012). Dans l'essai MISSION de phase III, cité précédemment, regroupant 703 patients atteints de CBNPC à des stades avancés, le sorafenib utilisé en monothérapie eut peu d'effets secondaires de haut grade, avec seulement 8 cas avec des effets de grade 4, comprenant la fatigue, des dyspnées et l'hypertension (Paz-Ares et al., 2015). Des études ont cherché à évaluer la tolérance d'une combinaison du sorafenib avec les EGFR-TKIs

de 1<sup>ère</sup> génération, gefitinib et erlotinib, chez des patients atteints de CBNPC (Adjei et al., 2007; Duran et al., 2007; Lim et al., 2016). Globalement, cette association fut bien tolérée, avec une majorité d'effets secondaires de grade 1/2 comprenant des diarrhées, des éruptions cutanées ou encore de la fatigue. Dans l'essai de 2016, chez 8% des patients, il a été relevé des effets secondaires de grade 3/4, notamment une élévation du rapport entre les concentrations des enzymes aspartate transaminase et alanine transaminase, classiquement utilisé pour identifier des problèmes hépatiques, par rapport à celui observé en monothérapie (Lim et al., 2016). Ces essais suggèrent également que cette combinaison aurait une efficacité antitumorale dans le CBNPC. Cependant, ils ont été réalisés chez peu de patients (moins de 50 patients par essai) et aucune comparaison n'a été faite avec un inhibiteur d'EGFR seul. De plus, dans l'étude de Lim *et al.* seulement 49% des tumeurs présentaient une mutation de l'EGFR alors que d'autres avaient une altération de KRAS (36%). Dans nos modèles précliniques de xénogreffes de cellules dérivées de patients, nous avons montré que la combinaison osimertinib-sorafenib permettait de retarder de plusieurs mois la rechute tumorale par rapport à l'osimertinib seul, démontrant également que cette combinaison est plutôt bien tolérée au cours du temps. Au vu de la plus faible toxicité observée chez les patients traités avec l'osimertinib comparé aux EGFR-TKIs de première et deuxième génération (Soria et al., 2017), on peut estimer que les effets secondaires d'une combinaison avec le sorafenib devraient être acceptables pour les patients. Toutefois, pour limiter le taux de toxicité, il serait également envisageable d'adapter le protocole d'administration thérapeutique en proposant, par exemple, un traitement séquentiel qui débiterait avec la combinaison, puis en alternance avec l'osimertinib seul.



# Conclusion et perspectives





Avec les travaux présentés dans ce manuscrit, nous proposons une nouvelle stratégie thérapeutique afin de prolonger la réponse du CBNPC aux EGFR-TKIs. Cette approche est basée sur l'utilisation du sorafenib, qui agit spécifiquement sur les sous-populations de cellules résistantes ou tolérantes à l'osimertinib, provoquant une répression globale de l'évolution clonale. A l'aide de différents modèles *in vivo*, nous avons montré qu'une combinaison osimertinib-sorafenib est efficace pour ralentir la progression tumorale. Ces résultats devraient permettre de justifier la mise en place d'un essai clinique, afin de tester cette combinaison en première ligne de traitement chez des patients atteints de CBNPC avec mutations d'EGFR. Cette démarche devrait être facilitée par le fait que le sorafenib est déjà approuvé en clinique pour le traitement d'autres types de cancers. De plus, d'autres stratégies combinatoires font actuellement l'objet d'essais cliniques chez des patients n'ayant reçu aucune thérapie au préalable, soutenant la faisabilité de ce type d'approche.

Eu égard de son mécanisme d'action, nos données indiquent que le sorafenib serait particulièrement efficace dans les cancers dépendants de l'EGFR. Grâce à notre approche, nous avons révélé la capacité de ce composé, en combinaison avec le cetuximab, à inhiber l'émergence de cellules résistantes dans des lignées cellulaires de cancer du côlon. Pour ouvrir le champ d'application de cette nouvelle stratégie thérapeutique, il serait nécessaire de compléter ces résultats avec des expériences dans d'autres lignées cellulaires et dans des modèles *in vivo*. En particulier, nos collaborateurs S. Arena et A. Bardelli ont développé une large collection de *patient-derived xenografts* et PDCs de cancer colorectal (Lazzari et al., 2019), qui nous permettra de tester ce type de combinaison dans des modèles plus proches des patients.

Le sorafenib pourrait être efficace dans d'autres contextes d'addiction oncogénique. Grâce à l'approche CRISPR-barcoding, nous pouvons développer des modèles de résistance dans des cancers présentant d'autres dépendances pouvant être ciblées par des agents thérapeutiques, telles que la mutation KRAS-G12C dans le CBNPC ou BRAF-V600E dans le mélanome. Ainsi, nous avons entrepris de nouvelles expériences dans les cellules H358 de CBNPC avec KRAS-G12C, en générant par CRISPR-barcoding une sous-population de cellules contenant la mutation KRAS-G12D, conférant une résistance au sotorasib. Les résultats de ces études nous permettront de déterminer si le sorafenib a un effet comparable à celui que nous avons montré dans les cellules dépendantes d'EGFR. Si ce n'est pas le cas, nous pourrions effectuer un nouveau criblage de petites molécules capables d'inhiber l'émergence de cellules résistantes au sotorasib.

Bien que nous ayons mis en évidence un certain nombre de cibles du sorafenib dans les cellules de CBNPC, pouvant expliquer, au moins en partie, son effet sur l'émergence de clones résistants, des expériences supplémentaires pourront être réalisées, notamment pour identifier le mécanisme impliqué dans l'inhibition de la phosphorylation de STAT3 et pour mieux comprendre comment ce composé provoque la dégradation de l'EGFR. Dans la continuité de ces études, nous pourrions également sélectionner et caractériser des cellules de CBNPC résistantes à la combinaison osimertinib-sorafenib, afin d'explorer les mécanismes potentiellement capables de promouvoir l'échappement tumoral en présence de ce type de traitement.

# Références bibliographiques



- Adjei, A.A., Molina, J.R., Mandrekar, S.J., Marks, R., Reid, J.R., Croghan, G., Hanson, L.J., Jett, J.R., Xia, C., Lathia, C., et al. (2007). Phase I trial of sorafenib in combination with gefitinib in patients with refractory or recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13, 2684–2691.
- Ahn, M.-J., Han, J.-Y., Lee, K.H., Kim, S.-W., Kim, D.-W., Lee, Y.-G., Cho, E.K., Kim, J.-H., Lee, G.-W., Lee, J.-S., et al. (2019). Lazertinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: results from the dose escalation and dose expansion parts of a first-in-human, open-label, multicentre, phase 1-2 study. *Lancet Oncol* 20, 1681–1690.
- Alexandrov, L.B., Ju, Y.S., Haase, K., Loo, P.V., Martincorena, I., Nik-Zainal, S., Totoki, Y., Fujimoto, A., Nakagawa, H., Shibata, T., et al. (2016). Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* 354, 618–622.
- Anderson, D.R., Grillo-López, A., Varns, C., Chambers, K.S., and Hanna, N. (1997). Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans* 25, 705–708.
- Arbour, K.C., and Riely, G.J. (2019). Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA* 322, 764–774.
- Arcila, M.E., Chaft, J.E., Nafa, K., Roy-Chowdhuri, S., Lau, C., Zaidinski, M., Paik, P.K., Zakowski, M.F., Kris, M.G., and Ladanyi, M. (2012). Prevalence, Clinicopathologic Associations, and Molecular Spectrum of ERBB2 (HER2) Tyrosine Kinase Mutations in Lung Adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 18, 4910–4918.
- Bargmann, C.I., Hung, M.C., and Weinberg, R.A. (1986a). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319, 226–230.
- Bargmann, C.I., Hung, M.C., and Weinberg, R.A. (1986b). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* 45, 649–657.
- Barker, H.E., Paget, J.T.E., Khan, A.A., and Harrington, K.J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat. Rev. Cancer* 15, 409–425.
- Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J.-P., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., et al. (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* 387, 1415–1426.
- Bartram, C.R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M.A., Davies, T., and Stone, M. (1983). Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306, 277–280.

- Baselga, J., Rischin, D., Ranson, M., Calvert, H., Raymond, E., Kieback, D. g., Kaye, S. b., Gianni, L., Harris, A., Bjork, T., et al. (2002). Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Trial of ZD1839, a Selective Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Five Selected Solid Tumor Types. *JCO* 20, 4292–4302.
- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., Rugo, H.S., Sahmoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., et al. (2012). Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *NEJM* 366, 520–529.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 10, 868–880.
- Bersanelli, M., Minari, R., Bordi, P., Gnetti, L., Bozzetti, C., Squadrilli, A., Lagrasta, C.A.M., Bottarelli, L., Osipova, G., Capelletto, E., et al. (2016). L718Q Mutation as New Mechanism of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR-Mutated NSCLC. *JTO* 11, e121-123.
- Bhang, H.C., Ruddy, D.A., Krishnamurthy Radhakrishna, V., Caushi, J.X., Zhao, R., Hims, M.M., Singh, A.P., Kao, I., Rakiec, D., Shaw, P., et al. (2015). Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nat. Med.* 21, 440–448.
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 14, 261–278.
- Blasco, M.T., Navas, C., Martín-Serrano, G., Graña-Castro, O., Lechuga, C.G., Martín-Díaz, L., Djurec, M., Li, J., Morales-Cacho, L., Esteban-Burgos, L., et al. (2019). Complete Regression of Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinomas upon Combined Inhibition of EGFR and C-RAF. *Cancer Cell* 35, 573-587.
- Blumenschein, G.R., Gatzemeier, U., Fossella, F., Stewart, D.J., Cupit, L., Cihon, F., O’Leary, J., and Reck, M. (2009). Phase II, multicenter, uncontrolled trial of single-agent sorafenib in patients with relapsed or refractory, advanced non-small-cell lung cancer. *JCO* 27, 4274–4280.
- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., and Hirth, P. (2012). Vemurafenib: the first drug approved for BRAF -mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 873–886.
- Brose, M.S., Nutting, C.M., Jarzab, B., Elisei, R., Siena, S., Bastholt, L., de la Fouchardiere, C., Pacini, F., Paschke, R., Shong, Y.K., et al. (2014). Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* 384, 319–328.
- Brown, M.C., and Gromeier, M. (2017). MNK Controls mTORC1:Substrate Association through Regulation of TELO2 Binding with mTORC1. *Cell Reports* 18, 1444–1457.
- Brown, J.R., Hamadani, M., Hayslip, J., Janssens, A., Wagner-Johnston, N., Ottmann, O., Arnason, J., Tilly, H., Millenson, M., Offner, F., et al. (2018). Voxtalisisib (XL765) in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma or chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 5, e170–e180.

- Bunney, T.D., and Katan, M. (2010). Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nat. Rev. Cancer.* 10, 342–352.
- Burger, J.A., Tedeschi, A., Barr, P.M., Robak, T., Owen, C., Ghia, P., Bairey, O., Hillmen, P., Bartlett, N.L., Li, J., et al. (2015). Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *NEJM* 373, 2425–2437.
- Buscail, L., Bournet, B., and Cordelier, P. (2020). Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 153–168.
- Bykov, V.J.N., Eriksson, S.E., Bianchi, J., and Wiman, K.G. (2018). Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 18, 89–102.
- Camidge, D.R., Kim, H.R., Ahn, M.-J., Yang, J.C.-H., Han, J.-Y., Lee, J.-S., Hochmair, M.J., Li, J.Y.-C., Chang, G.-C., Lee, K.H., et al. (2018). Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 379, 2027–2039.
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., and Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 493–502.
- Carey, K.D., Garton, A.J., Romero, M.S., Kahler, J., Thomson, S., Ross, S., Park, F., Haley, J.D., Gibson, N., and Sliwkowski, M.X. (2006). Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Res* 66, 8163–8171.
- Carlomagno, F., Anaganti, S., Guida, T., Salvatore, G., Troncone, G., Wilhelm, S.M., and Santoro, M. (2006). BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* 98, 326–334.
- Chabner, B.A., and Roberts, T.G. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 5, 65–72.
- Chabon, J.J., Simmons, A.D., Lovejoy, A.F., Esfahani, M.S., Newman, A.M., Haringsma, H.J., Kurtz, D.M., Stehr, H., Scherer, F., Karlovich, C.A., et al. (2016). Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun* 7, 11815.
- Chaft, J.E., Arcila, M.E., Paik, P.K., Lau, C., Riely, G.J., Pietanza, M.C., Zakowski, M.F., Rusch, V., Sima, C.S., Ladanyi, M., et al. (2012). Coexistence of PIK3CA and Other Oncogene Mutations in Lung Adenocarcinoma—Rationale for Comprehensive Mutation Profiling. *Mol Cancer Ther* 11, 485–491.
- Chaft, J.E., Rimner, A., Weder, W., Azzoli, C.G., Kris, M.G., and Cascone, T. (2021). Evolution of systemic therapy for stages I-III non-metastatic non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 18, 547–557.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *NEJM* 364, 2507–2516.

- Chen, K.-F., Tai, W.-T., Liu, T.-H., Huang, H.-P., Lin, Y.-C., Shiau, C.-W., Li, P.-K., Chen, P.-J., and Cheng, A.-L. (2010). Sorafenib Overcomes TRAIL Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells through the Inhibition of STAT3. *Clin Cancer Res* 16, 5189–5199.
- Chen, Z., Fillmore, C.M., Hammerman, P.S., Kim, C.F., and Wong, K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat. Rev. Cancer*. 14, 535–546.
- Cheng, C., Zhao, Y., Schaafsma, E., Weng, Y.-L., and Amos, C. (2020). An EGFR signature predicts cell line and patient sensitivity to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Int. J. Cancer Res*. 147, 2621–2633.
- Cho, H.-S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., and Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756–760.
- Choi, Y.-L., Lira, M.E., Hong, M., Kim, R.N., Choi, S.-J., Song, J.-Y., Pandey, K., Mann, D.L., Stahl, J.A., Peckham, H.E., et al. (2014). A novel fusion of TPR and ALK in lung adenocarcinoma. *JTO* 9, 563–566.
- Chung, B.M., Raja, S.M., Clubb, R.J., Tu, C., George, M., Band, V., and Band, H. (2009). Aberrant trafficking of NSCLC-associated EGFR mutants through the endocytic recycling pathway promotes interaction with Src. *BMC Cell Biol* 10, 84.
- Citrin, D.E. (2017). Recent Developments in Radiotherapy. *NEJM* 377, 2200–2201.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1, 309–315.
- Cohen, M.H., Williams, G.A., Sridhara, R., Chen, G., McGuinn, W.D., Morse, D., Abraham, S., Rahman, A., Liang, C., Lostritto, R., et al. (2004). United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 10, 1212–1218.
- Cohen, P., Cross, D., and Jänne, P.A. (2021). Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 20, 551–569.
- Coleman, R.L., Oza, A.M., Lorusso, D., Aghajanian, C., Oaknin, A., Dean, A., Colombo, N., Weberpals, J.I., Clamp, A., Scambia, G., et al. (2017). Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 390, 1949–1961.
- Colombat, P., Salles, G., Brousse, N., Eftekhari, P., Soubeyran, P., Delwail, V., Deconinck, E., Haioun, C., Foussard, C., Sebban, C., et al. (2001). Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 97, 101–106.
- Comoglio, P.M., Trusolino, L., and Boccaccio, C. (2018). Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 18, 341–358.



- Cortes, J.E., Gambacorti-Passerini, C., Deininger, M.W., Mauro, M.J., Chuah, C., Kim, D.-W., Dyagil, I., Glushko, N., Milojkovic, D., le Coutre, P., et al. (2018). Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *JCO* 36, 231–237.
- Cortot, A.B., Kherrouche, Z., Descarpentries, C., Wislez, M., Baldacci, S., Furlan, A., and Tulasne, D. (2017). Exon 14 Deleted MET Receptor as a New Biomarker and Target in Cancers. *JNCI* 109
- Cross, D.A.E., Ashton, S.E., Ghiorghiu, S., Eberlein, C., Nebhan, C.A., Spitzler, P.J., Orme, J.P., Finlay, M.R.V., Ward, R.A., Mellor, M.J., et al. (2014). AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 4, 1046–1061.
- Crump, M., Sawka, C.A., DeBoer, G., Buchanan, R.B., Ingle, J.N., Forbes, J., Meakin, J.W., Shelley, W., and Pritchard, K.I. (1997). An individual patient-based meta-analysis of tamoxifen versus ovarian ablation as first line endocrine therapy for premenopausal women with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 44, 201–210.
- Cui, G., Liu, D., Li, W., Fu, X., Liang, Y., Li, Y., Shi, W., Chen, X., and Zhao, S. (2017). A meta-analysis of the association between BRAF mutation and nonsmall cell lung cancer. *Medicine (Baltimore)* 96, e6552.
- Czuczman, M.S., Grillo-López, A.J., White, C.A., Saleh, M., Gordon, L., LoBuglio, A.F., Jonas, C., Klippenstein, D., Dallaire, B., and Varns, C. (1999). Treatment of Patients With Low-Grade B-Cell Lymphoma With the Combination of Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody and CHOP Chemotherapy. *JCO* 17, 268–268.
- D'Abronzio, L.S., and Ghosh, P.M. (2018). eIF4E Phosphorylation in Prostate Cancer. *Neoplasia* 20, 563–573.
- Dagogo-Jack, I., and Shaw, A.T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 81–94.
- Daley, G.Q., Etten, R.V., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824–830.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954.
- Davis, M.I., Hunt, J.P., Herrgard, S., Ciceri, P., Wodicka, L.M., Pallares, G., Hocker, M., Treiber, D.K., and Zarrinkar, P.P. (2011). Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 29, 1046–1051.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., and Aaronson, S.A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237, 178–182.

- Dixon, S.J., Patel, D.N., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E.D., Hayano, M., Thomas, A.G., Gleason, C.E., Tatonetti, N.P., Slusher, B.S., et al. (2014). Pharmacological inhibition of cystine–glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *ELife* 3, e02523.
- Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 69–84.
- Drilon, A., Wang, L., Hasanovic, A., Suehara, Y., Lipson, D., Stephens, P., Ross, J., Miller, V., Ginsberg, M., Zakowski, M.F., et al. (2013). Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 3, 630–635.
- Drilon, A., Rekhman, N., Arcila, M., Wang, L., Ni, A., Albano, M., Van Voorthuysen, M., Somwar, R., Smith, R.S., Montecalvo, J., et al. (2016). Cabozantinib in patients with advanced RET-rearranged non-small-cell lung cancer: an open-label, single-centre, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 17, 1653–1660.
- Drilon, A., Cappuzzo, F., Ou, S.-H.I., and Camidge, D.R. (2017). Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *JTO* 12, 15–26.
- Drilon, A., Oxnard, G.R., Tan, D.S.W., Loong, H.H.F., Johnson, M., Gainor, J., McCoach, C.E., Gautschi, O., Besse, B., Cho, B.C., et al. (2020). Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 383, 813–824.
- Drilon, A., Jenkins, C., Iyer, S., Schoenfeld, A., Keddy, C., and Davare, M.A. (2021). ROS1-dependent cancers — biology, diagnostics and therapeutics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 18, 35–55.
- Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. *Nat. Med.* 2, 561–566.
- Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001a). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *NEJM* 344, 1038–1042.
- Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., et al. (2001b). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *NEJM* 344, 1031–1037.
- Duran, I., Hotté, S.J., Hirte, H., Chen, E.X., MacLean, M., Turner, S., Duan, L., Pond, G.R., Lathia, C., Walsh, S., et al. (2007). Phase I targeted combination trial of sorafenib and erlotinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 13, 4849–4857.
- Eberlein, C.A., Stetson, D., Markovets, A.A., Al-Kadhimi, K.J., Lai, Z., Fisher, P.R., Meador, C.B., Spitzler, P., Ichihara, E., Ross, S.J., et al. (2015). Acquired Resistance to the Mutant-Selective EGFR Inhibitor AZD9291 Is Associated with Increased Dependence on RAS Signaling in Preclinical Models. *Cancer Res* 75, 2489–2500.

- Ehrenreiter, K., Kern, F., Velamoor, V., Meissl, K., Galabova-Kovacs, G., Sibia, M., and Baccarini, M. (2009). Raf-1 addiction in Ras-induced skin carcinogenesis. *Cancer Cell* 16, 149–160.
- Elliot, J.S. (1962). Treatment of bladder cancer with amethopterin. *Cancer Chemother Rep* 20, 147.
- Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer*. 9, 550–562.
- Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039–1043.
- Ettinger, D.S., Wood, D.E., Aggarwal, C., Aisner, D.L., Akerley, W., Bauman, J.R., Bharat, A., Bruno, D.S., Chang, J.Y., Chirieac, L.R., et al. (2019). NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw* 17, 1464–1472.
- Farago, A.F., and Keane, F.K. (2018). Current standards for clinical management of small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 7, 69–79.
- Farber, S., and Diamond, L.K. (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *NEJM* 238, 787–793.
- Fassunke, J., Müller, F., Keul, M., Michels, S., Dammert, M.A., Schmitt, A., Plenker, D., Lategahn, J., Heydt, C., Brägelmann, J., et al. (2018). Overcoming EGFR G724S -mediated osimertinib resistance through unique binding characteristics of second-generation EGFR inhibitors. *Nat. Commun.* 9, 4655.
- Fernandes Neto, J.M., Nadal, E., Bosdriesz, E., Ooft, S.N., Farre, L., McLean, C., Klarenbeek, S., Jurgens, A., Hagen, H., Wang, L., et al. (2020). Multiple low dose therapy as an effective strategy to treat EGFR inhibitor-resistant NSCLC tumours. *Nat. Commun.* 11, 3157.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3, 391–400.
- Ferrer, I., Zugazagoitia, J., Herbertz, S., John, W., Paz-Ares, L., and Schmid-Bindert, G. (2018). KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer* 124, 53–64.
- Ferrucci, P.F., Di Giacomo, A.M., Del Vecchio, M., Atkinson, V., Schmidt, H., Schachter, J., Queirolo, P., Long, G.V., Stephens, R., Svane, I.M., et al. (2020). KEYNOTE-022 part 3: a randomized, double-blind, phase 2 study of pembrolizumab, dabrafenib, and trametinib in BRAF-mutant melanoma. *J Immunother Cancer* 8, e001806.
- Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., et al. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *NEJM* 363, 809–819.

- Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J.-Y., Nishiwaki, Y., Vansteenkiste, J., Kudoh, S., Rischin, D., et al. (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *JCO* 21, 2237–2246.
- Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I.H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis, E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L.A., et al. (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14134–14139.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2015). Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* 28, 690–714.
- García-Foncillas, J., Sunakawa, Y., Aderka, D., Wainberg, Z., Ronga, P., Witzler, P., and Stintzing, S. (2019). Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Front. Oncol.* 9, 849
- Gautschi, O., Milia, J., Filleron, T., Wolf, J., Carbone, D.P., Owen, D., Camidge, R., Narayanan, V., Doebele, R.C., Besse, B., et al. (2017). Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry. *JCO* 35, 1403–1410.
- Gilman, A. (1963). The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg* 105, 574–578.
- Gilman, A., and Philips, F.S. (1946). The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides. *Science* 103, 409–436.
- Godwin, C.D., Gale, R.P., and Walter, R.B. (2017). Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 31, 1855–1868.
- Golan, T., Hammel, P., Reni, M., Van Cutsem, E., Macarulla, T., Hall, M.J., Park, J.-O., Hochhauser, D., Arnold, D., Oh, D.-Y., et al. (2019). Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *NEJM* 381, 317–327.
- Goodman, L.S., and Wintrobe, M.M. (1946). Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *J Am Med Assoc* 132, 126–132.
- Gopal, A.K., Kahl, B.S., de Vos, S., Wagner-Johnston, N.D., Schuster, S.J., Jurczak, W.J., Flinn, I.W., Flowers, C.R., Martin, P., Viardot, A., et al. (2014). PI3K $\delta$  inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *NEJM* 370, 1008–1018.
- Goss, G., Tsai, C.-M., Shepherd, F.A., Bazhenova, L., Lee, J.S., Chang, G.-C., Crino, L., Satouchi, M., Chu, Q., Hida, T., et al. (2016). Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 17, 1643–1652.
- Grant, M.J., Herbst, R.S., and Goldberg, S.B. (2021). Selecting the optimal immunotherapy regimen in driver-negative metastatic NSCLC. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 18, 625–644.

- Greenspan, E.M., and Fieber, M. (1962). Combination chemotherapy of advanced ovarian carcinoma with the antimetabolite, methotrexate, and the alkylating agent, thioTEPA. *J Mt Sinai Hosp N Y* 29, 48–62.
- Greenspan, E.M., Fieber, M., Lesnick, G., and Edelman, S. (1963). Response of advanced breast carcinoma to the combination of the antimetabolite, Methotrexate, and the alkylating agent, thio-TEPA. *J Mt Sinai Hosp N Y* 30, 246–267.
- Gschwind, A., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 361–370.
- Gu, F.-M., Li, Q.-L., Gao, Q., Jiang, J.-H., Huang, X.-Y., Pan, J.-F., Fan, J., and Zhou, J. (2011). Sorafenib inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by blocking STAT3. *World J Gastroenterol* 17, 3922–3932.
- Guernet, A., Mungamuri, S.K., Cartier, D., Sachidanandam, R., Jayaprakash, A., Adriouch, S., Vezain, M., Charbonnier, F., Rohkin, G., Coutant, S., et al. (2016). CRISPR-Barcoding for Intratumor Genetic Heterogeneity Modeling and Functional Analysis of Oncogenic Driver Mutations. *Mol. Cell* 63, 526–538.
- Guo, R., Luo, J., Chang, J., Rekhtman, N., Arcila, M., and Drilon, A. (2020). MET-dependent solid tumours — molecular diagnosis and targeted therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17, 569–587.
- Hainsworth, J.D. (2003). First-line and maintenance treatment with rituximab for patients with indolent non-Hodgkin’s lymphoma. *Semin. Oncol.* 30, 9–15.
- Han, S.-W., Kim, T.-Y., Hwang, P.G., Jeong, S., Kim, J., Choi, I.S., Oh, D.-Y., Kim, J.H., Kim, D.-W., Chung, D.H., et al. (2005). Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *JCO* 23, 2493–2501.
- Hanna, N.H., Schneider, B.J., Temin, S., Baker, S., Brahmer, J., Ellis, P.M., Gaspar, L.E., Haddad, R.Y., Hesketh, P.J., Jain, D., et al. (2020). Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer Without Driver Alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update. *JCO* 38, 1608–1632.
- Hata, A.N., Niederst, M.J., Archibald, H.L., Gomez-Caraballo, M., Siddiqui, F.M., Mulvey, H.E., Maruvka, Y.E., Ji, F., Bhang, H.C., Krishnamurthy Radhakrishna, V., et al. (2016). Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat. Med.* 22, 262–269.
- Havel, J.J., Chowell, D., and Chan, T.A. (2019). The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 19, 133–150.
- Heisterkamp, N., Jenster, G., ten Hoeve, J., Zovich, D., Pattengale, P.K., and Groffen, J. (1990). Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 344, 251–253.
- Herbst, R.S., Morgensztern, D., and Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 553, 446–454.

- Ho, C.-C., Liao, W.-Y., Lin, C.-A., Shih, J.-Y., Yu, C.-J., and Yang, J.C.-H. (2017). Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Osimertinib. *JTO* 12, 567–572.
- Hoeflich, K.P., Gray, D.C., Eby, M.T., Tien, J.Y., Wong, L., Bower, J., Gogineni, A., Zha, J., Cole, M.J., Stern, H.M., et al. (2006). Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. *Cancer Res* 66, 999–1006.
- Honegger, A.M., Dull, T.J., Felder, S., Van Obberghen, E., Bellot, F., Szapary, D., Schmidt, A., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1987). Point mutation at the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing. *Cell* 51, 199–209.
- Hosomi, Y., Morita, S., Sugawara, S., Kato, T., Fukuhara, T., Gemma, A., Takahashi, K., Fujita, Y., Harada, T., Minato, K., et al. (2020). Gefitinib Alone Versus Gefitinib Plus Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer With Mutated Epidermal Growth Factor Receptor: NEJ009 Study. *JCO* 38, 115–123.
- Hoxhaj, G., and Manning, B.D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer*. 20, 74–88.
- Hu, S., Niu, H., Minkin, P., Orwick, S., Shimada, A., Inaba, H., Dahl, G.V.H., Rubnitz, J., and Baker, S.D. (2008). Comparison of antitumor effects of multitargeted tyrosine kinase inhibitors in acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther* 7, 1110–1120.
- Huang, F., Khvorova, A., Marshall, W., and Sorkin, A. (2004). Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem* 279, 16657–16661.
- Huang, Y., Gan, J., Guo, K., Deng, Y., and Fang, W. (2019). Acquired BRAF V600E Mutation Mediated Resistance to Osimertinib and Responded to Osimertinib, Dabrafenib, and Trametinib Combination Therapy. *JTO* 14, e236–e237.
- Hudis, C.A. (2007). Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice *NEJM* 357, 39–51.
- Hudziak, R.M., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1987). Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7159–7163.
- Hyman, D.M., Puzanov, I., Subbiah, V., Faris, J.E., Chau, I., Blay, J.-Y., Wolf, J., Raje, N.S., Diamond, E.L., Hollebecque, A., et al. (2015). Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *NEJM* 373, 726–736.
- Ingle, J.N., Ahmann, D.L., Green, S.J., Edmonson, J.H., Bisel, H.F., Kvols, L.K., Nichols, W.C., Creagan, E.T., Hahn, R.G., Rubin, J., et al. (1981). Randomized clinical trial of diethylstilbestrol versus tamoxifen in postmenopausal women with advanced breast cancer. *NEJM* 304, 16–21.



- Iyevleva, A.G., Raskin, G.A., Tiurin, V.I., Sokolenko, A.P., Mitiushkina, N.V., Aleksakhina, S.N., Garifullina, A.R., Strelkova, T.N., Merkulov, V.O., Ivantsov, A.O., et al. (2015). Novel ALK fusion partners in lung cancer. *Cancer Lett.* 362, 116–121.
- Jaehne, J., Urmacher, C., Thaler, H.T., Friedlander-Klar, H., Cordon-Cardo, C., and Meyer, H.J. (1992). Expression of Her2/neu oncogene product p185 in correlation to clinicopathological and prognostic factors of gastric carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118, 474–479.
- Janku, F., Tsimberidou, A.M., Garrido-Laguna, I., Wang, X., Luthra, R., Hong, D.S., Naing, A., Falchook, G.S., Moroney, J.W., Piha-Paul, S.A., et al. (2011). PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Mol Cancer Ther* 10, 558–565.
- Janku, F., Hong, D.S., Fu, S., Piha-Paul, S.A., Naing, A., Falchook, G.S., Tsimberidou, A.M., Stepanek, V.M., Moulder, S.L., Lee, J.J., et al. (2014). Assessing PIK3CA and PTEN in early-phase trials with PI3K/AKT/mTOR inhibitors. *Cell Rep* 6, 377–387.
- Jänne, P.A., Yang, J.C.-H., Kim, D.-W., Planchard, D., Ohe, Y., Ramalingam, S.S., Ahn, M.-J., Kim, S.-W., Su, W.-C., Horn, L., et al. (2015). AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *NEJM* 372, 1689–1699.
- Johnston, S.R.D., and Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 821–831.
- Jones, D.T.W., Jäger, N., Kool, M., Zichner, T., Hutter, B., Sultan, M., Cho, Y.-J., Pugh, T.J., Hovestadt, V., Stütz, A.M., et al. (2012). Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* 488, 100–105.
- Jung, Y., Kim, P., Jung, Y., Keum, J., Kim, S.-N., Choi, Y.S., Do, I.-G., Lee, J., Choi, S.-J., Kim, S., et al. (2012). Discovery of ALK-PTPN3 gene fusion from human non-small cell lung carcinoma cell line using next generation RNA sequencing. *Genes Chromosomes Cancer* 51, 590–597.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *JCI* 119, 1420–1428.
- Kane, R.C., Farrell, A.T., Saber, H., Tang, S., Williams, G., Jee, J.M., Liang, C., Booth, B., Chidambaram, N., Morse, D., et al. (2006). Sorafenib for the Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 7271–7278.
- Karoulia, Z., Gavathiotis, E., and Poulikakos, P.I. (2017). New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 17, 676–691.
- Katakami, N., Atagi, S., Goto, K., Hida, T., Horai, T., Inoue, A., Ichinose, Y., Koboyashi, K., Takeda, K., Kiura, K., et al. (2013). LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *JCO* 31, 3335–3341.

- Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R.K., Audeh, M.W., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S.M., Hubert, A., et al. (2015). Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *JCO* 33, 244–250.
- Ke, E.-E., and Wu, Y.-L. (2016). EGFR as a Pharmacological Target in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: Where Do We Stand Now? *Trends Pharmacol Sci* 37, 887–903.
- Ke, X.-Y., Chen, Y., Tham, V.Y.-Y., Lin, R.Y.-T., Dakle, P., Nacro, K., Puhaindran, M.E., Houghton, P., Pang, A., Lee, V.K., et al. (2021). MNK1 and MNK2 enforce expression of E2F1, FOXM1, and WEE1 to drive soft tissue sarcoma. *Oncogene* 40, 1851–1867.
- Kim, D.-W., Lee, D.H., Han, J.-Y., Lee, J., Cho, B.C., Kang, J.H., Lee, K.H., Cho, E.K., Kim, J.-S., Min, Y.J., et al. (2019). Safety, tolerability, and anti-tumor activity of olmutinib in non-small cell lung cancer with T790M mutation: A single arm, open label, phase 1/2 trial. *Lung Cancer* 135, 66–72.
- Kim, G., Ison, G., McKee, A.E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., Sridhara, R., Lee, E., Tzou, A., Philip, R., et al. (2015). FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 21, 4257–4261.
- Kim, L.C., Song, L., and Haura, E.B. (2009). Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 587–595.
- King, C.R., Kraus, M.H., and Aaronson, S.A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229, 974–976.
- Kirkpatrick, P., Graham, J., and Muhsin, M. (2004). Cetuximab. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 549–550.
- Knebel, F.H., Bettoni, F., Shimada, A.K., Cruz, M., Alessi, J.V., Negrão, M.V., Reis, L.F.L., Katz, A., and Camargo, A.A. (2017). Sequential liquid biopsies reveal dynamic alterations of EGFR driver mutations and indicate EGFR amplification as a new mechanism of resistance to osimertinib in NSCLC. *Lung Cancer* 108, 238–241.
- Knight, J.R.P., Alexandrou, C., Skalka, G.L., Vlahov, N., Pennel, K., Officer, L., Teodosio, A., Kanellos, G., Gay, D.M., May-Wilson, S., et al. (2021). MNK Inhibition Sensitizes KRAS-Mutant Colorectal Cancer to mTORC1 Inhibition by Reducing eIF4E Phosphorylation and c-MYC Expression. *Cancer Discov* 11, 1228–1247.
- Kong, X., Kuilman, T., Shahrabi, A., Boshuizen, J., Kemper, K., Song, J.-Y., Niessen, H.W.M., Rozeman, E.A., Geukes Foppen, M.H., Blank, C.U., et al. (2017). Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature* 550, 270–274.
- Kong-Beltran, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., et al. (2006). Somatic Mutations Lead to an Oncogenic Deletion of Met in Lung Cancer. *Cancer Res* 66, 283–289.



- Kopetz, S., Desai, J., Chan, E., Hecht, J.R., O'Dwyer, P.J., Maru, D., Morris, V., Janku, F., Dasari, A., Chung, W., et al. (2015). Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *JCO* 33, 4032–4038.
- Kopetz, S., Grothey, A., Yaeger, R., Van Cutsem, E., Desai, J., Yoshino, T., Wasan, H., Ciardiello, F., Loupakis, F., Hong, Y.S., et al. (2019). Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *NEJM* 381, 1632–1643.
- Kosciuczuk, E.M., Saleiro, D., Kroczyńska, B., Beauchamp, E.M., Eckerdt, F., Blyth, G.T., Abedin, S.M., Giles, F.J., Altman, J.K., and Plataniias, L.C. (2016). Merestinib blocks Mnk kinase activity in acute myeloid leukemia progenitors and exhibits antileukemic effects in vitro and in vivo. *Blood* 128, 410–414.
- Kosmas, C., Stamatopoulos, K., Stavroyianni, N., Tsavaris, N., and Papadaki, T. (2002). Anti-CD20-based therapy of B cell lymphoma: state of the art. *Leukemia* 16, 2004–2015.
- Kubli, S.P., Berger, T., Araujo, D.V., Siu, L.L., and Mak, T.W. (2021). Beyond immune checkpoint blockade: emerging immunological strategies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1–21.
- Kurppa, K.J., Liu, Y., To, C., Zhang, T., Fan, M., Vajdi, A., Knelson, E.H., Xie, Y., Lim, K., Cejas, P., et al. (2020). Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway. *Cancer Cell* 37, 104-122.e12.
- Landi, L., Chiari, R., Tiseo, M., D'Inca, F., Dazzi, C., Chella, A., Delmonte, A., Bonanno, L., Giannarelli, D., Cortinovis, D.L., et al. (2019). Crizotinib in MET-Deregulated or ROS1-Rearranged Pretreated Non-Small Cell Lung Cancer (METROS): A Phase II, Prospective, Multicenter, Two-Arms Trial. *Clin Cancer Res* 25, 7312–7319.
- Langer, C.J., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E., and Soria, J.-C. (2010). The Evolving Role of Histology in the Management of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO* 28, 5311–5320.
- Lapenna, S., and Giordano, A. (2009). Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8, 547–566.
- Lazzari, L., Corti, G., Picco, G., Isella, C., Montone, M., Arcella, P., Durinikova, E., Zanella, E.R., Novara, L., Barbosa, F., et al. (2019). Patient-Derived Xenografts and Matched Cell Lines Identify Pharmacogenomic Vulnerabilities in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 25, 6243–6259.
- Le, X., Puri, S., Negro, M.V., Nilsson, M.B., Robichaux, J., Boyle, T., Hicks, J.K., Lovinger, K.L., Roarty, E., Rinsurongkawong, W., et al. (2018). Landscape of EGFR-Dependent and -Independent Resistance Mechanisms to Osimertinib and Continuation Therapy Beyond Progression in EGFR-Mutant NSCLC. *Clin Cancer Res* 24, 6195–6203.
- Lee, J., Kim, H.S., Lee, B., Kim, H.K., Sun, J.-M., Ahn, J.S., Ahn, M.-J., Park, K., and Lee, S.-H. (2020). Genomic landscape of acquired resistance to third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR T790M-mutant non-small cell lung cancer. *Cancer* 126, 2704–2712.

- Lee, P.-C., Fang, Y.-F., Yamaguchi, H., Wang, W.-J., Chen, T.-C., Hong, X., Ke, B., Xia, W., Wei, Y., Zha, Z., et al. (2018). Targeting PKC $\delta$  as a Therapeutic Strategy against Heterogeneous Mechanisms of EGFR Inhibitor Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Cell* 34, 954-969.e4.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., and Ferguson, K.M. (2014). The EGFR Family: Not So Prototypical Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a020768.
- Leonetti, A., Facchinetti, F., Rossi, G., Minari, R., Conti, A., Friboulet, L., Tiseo, M., and Planchard, D. (2018). BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treat Rev* 66, 82–94.
- Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E., and Tiseo, M. (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR -mutated non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 121, 725–737.
- Leventakos, K., Kipp, B.R., Rumilla, K.M., Winters, J.L., Yi, E.S., and Mansfield, A.S. (2016). S768I Mutation in EGFR in Patients with Lung Cancer. *JTO* 11, 1798–1801.
- Li, M.C., Hertz, R., and Bergenstal, D.M. (1958). Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. *NEJM* 259, 66–74.
- Lim, J.S., Ibaseta, A., Fischer, M.M., Cancilla, B., O’Young, G., Cristea, S., Luca, V.C., Yang, D., Jahchan, N.S., Hamard, C., et al. (2017). Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. *Nature* 545, 360–364.
- Lim, S.M., Cho, B.C., Kim, S.-W., Kang, S.Y., Heo, D.S., Kim, H.T., Lee, D.H., Kim, D.-W., Jung, M., Choi, J.-H., et al. (2016). A multicenter phase II study of sorafenib in combination with erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (KCSG-0806). *Lung Cancer* 93, 1–8.
- Lin, C.-C., Shih, J.-Y., Yu, C.-J., Ho, C.-C., Liao, W.-Y., Lee, J.-H., Tsai, T.-H., Su, K.-Y., Hsieh, M.-S., Chang, Y.-L., et al. (2018). Outcomes in patients with non-small-cell lung cancer and acquired Thr790Met mutation treated with osimertinib: a genomic study. *Lancet Respir. Med.* 6, 107–116.
- Linardou, H., Dahabreh, I.J., Bafaloukos, D., Kosmidis, P., and Murray, S. (2009). Somatic EGFR mutations and efficacy of tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 352–366.
- Liston, D.R., and Davis, M. (2017). Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. *Clin Cancer Res* 23, 3489–3498.
- Litvak, A.M., Paik, P.K., Woo, K.M., Sima, C.S., Hellmann, M.D., Arcila, M.E., Ladanyi, M., Rudin, C.M., Kris, M.G., and Riely, G.J. (2014). Clinical Characteristics and Course of 63 Patients with BRAF Mutant Lung Cancers. *JTO* 9, 1669–1674.

- Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.-L., Forner, A., et al. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *NEJM* 359, 378–390.
- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.J., et al. (2014). Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *NEJM* 371, 1877–1888.
- LoRusso, P.M., Weiss, D., Guardino, E., Girish, S., and Sliwkowski, M.X. (2011). Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clin Cancer Res* 17, 6437–6447.
- Lu, S., Wang, Q., Zhang, G., Dong, X., Yang, C.-T., Song, Y., Chang, G.-C., Lu, Y., Pan, H., Chiu, C.-H., et al. (2020). Abstract CT190: A multicenter, open-label, single-arm, phase II study: The third generation EGFR tyrosine kinase inhibitor almonertinib for pretreated EGFR T790M-positive locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (APOLLO). *Cancer Res* 80, CT190–CT190.
- Lu, Y., Futtner, C., Rock, J.R., Xu, X., Whitworth, W., Hogan, B.L.M., and Onaitis, M.W. (2010). Evidence That SOX2 Overexpression Is Oncogenic in the Lung. *PLOS ONE* 5, e11022.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *NEJM* 350, 2129–2139.
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., et al. (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *NEJM* 362, 2380–2388.
- Mar, N., Vredenburgh, J.J., and Wasser, J.S. (2015). Targeting HER2 in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 87, 220–225.
- Marine, J.-C., Dawson, S.-J., and Dawson, M.A. (2020). Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 20, 743–756.
- Marusyk, A., Janiszewska, M., and Polyak, K. (2020). Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. *Cancer Cell* 37, 471–484.
- Mauclet, C., Collard, P., Ghaye, B., Hoton, D., and Nana, F.A. (2021). Tumor response to EGFR/BRAF/MEK co-inhibition in a patient with EGFR mutated lung adenocarcinoma developing a BRAFV600 mutation as an acquired resistance mechanism. *Lung Cancer* 159, 42–44.
- Mazières, J., Peters, S., Lepage, B., Cortot, A.B., Barlesi, F., Beau-Faller, M., Besse, B., Blons, H., Mansuet-Lupo, A., Urban, T., et al. (2013). Lung Cancer That Harbors an HER2 Mutation: Epidemiologic Characteristics and Therapeutic Perspectives. *JCO* 31, 1997–2003.

- McKay, J.D., Hung, R.J., Han, Y., Zong, X., Carreras-Torres, R., Christiani, D.C., Caporaso, N.E., Johansson, M., Xiao, X., Li, Y., et al. (2017). Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. *Nat. Genet.* 49, 1126–1132.
- Ménard, L., Floc'h, N., Martin, M.J., and Cross, D.A.E. (2018). Reactivation of Mutant-EGFR Degradation through Clathrin Inhibition Overcomes Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res* 78, 3267–3279.
- Meng, P., Koopman, B., Kok, K., ter Elst, A., Schuurin, E., van Kempen, L.C., Timens, W., Hiltermann, T.J.N., Groen, H.J.M., van den Berg, A., et al. (2020). Combined osimertinib, dabrafenib and trametinib treatment for advanced non-small-cell lung cancer patients with an osimertinib-induced BRAF V600E mutation. *Lung Cancer* 146, 358–361.
- Miller, V.A., Hirsh, V., Cadranel, J., Chen, Y.-M., Park, K., Kim, S.-W., Zhou, C., Su, W.-C., Wang, M., Sun, Y., et al. (2012). Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 13, 528–538.
- Mo, S.P., Coulson, J.M., and Prior, I.A. (2018). RAS variant signalling. *Biochem Soc Trans* 46, 1325–1332.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469–6487.
- Mogi, A., and Kuwano, H. (2011). TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer. *J Biomed Biotechnol* (2011), e583929.
- Mok, T.S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *NEJM* 361, 947–957.
- Mok, T.S., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Garassino, M.C., Kim, H.R., Ramalingam, S.S., Shepherd, F.A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W.S.M.E., et al. (2017). Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *NEJM* 376, 629–640.
- Mok, T.S., Cheng, Y., Zhou, X., Lee, K.H., Nakagawa, K., Niho, S., Lee, M., Linke, R., Rosell, R., Corral, J., et al. (2018). Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *JCO* 36, 2244–2250.
- Moore, A.R., Rosenberg, S.C., McCormick, F., and Malek, S. (2020). RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat. Rev. Drug. Discov.* 19, 533–552.
- Moriceau, G., Hugo, W., Hong, A., Shi, H., Kong, X., Yu, C.C., Koya, R.C., Samatar, A.A., Khanlou, N., Braun, J., et al. (2015). Tunable-Combinatorial Mechanisms of Acquired Resistance Limit the Efficacy of BRAF/MEK Cotargeting but Result in Melanoma Drug Addiction. *Cancer Cell* 27, 240–256.

- Motzer, R.J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T.E., Porta, C., Bracarda, S., Grünwald, V., Thompson, J.A., Figlin, R.A., Hollaender, N., et al. (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 372, 449–456.
- Mu, Y., Hao, X., Xing, P., Hu, X., Wang, Y., Li, T., Zhang, J., Xu, Z., and Li, J. (2020). Acquired resistance to osimertinib in patients with non-small-cell lung cancer: mechanisms and clinical outcomes. *J Cancer Res Clin Oncol* 146, 2427–2433.
- Nagasaka, M., Zhu, V.W., Lim, S.M., Greco, M., Wu, F., and Ou, S.-H.I. (2021). Beyond Osimertinib: The Development of Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors For Advanced EGFR+ NSCLC. *JTO* 16, 740–763.
- Navas, C., Hernández-Porras, I., Schuhmacher, A.J., Sibilía, M., Guerra, C., and Barbacid, M. (2012). EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22, 318–330.
- Ng, J.M.Y., and Curran, T. (2011). The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 493–501.
- Niederst, M.J., Hu, H., Mulvey, H.E., Lockerman, E.L., Garcia, A.R., Piotrowska, Z., Sequist, L.V., and Engelman, J.A. (2015a). The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin Cancer Res* 21, 3924–3933.
- Niederst, M.J., Sequist, L.V., Poirier, J.T., Mermel, C.H., Lockerman, E.L., Garcia, A.R., Katayama, R., Costa, C., Ross, K.N., Moran, T., et al. (2015b). RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat. Commun.* 6, 6377.
- Nilsson, M.B., Robichaux, J., Herynk, M.H., Cascone, T., Le, X., Elamin, Y., Patel, S., Zhang, F., Xu, L., Hu, L., et al. (2021). Altered Regulation of HIF-1 $\alpha$  in Naive- and Drug-Resistant EGFR-Mutant NSCLC: Implications for a Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Phenotype. *JTO* 16, 439–451.
- Noronha, V., Patil, V.M., Joshi, A., Menon, N., Chougule, A., Mahajan, A., Janu, A., Purandare, N., Kumar, R., More, S., et al. (2020). Gefitinib Versus Gefitinib Plus Pemetrexed and Carboplatin Chemotherapy in EGFR-Mutated Lung Cancer. *JCO* 38, 124–136.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 25, 85–109.
- Nukaga, S., Yasuda, H., Tsuchihara, K., Hamamoto, J., Masuzawa, K., Kawada, I., Naoki, K., Matsumoto, S., Mimaki, S., Ikemura, S., et al. (2017). Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res* 77, 2078–2089.
- Ortiz-Cuaran, S., Scheffler, M., Plenker, D., Dahmen, L., Scheel, A.H., Fernandez-Cuesta, L., Meder, L., Lovly, C.M., Persigehl, T., Merkelbach-Bruse, S., et al. (2016). Heterogeneous Mechanisms of Primary and Acquired Resistance to Third-Generation EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res* 22, 4837–4847.

- Oser, M.G., Niederst, M.J., Sequist, L.V., and Engelman, J.A. (2015). Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol* 16, e165–e172.
- Ou, S.-H.I., Cui, J., Schrock, A.B., Goldberg, M.E., Zhu, V.W., Albacker, L., Stephens, P.J., Miller, V.A., and Ali, S.M. (2017). Emergence of novel and dominant acquired EGFR solvent-front mutations at Gly796 (G796S/R) together with C797S/R and L792F/H mutations in one EGFR (L858R/T790M) NSCLC patient who progressed on osimertinib. *Lung Cancer* 108, 228–231.
- Oxnard, G.R. (2016). The cellular origins of drug resistance in cancer. *Nat. Med.* 22, 232–234.
- Oxnard, G.R., Hu, Y., Mileham, K.F., Husain, H., Costa, D.B., Tracy, P., Feeney, N., Sholl, L.M., Dahlberg, S.E., Redig, A.J., et al. (2018). Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib. *JAMA Oncol* 4, 1527–1534.
- Oztan, A., Fischer, S., Schrock, A.B., Erlich, R.L., Lovly, C.M., Stephens, P.J., Ross, J.S., Miller, V., Ali, S.M., Ou, S.-H.I., et al. (2017). Emergence of EGFR G724S mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma post progression on osimertinib. *Lung Cancer* 111, 84–87.
- Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500.
- Paik, P.K., Drilon, A., Fan, P.-D., Yu, H., Rekhtman, N., Ginsberg, M.S., Borsu, L., Schultz, N., Berger, M.F., Rudin, C.M., et al. (2015). Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov* 5, 842–849.
- Pao, W., and Chmielecki, J. (2010). Rational, biologically based treatment of EGFR -mutant non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 10, 760–774.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., et al. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13306–13311.
- Papadimitrakopoulou, V.A., Wu, Y.-L., Han, J.-Y., Ahn, M.-J., Ramalingam, S.S., John, T., Okamoto, I., Yang, J.C.-H., Bulusu, K.C., Laus, G., et al. (2018). LBA51 - Analysis of resistance mechanisms to osimertinib in patients with EGFR T790M advanced NSCLC from the AURA3 study. *Ann. Oncol.* 29, viii741.
- Park, M.A., Reinehr, R., Häussinger, D., Voelkel-Johnson, C., Ogretmen, B., Yacoub, A., Grant, S., and Dent, P. (2010). Sorafenib Activates CD95 and Promotes Autophagy and Cell Death via Src Family Kinases in Gastrointestinal Tumor Cells. *Mol Cancer Ther* 9, 2220–2231.
- Passaro, A., Jänne, P.A., Mok, T., and Peters, S. (2021). Overcoming therapy resistance in EGFR -mutant lung cancer. *Nat. Cancer* 2, 377–391.



- Paz-Ares, L., Hirsh, V., Zhang, L., de Marinis, F., Yang, J.C.-H., Wakelee, H.A., Seto, T., Wu, Y.-L., Novello, S., Juhász, E., et al. (2015). Monotherapy Administration of Sorafenib in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer (MISSION) Trial: A Phase III, Multicenter, Placebo-Controlled Trial of Sorafenib in Patients with Relapsed or Refractory Predominantly Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer after 2 or 3 Previous Treatment Regimens. *JTO* 10, 1745–1753.
- Paz-Ares, L., Tan, E.-H., O’Byrne, K., Zhang, L., Hirsh, V., Boyer, M., Yang, J.C.-H., Mok, T., Lee, K.H., Lu, S., et al. (2017). Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol* 28, 270–277.
- Peters, S., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Gadgeel, S., Ahn, J.S., Kim, D.-W., Ou, S.-H.I., Pérol, M., Dziadziuszko, R., Rosell, R., et al. (2017). Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 377, 829–838.
- Pinquie, F., Cortot, A.B., Chevalier, L.-M., Morel, A., Sandrini, J., Guguen, C., Morvan, B., and Molinier, O. (2021). A Case Report of Successful Treatment With Crizotinib to Overcome Resistance to Osimertinib in an EGFR Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Patient Harboring an Acquired MET Exon 14 Mutation. *Clin. Lung Cancer* 13, 1525–7304.
- Piotrowska, Z., Isozaki, H., Lennerz, J.K., Gainor, J.F., Lennes, I.T., Zhu, V.W., Marcoux, N., Banwait, M.K., Digumarthy, S.R., Su, W., et al. (2018). Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET Fusion. *Cancer Discov* 8, 1529–1539.
- Planchard, D., Besse, B., Groen, H.J.M., Souquet, P.-J., Quoix, E., Baik, C.S., Barlesi, F., Kim, T.M., Mazieres, J., Novello, S., et al. (2016a). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAFV600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17, 984–993.
- Planchard, D., Kim, T.M., Mazieres, J., Quoix, E., Riely, G., Barlesi, F., Souquet, P.-J., Smit, E.F., Groen, H.J.M., Kelly, R.J., et al. (2016b). Dabrafenib in patients with BRAF(V600E)-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17, 642–650.
- Planchard, D., Smit, E.F., Groen, H.J.M., Mazieres, J., Besse, B., Helland, Å., Giannone, V., D’Amelio, A.M., Zhang, P., Mookerjee, B., et al. (2017). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18, 1307–1316.
- Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E.F., Faivre-Finn, C., Mok, T.S., Reck, M., Van Schil, P.E., Hellmann, M.D., et al. (2018). Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 29, iv192–iv237.

- Plastaras, J.P., Kim, S.-H., Liu, Y.Y., Dicker, D.T., Dorsey, J.F., McDonough, J., Cerniglia, G., Rajendran, R.R., Gupta, A., Rustgi, A.K., et al. (2007). Cell Cycle–Dependent and Schedule-Dependent Antitumor Effects of Sorafenib Combined with Radiation. *Cancer Res* 67, 9443–9454.
- Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., and Bernards, R. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483, 100–103.
- Prior, I.A., Hood, F.E., and Hartley, J.L. (2020). The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res* 80, 2969–2974.
- Qin, Q., Li, X., Liang, X., Zeng, L., Wang, J., Sun, L., and Zhong, D. (2021). Targeting the EMT transcription factor Snail overcomes resistance to osimertinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer* 12, 1708–1715.
- Quintanal-Villalonga, A., Taniguchi, H., Zhan, Y.A., Hasan, M.M., Chavan, S.S., Meng, F., Uddin, F., Manoj, P., Donoghue, M.T.A., Won, H.H., et al. (2021). Multi-omic analysis of lung tumors defines pathways activated in neuroendocrine transformation. *Cancer Discov* 20.1863.2021.
- Rahmani, M., Davis, E.M., Bauer, C., Dent, P., and Grant, S. (2005). Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J Biol Chem* 280, 35217–35227.
- Ramalingam, S.S., Cheng, Y., Zhou, C., Ohe, Y., Imamura, F., Cho, B.C., Lin, M.-C., Majem, M., Shah, R., Rukazenzov, Y., et al. (2018a). LBA50 - Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: Preliminary data from the phase III FLAURA study. *Annals of Oncology* 29, viii740.
- Ramalingam, S.S., Yang, J.C.-H., Lee, C.K., Kurata, T., Kim, D.-W., John, T., Nogami, N., Ohe, Y., Mann, H., Rukazenzov, Y., et al. (2018b). Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation–Positive Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *JCO* 36, 841–849.
- Ramirez, M., Rajaram, S., Steininger, R.J., Osipchuk, D., Roth, M.A., Morinishi, L.S., Evans, L., Ji, W., Hsu, C.-H., Thurley, K., et al. (2016). Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat. Commun.* 7, 10690.
- Ranson, M., Hammond, L.A., Ferry, D., Kris, M., Tullo, A., Murray, P.I., Miller, V., Averbuch, S., Ochs, J., Morris, C., et al. (2002). ZD1839, a Selective Oral Epidermal Growth Factor Receptor–Tyrosine Kinase Inhibitor, Is Well Tolerated and Active in Patients With Solid, Malignant Tumors: Results of a Phase I Trial. *JCO* 20, 2240–2250.
- Ratain, M.J., Eisen, T., Stadler, W.M., Flaherty, K.T., Kaye, S.B., Rosner, G.L., Gore, M., Desai, A.A., Patnaik, A., Xiong, H.Q., et al. (2006). Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JCO* 24, 2505–2512.



- Ready, N., Farago, A.F., de Braud, F., Atmaca, A., Hellmann, M.D., Schneider, J.G., Spigel, D.R., Moreno, V., Chau, I., Hann, C.L., et al. (2019). Third-Line Nivolumab Monotherapy in Recurrent SCLC: CheckMate 032. *JTO* 14, 237–244.
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A.G., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., et al. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 375, 1823–1833.
- Redemann, N., Holzmann, B., Rüden, T. von, Wagner, E.F., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1992). Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol. Cell. Biol.* 12, 491–498.
- Reungwetwattana, T., Liang, Y., Zhu, V., and Ou, S.-H.I. (2017). The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: The Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. *Lung Cancer* 103, 27–37.
- Ribas, A., Lawrence, D., Atkinson, V., Agarwal, S., Miller, W.H., Carlino, M.S., Fisher, R., Long, G.V., Hodi, F.S., Tsoi, J., et al. (2019). Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma. *Nat. Med.* 25, 936–940.
- Ribatti, D. (2012). Sidney Farber and the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with a Chemotherapeutic Agent. *Pediatr Hematol Oncol.* 29, 299–302.
- Robichaud, N., Hsu, B.E., Istomine, R., Alvarez, F., Blagih, J., Ma, E.H., Morales, S.V., Dai, D.L., Li, G., Souleimanova, M., et al. (2018). Translational control in the tumor microenvironment promotes lung metastasis: Phosphorylation of eIF4E in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E2202–E2209.
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S.M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., et al. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *NEJM* 377, 523–533.
- Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., et al. (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *NEJM* 361, 958–967.
- Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J.M., et al. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EORTC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 239–246.
- Rowley, J.D. (1973). A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* 243, 290–293.
- Rudin, C.M., Poirier, J.T., Byers, L.A., Dive, C., Dowlati, A., George, J., Heymach, J.V., Johnson, J.E., Lehman, J.M., MacPherson, D., et al. (2019). Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat. Rev. Cancer.* 19, 289–297.

- Rudin, C.M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., and Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* 7, 1–20.
- Ruggero, D., Montanaro, L., Ma, L., Xu, W., Londei, P., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat. Med.* 10, 484–486.
- Rugo, H.S., Olopade, O.I., DeMichele, A., Yau, C., van 't Veer, L.J., Buxton, M.B., Hogarth, M., Hylton, N.M., Paoloni, M., Perlmutter, J., et al. (2016). Adaptive Randomization of Veliparib-Carboplatin Treatment in Breast Cancer. *NEJM* 375, 23–34.
- Russo, A., Franchina, T., Ricciardi, G., Battaglia, A., Picciotto, M., and Adamo, V. (2019). Heterogeneous Responses to Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Patients with Uncommon EGFR Mutations: New Insights and Future Perspectives in this Complex Clinical Scenario. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1431.
- Ryan, M.B., and Corcoran, R.B. (2018). Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 709–720.
- Salgia, R., Pharaon, R., Mambetsariev, I., Nam, A., and Sattler, M. (2021). The improbable targeted therapy: KRAS as an emerging target in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cell Rep Med.* 2, 100186.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., et al. (2004). High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science* 304, 554–554.
- Sanclémente, M., Francoz, S., Esteban-Burgos, L., Bousquet-Mur, E., Djurec, M., Lopez-Casas, P.P., Hidalgo, M., Guerra, C., Drosten, M., Musteanu, M., et al. (2018). c-RAF Ablation Induces Regression of Advanced Kras/Trp53 Mutant Lung Adenocarcinomas by a Mechanism Independent of MAPK Signaling. *Cancer Cell* 33, 217–228.
- Sarode, P., Mansouri, S., Karger, A., Schaefer, M.B., Grimminger, F., Seeger, W., and Savai, R. (2020). Epithelial cell plasticity defines heterogeneity in lung cancer. *Cell. Signal.* 65, 109463.
- Sawyers, C.L. (2019). Herceptin: A First Assault on Oncogenes that Launched a Revolution. *Cell* 179, 8–12.
- Sawyers, C.L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J.M., Miller, C.B., Ottmann, O.G., Schiffer, C.A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M.W.N., et al. (2002). Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study Presented in part at the 43rd Annual Meeting of The American Society of Hematology, Orlando, FL, December 11, 2001. *Blood* 99, 3530–3539.
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I., and Weinberg, R.A. (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312, 513–516.

- Schoenfeld, A.J., Chan, J.M., Kubota, D., Sato, H., Rizvi, H., Daneshbod, Y., Chang, J.C., Paik, P.K., Offin, M., Arcila, M.E., et al. (2020). Tumor Analyses Reveal Squamous Transformation and Off-Target Alterations As Early Resistance Mechanisms to First-line Osimertinib in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 26, 2654–2663.
- Schram, A.M., Chang, M.T., Jonsson, P., and Drilon, A. (2017). Fusions in solid tumours: diagnostic strategies, targeted therapy, and acquired resistance. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 735–748.
- Sequist, L.V., Martins, R.G., Spigel, D., Grunberg, S.M., Spira, A., Jänne, P.A., Joshi, V.A., McCollum, D., Evans, T.L., Muzikansky, A., et al. (2008). First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *JCO* 26, 2442–2449.
- Sequist, L.V., Waltman, B.A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A.B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A.T., Gettinger, S., Cosper, A.K., et al. (2011). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Sci. Transl. Med* 3, 75ra26-75ra26.
- Sequist, L.V., Yang, J.C.-H., Yamamoto, N., O’Byrne, K., Hirsh, V., Mok, T., Geater, S.L., Orlov, S., Tsai, C.-M., Boyer, M., et al. (2013). Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *JCO* 31, 3327–3334.
- Sequist, L.V., Rolfe, L., and Allen, A.R. (2015). Rociletinib in EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 373, 578–579.
- Sequist, L.V., Han, J.-Y., Ahn, M.-J., Cho, B.C., Yu, H., Kim, S.-W., Yang, J.C.-H., Lee, J.S., Su, W.-C., Kowalski, D., et al. (2020). Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors: interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol* 21, 373–386.
- Sharma, S.V., and Settleman, J. (2007). Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* 21, 3214–3231.
- Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., and Haber, D.A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 169–181.
- Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., et al. (2010). A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* 141, 69–80.
- Shaw, A.T., Hsu, P.P., Awad, M.M., and Engelman, J.A. (2013a). Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. *Nat. Rev. Cancer.* 13, 772–787.
- Shaw, A.T., Kim, D.-W., Nakagawa, K., Seto, T., Crinó, L., Ahn, M.-J., De Pas, T., Besse, B., Solomon, B.J., Blackhall, F., et al. (2013b). Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *NEJM* 368, 2385–2394.

- Shaw, A.T., Ou, S.-H.I., Bang, Y.-J., Camidge, D.R., Solomon, B.J., Salgia, R., Riely, G.J., Varella-Garcia, M., Shapiro, G.I., Costa, D.B., et al. (2014). Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *NEJM* 371, 1963–1971.
- Shaw, A.T., Bauer, T.M., de Marinis, F., Felip, E., Goto, Y., Liu, G., Mazieres, J., Kim, D.-W., Mok, T., Polli, A., et al. (2020). First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *NEJM* 383, 2018–2029.
- Shi, P., Oh, Y.-T., Zhang, G., Yao, W., Yue, P., Li, Y., Kanteti, R., Riehm, J., Salgia, R., Owonikoko, T.K., et al. (2016). Met gene amplification and protein hyperactivation is a mechanism of resistance to both first and third generation EGFR inhibitors in lung cancer treatment. *Cancer Lett.* 380, 494–504.
- Shi, Y., Au, J.S.-K., Thongprasert, S., Srinivasan, S., Tsai, C.-M., Khoa, M.T., Heeroma, K., Itoh, Y., Cornelio, G., and Yang, P.-C. (2014). A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *JTO* 9, 154–162.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., and Weinberg, R.A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290, 261–264.
- Shtiegman, K., Kochupurakkal, B.S., Zwang, Y., Pines, G., Starr, A., Vexler, A., Citri, A., Katz, M., Lavi, S., Ben-Basat, Y., et al. (2007). Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling. *Oncogene* 26, 6968–6978.
- Skoulidis, F., and Heymach, J.V. (2019). Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 19, 495–509.
- Skoulidis, F., Li, B.T., Dy, G.K., Price, T.J., Falchook, G.S., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., et al. (2021). Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation *NEJM* 24, 2371-2381.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707–712.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *NEJM* 344, 783–792.
- Sledge, G.W. (2005). What is targeted therapy? *JCO* 23, 1614–1615.
- Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566.

- Solit, D.B., Garraway, L.A., Pratilas, C.A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J.M., She, Y., Osman, I., et al. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439, 358–362.
- Solomon, B.J., Mok, T., Kim, D.-W., Wu, Y.-L., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T., et al. (2014). First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *NEJM* 371, 2167–2177.
- Solomon, B.J., Besse, B., Bauer, T.M., Felip, E., Soo, R.A., Camidge, D.R., Chiari, R., Bearz, A., Lin, C.-C., Gadgeel, S.M., et al. (2018). Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol* 19, 1654–1667.
- Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H.A., and Piccart, M. (2015). An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 27–41.
- Soria, J.-C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K.H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., et al. (2017). Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *NEJM* 11, 113-125.
- Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., et al. (2012). Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *NEJM* 366, 707–714.
- Stemmler, H.J., Kahlert, S., Brudler, O., Beha, M., Müller, S., Stauch, B., and Heinemann, V. (2005). High efficacy of gemcitabine and cisplatin plus trastuzumab in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer: a phase II study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 17, 630–635.
- Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O’Meara, S., Smith, R., Parker, A., et al. (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431, 525–526.
- Syeda, M.M., Wiggins, J.M., Corless, B.C., Long, G.V., Flaherty, K.T., Schadendorf, D., Nathan, P.D., Robert, C., Ribas, A., Davies, M.A., et al. (2021). Circulating tumour DNA in patients with advanced melanoma treated with dabrafenib or dabrafenib plus trametinib: a clinical validation study. *Lancet Oncol* 22, 370–380.
- Tai, W.-T., Cheng, A.-L., Shiau, C.-W., Huang, H.-P., Huang, J.-W., Chen, P.-J., and Chen, K.-F. (2011). Signal transducer and activator of transcription 3 is a major kinase-independent target of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 55, 1041–1048.
- Tai, W.-T., Shiau, C.-W., Chen, H.-L., Liu, C.-Y., Lin, C.-S., Cheng, A.-L., Chen, P.-J., and Chen, K.-F. (2013). Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* 4, e485.
- Tai, W.-T., Shiau, C.-W., Chen, P.-J., Chu, P.-Y., Huang, H.-P., Liu, C.-Y., Huang, J.-W., and Chen, K.-F. (2014). Discovery of novel Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 agonists from sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 59, 190–201.

- Takeuchi, K., Choi, Y.L., Togashi, Y., Soda, M., Hatano, S., Inamura, K., Takada, S., Ueno, T., Yamashita, Y., Satoh, Y., et al. (2009). KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinin identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 15, 3143–3149.
- Takezawa, K., Pirazzoli, V., Arcila, M.E., Nebhan, C.A., Song, X., de Stanchina, E., Ohashi, K., Janjigian, Y.Y., Spitzler, P.J., Melnick, M.A., et al. (2012). HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov* 2, 922–933.
- Tam, K.W., Zhang, W., Soh, J., Stastny, V., Chen, M., Sun, H., Thu, K., Rios, J.J., Yang, C., Marconett, C.N., et al. (2013). CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small cell lung cancer. *JTO* 8, 1378–1388.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Thomson, R.J., Moshirfar, M., and Ronquillo, Y. (2021). Tyrosine Kinase Inhibitors. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562293/>
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., and Zhao, J.J. (2015). PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer*. 15, 7–24.
- Thress, K.S., Paweletz, C.P., Felip, E., Cho, B.C., Stetson, D., Dougherty, B., Lai, Z., Markovets, A., Vivancos, A., Kuang, Y., et al. (2015). Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat. Med.* 21, 560–562.
- Togashi, Y., Soda, M., Sakata, S., Sugawara, E., Hatano, S., Asaka, R., Nakajima, T., Mano, H., and Takeuchi, K. (2012). KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only. *PLoS One* 7, e31323.
- Tricker, E.M., Xu, C., Uddin, S., Capelletti, M., Ercan, D., Ogino, A., Pratilas, C.A., Rosen, N., Gray, N.S., Wong, K.-K., et al. (2015). Combined EGFR/MEK Inhibition Prevents the Emergence of Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discov* 5, 960–971.
- Turner, N.C., Ro, J., André, F., Loi, S., Verma, S., Iwata, H., Harbeck, N., Loibl, S., Huang Bartlett, C., Zhang, K., et al. (2015). Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *NEJM* 373, 209–219.
- Tuveson, D.A., Weber, B.L., and Herlyn, M. (2003). BRAF as a potential therapeutic target in melanoma and other malignancies. *Cancer Cell* 4, 95–98.
- Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S., and Fukunaga, R. (2004). Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol Cell Biol* 24, 6539–6549.



- Uramoto, H., and Tanaka, F. (2014). Recurrence after surgery in patients with NSCLC. *TLCR* 3, 242–249.
- Uramoto, H., Iwata, T., Onitsuka, T., Shimokawa, H., Hanagiri, T., and Oyama, T. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in EGFR-TKI acquired resistant lung adenocarcinoma. *Anticancer Res* 30, 2513–2517.
- Vasan, N., Baselga, J., and Hyman, D.M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature* 575, 299–309.
- Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 274, 2086–2089.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501.
- Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., et al. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *JCO* 20, 719–726.
- Wakelee, H.A., Lee, J.-W., Hanna, N.H., Traynor, A.M., Carbone, D.P., and Schiller, J.H. (2012). A Double-Blind Randomized Discontinuation Phase-II Study of Sorafenib (BAY 43–9006) in Previously Treated Non–Small-Cell Lung Cancer Patients: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2501. *JTO* 7, 1574–1582.
- Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Project, C.G., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., et al. (2004). Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855–867.
- Wang, C., Vegna, S., Jin, H., Benedict, B., Lieftink, C., Ramirez, C., de Oliveira, R.L., Morris, B., Gadiot, J., Wang, W., et al. (2019). Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. *Nature* 574, 268–272.
- Wang, L., Leite de Oliveira, R., Huijberts, S., Bosdriesz, E., Pencheva, N., Brunen, D., Bosma, A., Song, J.-Y., Zevenhoven, J., Los-de Vries, G.T., et al. (2018). An Acquired Vulnerability of Drug-Resistant Melanoma with Therapeutic Potential. *Cell* 173, 1413–1425.
- Wang, S., Tang, J., Sun, T., Zheng, X., Li, J., Sun, H., Zhou, X., Zhou, C., Zhang, H., Cheng, Z., et al. (2017a). Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages. *Sci Rep* 7, 1339.
- Wang, Y., McKay, J.D., Rafnar, T., Wang, Z., Timofeeva, M.N., Broderick, P., Zong, X., Laplana, M., Wei, Y., Han, Y., et al. (2014). Rare variants of large effect in BRCA2 and CHEK2 affect risk of lung cancer. *Nat. Genet.* 46, 736–741.
- Wang, Z., Yang, J.-J., Huang, J., Ye, J.-Y., Zhang, X.-C., Tu, H.-Y., Han-Zhang, H., and Wu, Y.-L. (2017b). Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR T790M and In Trans C797S Responds to Combination Therapy of First- and Third-Generation EGFR TKIs and Shifts Allelic Configuration at Resistance. *JTO* 12, 1723–1727.

- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16, 1909–1920.
- Wei, Y., Jiang, B., Liu, S., Zhang, Z., Fang, W., Yang, Y., Li, X., Zhao, J., and Zhao, H. (2021). Afatinib as a Potential Therapeutic Option for Patients With NSCLC With EGFR G724S. *JTO Clin Res Rep* 2, 100193.
- Weiner, D.B., Nordberg, J., Robinson, R., Nowell, P.C., Gazdar, A., Greene, M.I., Williams, W.V., Cohen, J.A., and Kern, J.A. (1990). Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res.* 50, 421–425.
- Weinstein, I.B. (2002). Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer. *Science* 297, 63–64.
- Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res.* 68, 3077–3080.
- Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C.J., and Marais, R. (2004). V599EB-RAF is an Oncogene in Melanocytes. *Cancer Res* 64, 2338–2342.
- Wendel, H.-G., Silva, R.L.A., Malina, A., Mills, J.R., Zhu, H., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., Teruya-Feldstein, J., Pelletier, J., et al. (2007). Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* 21, 3232–3237.
- Weng, C.-H., Chen, L.-Y., Lin, Y.-C., Shih, J.-Y., Lin, Y.-C., Tseng, R.-Y., Chiu, A.-C., Yeh, Y.-H., Liu, C., Lin, Y.-T., et al. (2019). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene* 38, 455–468.
- Wheeler, D.L., Dunn, E.F., and Harari, P.M. (2010). Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 493–507.
- Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., et al. (2004). BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Res* 64, 7099–7109.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Allison, K.H., Harvey, B.E., Mangu, P.B., Bartlett, J.M.S., Bilous, M., Ellis, I.O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., et al. (2018). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *JCO* 36, 2105–2122.
- Wu, P., Nielsen, T.E., and Clausen, M.H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 36, 422–439.
- Wu, Y.-L., Cheng, Y., Zhou, X., Lee, K.H., Nakagawa, K., Niho, S., Tsuji, F., Linke, R., Rosell, R., Corral, J., et al. (2017). Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18, 1454–1466.



- Wu, Y.-L., Tsuboi, M., He, J., John, T., Grohe, C., Majem, M., Goldman, J.W., Laktionov, K., Kim, S.-W., Kato, T., et al. (2020). Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer *NEJM* 383, 1711–1723.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.W., Hynes, M., Goddard, A., et al. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90–92.
- Xie, Z., Gu, Y., Xie, X., Lin, X., Ouyang, M., Qin, Y., Zhang, J., Lizaso, A., Chen, S., and Zhou, C. (2021). Lung Adenocarcinoma Harboring Concomitant EGFR Mutations and BRAF V600E Responds to a Combination of Osimertinib and Vemurafenib to Overcome Osimertinib Resistance. *Clin Lung Cancer* 22, e390–e394.
- Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M.S., Büchler, M., Kunz, J., Beger, H.G., and Korc, M. (1993). Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum. Pathol.* 24, 1127–1134.
- Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Go, Z., Iyer, R., Kolis, S., Zhao, S., Lee, R., Grippo, J.F., et al. (2010). RG7204 (PLX4032), a Selective BRAFV600E Inhibitor, Displays Potent Antitumor Activity in Preclinical Melanoma Models. *Cancer Res* 70, 5518–5527.
- Yang, J.C.-H., Hirsh, V., Schuler, M., Yamamoto, N., O’Byrne, K.J., Mok, T.S.K., Zazulina, V., Shahidi, M., Lungershausen, J., Massey, D., et al. (2013). Symptom control and quality of life in LUX-Lung 3: a phase III study of afatinib or cisplatin/pemetrexed in patients with advanced lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *JCO* 31, 3342–3350.
- Yang, J.C.-H., Ahn, M.-J., Kim, D.-W., Ramalingam, S.S., Sequist, L.V., Su, W.-C., Kim, S.-W., Kim, J.-H., Planchard, D., Felip, E., et al. (2017). Osimertinib in Pretreated T790M-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: AURA Study Phase II Extension Component. *JCO* 35, 1288–1296.
- Yang, J.C.-H., Camidge, D.R., Yang, C.-T., Zhou, J., Guo, R., Chiu, C.-H., Chang, G.-C., Shiah, H.-S., Chen, Y., Wang, C.-C., et al. (2020). Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics of Almonertinib (HS-10296) in Pretreated Patients With EGFR-Mutated Advanced NSCLC: A Multicenter, Open-label, Phase 1 Trial. *JTO* 15, 1907–1918.
- Yang, J.C.-H., Reckamp, K.L., Kim, Y.-C., Novello, S., Smit, E.F., Lee, J.-S., Su, W.-C., Akerley, W.L., Blakely, C.M., Groen, H.J.M., et al. (2021). Efficacy and Safety of Rociletinib Versus Chemotherapy in Patients With EGFR-Mutated NSCLC: The Results of TIGER-3, a Phase 3 Randomized Study. *JTO Clin Res Rep.* 2, 100114.
- Yang, Z., Yang, N., Ou, Q., Xiang, Y., Jiang, T., Wu, X., Bao, H., Tong, X., Wang, X., Shao, Y.W., et al. (2018). Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 24, 3097–3107.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127–137.

- Yasuda, H., Kobayashi, S., and Costa, D.B. (2012). EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* 13, e23-31.
- Yochum, Z.A., Cades, J., Wang, H., Chatterjee, S., Simons, B.W., O'Brien, J.P., Khetarpal, S.K., Lemtiri-Chlieh, G., Myers, K.V., Huang, E.H.-B., et al. (2019). Targeting the EMT transcription factor TWIST1 overcomes resistance to EGFR inhibitors in EGFR- mutant non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 38, 656–670.
- Yoshizawa, A., Sumiyoshi, S., Sonobe, M., Kobayashi, M., Uehara, T., Fujimoto, M., Tsuruyama, T., Date, H., and Haga, H. (2014). HER2 status in lung adenocarcinoma: A comparison of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization (FISH), dual-ISH, and gene mutations. *Lung Cancer* 85, 373–378.
- Younes, A., Bartlett, N.L., Leonard, J.P., Kennedy, D.A., Lynch, C.M., Sievers, E.L., and Forero-Torres, A. (2010). Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *NEJM* 363, 1812–1821.
- Yu, H.A., and Pao, W. (2013). Targeted therapies: Afatinib--new therapy option for EGFR-mutant lung cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10, 551–552.
- Yun, C.-H., Boggon, T.J., Li, Y., Woo, M.S., Greulich, H., Meyerson, M., and Eck, M.J. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* 11, 217–227.
- Yun, C.-H., Mengwasser, K.E., Toms, A.V., Woo, M.S., Greulich, H., Wong, K.-K., Meyerson, M., and Eck, M.J. (2008). The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2070–2075.
- Zeng, L., Yang, N., and Zhang, Y. (2018). GOPC-ROS1 Rearrangement as an Acquired Resistance Mechanism to Osimertinib and Responding to Crizotinib Combined Treatments in Lung Adenocarcinoma. *JTO* 13, e114–e116.
- Zhan, Y., Guo, J., Yang, W., Goncalves, C., Rzymiski, T., Dreas, A., Żyłkiewicz, E., Mikulski, M., Brzózka, K., Golas, A., et al. (2017). MNK1/2 inhibition limits oncogenicity and metastasis of KIT-mutant melanoma. *J Clin Invest* 127, 4179–4192.
- Zhang, C., and Bollag, G. (2010). Scaffold-based design of kinase inhibitors for cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* 20, 79–86.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18.
- Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 9, 28–39.
- Zhang, Q., Zhang, X.-C., Yang, J.-J., Yang, Z.-F., Bai, Y., Su, J., Wang, Z., Zhang, Z., Shao, Y., Zhou, Q., et al. (2018). EGFR L792H and G796R: Two Novel Mutations Mediating Resistance to the Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib. *JTO* 13, 1415–1421.

- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., and Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125, 1137–1149.
- Zhao, S., Li, X., Zhao, C., Jiang, T., Jia, Y., Shi, J., He, Y., Li, J., Zhou, F., Gao, G., et al. (2019). Loss of T790M mutation is associated with early progression to osimertinib in Chinese patients with advanced NSCLC who are harboring EGFR T790M. *Lung Cancer* 128, 33–39.
- Zhou, W., and Christiani, D.C. (2011). East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer* 30, 287–292.
- Zhou, C., Wu, Y.-L., Chen, G., Feng, J., Liu, X.-Q., Wang, C., Zhang, S., Wang, J., Zhou, S., Ren, S., et al. (2011). Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 12, 735–742.
- Zhou, Q., Xu, C.-R., Cheng, Y., Liu, Y.-P., Chen, G.-Y., Cui, J.-W., Yang, N., Song, Y., Li, X.-L., Lu, S., et al. (2021). Bevacizumab plus erlotinib in Chinese patients with untreated, EGFR-mutated, advanced NSCLC (ARTEMIS-CTONG1509): A multicenter phase 3 study. *Cancer Cell* 39, 1279-1291.
- Zhu, V.W., Upadhyay, D., Schrock, A.B., Gowen, K., Ali, S.M., and Ou, S.-H.I. (2016). TPD52L1-ROS1, a new ROS1 fusion variant in lung adenosquamous cell carcinoma identified by comprehensive genomic profiling. *Lung Cancer* 97, 48–50.
- Zukin, M., Barrios, C.H., Rodrigues Pereira, J., De Albuquerque Ribeiro, R., de Mendonça Beato, C.A., do Nascimento, Y.N., Murad, A., Franke, F.A., Precivale, M., de Lima Araujo, L.H., et al. (2013). Randomized Phase III Trial of Single-Agent Pemetrexed Versus Carboplatin and Pemetrexed in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer and Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status of 2. *JCO* 31, 2849–2853.





# Résumé

Les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) avec mutations activatrices de l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) sont traités en première ligne avec des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKIs) de ce récepteur, tels que l'osimertinib. Malheureusement, après une phase initiale de réponse, presque invariablement les patients rechutent, suite à l'émergence de sous-populations de clones résistants, souvent déjà présents avant le début du traitement. Notre équipe a récemment mis au point une nouvelle stratégie basée sur CRISPR/Cas9 pour récapituler et étudier l'hétérogénéité intratumorale, que nous avons appelée CRISPR-barcoding. En utilisant des modèles cellulaires générés par cette approche, nous avons réalisé un criblage de petites molécules, qui nous a permis d'identifier l'inhibiteur multikinase sorafenib pour sa capacité à prévenir l'amplification des cellules de CBNPC insensibles aux EGFR-TKIs.

Dans mes travaux de thèse, nous avons montré que, en combinaison avec l'osimertinib, le sorafenib réduit l'avantage sélectif des cellules résistantes à l'inhibition d'EGFR, tout en préservant la réponse des cellules sensibles. Le sorafenib agit par un mécanisme complexe et indépendant des MAPKs, qui implique l'inhibition précoce de l'activité catalytique des *MAPK interacting kinases 1/2* et de la phosphorylation du facteur de transcription STAT3. A des stades plus tardifs, ce composé provoque une réduction de l'expression du facteur anti-apoptotique MCL-1 et promeut la dégradation de l'EGFR par les lysosomes. En utilisant des lignées cellulaires et des *patient-derived cells* de CBNPC, nous avons montré que le sorafenib empêche l'émergence de sous-populations contenant différentes mutations identifiées chez les patients, telles que EGFR-C797S, KRAS-G12D, BRAF-V600E, PIK3CA-E545K, ou l'amplification d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, comme MET et HER2. Nous avons pu confirmer ces résultats *in vivo* dans des modèles CRISPR-barcoding de CBNPC, qui ont révélé que la combinaison osimertinib-sorafenib retarde fortement la progression tumorale.

En conclusion, mes travaux de thèse proposent une nouvelle approche thérapeutique, qui vise à prolonger la réponse du CBNPC aux EGFR-TKIs en prévenant l'évolution clonale induite par le traitement *via* l'abolition de l'avantage sélectif des cellules résistantes.

Mots clés : Cancer bronchique non à petites cellules – Résistance à la thérapie – Inhibiteurs de tyrosine kinases - EGFR – Sorafenib – Osimertinib – Evolution clonale – CRISPR-barcoding